



2013

Efeitos do exercício físico na toxicidade mitocondrial hepática induzida por Diclofenac

Estela Alves



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeitos do exercício físico na toxicidade  
mitocondrial hepática induzida por Diclofenac

---

Estela Alves

2013



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

### Efeito do exercício físico na toxicidade mitocondrial hepática induzida por Diclofenac

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Moreno (Universidade de Coimbra), do Professor Doutor António Ascensão e Professor Doutor José Magalhães (Universidade do Porto)

Estela Alves

2013

## **FINANCIAMENTO:**

O presente trabalho teve o apoio do projeto PTDC/DES/113580/2009-FCOMP-01-0124-FEDER-014705 financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (António Ascensão) e do Centro de Investigação em Atividade Física, Saúde e Lazer (PEst-OE/SAU/UI0617/2011).





## Índice de Conteúdos

1. Introdução .....	1
2. Revisão de Literatura.....	5
2.1 Sociedade e uso de fármacos .....	7
2.2 Hepatotoxicidade induzida por drogas .....	7
2.3 A Mitocôndria .....	8
2.3.1 Ultra-estrutura e composição.....	8
2.3.2 Mitocôndria como modelo energético.....	10
2.3.3 Mitocôndria como regulador da homeostase de cálcio .....	12
2.3.4 A mitocôndria e a produção de espécies reativas de oxigénio .....	13
2.3.5 Indução do poro de permeabilidade transitória mitocondrial.....	18
2.3.6 O papel da mitocôndria nos processos de morte celular .....	21
2.4 Toxicidade induzida pelo diclofenac. Papel da mitocôndria.....	24
2.4.1 Toxicidade mediada pela formação de metabolitos reativos.....	26
2.4.2 Toxicidade associada à disfunção mitocondrial.....	28
2.5 Terapias contra hepatotoxicidade .....	33
2.5.1 O papel do exercício físico .....	33
2.5.2 Alterações promovidas pelo exercício no estado redox do fígado .....	36
2.5.3 Efeito do exercício nas mitocôndrias de fígado.....	39
3. Objetivos.....	45
3.1 Objetivo geral: .....	47
3.2 Objetivos específicos:.....	47
4. Material e métodos .....	49
4.1 Reagentes.....	51
4.2 Caracterização da Amostra.....	51
4.3 Protocolo Experimental .....	52
4.3.1 Treino de Endurance.....	52
4.3.2 Roda Livre .....	53
4.4 Isolamento Mitocondrial.....	53
4.5 Avaliação da Atividade Respiratória Mitocondrial .....	54
4.6 Avaliação do Potencial Elétrico Transmembranar Mitocondrial .....	55
4.7 Indução do poro de permeabilidade transitória mitocondrial .....	56
4.8 Parâmetros de dano oxidativo mitocondrial e antioxidantes .....	56

4.8.1 Peroxidação lipídica .....	57
4.8.2 Grupos Sulfidril .....	57
4.8.3 Atividade de Aconitase.....	58
4.8.4 Atividade de Superóxido Dismutase .....	58
4.8.5 Atividade da Citrato Sintetase no Músculo Soleus .....	58
4.9 Atividade de caspases.....	59
4.10 Semi-quantificação da expressão proteica por <i>Western Blotting</i> .....	59
4.11 Tratamento Estatístico .....	60
5. Desenho Experimental.....	63
6. Resultados.....	67
6.1 Caracterização dos animais .....	69
6.2 Consumo de oxigénio mitocondrial.....	70
6.3 Potencial Transmembranar Mitocondrial .....	72
6.4 Efeito do exercício físico na queda do $\Delta\psi$ e nas variações do consumo de O <sub>2</sub> de mitocôndrias hepáticas incubadas com diclofenac (15 e 25 $\mu$ M) e veículo ao longo do tempo (15min). .....	74
6.5 Suscetibilidade à abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial induzida por Ca <sup>2+</sup> .....	76
6.6 Efeito do exercício físico na atividade da citrato sintetase no músculo <i>soleus</i> ....	78
6.7 Efeito do exercício físico nos indicadores de stress e lesão oxidativa .....	78
6.8 Efeito do exercício físico na atividade das caspases. ....	79
6.9 Efeito do exercício físico na expressão de ANT, CycD, Bcl-2 e Bax.....	80
7. Discussão dos Resultados.....	83
7.1 Síntese dos principais achados .....	85
7.2 Discussão da metodologia .....	86
7.2 Efeito do diclofenac nas mitocôndrias hepáticas.....	88
7.3 Efeito isolado do treino de <i>endurance</i> em tapete rolante e da atividade física voluntária em roda livre nas mitocôndrias hepáticas.....	91
7.4. Efeito do exercício físico contra a toxicidade <i>in vitro</i> induzida pelo diclofenac	96
8. Conclusões.....	99
9. Bibliografia.....	101

## Índice de Ilustrações

<b>Ilustração 1.</b> Mitocôndrias obtidas através de microscopia eletrônica de uma secção de células HeLa (Benard and Rossignol 2008) .....	10
<b>Ilustração 2.</b> Esquema representativo da cadeia transportadora de electrões .....	11
<b>Ilustração 3.</b> Vias metabólicas e principais metabolitos do diclofenac em fígado humano (Daly, Aithal et al. 2007). .....	28

## Índice de Equações

<b>Equação 1.</b> $\Delta p = (\Delta\mu_{H^+})/F = \Delta\Psi - [2.3 RT/F] \Delta pH,$ .....	11
<b>Equação 2.</b> $\Delta\tilde{\mu}_{Ca} = zF\Delta\Psi + RT \ln [Ca^{2+}]_i / [Ca^{2+}]_o.$ .....	12
<b>Equação 3.</b> $\Delta\psi = 59 \times \log (v/V) - 59 \times \log (10 \Delta E / 59 - 1)$ .....	55

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Alguns resultados e modelos utilizados no estudo da toxicidade induzida pelo diclofenac em mitocôndrias hepáticas .....	32
<b>Tabela 2.</b> Efeitos do treino <i>endurance</i> e aptidão aeróbica no stress oxidativo, marcadores antioxidantes e dano hepático. ....	38
<b>Tabela 3.</b> Efeitos do treino <i>endurance</i> , cessação da atividade física e capacidade aeróbica nos marcadores de integridade e função hepática. ....	42
<b>Tabela 4.</b> Protocolo de treino de <i>endurance</i> .....	53
<b>Tabela 5.</b> Efeitos do treino <i>endurance</i> em tapete rolante.(TR) e da atividade física voluntária em roda livre (RL) nos pesos corporais, coração e fígado dos ratos.....	70
<b>Tabela 6.</b> Efeito do treino em tapete rolante e da atividade física em roda livre nas flutuações do $\Delta\psi$ em mitocôndrias de fígado. ....	73

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Distância percorrida pelos animais ao longo de doze semanas nos protocolos de TR e RL .....	69
<b>Figura 2.</b> Efeito de dois tipos de exercício físico nos parâmetros associados ao consumo de O <sub>2</sub> avaliados em mitocôndrias de fígado isoladas incubadas com duas concentrações de diclofenac (15µM e 25µM).....	72
<b>Figura 3.</b> O efeito dos dois tipos de exercício físico na queda do potencial elétrico transmembranar (A-C) e no consumo de oxigénio mitocondrial (D-E) ao longo do tempo em mitocôndrias hepáticas na presença de duas concentrações (15 e 25µM) de diclofenac ou de veículo .....	75
<b>Figura 4.</b> O efeito dos dois tipos de exercício físico crónico na indução do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM): <b>A e D</b> ) traçado representativo dos ensaios de <i>swelling</i> 540 nm presença de veículo e de diclofenac, respetivamente; <b>B e C</b> ) veículo e cálcio 80 nmol/mg e <b>E e F</b> ) diclofenac (15 e 25 µM) e cálcio 20 nmol/mg...	77
<b>Figura 5.</b> Efeitos de 2 tipos de exercício crónico na atividade mitocondrial da citrato sintetase no musculo solear (A).....	78
<b>Figura 6.</b> Efeitos de 2 tipos de exercício crónico na atividade mitocondrial da aconitase (A), conteúdo de grupos sulfidrilo (B), atividade da superoxido dismutase dependente do manganês (Mn-SOD, C), e conteúdo de malondialdeído (MDA, D).....	79
<b>Figura 7.</b> Efeito de 2 tipos de exercício crónico na atividade das caspases 3 (A), 8 (B) e 9 (C).....	80
<b>Figura 8.</b> Efeito de 2 tipos de exercício crónico na semi-quantificação de proteínas associadas ao PPTM (A, B) e resposta apoptótica (C, D).....	82

## Resumo

O diclofenac é um anti-inflamatório não esteroide amplamente utilizado. Contudo, um dos efeitos secundários associados ao seu consumo é a toxicidade hepática, na qual a disfunção mitocondrial parece ter um papel relevante. O exercício físico tem sido considerado uma estratégia preventiva e terapêutica para contrariar a disfunção mitocondrial provocada por uma variedade de estímulos deletérios, incluindo os relacionados com doenças metabólicas, cardiovasculares e, ultimamente, os efeitos de fármacos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito do treino de endurance realizado em tapete rolante (TR) e da atividade física diária em roda livre (RL) na bioenergética das mitocôndrias do fígado, incubadas com Diclofenac ou solução salina, com particular destaque na suscetibilidade para a abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM) e sinalização apoptótica.

Dezoito ratos Sprague-Dawley (3 semanas) foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (n=6): sedentários, TR (12 semanas, 60 min/dia) e RL (12 semanas com acesso 24h/dia). Foram avaliadas, *in vitro*, a taxa de consumo de oxigénio mitocondrial, as flutuações de potencial elétrico transmembranar e a indução do PPTM através da amplitude e taxa de *swelling* após a adição de cálcio, na presença e ausência de diclofenac. Paralelamente, foram também avaliadas a sinalização apoptótica, através da atividade das caspases 3, 8 e 9 e da semi-quantificação da Bax, Bcl-2, e a expressão de ANT e CycD. A atividade mitocondrial da aconitase, superóxido dismutase (Mn-SOD) e o conteúdo de grupos sulfidrilo (-SH) e malondialdeído (MDA) foram também avaliados.

Só por si, o treino de endurance em TR como a atividade física voluntária em RL não promoveram alterações significativas nos parâmetros respiratórios avaliados. Porém, quando as mitocôndrias foram incubadas com Diclofenac, verificou-se uma

atenuação significativa do aumento do estado 2 e 4 em ambos os grupos exercitados. Verificou-se, ainda, uma atenuação na diminuição do RCR no grupo RL para a concentração de 15 $\mu$ M de Diclofenac. Não se observaram diferenças entre grupos no estado 3 e no rácio ADP/O. Não se observaram diferenças no potencial máximo, nem na *lag phase* associada à fosforilação do ADP nos grupos estudados. Os grupos exercitados mostraram uma menor amplitude e taxa de *swelling* após a adição de cálcio na ausência e presença de diclofenac, o que sugere uma menor suscetibilidade à abertura do PPTM. Verificou-se um aumento da atividade de aconitase no grupo RL, mas não no grupo TR. Contrariamente, verificou-se uma diminuição do conteúdo de malondialdeído no grupo TR, sendo que o mesmo não se observou no grupo RL. O conteúdo de grupos sulfidrilo, assim como a atividade da Mn-SOD não sofreram alterações com o exercício físico. Foi observado um aumento da expressão de Bcl-2 nos grupos com TR e RL e uma diminuição da atividade da caspase-9 no grupo RL. No entanto, não foram encontradas diferenças entre grupos relativamente à expressão de Bax, CycD e no rácio Bax/Bcl-2. Os grupos TR e RL registaram uma diminuição da expressão de ANT.

Os resultados obtidos parecem sugerir que quer o treino em TR quer a atividade física em RL promovem adaptações conducentes a uma maior resistência ao dano mitocondrial associado ao diclofenac. Esta resistência acrescida parece estar relacionada com uma menor suscetibilidade à indução do PPTM e a menores níveis de sinalização apoptótica.

**Palavras chave:** Exercício, NSAID, bioenergética, fígado, toxicidade, morte celular

## Abstract

Diclofenac is a worldwide-prescribed non-steroidal anti-inflammatory drug that causes severe liver toxicity by mitochondrial-mediated mechanisms. Here we tested the hypothesis that physical exercise, a known therapeutic and/or preventive strategy against several metabolic diseases, affords protection against *in vitro* liver mitochondrial harmful effects caused by diclofenac.

Male Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups (n=6, 15-wks old): Sedentary (SED), 12-wks of endurance training (TR) and voluntary free wheel activity (RL). *In vitro* liver mitochondrial function [oxygen consumption, membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) and susceptibility to mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening] was evaluated in the absence and in the presence of diclofenac (15, 25  $\mu$ M). Mitochondrial oxidative stress (Mn-SOD and aconitase activities, -SH and MDA contents), apoptotic signaling (caspase-3, 8 and 9-like activities, Bax, Bcl-2 and CypD expression) and ANT expression were assessed.

Diclofenac-induced increased state 2 and 4 respiration, decreased respiratory control ratio (RCR) and maximal and repolarization  $\Delta\Psi$ , and increased the susceptibility to MPTP opening. Despite no effects of TR and RL in liver mitochondrial oxygen consumption and  $\Delta\Psi$  endpoints in the absence of diclofenac, exercised animals showed lower susceptibility to MPTP than SED group. With the exception of RCR and maximal  $\Delta\Psi$ , RL and TR reverted all the other above-mentioned effects of diclofenac.

RL group showed higher aconitase activity and TR decreased MDA content. Both RL and TR induced increased Bcl-2 content and decreased caspase-9. Unexpectedly, RL and TR decreased ANT expression. No alterations in caspases-3, 8 and Mn-SOD activities, Bax, CypD and -SH contents were noted.

The results seem to suggest that TR and RL increased resistance against diclofenac-induced mitochondrial dysfunction. This increased resistance appears to be related to an decreased susceptibility to MPTP and lower levels of oxidative stress and apoptotic signaling.

**Keywords:** Exercise, NSAID, bioenergetics, liver, toxicity,

## Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos

ACC	Acetil-CoA carboxilase
$[Ca^{2+}]_c$	Concentração de cálcio citosólico
4-HNE	Dutos de proteína 4-hidroxinonenal
ADP	Adenosina difosfato
ADP/O	Rácio entre o ADP fosforilado e o oxigénio consumido
AIF	Fator indutor de apoptose
ALT	Alanina aminotransferase
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
Asp34	Aspartato 34
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	ATP sintetase
BAPTA	<i>1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
BSA	Albumina de soro de boi
Ca	Capacidade antioxidante
$Ca^{2+}$	Ião cálcio
CAT	Catalase
cm	Centímetro
CoQ	Coenzima Q
COX	Citocromo <i>c</i> oxidase
CPT	Carnitina palmitoil transferase
CS	Citrato sintetase
CTE	Cadeia transportadora de eletrões
CuZnSOD	Isoforma citosólica da superóxido dismutase contendo cobre e zinco
Cyc D	Cliclofilina D
CycA	Ciclosporina A
Diclof	Diclofenac
DISC	<i>Death inducing signaling</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Exercício
EndoG	Endonuclease G
ERON	Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio
F	Constante de <i>Farady</i>
Fas	<i>Adaptor Death Domain</i>
$Fe^{2+}$	Ião ferro
g	Gramma
G/M	Glutamato/malato
G6PDH	Glucose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GRP	Glutationa reguladora de glucose

GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
h	Hora
H <sup>+</sup>	Ião de hidrogénio
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HO <sup>-</sup>	Oxido de hidrogénio
HO•	Radical hidroxilo
HSPs	Proteínas de choque térmico
KDa	Quilo Dalton
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litro
ln	Logaritmo natural de base e
log	Logaritmo natural de base 10
M	Molar
m	Metros
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	Morte celular programada
MDA	Malondialdeído
mDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimole
Mn-SOD	Isoforma mitocondrial da superóxido dismutase
mRNA	Ácido ribonucleico mitocondrial
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
mV	Milivoltes
Na <sup>+</sup>	Ião sódio
NADH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido
NAIDS	Fármaco anti-inflamatório não-esteroide
natmO	Nanoátomos de oxigénio
NF-kB	<i>Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
nm	Nanometros
nmol	Nanomoles
NO	Óxido nítrico
NQO	NADPH-quinona-oxireductase
NS	Não significativos
O <sub>2</sub>	Oxigénio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Oxido de oxigénio
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Anião superóxido
°C	Graus <i>Celcius</i>
OGG1	8-Oxoguanina glicosilase

OLETF	<i>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty</i>
oxo8dG	8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina
pACC	Acetil-coenzima A carboxilase fosforilada
PGC-1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
pH	Potencial de hidrogénio
Pi	Fosfato
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPTM	Poros de permeabilidade transitória mitocondrial
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
R	Constante dos gases ideais
RCR	Rácio de controlo respiratório
RL	Atividade física voluntária em roda livre
ROS	Espécies reativas de oxigénio
s	Segundo
S	Ião sulfato
SDC	Esteróide-CoA desaturase
SED	Sedentários
SEM	Erro padrão
-SH	Grupos Sulfidrilo
SIRT3	Sirtuina 3
SO	Oxido de sulfato
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1c	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1</i>
S-S	Pontes dissulfito
STZ	<i>Streptozotocin</i>
T	Tratamento
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
Tfam	Fator de transcrição mitocondrial A
TGSH	Glutationa Total
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TPP+	Tetrafenilfosfónio
TR	Treino de <i>endurance</i> em tapete rolante
U	Unidades universais
UCM	Uniporte mitocondrial de cálcio
v	Volume
VDAC	Canal iónico dependente de voltagem
Veíc	Veículo
V <sub>máx</sub>	Volume máximo
VO <sub>2 máx</sub>	Consumo máximo de oxigénio
w	Peso
$\beta$ -HAD	Beta hidroxilacil-CoA desidrogenase
$\Delta E$	Deflexão do potencial do eléctrodo a partir do estado basal
$\Delta p$	Força protomotriz
$\Delta pH$	Gradiente químico de hidrogénio
$\Delta \ddot{u}Ca$	Gradiente eletroquímico de cálcio

$\Delta\mu\text{H}^+$

Gradiente eletroquímico de prótons

$\Delta\psi$

Diferença de potencial elétrico transmembranar

$\mu\text{L}$

Microlitro

$\mu\text{M}$

Micromolar



# **1. Introdução**



Diversas intervenções não farmacológicas, entre as quais o exercício físico e a dieta têm sido recomendadas como forma de antagonizar os efeitos adversos associados a uma variedade de patologias, incluindo doenças cardiovasculares e metabólicas (Gauthier, Couturier et al. 2004, Johnson and George 2010), bem como à disfunção hepática induzida por drogas (Begrache, Igoudjil et al. 2006). Especificamente, tem sido demonstrado que o exercício físico crônico induz alterações favoráveis no fenótipo hepático, tornando este tecido mais resistente à agressão (Rector and Thyfault 2011). Neste sentido, Thyfault, Rector et al. (2009) observaram que ratos geneticamente modificados para apresentarem uma reduzida capacidade aeróbia, revelaram uma capacidade oxidativa mitocondrial hepática diminuída e demonstram ser mais suscetíveis a desenvolver esteatose hepática. Recentemente, o nosso grupo reportou que 5 semanas de treino de *endurance* em tapete rolante (TR), parece atenuar, em mitocôndrias de fígado, alguns dos efeitos negativos do salicilato, uma droga anti-inflamatória não-esteróide (NSAID) utilizada à escala mundial (Ascensao, Goncalves et al. 2012).

Apesar de contraditórios, dados na literatura sugerem que, na generalidade, o exercício físico tem um efeito modular no estado redox do fígado e no metabolismo mitocondrial, promovendo um fenótipo mais resistente contra a lesão hepática induzida por inúmeros estímulos hepatotóxicos (Radak, Chung et al. 2004, Nakamoto, Kaneko et al. 2007, Radak, Chung et al. 2008).

Atualmente, o consumo de agentes farmacológicos, incluindo as NSAID, tem aumentado mundialmente. Um dos fármacos mais consumidos desta classe é o diclofenac, o qual é usado como um anti-inflamatório e analgésico contra diversas situações indutoras de dor. O dano mitocondrial, o stress oxidativo e a diminuição dos níveis de glutathione intracelular, são alterações importantes associadas à hepatotoxicidade

provocada por lesões no fígado decorrentes do consumo de drogas, incluindo o diclofenac (Xu, Henstock et al. 2008). De facto, tem vindo a ser relatado em diversos estudos *in vitro*, que o diclofenac tem um efeito adverso na função mitocondrial do fígado, induzindo alterações no sistema fosforilativo comprometendo a formação de ATP, diminuindo a resistência ao poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM) e aumentando a sinalização apoptótica (Petrescu and Tarba 1997, Masubuchi, Yamada et al. 1999, Masubuchi, Nakayama et al. 2002, Gómez-Lechón, Ponsoda et al. 2003, Siu, Pun et al. 2008, Lal, Kumar et al. 2009). Considerando a mitocôndria isolada como um modelo fiável em estudos de toxicidade mediada por drogas (Oliveira 2011) e os resultados benéficos induzidos pelo exercício crónico no fenótipo mitocondrial do fígado (Rector and Thyfault 2011), o presente trabalho tem como objetivo analisar se as alterações bioenergéticas mitocondriais no fígado induzidas pelo TR e pela atividade física voluntária em roda livre (RL) diminuem ou atenuam os efeitos nefastos do diclofenac no tecido hepático. Atualmente, o conhecimento de alguns dos mecanismos pelos quais o exercício crónico modela a bioenergética mitocondrial no fígado pode facilitar o entendimento do impacto destas intervenções sobre os efeitos induzidos por drogas neste órgão. Como os potenciais consumidores de NSAID poderão ter capacidades diferentes de praticar exercício físico, dois modelos de exercício crónico distintos em relação à duração e à intensidade (TR e RL) serão utilizados no presente estudo.

## **2. Revisão de Literatura**



## **2.1 Sociedade e uso de fármacos**

É já longínquo o interesse que a sociedade, mostra relativamente à toma de medicamentos. De facto, de forma muitas vezes inadvertida, a população utiliza recorrentemente fármacos anteriormente receitados ou até a substâncias ervanárias pela noção errada de que são um medicamento natural e, dessa forma, não tão prejudiciais como o químico sintético. Contudo, antes de ser comercializado, um fármaco é previamente sujeito a estudos de toxicidade e normalmente farmacocinética, enquanto que com os produtos naturais, o controlo não é tão apertado e rigoroso pelo que se tende habitualmente a “abusar” da toma, sendo que para muitas destas substâncias, a toxicidade é dependente da dose. Este fator, associado a comportamentos de risco como o consumo de álcool, a obesidade e uma vida sedentária, bem como fatores epigenéticos, pode conduzir à bioacumulação de toxinas bem como à formação de metabolitos tóxicos para o organismo.

## **2.2 Hepatotoxicidade induzida por drogas**

O fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo e eliminação de substâncias e a probabilidade de surgirem lesões hepáticas associadas ao consumo de drogas é elevada podendo surgir de forma direta e idiossincrática (Grattagliano, Bonfrate et al. 2009). A incidência da toxicidade hepática induzida por drogas varia entre 1 em 1.000 e 1 em 100.000 indivíduos para toma/consumo de doses terapêuticas de medicamentos. Entre 1975 e 1999, das 548 novas substâncias aprovadas para comercialização, 10 receberam alertas para potencial toxicidade hepática e 4 foram retiradas do mercado. Crê-se que a toxicidade hepática induzida por drogas esteja subestimada na população geral, correspondendo a mais de 50% dos casos de falência hepática aguda nos Estados Unidos da América e a 10% dos transplantes hepáticos

realizados em alguns centros. O desenvolvimento de icterícia e a elevação de alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST respetivamente) em doentes com toxicidade hepática induzida por fármacos está associada a uma mortalidade estimada em 10% (Amin and Hamza 2005, Beger, Sun et al. 2010). De entre os principais modelos para o estudo da toxicidade orgânica de fármacos, em geral e da toxicidade hepática em particular, as alterações metabólicas, bioquímicas, funcionais e estruturais ao nível da mitocôndria têm ocupado um lugar de relevo. Efetivamente, um conjunto vasto de estudos têm demonstrado (i) que o modelo de análise das alterações morfológicas e funcionais mitocondriais é fiável e um contributo útil para a testagem da toxicidade de fármacos e (ii) perturbações funcionais hepáticas induzidas pela administração de fármacos correlacionam-se de forma elevada com a disfunção mitocondrial associada (Maddrey 2005, Arundel and Lewis 2007, Beger, Sun et al. 2010).

Desta forma, os subcapítulos que se seguem têm como objetivo descrever e analisar aspetos mais fundamentais da estrutura e função mitocondriais, bem como a interação com diferentes estímulos *in vitro* e *in vivo*, incluindo fármacos e exercício físico.

## **2.3 A Mitocôndria**

### *2.3.1 Ultra-estrutura e composição*

O termo mitocôndria foi introduzido por Brenda nos finais do século XIX. Contudo, só após uma década, devido ao desenvolvimento de metodologias de isolamento de mitocôndrias intactas de vários tecidos animais e vegetais, foram identificadas como locais de metabolismo energético. Hoje em dia, a mitocôndria é, por excelência, o alvo de estudo da bioenergética, debruçando-se esta área da bioquímica sobre metabolismo energético celular.

Os estudos de microscopia eletrônica permitiram definir a morfologia básica das mitocôndrias e embora haja alguma variabilidade, todas as mitocôndrias apresentam algumas propriedades fundamentais comuns. Independente do tecido, todas as mitocôndrias se individualizam do citoplasma através de um sistema duplo de membranas (membrana interna e a membrana externa), separadas pelo espaço intermembranar. A membrana externa, permeável à maior parte dos solutos e moléculas, apresenta um elevado conteúdo em colesterol e contém proteínas embebidas ou associadas que promovem a comunicação entre as mitocôndrias e o resto da rede metabólica celular. A membrana interna envolve um compartimento preenchido por um gel viscoso (a matriz), onde se encontram associadas várias enzimas (envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e  $\beta$ -oxidação) e ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mDNA). Esta membrana apresenta uma elevada impermeabilidade à maior parte dos solutos e iões, mas possui maquinaria de proteínas especiais que permitem o transporte de metabolitos e iões selecionados. Esta impermeabilidade é fundamental para a integridade morfológica e funcional das mitocôndrias. Em relação à composição lipídica, sabe-se que a membrana interna contém um elevado teor em cardiolipina (Paradies, Petrosillo et al. 2010) o que a torna num alvo para a toxicidade de alguns xenobióticos, visto que certas drogas apresentam elevada afinidade pela cardiolipina.

Nos últimos anos, a utilização de um conjunto de técnicas incluindo a tomografia de elétrons, bem como o desenvolvimento de culturas celulares, microscopia de fluorescência, juntamente com a utilização de sondas mitocondriais, permitiram refinar a definição estrutural da mitocôndria (Ilustração 1). Sabe-se que existem junções que separam as cristas da membrana interna e que, dependente do tecido, a estrutura das mitocôndrias pode variar consoante a sua necessidade energética o que permite alojar

um maior número de complexos proteicos envolvidos na produção de energia (Benard and Rossignol 2008).



**Ilustração 1.** Mitocôndrias obtidas através de microscopia eletrônica de uma secção de células HeLa (Benard and Rossignol 2008)

### 2.3.2 Mitocôndria como modelo energético

A mitocôndria é responsável pela produção de cerca de 95% de toda a adenosina trifosfato (ATP) utilizado pelas células eucarióticas. Esta produção ocorre devido à transferência energética entre moléculas, desencadeando na produção de energia num processo designado por fosforilação oxidativa. O modelo vulgarmente aceite para a síntese de ATP foi proposto por Peter Mitchell em 1966, sendo conhecido por *Teoria Quimiosmótica*. Segundo a mesma, a síntese de ATP está acoplada à energia disponível num gradiente eletroquímico ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ), gerado a partir da ejeção de prótons ( $\text{H}^+$ ) da matriz para o espaço intermembranar. Esta ejeção é efetuada por três grandes complexos proteicos localizados na membrana interna da mitocôndria (NADH:ubiquinona-oxidoreductase, Ubiquinol:citocromo c-oxidoreductase, Citocromo c-oxidoreductase) e está acoplada ao transporte de eletrões através dessas proteínas. O conjunto formado por estes complexos proteicos e outros elementos móveis ubiqüitários é denominada por cadeia transportadora de eletrões. A succinato:ubiquinona-

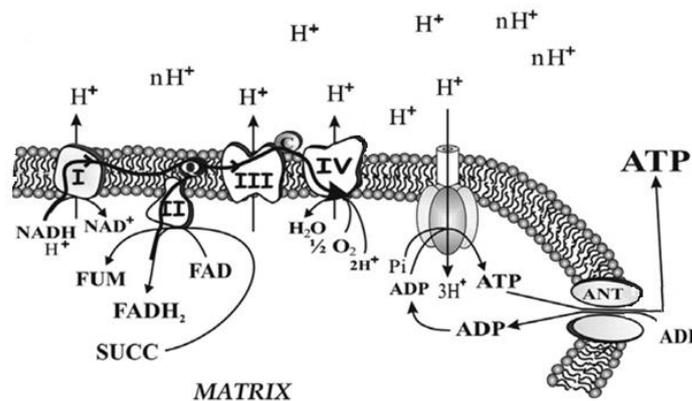
oxidoreductase faz também parte deste conjunto de proteínas; contudo este complexo mitocondrial não participa no bombeamento de prótons, funcionando essencialmente como auxiliar, cedendo elétrons provenientes do succinato à ubiquinona. O destino final destes elétrons é o oxigênio ligado ao grupo heme da citocromo *c*- oxidoreductase, que é reduzido a água (H<sub>2</sub>O) (Ilustração 2).

O gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) ou também designado por força protomotriz ( $\Delta p$ ), constitui a força motriz capaz de “puxar” os prótons para o interior da mitocôndria, é traduzida pela equação:

$$\text{Equação 1. } \Delta p = (\Delta\mu_{H^+})/F = \Delta\Psi - [2.3 RT/F] \Delta pH,$$

onde  $\Delta\Psi$  é o potencial elétrico transmembranar e o  $\Delta pH$  é o gradiente químico de H<sup>+</sup>. O potencial membranar ( $\Delta\Psi$ ) gerado no interior da mitocôndria é de cerca de -180 mV sendo o pH do meio interno cerca de 8.

Contudo devido à impermeabilidade da membrana interna a prótons, o fluxo de prótons do espaço intermembranar para a matriz ocorre principalmente através da subunidade F<sub>O</sub> da ATP sintase (ATPase), gerando a energia necessária para a produção de ATP através da fosforilação do ADP ao nível da subunidade F<sub>1</sub> da ATP sintase (Nicholls and Ferguson 2001).



**Ilustração 2.** Esquema representativo da cadeia transportadora de elétrons

### 2.3.3 Mitocôndria como regulador da homeostase de cálcio

A sinalização baseada nos fluxos de cálcio é um mecanismo universal através do qual mensageiros extracelulares modificam a atividade das células alvo. As células podem decodificar sinais de cálcio baseadas nas alterações da sua concentração intracelular (amplitude, duração, frequência e localização) e gerar resultados tão distintos como a proliferação ou a morte celular (Contreras, Drago et al. 2010). Sabe-se, há algumas décadas, que a mitocôndria desempenha um papel importante como regulador da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. De facto, tem vindo a ser descrito que ocorre uma cooperação deste organelo com o reticulo sarcoplasmático no controlo do  $\text{Ca}^{2+}$  celular e na regulação de várias e importantes vias de sinalização (Gunter, Yule et al. 2004, Saris and Carafoli 2005, Csordas, Varnai et al. 2010, Raturi and Simmen 2012). Este papel é demonstrado por diversos estudos que indicam que a captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  em níveis fisiológicos moderados aumenta a taxa de produção de NADH pela piruvato e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, aumentando a síntese de ATP e a atividade do transportador de nucleótidos de adenina (ANT) (Gunter, Yule et al. 2004, Bazil and Dash 2011).

Durante a respiração celular, a mitocôndria acoplada apresenta um  $\Delta\psi$  negativo (matriz), essencial para a captação  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo que este processo eletroforético é conduzido por um gradiente eletroquímico de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\Delta\tilde{\mu}\text{Ca}$ ):

$$\text{Equação 2. } \Delta\tilde{\mu}\text{Ca} = zF\Delta\psi + RT \ln [\text{Ca}^{2+}]_i / [\text{Ca}^{2+}]_o.$$

O transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  é realizado através de um canal específico da membrana interna, o uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (UCM). O aumento de catiões é compensado pelo bombeamento de  $\text{H}^+$  pela cadeia respiratória, resultando num aumento de pH na matriz, prevenindo a recuperação do  $\Delta\psi$  e limitando, desta forma, a capacidade da mitocôndria para acumular mais  $\text{Ca}^{2+}$  (Bernardi and von Stockum 2012). Assim, uma captação

substancial de cálcio requer o tamponamento do pH da matriz (para que haja uma recuperação do potencial) e o tamponamento da matriz ao cálcio (para prevenir a formação de um gradiente de concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ ). O tamponamento do pH da matriz é conseguido através da entrada de prótons e aniões por difusão do ácido dissociado na membrana interna ou através de proteínas transportadoras como o simporte de  $\text{H}^+$ -fosfato (Pi). O tamponamento da matriz a  $\text{Ca}^{2+}$  depende em parte dos co-transportadores iónicos (antiporte  $3\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  e o  $3\text{H}^+-\text{Ca}^{2+}$ ) e dos constituintes da matriz (Duchen, Verkhratsky et al. 2008, Bazil and Dash 2011, Bernardi and von Stockum 2012). Apesar do equilíbrio cinético entre a concentração de cálcio intra/extramitocondrial ser mantido na maioria das situações, pela entrada/saída de cálcio dependentes de ATP e de ocorrer por mecanismos independentes, o facto do volume máximo ( $V_{\text{máx}}$ ) do UCM ser de aproximadamente 1400 nmol  $\text{Ca}^{2+}$  enquanto que o  $V_{\text{máx}}$  das vias de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ser de aproximadamente 20 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ , compromete este equilíbrio. Sendo o UCM sensível à concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial, quando ocorre um aumento excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, a taxa de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  vai-se sobrepor à taxa de efluxo, resultando numa dissipação de energia e do potencial transmembranar levando a abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM). Desta forma a indução do PPTM pode ser apresentado com uma estratégia para a dissipação rápida de grandes quantidades de cálcio (Palty, Silverman et al. 2010, Bernardi and von Stockum 2012). Este tópico será abordado em detalhe mais adiante nesta revisão.

#### *2.3.4 A mitocôndria e a produção de espécies reativas de oxigénio*

Cerca de 2% do oxigénio total consumido pelas mitocôndrias não é totalmente reduzido, o que resulta na formação do anião superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Embora o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  apresente uma reatividade química moderada, em solução aquosa este anião pode dar

origem a outras espécies reativas altamente oxidativas e citotóxicas. O  $O_2^{\bullet-}$  gerado pela mitocôndria é rapidamente dismutado em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) pela superóxido dismutase intramitocondrial (Mn-SOD) (Kowaltowski, Castilho et al. 2001). Na presença de  $Fe^{2+}$ , o  $H_2O_2$  é convertido em radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), via reação de *Fenton* ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^\bullet + HO^-$ ). Em condições normais, a maioria do  $Fe^{2+}$  encontra-se complexado com várias moléculas, mas na presença de  $Ca^{2+}$ , o  $Fe^{2+}$  pode ser libertado, aumentando assim a disponibilidade do ião livre. Deste modo, verifica-se que o  $Ca^{2+}$  apresenta um papel ativo na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). No entanto, para além de aumentar a concentração de  $Fe^{2+}$  livre, o  $Ca^{2+}$  também promove um aumento da formação de  $O_2^{\bullet-}$  a partir da cadeia transportadora de eletrões (Sutton and Winterbourn 1989, Sinha, Das et al. 2013).

A produção do anião  $O_2^{\bullet-}$  ocorre principalmente no complexo I (NADH desidrogenase), sobretudo nas reações catalisadas pela coenzima Q (CoQ). Embora a citocromo *c* oxidase (complexo IV) seja o local onde o oxigénio é reduzido maioritariamente, a formação de  $O_2^{\bullet-}$  a este nível é diminuta. Isto verifica-se porque este complexo enzimático liga fortemente os intermediários de oxigénio parcialmente reduzidos, impedindo a sua libertação, antes da redução completa. A formação de  $O_2^{\bullet-}$  nos centros de Fe-S do complexo I é aumentada por substratos como malato, glutamato e piruvato. Adicionalmente, a matriz mitocondrial possui formas únicas de óxido nítrico sintetase (Giulivi, Poderoso et al. 1998) o que assume um papel preponderante no metabolismo mitocondrial, uma vez que o óxido nítrico (NO) interage com diversos grupos de citocromos, particularmente com a citocromo *c* oxidase resultando na inibição da respiração mitocondrial através da formação de  $O_2^-$  (Poderoso, Carreras et al. 1996). O  $O_2^-$ , por sua vez, poderá reagir com NO formando peroxinitrito, um potente oxidante

capaz de inibir importantes enzimas e afetando a integridade e função mitocondrial (Brown and Borutaite 2002, Radi, Cassina et al. 2002).

Apesar dos processos de geração de ROS serem parte integrante dos processos celulares, a sua aptidão nociva prende-se, sobretudo, com o facto de estes terem uma forte afinidade para extrair eletrões, sendo responsáveis pela lesão de diversos componentes das estruturas celulares, de forma a se tornarem quimicamente mais estáveis (Halliwell and Gutteridge 1999). Os componentes mais suscetíveis ao “ataque” por estas espécies na membrana interna mitocondrial são os lípidos e proteínas; contudo o DNA mitocondrial localizado na matriz e ligado à membrana interna é também alvo para a ação das ROS. Em casos extremos, a produção elevada de ROS pode levar a um ciclo vicioso de lesões oxidativas, causando progressivas alterações no DNA e função mitocondriais, levando a uma declínio na produção energética, desequilíbrios redox e consequente disfunção celular (Benard and Rossignol 2008).

Devido ao facto da produção de ROS pela mitocôndria ser um processo contínuo em condições fisiológicas, este organelo desenvolveu uma bateria de defesas antioxidantes. A expressão de enzimas antioxidantes parece assumir um papel preponderante na manutenção do equilíbrio redox. Alguns antioxidantes parecerem ser ativados em resposta ao stress oxidativo agudo, induzido por processos inflamatórios, tóxicos ou distúrbios metabólicos, e crónico de que são exemplo o envelhecimento biológico, algumas patologias, alterações ambientais e o treino de *endurance* (Ji 2007). A Mn-SOD, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase, antioxidantes solúveis em lípidos ( $\alpha$  - tocoferol) e citocromo *c* são alguns exemplos que fazem parte deste sistema complexo de defesas antioxidantes. Em mitocôndrias cardíacas foi também identificada a presença de catalase e de algumas isoformas de tioredoxina peroxidase e tioredoxina reductase. A Mn-SOD e a CuZnSOD convertem o radical  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  reduzindo a

possibilidade da formação do OH $\cdot$ . Posteriormente, o H $_2$ O $_2$  é reduzido a H $_2$ O pela GPx, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como dador de elétrões. Estas características fazem da GPx um importante protetor celular contra a ação do H $_2$ O $_2$  (e consequentemente do OH) nos lípidos membranares, assim como proteínas e ácidos nucleicos (Halliwell and Gutteridge 1999, Kowaltowski, Castilho et al. 2001). Paralelamente, a catalase (CAT) possui como principal função catalisar a decomposição de H $_2$ O $_2$  em água e oxigénio (Powers, Criswell et al. 1994). Comparativamente, a GPx e a CAT diferem relativamente à sua afinidade com H $_2$ O $_2$  ao nível do substrato. Nos mamíferos a GPx possui maior afinidade pelo H $_2$ O $_2$  do que a CAT, desempenhando um papel mais ativo na remoção de H $_2$ O $_2$  nas células do músculo esquelético. A CAT está presente nos pexorissomas e nas mitocôndrias (Halliwell and Gutteridge 1999). Desempenha um papel mais ativo nos músculos com maior capacidade oxidativa sendo menor a sua atividade em músculos com maior percentagem de fibras tipo II (Lawler, Powers et al. 1993).

Neste sentido, as mitocôndrias parecem ser responsáveis pela maior parte da produção de ROS e, concomitantemente, o principal alvo da sua regulação, e fonte de produção de substâncias responsáveis pela sinalização celular, proliferação e apoptose (Cadenas 2004, Benard and Rossignol 2008). Todavia, a manutenção do equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes parece ser condição fundamental para a sobrevivência celular (Halliwell and Gutteridge 1999). O stress oxidativo é, assim, numa conceção mais clássica um desequilíbrio entre os mecanismos de produção e de neutralização das ROS, a favor da produção. Este fenómeno resulta de uma incapacidade dos sistemas antioxidantes em combater a produção excessiva de ROS (Sen and Goldfarb 2000). Mais recentemente tem sido proposta uma noção compartimentalizada de ROS a nível celular, em que alterações ocorridas em pares redox como glutathiona reduzida/oxidada

(GSH/GSSG) ou cisteína/cistina, determinam mecanismos de sinalização, adaptação e de morte celular importante do ponto de vista subcelular (Jones and Go 2010).

Estímulos como o aumento da temperatura, radiação, hipóxia e inflamação promovidas pelo aumento do metabolismo podem resultar na produção de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ERON). Porém, em contraste com a ideia convencional de que as ERON apenas contribuem para lesar as estruturas biológicas, uma baixa mas relevante concentração de ERON pode regular uma variedade de mecanismos moleculares mitocondriais (Nemoto, Takeda et al. 2000, Finkel 2001, Hancock, Desikan et al. 2001, Cadenas 2004). De facto, estas moléculas apresentam um potencial de sinalização celular importante na plasticidade mitocondrial. Tem vindo a ser reconhecido que, uma baixa concentração poderão afetar positivamente, não só a expressão de alguns antioxidantes indutíveis, como processos metabólicos relacionados com o transporte de glucose, atividade da ATPase, libertação de cálcio, atividade da creatina quinase, biogénese mitocondrial e diferenciação das fibras musculares (Sakamoto and Goodyear 2002, Taylor and Starnes 2003). As vias de sinalização sensíveis às alterações redox utilizam os ERON como moléculas sinalizadoras na ativação de fatores de transcrição (Meyer, Pahl et al. 1994). Destas podemos destacar, *Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) e as cascatas associadas a *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) que são consideradas preponderantes na resposta celular ao stress oxidativo (Baeuerle and Baltimore 1988), induzido, entre outros, por estímulos fisiológicos com o treino de *endurance* (Ji, Gomez-Cabrera et al. 2004, Coffey, Zhong et al. 2006). Assim sendo, em alguns casos, o stress oxidativo mitocondrial pode ser benéfico. Por exemplo, uma situação de stress oxidativo moderado induzido por isquemia/reperfusão de cardiomiócitos contribui para o pré-condicionamento do miocárdio, tornando o tecido mais resistente a

danos isquémicos posteriores (Lee, Min et al. 2012). Um aumento da síntese de proteínas por stress oxidativo moderado poderá ser atribuída a uma ativação da transcrição induzida pelas ROS.

### *2.3.5 Indução do poro de permeabilidade transitória mitocondrial*

Como referido anteriormente, a mitocôndria é o principal fornecedor de ATP, sendo uma das suas funções mais preponderantes. Porém, a partir dos anos noventa, o papel das mitocôndrias nos processos de morte celular tem sido alvo de uma atenção particular por parte da comunidade científica, devido ao reconhecimento de que a mitocôndria estaria envolvida nas vias de morte celular (apoptose e necrose) sendo que, este papel tem sido associado à indução de poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM) (Duchen and Szabadkai 2010, Di Lisa, Carpi et al. 2011).

O PPTM pode ser descrito como um canal cuja abertura é estimulada por concentrações elevadas de cálcio e stress oxidativo, sendo seletivamente inibido por ciclosporina A (CycA) e dependente de voltagem. Para valores de  $\Delta\Psi$  elevados, o poro encontra-se numa conformação fechada; quando a membrana mitocondrial sofre despolarização a abertura deste poro é estimulada (Bernardi, Broekemeier et al. 1994, Bernardi and von Stockum 2012). A concentração limiar de  $\text{Ca}^{2+}$  necessário para induzir o poro quando a mitocôndria se encontra despolarizada é mais baixa; contudo, este limiar varia consoante a subpopulação mitocondrial. O poro está localizado na membrana mitocondrial interna e regulado por interações específicas proteína-proteína com a membrana mitocondrial externa. A abertura deste canal de tamanho molecular de cerca de 3 nm causa um aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial permitindo a passagem de moléculas com pesos molecular superiores a 1500KDa (Di Lisa, Carpi et al. 2011, Bernardi and von Stockum 2012). Através de estudos realizados

com sondas potenciométricas, sabe-se hoje que o PPTM pode assumir uma forma intermitente por um curto período de tempo com uma baixa condutância que se sabe ter um papel importante na homeostase e sinalização do cálcio, ou, de outra forma, persistente e assumir-se de um modo de alta condutância que pode causar o entumescimento mitocondrial, ruptura de membrana externa e liberação do citocromo c, o qual está associado a vários modelos de morte celular (Gáll, Škrha Jr et al. 2012).

A formação e abertura do PPTM ocorre sob certas condições particulares incluindo as concentrações suprafisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Apesar de a mitocôndria ter um sistema de tamponamento de cálcio, este torna-se ineficiente quando a concentração do íon atinge um valor limiar. De acordo com vários dados experimentais, supõe-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  induz o PPTM por quatro vias diferentes: (i) produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela cadeia respiratória mitocondrial (anteriormente descrito); (ii) estimulação da reação de *Fenton* devido à mobilização de íons  $\text{Fe}^{2+}$  (também referido anteriormente); (iii) alterações de conformação em proteínas membranares, promovendo a exposição de grupos sulfidrilo (-SH) que se tornam mais suscetíveis à oxidação na presença de reagentes sulfidrilo hidrofílicos (a oxidação de -SH de proteínas que fazem parte do complexo proteico do PPTM leva à formação de pontes dissulfeto (S-S) entre eles, com consequente abertura do poro) e (iv) regulação direta da abertura do poro por ligação a locais específicos em proteínas das membranas mitocondriais (Bernardi and von Stockum 2012). A ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  aos lípidos membranares é também essencial para a indução do PPTM. Estudos realizados em mitocôndrias isoladas de coração de rato mostraram que a peroxidação de cardiolipina se comporta como um indutor do PPTM, estando associada a liberação de citocromo c das mitocôndrias (Petrosillo, Moro et al. 2010).

A abertura do PPTM pode ainda ser estimulada ou inibida pela presença de certos compostos (indutores ou inibidores). Na categoria dos indutores são incluídos o

fosfato inorgânico; oxidantes de nucleótidos de piridina (baixam o potencial redox mitocondrial necessário para defesa contra ROS); reagentes ditiólicos (promovem a formação de pontes dissulfito entre grupos –SH de proteínas, como referido), ligandos de nucleótidos de adenina (compostos que estabilizam a conformação do transportador (ANT) quando este se localiza na face citosólica da membrana interna mitocondrial, como por exemplo o *carboxiatractilosido*), entre outros (Zoratti and Szabò 1995). Já na categoria dos inibidores podemos encontrar os desacopladores (dissipam totalmente o potencial de membrana, impedindo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ); nucleótidos de adenina (ADP mais eficiente que o ATP, pois poderá promover alterações conformacionais ao nível do trocador de nucleótidos de modo a impedir a exposição de grupos tiólicos da proteína); oligomicina (promove um aumento do conteúdo de ADP, aumentando o potencial transmembranar das mitocôndrias, pois inibe o *leak* prótonico através da ATPase), *scavengers* de radicais livres, poliaminas, CycA, antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , entre outros (Zoratti and Szabò 1995, Duchen and Szabadkai 2010). A CycA é talvez o inibidor mais estudado e o mais utilizado para inibir o PPTM. Esta inibição é promovida através da ligação à ciclofilina D (CycD), uma isomerase cis-trans peptidil-propil codificada no gene Ppif que facilita a abertura do PPTM (Bernardi and von Stockum 2012).

A composição molecular efetiva do PPTM continua a ser controversa entre a comunidade científica. Contudo, tem sido sugerido que a constituição do PPTM envolve o ANT, localizado na membrana interna mitocondrial, o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) localizado na membrana externa, e pela CycD na matriz mitocondrial (Duchen and Szabadkai 2010). Porém, estudos com ratos *knockout* para o ANT e o VDAC desenvolvidos com o objetivo de prevenir da abertura do PPTM, têm vindo a colocar em causa o papel destes componentes na constituição do PPTM,

enquanto que a CycD que parece ser um dos componentes do PPTM (Duchen and Szabadkai 2010).

Recentemente, estudos acerca da caracterização do PPTM sugerem através de resultados experimentais genéticos que a subunidade  $F_o$  da ATPase é necessária para abertura do PPTM, fragmentação mitocondrial e morte celular, promovidos quer pela sobrecarga de cálcio citosólico ou aumento de stress oxidativo em modelos celulares (Bonora, Bononi et al. 2013)

### *2.3.6 O papel da mitocôndria nos processos de morte celular*

As ultimas décadas modificaram fortemente o conhecimento sobre a biologia mitocondrial. As mitocôndrias deixaram de ser apenas consideradas como as fábricas de energia da célula, para assumir, igualmente, um papel central na definição da vida e morte celulares. Entre 1994-1995, um conjunto de publicações emergiu mostrando que, quando libertado para o citosol, o citocromo c poderia desencadear uma cascata de interações que resultariam na destruição celular coordenada e organizada. Esta descoberta fez com que a mitocôndria se tornasse o foco de pesquisa em muitos laboratórios (Duchen 2004).

A morte celular programada (MCP) é essencial no desenvolvimento, morfogénese, remodelação tecidual e regulação imunológica, estando ligada também a diversos processos fisio-patológicos (Fiers, Beyaert et al. 1999). Porém, antes de referir o papel da mitocôndria no fenómeno de apoptose ou morte celular programada, convém distinguir este fenómeno da morte celular não-programada, conhecida por necrose. A necrose é caracterizada por vários eventos, nomeadamente a perda precoce de integridade membranar, aparecimento de uma morfologia anormal dos organelos, intumescimento celular, rutura de lisossomas e libertação do seu conteúdo e a formação

de invaginações na membrana celular, sendo um fenómeno associado a vastas zonas celulares (Schweichel and Merker 1973, Grooten, Goossens et al. 1993). A apoptose, pelo contrário, está restrita a zonas dispersas de células e caracteriza-se, entre outros fenómenos, pela condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de invaginações na membrana celular e libertação de corpos apoptóticos e preservação da estrutura dos organelos, incluindo a mitocôndria e lisossomas (Kerr, Wyllie et al. 1972, Fiers, Beyaert et al. 1999).

A sinalização apoptótica pode ser desencadeada em resposta a uma variedade de estímulos como sejam a sinalização hormonal, as alterações na expressão de citoquinas, a sinalização de  $Ca^{2+}$  e, a produção ROS (Richter 1997) podendo ocorrer por processos intrínsecos e extrínsecos (Green and Evan 2002). A via extrínseca é desencadeada por recetores plasmomembranares como o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) ou o *adaptor death domain* (Fas). A ativação destes recetores promove a formação do complexo proteico *death inducing signaling* (DISC) que recruta e ativa a cascata das caspases, presentes no citoplasma numa conformação inativa. As caspases são proteases de cisteína que clivam substratos após resíduos específicos de aspartato. A especificidade dos locais de ativação parece ser determinada por uma sequência de reconhecimento de quatro aminoácidos, bem como por outros aspetos da estrutura tridimensional da proteína alvo. As caspases são sintetizadas como pró-caspases que são ativadas por outras caspases, através da clivagem de resíduos de aspartato localizadas no interior da sua estrutura. As pró-caspases podem ser divididas em duas classes dependendo do seu N-terminal: aquelas cujo o N-terminal é longo são denominadas caspases iniciadoras e as com um N-terminal curto as executoras (Abraham and Shaham 2004).

Uma das vias intrínsecas (adicionalmente à via do reticulo endoplasmático) é ativada pela libertação de diversas proteínas pro-apoptóticas mitocondriais para o

citocromo c (Wang 2001, Green and Evan 2002), das quais podemos destacar o citocromo c. Uma vez libertado para o citoplasma, e na presença de ATP, o citocromo c liga-se à *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1), potencia a sua oligomerização e consequentemente o recrutamento/ativação da pro-caspase-9. O complexo proteico que compreende o citocromo c, Apaf-1 e pro-caspase-9, é denominado de apoptosoma (Desagher and Martinou 2000, Hill, Adrian et al. 2003, Tsujimoto 2003). A indução desta via é controlada pelas proteínas da família Bcl-2 (Adams and Cory 2001, Tsujimoto 2003). A família das proteínas Bcl-2 foram descobertas em células B do linfoma folicular e são conhecidas atualmente cerca de 20 proteínas. Todas as proteínas da família contém preservados um dos quatro domínios homólogos Bcl-2 (BH<sub>1</sub>-BH<sub>4</sub>) e a sua classificação é apoiada na quantidade de domínios presentes na proteína ativa e divergem em 3 grupos: I) anti-apoptóticas, com os 4 domínios preservados, estão incluídas neste grupo a Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-B e A1, II) proteínas pró-apoptóticas que são, por sua vez, divididas em dois grupos distintos: IIa) proteínas com multidomínios, contendo 3 domínios BH (Bax, Bak, e a Bok) e IIb) proteínas apenas com o domínio BH3 preservado (Bad, Bid, Bmf, Bik Hrk, Noxa e Puma), as quais se ligam a proteínas anti-apoptóticas promovendo desta forma apoptose. A Bcl-2 e Bcl-xL são principalmente conhecidas por prevenir a apoptose, no entanto, alguns estudos sugerem que, dependendo da interação destas proteínas com outras, podem ativar mecanismos deletérios pró-morte celular (Brunelle and Letai 2009). De facto, Cheng, et al (1997) mostraram que a clivagem do aspartato 34 (Asp34) no domínio *loop* da Bcl-2 em células com uma sobre-expressão de caspase-3 desencadeava a morte celular por apoptose.

Para além da libertação do citocromo c, estão também associadas à(s) via(s) mitocondrial(is) a libertação de outras proteínas pró-apoptóticas mitocondriais

localizadas no espaço intermembranar como Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, fator indutor apoptótico (AIF) e endonuclease G (EndoG) (Wang 2001, Green and Evan 2002).. Contudo, os mecanismos associados à liberação de proteínas pró-apoptóticas são bastante controversos entre a comunidade científica. Diversos autores apontam a permeabilidade transitória mitocondrial como um fenômeno que poderá levar ao rompimento da membrana externa mitocondrial e consequente liberação de fatores contidos no espaço intermembranar. No entanto, outros sugerem que a abertura do poro e consequente despolarização acontecem a montante ou simultaneamente com a liberação do citocromo *c*. Outros sugerem, ainda, que a abertura do poro e/ou perda do potencial membranar mitocondrial ocorrem a jusante da liberação do citocromo *c* (Yang, Liu et al. 1997, Bossy-Wetzel, Newmeyer et al. 1998), podendo nem sequer existir despolarização membranar (Kluck, Bossy-Wetzel et al. 1997). A despolarização observada em alguns casos seria consequência da ação das caspases que iriam interferir no normal funcionamento mitocondrial (Bossy-Wetzel, Newmeyer et al. 1998). Uma vez que o presente trabalho tem como objetivo o estudo do papel do exercício físico na ação hepatotóxica do diclofenac, utilizando a mitocôndria como modelo de toxicidade/integridade celular, as próximas seções desta revisão centrar-se-ão na ação deletéria deste fármaco na bioenergética hepática e nos potenciais mecanismos indutores de proteção contra o seus efeitos.

#### **2.4 Toxicidade induzida pelo diclofenac. Papel da mitocôndria.**

O dano hepático induzido por fármacos tem, geralmente, uma assinatura característica dependendo do tipo de lesão (hepatocelular vs colestática) e do tempo da mesma. Existem vários fatores que podem aumentar ou diminuir a suscetibilidade do fígado a estas lesões como por exemplo a idade, o sexo, comportamentos de risco (uso

de drogas de abuso, álcool, dietas hipercalóricas, sedentarismo) e polimorfismos genéticos. Contudo, para além destes fatores, a toxicidade de um fármaco é também determinada pela sua cinética de absorção e metabolização, pela interação droga-droga no caso de pacientes que estejam a fazer dois ou mais tipos de medicação, bem como pela formação de metabolitos formados, os quais podem ser mais ou menos reativos. Nestes casos, o balanço entre a produção de metabolitos reativos e a efetividade do fármaco pode determinar se ocorre ou não dano hepático (Maddrey 2005)

O diclofenac é um fármaco anti-inflamatório não-esteróide (NSAID) frequentemente utilizado no tratamento de desordens reumatóides, incluindo osteoartrites, artrite reumatóide, dores musculares agudas, entre outras. Tem uma característica lipofílica, levemente acídica e tem na sua estrutura dois anéis aromáticos, o que promove um impacto elevado no comportamento metabólico do fármaco nos hepatócitos (Ortiz, Torres-López et al. 2002, Boelsterli 2003). De facto, a sua ação farmacológica envolve a inibição de ciclo-oxigenases envolvidas na síntese de prostaglandinas (van Leeuwen, Ünlü et al. 2012) e, tal como outros NSAID, o seu uso está associado a raros, porém graves, casos clínicos de hipersensibilidade e hepatotoxicidade, estando descrito que a sua toxicidade é dependente da concentração administrada (Gómez-Lechón, Ponsoda et al. 2003, Siu, Pun et al. 2008, Mueller, Müller-Vieira et al. 2012).

Entre os possíveis mecanismos explicativos para a toxicidade induzida pelo diclofenac, dois parecem ser o alvo preferencial dos investigadores: – a formação de intermediários reativos (Boelsterli 2003, Gómez-Lechón, Ponsoda et al. 2003, Mueller, Müller-Vieira et al. 2012) e a disfunção mitocondrial (Siu, Pun et al. 2008, van Leeuwen, Orij et al. 2011), os quais iremos detalhar nos subcapítulos seguintes.

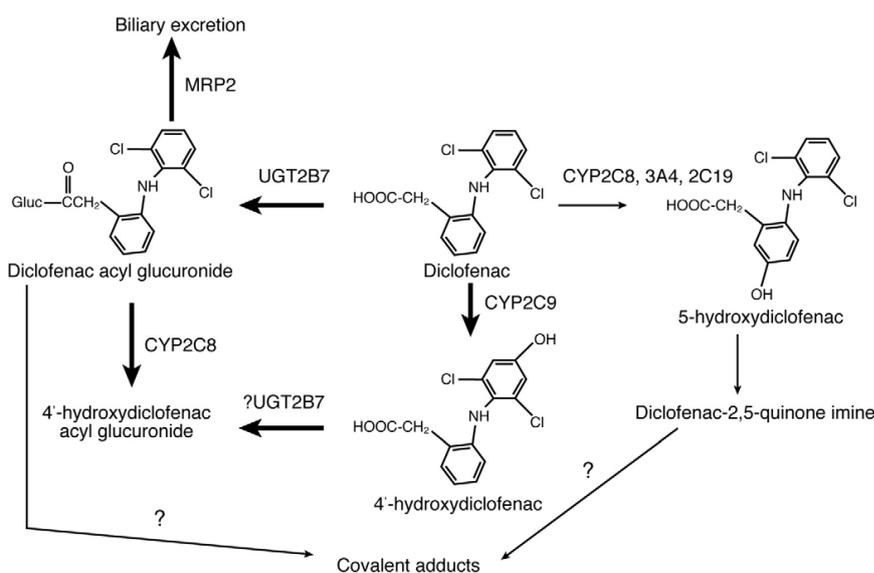
#### 2.4.1 Toxicidade mediada pela formação de metabólitos reativos

A hepatotoxicidade do diclofenac tem vindo a ser estudada em modelos animais e em ensaios clínicos com seres humanos. Interessantemente, um dos estudos acerca da dramática diminuição da população de abutres do subcontinente indiano em 1992 provou estar diretamente relacionado com a introdução de NSAID na alimentação de gado no mesmo período. No mesmo estudo, o grupo de abutres alimentados com dosagens de diclofenac em laboratório exibiram os mesmos resultados *post-mortem* que os abutres selvagens, sugerindo que para além da toxicidade induzida por estes compostos ser bastante relevante, ela mantém-se ativa após metabolização (Oaks, Gilbert et al. 2004). Apesar de ser evidente que o diclofenac induz toxicidade, os mecanismos pelos quais a mesma ocorre continua a ser alvo de discussão.

Sabe-se que diclofenac é fortemente metabolizado pelo fígado por duas vias principais, tanto em humanos como em animais (ilustração 2). A primeira via envolve a hidroxilação do anel aromático, catalisado pelo hCYP2C9 (uma enzima responsável pela metabolização de NSAID), que resulta na formação do maior metabólito oxidativo encontrado no plasma e urina, o 4'-hidroxiclofenac e outros metabólitos em menor quantidade, como o 5-hidroxiclofenac, catalisado pelo hCYP3A4. A segunda via de metabolização é a glucoronidação pela glucoronosil-transferase que resulta na formação do 1-O- $\beta$ -acilglucoronido. A formação destes metabólitos tem especial interesse devido as suas propriedades reativas e oxidantes (Bort, Macé et al. 1999, Boelsterli 2003, Daly, Aithal et al. 2007). Num estudo realizado por van Leeuwen, Vredenburg et al. (2011) em *Saccharomyces cerevisiae* foi analisada a toxicidade do diclofenac e dos metabólitos formados. Para esse efeito, foram criadas estirpe de leveduras para expressar o citocromo P450 (BM3M11). Estes estudos são importantes porque minimizam o sacrifício de animais e permitem o controlo dos mecanismos através de inibidores e

estimuladores. Os autores observaram uma diminuição do crescimento de estirpe mutada em relação a estirpe controle, quando exposta ao diclofenac mostrando que o citocromo P450 aumenta a toxicidade do diclofenac. Curiosamente, quando os mesmos autores estudaram o efeito dos metabolitos 4- e 5- hidroxidiclofenac, propostos na literatura como sendo responsáveis pela formação de iminas quinonas consideradas em diversos estudos como responsáveis pela toxicidade do diclofenac, não encontraram alterações no crescimento celular ou a formação de ROS em leveduras com o vetor BM3M11. Estes resultados sugerem, que a toxicidade do diclofenac em leveduras não se encontra associada aos metabolitos secundários, mas sim à formação dos metabolitos primários como óxidos de arenos ou na formação de ROS durante a descarboxilação. Com o mesmo objetivo, Mueller, Müller-Vieira et al. (2012) conduziram um estudo em hepatócitos humanos primários num meio de cultura isento de soro durante 3 semanas, onde foram analisados a viabilidade e capacidade dos hepatócitos em metabolizar o diclofenac de forma aguda e crónica, bem como a toxicidade resultante do metabolismo I e II do diclofenac. A toxicidade aguda foi avaliada com a exposição dos hepatócitos ao diclofenac durante 24h para uma gama de concentrações 10-1000  $\mu\text{M}$ , enquanto que a toxicidade crónica foi avaliada através da exposição ao diclofenac (9 doses) para as concentrações 4, 6 e 100  $\mu\text{M}$ . No protocolo agudo os autores verificaram que de 1 mM de diclofenac induziu toxicidade nos hepatócitos, enquanto que no ensaio crónico a toxicidade estava presente na concentração mais baixa, e que as vias de metabolização estiveram ativas durante 3 semanas, sendo o metabolito predominante o diclofenac acilglucoronico. Adicionalmente, foi verificado um aumento do consumo de glucose e galactose após incubação crónica com a droga e estas alterações nas vias metabólicas mostraram que o diclofenac induz o desacoplamento da fosforilação oxidativa e disfunção mitocondrial. Após a exposição ao diclofenac (100  $\mu\text{M}$ ), Mueller, Müller-

Vieira et al. (2012) observam também um aumento da produção de lactato, um marcador de stress e toxicidade que indica um aumento da atividade glicolítica. Os dois estudos documentados anteriormente mostram claramente que apesar da metabolização da droga originar metabolitos reativos que podem ou não induzir toxicidade nos hepatócitos, os resultados parecem também sugerir que o diclofenac altera a funcionalidade mitocondrial.



**Ilustração 3.** Vias metabólicas e principais metabolitos do diclofenac em fígado humano (Daly, Aithal et al. 2007).

#### 2.4.2 Toxicidade associada à disfunção mitocondrial.

Dependendo da natureza e severidade, o diclofenac é capaz de induzir desde alterações ligeiras a elevadas alterações mitocondriais, levando ao desacoplamento da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e ao colapso do potencial transmembranar ( $\Delta\psi$ ), alterando dessa forma o ambiente citosólico celular (Masubuchi, Nakayama et al. 2002, Gómez-Lechón, Ponsoda et al. 2003, Lim, Lim et al. 2006, Begriche, Massart et al. 2011). Na tabela 1 encontram-se algumas das alterações induzidas pelo diclofenac em mitocôndrias hepáticas. Os mecanismos pelos quais o diclofenac induz toxicidade mitocondrial ainda não estão completamente esclarecidos e esta é uma questão ainda

muito discutida por diversos autores. Neste capítulo serão enunciados alguns dos estudos realizados ao longo dos anos, que procuram esclarecer esta questão. Desta forma Masubuchi, Nakayama et al. (2002) incubaram mitocôndrias e hepatócitos isolados de rato *Wistar* com diferentes concentrações de diclofenac. Semelhante a resultados anteriormente já descritos, os autores observaram que a toxicidade é dependente da dose e do tempo de incubação e que quando o diclofenac promove toxicidade, induz *swelling* mitocondrial, despolarização da membrana e a oxidação de nucleótidos e grupos tiólicos de proteínas, sendo todas estas alterações revertidas quando incubam as mitocôndrias com CycA, sugerindo que um dos mecanismos envolvidos na toxicidade induzida pelo diclofenac é abertura do PPTM. Adicionalmente, os autores observaram que na cultura de hepatócitos incubados durante 24h com diclofenac ocorreu uma diminuição do ATP celular, bem como a clivagem da lactato desidrogenase e despolarização membranar, alterações que são atenuadas por CycA e verapamil. Estes resultados revelam que o PPTM pode ter um papel importante no dano induzido pelo diclofenac e, possivelmente, contribui para a hepatotoxicidade idiossincrática em humanos. Assim sendo, a indução do PPTM parece ser um evento comum na toxicidade mitocondrial induzida pelo diclofenac. No entanto, incertezas relativas aos mecanismos que fazem aumentar a susceptibilidade ao PPTM persistem. Gómez-Lechón, Ponsoda et al. (2003) utilizaram como modelo toxicológico hepatócitos humanos e de rato e incubaram-nos com diclofenac (variando o tempo de incubação e a concentração). Os resultados mostram um aumento de núcleos apoptóticos há medida que o tempo de incubação vai aumentando o que é mais visível para concentrações mais elevadas de diclofenac. Após avaliação da atividade de caspases, observaram que a atividade é máxima após 12h de incubação com diclofenac e que o mecanismo de apoptose envolvido é dependente da ativação de caspases, uma vez que ativação de

caspase-3 foi completamente bloqueada quando foram adicionados inibidores das caspases-8 e 9. A adição de inibidores de PPTM permitiu aos autores avaliar a correlação entre a atividade das caspases-3, 8 e 9 e a abertura do PPTM induzido pelo diclofenac. A ativação das caspases-3, 8 e 9 é completamente inibida na presença de inibidores do PPTM, o que confirma que a apoptose induzida pelo diclofenac é dependente do PPTM, tanto nos hepatócitos de rato como em humanos. As culturas de hepatócitos foram incubadas com antioxidantes com o objetivo de avaliar o perfil oxidante induzido pelo diclofenac. A cascata de caspases é largamente inibida assim como o evento de apoptose, sugerindo que a mediação do PPTM pelo stress oxidativo é um evento crucial para a indução de apoptose pelo diclofenac nos hepatócitos.

Tendo em conta os resultados a apoptose mediada por recetores merece alguma atenção. Como sabemos, o recrutamento e clivagem da pro-caspase 8, formando desta forma a caspase-8 ativa, é um acontecimento importante na morte celular. Por sua vez, a caspase-8 cliva a Bid, que é translocada para a mitocôndria iniciando a via apoptótica mitocondrial. Contudo e curiosamente, os autores não observaram Bid clivada nos hepatócitos tratados com diclofenac, isto pode indicar que a caspase-8 possa estar a ser ativada pelo diclofenac de uma forma independente de recetores de morte celular. Um dos resultados interessantes obtidos também neste estudo foi o aumento a expressão de Bcl-xL que coincide com o aumento de ROS em hepatócitos tratados com diclofenac, sugerindo que os ROS podem estar atuar na regulação da expressão genética, em particular de NF- $\kappa$ B o qual é ativado pelo stress e desta forma influenciar a expressão de Bcl-xL. Na mesma perspetiva, um outro estudo dirigido por Lim, Lim et al. (2006) avaliou o papel da concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico ( $[Ca^{2+}]_c$ ) no dano hepático induzido por diclofenac com o auxílio de sondas fluorescentes de  $Ca^{2+}$ . Os resultados revelaram que após 8h de incubação existe um aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  independente de CycA e que a

exposição combinada de diclofenac/BAPTA (quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ ) inibe o dano celular, indicando que o  $\text{Ca}^{2+}$  tem um papel fundamental na abertura do PPTM. Os autores observaram também que mesmo na presença de CycA ou de BAPTA, há uma diminuição do  $\Delta\psi$ , indicando que a despolarização mitocondrial não é uma consequência do PPTM ou do aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . A utilização de um inibidor do CYP2C9, o sulfafenazol (10  $\mu\text{M}$ ), confere uma proteção celular ao dano causado pelo diclofenac através da inibição do aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Contudo, não foi observado qualquer efeito na dissipação do  $\Delta\psi$ , mostrando que a despolarização observada é um efeito direto do diclofenac.

Resumidamente, o diclofenac parece induzir dano mitocondrial pelo aumento da produção de ROS, possivelmente uma consequência do seu metabolismo oxidativo, que muito provavelmente atua como um sinal para o início da apoptose e uma possível ativação do NF- $\kappa$ B endógeno. O PPTM e a disfunção mitocondrial parecem ser uma consequência direta e imediata do diclofenac, que leva a libertação de proteínas pro-apoptóticas como o citocromo c das mitocôndrias o que pode contribuir para a ativação das caspases-9 e 3 e desta forma induzir apoptose. A toxicidade associada à metabolização do fármaco e a toxicidade mitocondrial parecem estar intimamente relacionadas, visto que a variação da expressão do CYP2C19 já discutido no capítulo anterior, pode levar a um aumento do dano celular, provavelmente devido ao aumento da produção de espécies reativas a nível mitocondrial.

**Tabela 1.** Alguns resultados e modelos utilizados no estudo da toxicidade induzida pelo diclofenac em mitocôndrias hepáticas

Protocolos de Toxicidade/Modelo animal	Alterações	Referências
Estudo <i>in vitro</i> ; Incubação de mitocôndrias hepáticas e células de hepatoma AS-30D com diclofenac	↑ respiração basal/ desacoplamento; ↓ síntese de ATP; $\Delta\psi$ Inibe a atividade da ANT e levemente a atividade da ATPase	Moreno-Sanchez, Bravo et al. (1999)
Estudo <i>in vitro</i> ; incubação de mitocôndrias hepáticas e cultura de hepatócitos com diclofenac (12.5-100 mmol/L)	Induz o PPTM; Após 24h de incubação ↓ ATP; $\Delta\psi$ ; ↑ lactato;	Masubuchi, Nakayama et al. (2002)
Estudo <i>in vitro</i> ; incubação ao longo do tempo (24h) com diferentes concentrações de diclofenac/ cultura celular HepG2	↓ viabilidade com a concentração e período de incubação; ↑ Aumento da atividade de caspase3 após 12h de incubação para concentrações iguais ou superiores a 350 $\mu$ M; Induz o PPTM para concentrações iguais ou superiores a 350 $\mu$ M;	Gomez-Lechon, Ponsoda et al. (2003)
Estudo <i>in vitro</i> ; incubação com duas concentrações de diclofenac (500 e 1000 $\mu$ M)/ cultura celular HC-04	↑[Ca <sup>2+</sup> ] após 8h de incubação da ↓ potencial transmembranar mitocondrial ↑ produção de superóxido mitocondrial	Lim, Lim et al. (2006)
Estudo <i>in vitro</i> ; incubação crónica e aguda de diclofenac/ <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	↓ crescimento celular ↑ ROS	van Leeuwen, Vredenburg et al. (2011)

↑ aumento, ↓ diminuição; ATP (adenosina trifosfato),  $\Delta\psi$  (potencial transmembranar mitocondrial), ANT (translocador de nucleótidos de adenina), PPTM (poro de permeabilidade transitória mitocondrial); ROS (espécies reativas de oxigénio).

## 2.5 Terapias contra hepatotoxicidade

Dependendo da severidade e da origem da lesão hepática, estão configurados diferentes tipos de terapêutica. Nos casos mais graves de hepatotoxicidade, o transplante pode ser o último recurso. Contudo, em lesões em fases iniciais, a terapêutica pode passar pela interrupção da toma do fármaco que pode estar na origem da toxicidade, por uma dieta ou através do exercício físico. O exercício físico é cada vez mais associado a benefícios em diversas fisiopatologias, como a obesidade ou a diabetes do tipo 2 que em fases iniciais podem mesmo vir a ser revertidas por um aumento da atividade física (Little, Safdar et al. 2012). Desta forma, é cada vez mais recomendado pela comunidade científica como um complemento em diversos tipos de intervenções. No presente trabalho pretendemos analisar o efeito do exercício físico na resposta mitocondrial hepática contra o diclofenac. Para melhor compreender esta possível interação, irá ser descrito neste capítulo o papel do exercício como modelador das respostas metabólicas no tecido hepático.

### 2.5.1 O papel do exercício físico

O aumento dos níveis de atividade física em geral, e de exercício físico de forma mais regulada em particular, têm sido uma estratégia muito recomendada na prevenção e terapia de inúmeras patologias. Nestas incluem-se as doenças cardiovasculares e respiratórias, doenças neurodegenerativas, miopatias musculares, doenças do foro oncológico, as doenças do foro metabólico como a obesidade e a diabetes *mellitus*, entre outras (Ascensao, Ferreira et al. 2007, da Luz, Frederico et al. 2011, Lau, Patki et al. 2011, Lee, Min et al. 2012). Deste modo, o estudo dos mecanismos fisiológicos que estão associados à ação do exercício físico contra as alterações teciduais e celulares decorrentes destas patologias parece assumir uma importância crucial.

Parece hoje em dia evidente que em tecidos com capacidade contráctil como os músculos esquelético e cardíacos, o exercício físico parece proporcionar proteção contra diversas condições deletérias. Um programa regular de treino de *endurance* produz uma série de adaptações significativas no músculo esquelético, que resultam em melhorias consistentes na capacidade oxidativa mitocondrial (Fluck and Hoppeler 2003). Estas adaptações permitem prolongar a duração da atividade física, antes que os sinais da fadiga induzida pela atividade contráctil se traduzam em fatores limitantes, e podem possuir efeitos terapêuticos benéficos para o tecido muscular que padece de fisiopatologias como as miopatias, diminuindo a intolerância ao exercício (Tarnopolsky and Raha 2005, Lumini, Magalhães et al. 2008).

Algumas das adaptações induzidas pelo treino de *endurance* no músculo esquelético incluem, entre outras, o aumento da densidade mitocondrial (Fluck and Hoppeler 2003), aumento da atividade enzimática oxidativa (Holloszy 1967), regulação da capacidade antioxidante nomeadamente, a Mn-SOD (Gore, Fiebig et al. 1998, Hollander, Fiebig et al. 1999), GPx (Gore, Fiebig et al. 1998) ou as proteínas de choque térmico (HSPs) (Naito, Powers et al. 2001, Atalay, Oksala et al. 2004, Desplanches, Ecochard et al. 2004). Adicionalmente, o treino de *endurance* resulta em melhorias de alguns parâmetros respiratórios mitocondriais e na diminuição da suscetibilidade, *in vitro*, ao *stress* oxidativo (para refs. ver Tonkonogi and Sahlin 2002).

Neste sentido, partindo do pressuposto que o treino induz adaptações benéficas, nos sistemas antioxidantes e diminui a sinalização apoptótica, resultando numa melhoria da função mitocondrial e que a abertura do PPTM é favorecida sobre condições pró-oxidantes, pode ser esperado que o treino de *endurance* possa exercer um efeito de tolerância cruzada contra a suscetibilidade à abertura do PPTM com consequente atenuação dos índices apoptóticos.

Ainda no musculo esquelético, o exercício físico tem vindo a ser reconhecido como um indutor de biogénese mitocondrial. De facto o aumento da capacidade mitocondrial no musculo esquelético e cardíaco em resposta ao exercício parece estar associado, em parte, a uma melhoria em diversas físiopatológicas. No entanto, há uma crescente valorização do papel de exercício para induzir adaptações mitocondriais favoráveis em tecidos como o fígado, rins, cérebro ou o tecido adiposo. Dado o papel central da mitocôndria na produção de energia celular e a ligação entre disfunção mitocondrial e doenças crónicas em vários destes tecidos, podemos considerar que os efeitos conhecidos do exercício em algumas doenças possam estar relacionados com a biogénese mitocondrial induzida pelo exercício a um nível sistémico. Contudo, as vias de sinalização intracelular e os reguladores transcricionais envolvidos na regulação da biogénese mitocondrial pelo exercício físico ainda não estão completamente esclarecidas. Alguns estudos sugerem que coativadores transcricionais tais como o *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)  $\gamma$  e o coativador-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), desempenham um papel fundamental na regulação do metabolismo energético do musculo esquelético. A PGC-1 $\alpha$  ativa os fatores de transcrição que regulam a expressão de genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais e que induzem a expressão do fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), que por sua vez regula a transcrição do DNA, ativando assim a expressão coordenada de proteínas mitocondriais. A estimulação da PGC-1 $\alpha$  aumenta a capacidade oxidativa mitocondrial no musculo esquelético (Ojuka 2004, Higashida, Higuchi et al. 2008, Wang, Mascher et al. 2011). Apesar de existir controvérsia, alguns artigos sugerem que a estimulação da PGC-1 $\alpha$  aumenta a capacidade oxidativa mitocondrial no musculo esquelético (Ojuka 2004, Higashida, Higuchi et al. 2008, Wang, Mascher et al. 2011).

### *2.5.2 Alterações promovidas pelo exercício no estado redox do fígado*

Sendo o fígado um tecido com uma elevada exigência metabólica, tem uma elevada taxa de consumo de oxigénio e, conseqüentemente, uma elevada formação de ROS. Com o aumento da atividade física, o fluxo sanguíneo e o consumo de oxigénio no fígado é naturalmente baixo; contudo o fígado contém altos níveis de ROS gerados pelo complexo xantina desidrogenase/oxidase, o qual é sugerido ser ativado durante e particularmente após períodos de exercício físico (Radak, Chung et al. 2008). Estas alterações redox associadas ao aumento da atividade física as quais se acredita serem maioritariamente de origem sistémica, parecem ser a base da remodelação do tecido, aumentando a resistência contra diversas condições adversas, particularmente aquelas que estão diretamente relacionadas com o envelhecimento e condições patológicas. De facto, em modelos de exercício crónico e em condições controlo, isto é, na ausência de condições patológicas ou envelhecimento (tabela 2), não são visíveis efeitos consideráveis de sobre-regulação nos níveis de antioxidantes ou na atividade de enzimas hepáticas (Liu, Yeo et al. 2000, Gul, Laaksonen et al. 2002, Fernstrom, Tonkonogi et al. 2004, Moreno, Oliveira et al. 2007). Contudo, em condições fisiopatológicas, algumas moléculas dependentes do estado redox, conhecidas por estarem envolvidas na proteção do tecido são sobre-expressas ou reguladas com o aumento da atividade física de uma forma consistente com o aumento da resistência do tecido a efeitos deletérios. Estes incluem a atenuação observada na diminuição da expressão de NF-kB induzida pela idade, no conteúdo de GSH, 8-Oxoguanina DNA glicosilase, e no aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina mitocondrial (Radak, Chung et al. 2004, Nakamoto, Kaneko et al. 2007). Num estudo realizado por Nakamoto, Kaneko et al. (2007), após 8 semanas de treino de endurance em tapete rolante, verificou-se uma ativação da expressão do fator de choque térmico-1 (HSF-1), o qual se traduz numa sobre-expressão das proteínas

de choque térmico 72 (Hsp 72), uma chaperona envolvida no dobramento/desdobramento e redobramento de proteínas em condições de stress, tanto no grupo controlo como no grupo de diabetes induzida por streptozotocina (STZ). (Nakamoto, Kaneko et al. 2007). Outro modelo para estudar a de fragilidade associada a um aumento da suscetibilidade a doenças metabólicas no fígado consiste na utilização de ratos selecionados para expressar o fenótipo de capacidade aeróbica reduzida. Neste modelo, e em comparação com os seus homólogos com uma capacidade aeróbica elevada, o fígado dos animais com baixa capacidade aeróbica apresentavam níveis mais elevados de peroxidação lipídica, bem como uma maior percentagem de dano (apoptose e fibrose) e um aumento da atividade peroxissomal, consistentes com menor conteúdo mitocondrial e capacidade para a oxidação de lipídios (Thyfault, Rector et al. 2009). Estes resultados sugerem efeitos promissores do exercício físico na modelação do fenótipo hepático potencialmente mais resistente às condições de stress adicional.

**Tabela 2.** Efeitos do treino *endurance* e aptidão aeróbica no stress oxidativo, marcadores antioxidantes e dano hepático.

Protocolos de Intervenção/Modelo animal	Alterações	Referências
10 semanas corrida	= % GSSG = GPx, GR, G6PDH, CAT	Lew and Quintanilha (1991)
8 semanas corrida /privação de vitamina E	= GPx, GR, SOD, CAT, GST, TGSH, dienos conjugados, MDA	Tiidus and Houston (1994), Gul, Laaksonen et al. (2002)
10 semanas de natação	↑ GPx, = GR, Ca	Venditti and Di Meo (1996)
3 semanas corrida	= radical hidroxil, TGSH/GSH	Itoh, Ohkuwa et al. (1998)
8 semanas corrida	= grupos carbonil, OH-1, HSP90, GRP75, MDA, vit C and E, CoQ, GSH, GSSG, oxo8dG, ↑ HSF-1, HSP72 ↓ cisteína, cistina, grupos carbonil, GS	Liu, Yeo et al. (2000), Atalay, Oksala et al. (2004)
Ratos criados seletivamente LCR vs HCR	↑ 4-HNE, acil CoA oxidase, CAT, SREBP-1c, ACC	Thyfault, Rector et al. (2009)
10 semanas de corrida em ratos envelhecidos	↓ diminuição NF-kB induzida pela idade, GSH, OGG1 no núcleo, aumento mitocondrial e no núcleo de oxo8dG,	Radak, Chung et al. (2004), Nakamoto, Kaneko et al. (2007)
4semanas de corrida de <i>endurance</i> seguido de 4semanas de corrida de exaustão a alta intensidade	↑ MDA, GST, NQO-1 = GSH, ROS, GPx	Sun, Shen et al. (2010)

↑ aumento, ↓ diminuição, = inalterável. 4-HNE (dutos de proteína 4-hidroxinonal), oxo8dG (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina), Ca (capacidade antioxidante), CAT (catalase), CoQ (coenzima Q), GPx (glutaciona peroxidase), GR (glutaciona redutase), GRP (proteína reguladora de glucose), GS (glutamina sintetase), GST (glutaciona-S-transferase), G6PDH (glucose-6-fosfato desidrogenase), GSSG (glutaciona oxidada), HSF (factor de choque térmico), HSP (proteinas de choque térmico), MDA (malonaldeído), NQO (NADPH-quinona-oxiredutase), NF-kB (fator de necrose tumoral), OGG1 (8-Oxoguanina glicosilase), SOD (superóxido dismutase), TGSH (glutaciona total), SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element-Binding Transcription*).

### *2.5.3 Efeito do exercício nas mitocôndrias de fígado*

Está estabelecido que o exercício crônico exerce efeitos benéficos numa vasta tipologia de tecidos e não apenas no músculo estriado. Uma das possíveis justificações para esta modelação é ativação de mecanorreceptores e a libertação de  $\beta$ -endorfina nos fluidos corporais que promove a remodelação mitocondrial em tecidos não contrácteis tais como o fígado (Wallace 1999, Navarro, Gomez et al. 2004, Boveris and Navarro 2008). De qualquer forma, estas adaptações sugerem o aumento da resistência dos tecidos a efeitos deletérios associados a diversas condições e patologias, agindo como uma estratégia preventiva. Atualmente, a mitocôndria é considerada um importante sensor da viabilidade funcional do tecido (Sardao, Pereira et al. 2008). Desta forma, exemplos do paralelismo disfunção/função mitocondrial e diminuição/incremento da resistência tecidual à agressão são muitas vezes reportados.

Na tabela 3, estão resumidos os principais efeitos moduladores do exercício físico regular, inatividade física e dos níveis de aptidão aeróbica na função mitocondrial hepática. Embora alguns estudos não demonstrem melhorias significativas na função mitocondrial com o treino (Venditti and Di Meo 1996, Terblanche, Gohil et al. 2001), outros revelam alterações metabólicas e estruturais positivas da mitocôndria, como aumento da concentração de citocromo c (Quiles, Huertas et al. 2001), melhorias no perfil lipídico mitocondrial (Quiles, Huertas et al. 1999, Quiles, Huertas et al. 2001) e uma regulação favorável do aumento da peroxidação lipídica mitocondrial e da alteração oxidativa de proteínas, bem como uma atenuação na diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e da cadeia transportadora de eletrões induzidas pelo envelhecimento (Navarro, Gomez et al. 2004, Navarro, Lopez-Cepero et al. 2008). Embora não tenham sido encontradas alterações significativas na atividade de Mn-SOD mitocondrial, no conteúdo de MDA e grupos sulfidril reduzidos, subunidades dos

complexos da cadeia transportadora de elétrons, atividade de caspase-3, potencial transmembranar associado à indução da suscetibilidade PPTM induzida por cálcio, HSP70 e níveis de proteína CycD, o nosso grupo observou recentemente uma diminuição na atividade da aconitase e caspase-8 e uma elevação dos níveis de sirtuina 3 nas mitocôndrias hepáticas de animais após 5 semanas de treino de resistência em tapete rolante (Ascensao, Goncalves et al. 2012). Mais estudos são, de facto, necessários a fim de verificar se as alterações no estado redox mitocondrial e nas defesas antioxidantes se traduzem em distintos fenótipos mitocondriais. No entanto, é provável que o conteúdo de SIRT3 mitocondrial no fígado e a diminuição da sinalização apoptótica através da diminuição da ativação da caspase-8 possam ser incluídos nas adaptações moleculares associadas a um possível fenótipo protetor observado na sequência de um programa de treino crónico.

Num estudo desenvolvido por Rector, Uptergrove et al. (2011), utilizando animais *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF) como modelo de obesidade e diabetes do tipo II e o exercício voluntário em roda livre como forma de mimetizar a atividade física voluntária foi reportado que com a cessação da atividade física ocorre uma alteração na suscetibilidade do fígado para desenvolver esteatose hepática (Rector, Thyfault et al. 2008, Laye, Rector et al. 2009, Rector and Thyfault 2011, Rector, Uptergrove et al. 2011). Quando comparados com o grupo controlo, ratos OLEFT submetidos a 16 ou 36 semanas de atividade física diária em roda livre exibiram um aumento na capacidade de oxidação mitocondrial de ácidos gordos, uma função enzimática oxidativa e conteúdo proteico mais elevados, bem como uma supressão dos níveis de lipogénese *de novo* (Rector, Thyfault et al. 2008, Rector, Uptergrove et al. 2011). De facto, o aumento da percentagem de oxidação de palmitato, da atividade da citrato sintetase,  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase e da carnitina palmitoil-CoA

transferase 1, conteúdo de citocromo C e do complexo VI da cadeia transportadora de elétrons fazem parte dos marcadores da função oxidativa mitocondrial sugestivos de um fenótipo metabólico hepático benéfico após um programa de treino voluntário. Adicionalmente, um aumento da forma fosforilada do acetil-CoA carboxilase e uma diminuição da sua forma não fosforilada, de síntese de ácidos gordos e a esteroil-CoA desaturase indicadores da inibição da lipogénese *de novo*, foram igualmente observados após a aplicação de um protocolo de exercício (tabela 3). Laye, Rector et al. (2009), utilizando o mesmo modelo de animais sujeitos a exercício voluntário em roda livre que posteriormente transitaram para uma condição sedentária, sugeriram que com a cessação da atividade física verificou-se um aumento da oxidação do palmitato com uma diminuição concomitante dos níveis de transcritos de PGC-1 $\alpha$  tendo observado alterações em enzimas oxidativas como a citrato sintetase, a  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase, da carnitina palmitoil-CoA transferase-1 e citocromo c oxidase. Confirmando a importância que a aptidão física aeróbia tem sobre a capacidade metabólica do fígado para oxidar substratos energéticos através do aumento das funções mitocondriais, ratos com uma capacidade aeróbia superior apresentaram uma elevada capacidade para a oxidação de palmitato, um aumento na atividade das enzimas oxidativas citrato sintetase e  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase, bem como um aumento dos níveis proteicos de citocromo c, quando comparados com o grupo com capacidade aeróbia limitada (Thyfault, Rector et al. 2009). Os mesmos autores verificaram ainda que o aumento da capacidade oxidativa mitocondrial no grupo com elevada capacidade aeróbia foi acompanhado pela diminuição do conteúdo de proteínas envolvida na síntese de lipídios correlacionando assim a capacidade aeróbia com a suscetibilidade para esteatose hepática e dano hepático (Thyfault, Rector et al. 2009).

**Tabela 3.** Efeitos do treino *endurance*, cessação da atividade física e capacidade aeróbica nos marcadores de integridade e função hepática.

Protocolo de intervenção/Modelo animal	Alteration	Reference
10 semanas de natação	= desacoplamento/ respiração basal	Venditti and Di Meo (1996)
5-6 semanas de corrida	= atividade dos componentes da CTE	Terblanche, Gohil et al. (2001)
5-8 semanas de corrida + <i>bout</i> de corrida exaustiva	↓ atividade dos componentes da CTE, MUFA/PUFA ↑ CoQ, citocromo b, c+c <sub>1</sub> , a+a <sub>3</sub> , PUFA-n <sub>6</sub> = SFA, GS, MDA ↓ SCD-1 mRNA e proteína ↓ MUFA, fosfolípidos /α-tocoferol ↓ TBARS e carbonilos induzidos pela idade	Mataix, Quiles et al. (1998), Terblanche, Gohil et al. (2001)
8 semanas de corrida	↑ diminuição induzida pela idade NADH-citocromo c, atividade de transferência citocromo c-oxigênio na CTE ↑ diminuição induzida pela idade na Mn-SOD, CuZnSOD, CAT	Mataix, Quiles et al. (1998), Quiles, Huertas et al. (1999), Quiles, Huertas et al. (2001), Yasari, Prud'homme et al. (2010)
24 e/ou 50 semanas de corrida em ratos envelhecidos	↑ oxidação de palmitato, = CPT-1, β-HAD, CS, COX, ↓ PGC-1α 173h após o bloqueio da roda livre	Navarro, Gomez et al. (2004), Boveris and Navarro (2008)
Cessamento de exercício após 6 semanas de atividade física voluntária		Laye, Rector et al. (2009)

---

Cessamento de exercício após 6 semanas de atividade física voluntária em ratos OLETF	↓ % oxidação de palmitato 173h após o bloqueio da roda livre, COX, pACC/ACC ↑ ACC, FAS, malonil-CoA = β-HAD, CS, citocromo c, PPARγ, SCD-1	Rector, Thyfault et al. (2008)
Ratos seletivamente criados para baixa/elevada capacidade aeróbia	↓ β-HAD, CS, citocromo c, oxidação de palmitato	Thyfault, Rector et al. (2009)
5semanas de atividade física voluntária	= PGC-1α	Matiello, Fukui et al. (2010)
4semanas de corrida de <i>endurance</i> seguida de 4 semanas de corrida de exaustão de alta intensidade	↑ complexos I, IV, V da CTE, GSH = complexos II, III da CTE, ROS, MDA	Sun, Shen et al. (2010)

---

↑ aumento, ↓ diminuição, = inalterado. ACC (acetil-CoA carboxilase), β-HAD (beta hidroxiaçil-CoA desidrogenase), CPT (carnitina palmitoil transferase), CAT (catalase), CoQ (coenzima Q), CS (citrato sintetase), COX (citocromo c oxidase), Cu/Zn-SOD (superóxido dismutase dependente de cobre/zinco), CTE (cadeia transportadora de elétrons), FAS (ácido gordo sintetase), GS (glutamina sintetase), Mn-SOD (superóxido dismutase dependente de manganésio), MUFA (ácidos gordos monoinsaturados), OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty), PGC-1α (*peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1*), pACC (acetil-coenzima A carboxilase fosforilada), PPARγ (*peroxisome proliferator-activated receptor*), PUFA (ácidos gordos polinsaturados), SDC (*Stearoyl-CoA desaturase*), SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Transcription*).



### **3. Objetivos**



### 3.1 Objetivo geral:

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar o efeito do treino de *endurance* em tapete rolante e da atividade física voluntária em roda livre na disfunção bioenergética mitocondrial hepática *in vitro* induzida pelo diclofenac.

### 3.2 Objetivos específicos:

Podemos definir como objetivos específicos deste trabalho o estudo do efeito dos dois modelos crônicos de exercício físico (TR e RL):

- ✓ Nos parâmetros associados ao consumo de oxigénio mitocondrial hepático na presença e ausência de diclofenac;
- ✓ Nas flutuações do potencial elétrico transmembranar mitocondrial hepático na presença e ausência de diclofenac;
- ✓ Na suscetibilidade à abertura do PPTM hepático induzido por cálcio na presença e ausência de diclofenac;
- ✓ Em parâmetros de stress oxidativo e de resposta antioxidante;
- ✓ Na sinalização apoptótica;



## **4. Material e métodos**



#### 4.1 Reagentes

A água desionizada (18.7 MΩ) utilizada na preparação dos meios e soluções foi obtida através do sistema Arium® 611VF (*Sartorius, Göttingen, Deutschland*). O substrato para quantificação de caspases-3, 8 e 9 Ac (N-acetil)-LEHD-pNA (p-Nitroamilina) foi fornecida pela *Calbiochen (Darmstadt, Germany)*. O kit RANSOD utilizado para a determinação de SOD foi adquirido *Randox (London, UK)*. Os reagentes utilizados na preparação das amostras e do gel SDS-page para *Western Blotting* foram obtidos na *Bio-Rad (Amadora, Portugal)*. O quimioluminiscente e as membranas de PVDF foram compradas à *GE Healthcare (Buckinghamshire, U.K.)*. Os anti-corpos utilizados na mesma técnica foram obtidos: anti-ciclofilina D (ab110324); anti-Bcl<sub>2</sub> (#2870), anti-Bax (#2772), *Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)*; Anti-ANT (sc-70205), anti-TOM 20 (cs-11415), *Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, USA)*. Os anticorpos secundários utilizados foram obtidos: anti-goat (sc-2354); anti-rabbit (sc-4004), *Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, USA)*. Todos os restantes reagentes incluindo o diclofenac foram adquiridos à *Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)*.

#### 4.2 Caracterização da Amostra

O estudo contou com uma amostra de dezoito ratos machos Sprague-Dawley - Crl:CD (SD), obtidos na *Charles River Laboratories International, Inc. (L'Arbresle, França)*. Os animais chegaram ao laboratório com 3-4 semanas e com um peso inicial de ≈ 200g. Após o período de quarentena, iniciou-se o protocolo experimental que consistiu em 13 semanas nas quais os animais permaneceram em gaiolas coletivas (dois ratos por gaiola) e mantidos em biotério com atmosfera normal (21-22°C; 50-60% humidade) num ciclo de 12h dia/noite, comida (*Scientific Animal Food and*

*Engineering, A04*) e água *ad libitum*. Para a realização do nosso protocolo experimental, dividimos os animais aleatoriamente em três grupos (n=6 por grupo): sedentários (SED), treinados em tapete rolante (TR) e com acesso à roda livre (RL). Todas as experiências com envolvimento de animais foram conduzidas de acordo com Convenção Europeia para a Proteção de Animais Vertebrados usados com propósitos experimentais e outros (CETS no. 123 de 18 março 1986 e revisto em 2005) e com a Recomendação da Comissão sobre as normas para os cuidados na utilização e manipulação laboratorial de animais em investigação de 18 de junho 2007 (C (2007) 2525). Os orientadores deste trabalho são creditados pela *Federation of Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

### **4.3 Protocolo Experimental**

#### *4.3.1 Treino de Endurance*

O grupo de animais (TR) foi sujeito a exercício em tapete rolante monitorizado 5 dias/semana, durante 12 semanas. No protocolo de treino, foi incluída uma semana de habituação ao tapete rolante com 10 min de corrida, com aumentos de 5-10 min até perfazer 30 min, à velocidade de 10 m/min. Os animais pertencentes ao grupo SED não foram exercitados, tendo sido colocados no tapete rolante imóvel cinco vezes por semana (10-30 min/sessão) com o propósito de uniformizar o mais possível o ambiente de stress induzido pelo tapete rolante sem promover qualquer adaptação induzida pelo treino.

Tabela 4. Protocolo de treino de *endurance*

<b>Semanas</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
TR (m/min)	15	18	20	22	24	25	25	27	27	28	28	30	30
Duração (min/dia)	30	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

#### 4.3.2 Roda Livre

Os animais do grupo RL tiveram acesso à roda livre instalada nas respectivas gaiolas [(perímetro = 1,05m), tipo 304 *Stainless steel* (2154F0106-1284L0106) *Techniplas* (Casale Litta, Italy)], 24h/dia durante 7 dias por semana ao longo das 12 semanas. O número de rotações por dia foram monitorizados e registadas diariamente, usando *ECO 701* (Lancashire, U.K.).

#### 4.4 Isolamento Mitocondrial

Os animais foram mantidos em jejum 24h antes de serem sacrificados. O sacrifício foi realizado por deslocamento cervical entre as 9:00-10:00 pm para eliminar possíveis efeitos da variação circadiana. O extrato mitocondrial hepático foi obtido através do método de centrifugação diferencial (Custodio, Moreno et al. 1998) com pequenas modificações. O tecido foi recolhido e lavado em tampão contendo 250 mM Sacarose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0,1% de serum de albumina bovina deslipidificada (BSA) com pH ajustado a 7,4 com KOH. O fígado foi cortado e homogeneizado com um homogeneizador de vidro (*Potter-Elvehjem*) e com um pistão de teflon no tampão mantido a 4 °C. O homogeneizado foi posteriormente centrifugado a 800 xg durante 10 min. Posteriormente foram adicionados três volumes de meio de isolamento e a amostra foi centrifugada a 800 xg durante 10 min, 4 °C (Sigma 2-16KC). A gordura suspensa foi aspirada e o sobrenadante recolhido, o qual foi centrifugado a

10000 xg durante 10 min, 4 °C. Seguidamente, o sobrenadante foi decantado de forma a garantir que toda a gordura era recolhida e o *pellet* foi delicadamente ressuspensionado no tampão de lavagem, e novamente centrifugado a 10000 xg durante 10 min, 4 °C. Foi novamente desperdiçado o sobrenadante, e o *pellet* ressuspensionado em tampão de ressuspensão contendo 250 mM Sacarose, 10 mM de HEPES, pH=7,4. Este passo foi repetido uma vez mais. O *pellet* obtido da última centrifugação foi ressuspensionado delicadamente em 2-3 mL de meio de ressuspensão e armazenado em *ependorfs*. Todos os passos anteriormente descritos foram realizados à temperatura de 4° C. A concentração de proteína foi estimada espectrofotometricamente através do método do biureto (Gornall, Bardawill et al. 1949), utilizando BSA como proteína padrão. A suspensão mitocondrial (30-40 mg proteína/mL) foi mantida a 4 °C durante os ensaios e utilizada nas 4-5h seguintes.

#### **4.5 Avaliação da Atividade Respiratória Mitocondrial**

A função respiratória mitocondrial foi avaliada polarograficamente utilizando eletrodo de oxigénio tipo Clark (YSI) ligado a um registador (Linseis L200E). A avaliação decorreu numa câmara fechada de 1 mL mantida a uma temperatura controlada de 30° C em agitação constante. O ensaio teve início com adição de 1mg de proteína em 1 mL de tampão de reação 130 mM Sacarose, 50 mM de KCl, 5 mM HEPES, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0.1 mM EGTA, pH 7.4. Após um período de 1min de calibração, foi adicionada à suspensão glutamato/malato (G/M) com uma concentração final de 5 e 2,5 mM respetivamente. O estado 3 foi avaliado após adição de ADP (150 nmol) e que o estado 4 foi determinado após a fosforilação total de ADP adicionado. Os parâmetros de RCR - rácio entre o estado 3 e o estado 4, e do ADP/O – número de nmol de ADP fosforilado pelo natms de oxigénio (O) consumido, foram

calculados de acordo com Estabrook (1967), usando valor tabelado da solubilidade do oxigênio em água destilada a 30 °C (474  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ).

Os parâmetros associados ao consumo de oxigênio mitocondrial foram também obtidos na presença de diclofenac (15 e 25  $\mu\text{M}$ ). Num ensaio independente, foram avaliadas as alterações no consumo de oxigênio na presença e ausência de diclofenac (15 e 25  $\mu\text{M}$ ). Dessa forma, a suspensão mitocondrial (1 mg/mL) foi energizada com G/M, sendo registrado e seguido o consumo e registrado a cada 5 min durante 20 min.

#### 4.6 Avaliação do Potencial Elétrico Transmembranar Mitocondrial

O potencial elétrico transmembranar ( $\Delta\psi$ ) foi estimado com base na atividade do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio ( $\text{TPP}^+$ ) utilizando um eletrodo seletivo para  $\text{TPP}^+$  preparado no nosso laboratório de acordo com (Ascensao, Lumini-Oliveira et al. 2011) e usando como referencia um eletrodo AgCl (Tacussel, Model MI 402).

As flutuações do potencial transmembranar foram avaliadas em simultâneo com as medição do consumo de oxigênio, na ausência e presença de diclofenac (15 e 25  $\mu\text{M}$ ), em câmara aberta com o auxílio de um registador (Linseis, L200E). O ensaio foi iniciado após adição de G/M (5/2,5 mM), 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{TPP}^+$  e 1 mg/mL de proteína mitocondrial hepática em 1,1 mL de meio de reação (130 mM Sacarose, 50 mM KCl, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM HEPES, 0,1 mM EGTA, pH=7,4). O tempo gasto para fosforilar o ADP adicionado (150 nmol) denominada *lagphase*, foi obtido. O  $\Delta\psi$  foi estimado através da equação (30 °C):

$$\text{Equação 3. } \Delta\psi = 59 \times \log (v/V) - 59 \times \log (10 \Delta E / 59 - 1)$$

onde, v corresponde ao volume mitocondrial; V corresponde ao volume do meio de incubação;  $\Delta E$  corresponde à deflexão do potencial do eletrodo a partir do estado basal.

A queda do  $\Delta\psi$  foi também avaliado na ausência e presença de diclofenac (15 e 25  $\mu\text{M}$ ) no meio de reação e registrada a cada 5 min durante um registro de 15-20 min.

#### **4.7 Indução do poro de permeabilidade transitória mitocondrial**

A indução de poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM) foi avaliada, na presença e ausência de diclofenac, por espectrofotometria com base pela capacidade da mitocôndria de tolerar cálcio. O ensaio foi efetuado num espectrofotómetro Jasco V-630 e teve início com adição de 8mM de succinato e 1,5  $\mu\text{M}$  rotenona ao meio de reação (200 mM Sacarose, 10 mM HEPES, 1 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$  EGTA, pH=7,4) no qual, a suspensão mitocondrial foi adicionada posteriormente. Os parâmetros relativos à taxa e amplitude de *swelling* foram avaliados após adição de 80  $\mu\text{M}$  de cálcio nos ensaios em que não foi adicionado o diclofenac. Os ensaios em que avaliamos a ação do fármaco na indução de PPTM, o diclofenac foi adicionado após a energização com adição de 8 mM de succinato e 1,5  $\mu\text{M}$  rotenona. A taxa e amplitude de *swelling* foram avaliados 3 minutos após adição do diclofenac e 20  $\mu\text{M}$  de cálcio. Foi realizado um ensaio controlo com 1  $\mu\text{M}$  de Cyc A, um inibidor seletivo do PPTM

#### **4.8 Parâmetros de dano oxidativo mitocondrial e antioxidantes**

As suspensões mitocondriais foram submetidas a ciclos de congelamento/descongelamento logo após o seu isolamento a fim de romper as membranas mitocôndriais intactas e foram armazenadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para posteriores análises.

#### 4.8.1 Peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica nas mitocôndrias de fígado foi avaliada pela quantificação do conteúdo de MDA através de ensaio colorimétrico de acordo com o procedimento modificado (Buege and Aust 1978). O ensaio foi iniciado com adição de suspensão mitocondrial de fígado (1 mg/mL) em 150 $\mu$ L de meio (175 mM KCl e 10 mM Tris-HCl, pH=7,4). Posteriormente, foram adicionados 2 volumes de ácido tricloroacético (10%) e 2 volumes de ácido tiobarbitúrico (1%). A mistura foi aquecida a 90 °C durante 10 min e posteriormente uma centrifugada a 4000 xg durante 10 min, sendo o sobrenadante recolhido e medida a sua absorvância a 535 nm num espectrofotómetro Jasco V-630. O conteúdo de TBARS formado foi calculado usando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{535} = 1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e expressão em nmol MDA mg<sup>-1</sup> de proteína.

#### 4.8.2 Grupos Sulfidril

O conteúdo mitocondrial basal de grupos SH modificados foi quantificado através de um ensaio colorimétrico de acordo com Hu (1990). O ensaio teve início com adição da suspensão mitocondrial de fígado (2 mg/mL) ao tampão contendo 0,25 mM Tris-base (pH=8,2). De seguida adicionou-se 10 mM 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoate) (DTNB). O volume foi ajustado até 1 mL com metanol absoluto. A mistura foi incubada durante 30 min no escuro e à temperatura ambiente, protegidos da luz. Foi medida a absorvância da amostra a 414nm contra um branco num espectrofotómetro ASYS UVM 340 (Milão, Itália). O conteúdo de SH foi expresso em nmol/mg de proteína ( $\epsilon_{414} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4.8.3 Atividade de Aconitase

Para a quantificação da atividade de aconitase (EC 4.2.1.3), a fração mitocondrial (2 mg/mL) foi ressuspensa em 0,5 mL de tampão contendo 50 mM de Tris-HCl (pH=7,4) e 0,6 mM de  $MnCl_2$  e adicionado 20 mM isocitrato (EC 1.1.1.42). A atividade de aconitase foi medida espectrofotometricamente (Jasco V-630) através da formação de cis-aconitase a partir de isocitrato a 25 °C, previamente descrito por Ascensão (Ascensao, Magalhaes et al. 2005). Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de cis-aconitase por minuto ( $\epsilon_{240} = 3,6 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.8.4 Atividade de Superóxido Dismutase

A atividade da superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) dependente de magnésio foi determinada espectrofotometricamente (Jasco V-630) a 505 nm com o auxílio de um kit comercial (*RANSOD, Randox, UK*). A suspensão mitocondrial de fígado foi adicionada ao tampão fosfato (10 mM, pH=7,0) numa concentração final de 0,5 mg/mL. Seguidamente, a mistura de substrato (0,05 mmol/L xantina e 0,025 mmol/L I.N.T) e 15  $\mu$ L de amostra mitocondrial foi adicionada a placa de ELISA, e a reação foi iniciada pela adição de 75  $\mu$ L de xantina oxidase (80 U/L). A leitura foi feita após a incubação durante 3 min a 37 °C.

#### 4.8.5 Atividade da Citrato Sintetase no Músculo Soleus

A atividade da citrato sintetase (EC. 4.1,3.7) no soleus foi determinada usando o método modificado descrito por Coore, et al (1971). O princípio de ensaio consiste na reação do acetil-CoA com oxaloacetato na presença de DTNB. Os grupos tiol (SH) livres da Coenzima-A reagem com DTNB, formando DTNB-CoA e citrato. A

absorvância da amostra foi medida a 412 nm num espectrofotómetro *Thermo Scientific Multiskan GO*. O conteúdo de citrato foi expresso em nmol/min/mg de proteína ( $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **4.9 Atividade de caspases**

Uma porção de fígado foi homogeneizado em tampão (200 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, pH=7.4, 1% Triton X-100, 10% Glicerol). O homogeneizado foi centrifugado a 4000 xg durante 10 min e o sobrenadante foi recolhido, tendo sido efetuados ciclos de congelamento/descongelamento e armazenadas aliquotas a -80 °C para posterior análise.

A medição da atividade de caspases-3, 8 e 9 foi efetuada pela deteção do cromóforo pNA após a clivagem do substrato Ac-LEHD-p-nitroanilide a 405 nm, previamente descrito. O homogeneizado de fígado foi incubado num tampão de reação (25 mM HEPES, pH=7.4, 10% (w/v) Sacarose, 0,1% CHAPS, 10 mM de DTT e 100  $\mu\text{M}$  de substrato de caspase Ac (N-acetyl)-LEHD-pNA (p-nitroaniline) por 2 h a 37 °C.

#### **4.10 Semi-quantificação da expressão proteica por *Western Blotting***

Após o isolamento mitocondrial, o extrato é lisado com tampão de Laemmli 2x concentrado e  $\beta$ -mercaptoetanol, e armazenado a -80 °C para utilização posteriormente. Para a semi-quantificação do conteúdo proteico por *Western Blotting*, o lisado mitocondrial foi separado por SDS/PAGE (em gel a 12%) como descrito por Laemmli (1970) seguido por *blotting* em membranas de PVDF de acordo com o método de Locke, et al (1990). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em 5% (w/v) de leite em pó desnaturado em tampão contendo tris-base com 0,1% de Tween (TBS-T),

de forma a diminuir as ligações não-específicas. De seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anti-Bcl-2 (1:1000; #2870 *rabbit* monoclonal IgG; *Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA*), anti-Bax (1:1000; #2772 *rabbit* policlonal IgG; *Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA*), anti-CypD (1:1000; MSA04 *mouse* monoclonal IgG; *MitoSciences, Eugene, Oregon, USA*) e anti-ANT2/3 (1:500; sc-70205 *goat* policlonal, *Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA*). As membranas foram posteriormente lavadas e incubadas com os anticorpos secundários anti-*mouse* ou anti-*rabbit* (1:10000, *Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA*). As bandas das proteínas foram visualizadas após o tratamento das membranas com ECL Plus (*GE Healthcare, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK*) com o auxílio do sistema Chemidoc (*Bio-Rad Laboratories, Amadora, Portugal*) e analisadas com recurso a um *software* específico *Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Amadora, Portugal)*. A análise densitométrica foi realizada no momento imediatamente precedente à saturação do sinal. Os valores de intensidade das bandas são apresentados em unidade arbitrárias e os resultados expressos em percentagem de variação do grupo sedentário.

#### **4.11 Tratamento Estatístico**

O tratamento estatístico dos dados foi realizado recorrendo ao programa GraphPad Software, Inc (*Prism, versão 6.02 para Windows*).

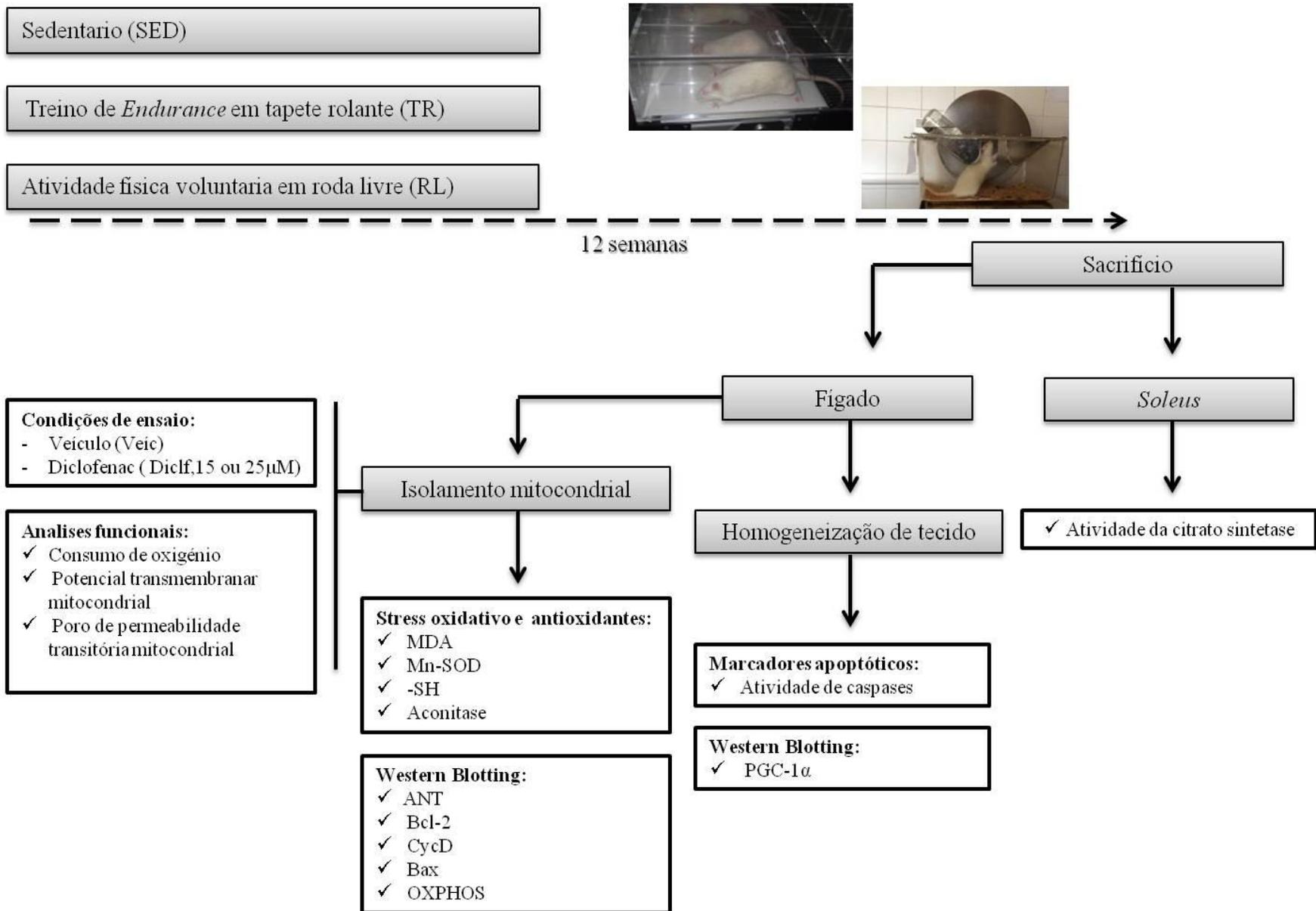
Foi calculada a estatística descritiva (a média e o erro padrão (SEM)) para todas as variáveis em estudo de cada grupo. Para comparar os grupos nas diferentes condições (com e sem a incubação com diclofenac) utilizou-se o teste *Two-Way Anova*. Para comparar as diferenças entre os ensaios em que não houve a incubação com a droga foi usado uma *One-Way Anova*. O teste utilizado para comparação de médias foi o *Bonferroni*.

As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p \leq 0.05$ .  
A interação entre o exercício físico (E) e o tratamento (T) foi também avaliado, sendo a interação considerada significativa para  $p \leq 0,05$ .



## **5. Desenho Experimental**







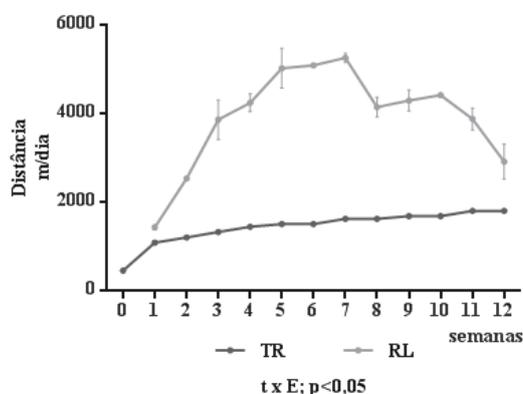
## **6. Resultados**



## 6.1 Caracterização dos animais

Os animais dos grupos exercitados foram sujeitos a 12 semanas de um protocolo de treino de *endurance* (TR) e de atividade física voluntária (RL) em tapete rolante e roda livre respetivamente. Na figura 1 podemos observar a distância percorrida pelos animais de ambos os grupos. À exceção da semana 1, os animais com acesso à roda livre percorreram significativamente mais distância que os animais do protocolo de treino de *endurance* em tapete rolante ( $p \leq 0,05$ ).

A



**Figura 1.** Distância percorrida pelos animais ao longo de doze semanas nos protocolos de TR e RL. As comparações entre grupos foram analisadas usando uma *Two-way* ANOVA, seguido do teste de *Bonferroni*. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) do efeito do exercício (E), do tempo (t) ou da sua interação (t x E) são exibidas no gráfico assim como os resultados não significativos (NS  $p > 0,05$ )

Como se pode observar na Tabela 5, o peso corporal diminuiu significativamente nos animais com acesso a roda livre. O peso do coração, bem como o seu rácio com o peso corporal, aumentaram significativamente nos grupos TR e RL. O peso do fígado diminuiu significativamente no animais com acesso a atividade física voluntária. Não existiram alterações significativas no rácio do peso de fígado/peso corporal, na concentração de proteína e no rendimento do isolamento mitocondrial.

**Tabela 5.** Efeitos do treino *endurance* em tapete rolante.(TR) e da atividade física voluntária em roda livre (RL) nos pesos corporais, coração e fígado dos ratos.

	SED	TR	RL
Peso inicial corporal (g)	207,17±3,42	206,50±5,31	213,75±2,01
Peso final corporal (g)	583,0±24,02	539,3±13,21	502,3±12,17 <sup>c</sup>
Peso coração (g)	1,39±0,04	1,92±0,08 <sup>c</sup>	1,85±0,08 <sup>c</sup>
Peso coração(g)/Peso corporal (g)	2,32±0,09	3,63±0,12 <sup>c</sup>	3,68±0,14 <sup>c</sup>
Peso Fígado (g)	13,14±0,56	12,47±0,67	10,46±0,32 <sup>c</sup>
Peso Fígado(g)/Peso corporal (g)	0,022±0,001	0,023±0,001	0,020±0,001
Proteína Mitocondrial (mg/mL)	53,44±5,11	54,76±4,40	62,94±2,88
<i>Yielding</i> mitocondrial (mg proteína/g de tecido)	4,07±0,35	4,45±0,45	6,04±0,42

Os resultados são apresentados como média ± SEM. SED – Sedentário; TR – Treino em tapete rolante; RL – Atividade física voluntária em roda livre. (c) vs. SED (p<0,05). As comparações entre grupos foram analisadas usando ANOVA (*one-way analysis of variance*) seguido do teste de Bonferroni.

## 6.2 Consumo de oxigênio mitocondrial

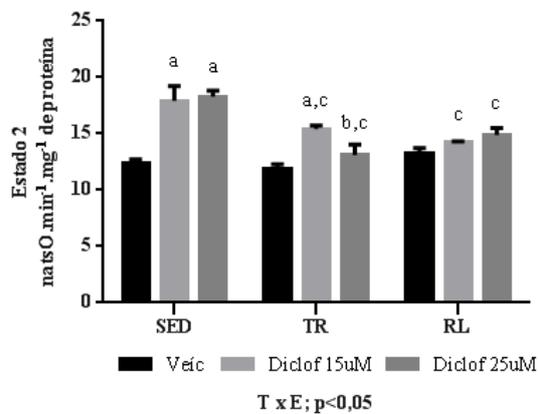
Os parâmetros relativos à respiração de mitocôndrias hepáticas energizadas com G/M são apresentados na Figura 2.

Independentemente da tipologia, o exercício físico *per se* não altera quaisquer dos parâmetros da respiração mitocondrial considerados.

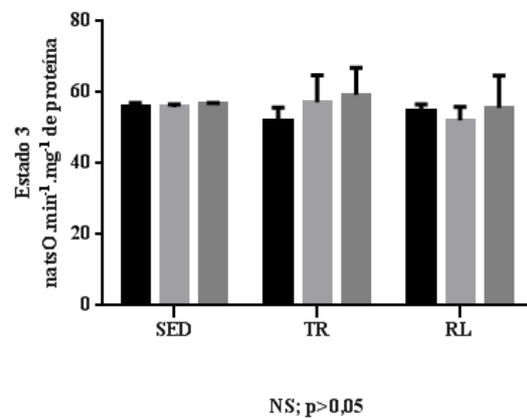
A incubação das frações mitocondriais com diclofenac aumentou significativamente a taxa respiratória em estado 2 e estado 4 em todos os grupos. Porém este aumento foi significativamente superior nos animais sedentários, o que parece indicar que o exercício físico conferiu proteção contra alguns danos mitocôndrias induzidos pelo diclofenac, independente da sua concentração. Os parâmetros respiratórios estado 3 e ADP/O não foram alterados pelo exercício físico nem pela incubação com diclofenac.

Não foram encontradas variações significativa no RCR em nenhum dos protocolos de exercício físico; contudo, este parâmetro diminuiu significativamente na presença de diclofenac em todos os grupos. Apesar desta diminuição, verificou-se que o exercício físico aumentou o RCR relativamente a condição sedentária, apenas para a incubação com 15µM de diclofenac.

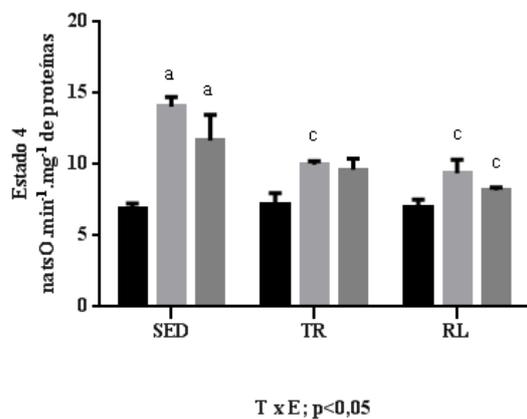
A



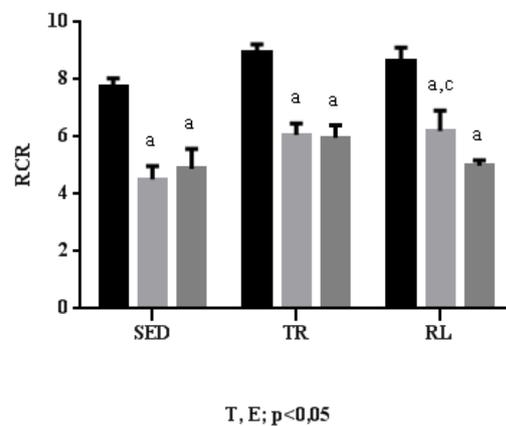
B



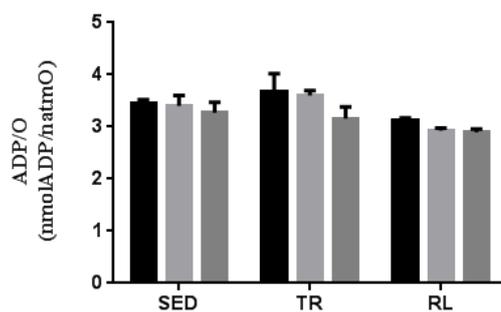
C



D



**F**



E; P<0,05

**Figura 2.** Efeito de dois tipos de exercício físico nos parâmetros associados ao consumo de O<sub>2</sub> avaliados em mitocôndrias de fígado isoladas incubadas com duas concentrações de diclofenac (15µM e 25µM). Os resultados são apresentados como média ± SEM. As taxas de consumo de oxigénio durante os estados 2, 3 e 4 são expressos em natmO/min/mg de proteína. RCR (estado3/estado4) – índice de controlo respiratório; ADP/O – número de nmol de ADP adicionado pelo consumo de oxigénio em natmO. O consumo de oxigénio foi avaliado polarograficamente a 30 °C em um eléctrodo de O<sub>2</sub> do tipo Clark como descrito na secção de materiais e métodos, num volume de 1,1mL. As mitocôndrias de fígado (1mg/mL) foram energizadas com glutamato (5mM)/ malato (2,5mM). Após a energização, as mitocôndrias foram incubadas com o diclofenac (15 e 25µM) ou veículo. Veic – veículo; Diclof – Diclofenac (15 e 25µM); SED – Sedentário; TR – Treino de *endurance* em tapete rolante; RL – Atividade física voluntária em roda livre. (a) vs. Veic (p≤0.05). (b) vs. 15µM Diclof (p≤0.05). (c) vs. SED (p≤0.05). As comparações múltiplas foram efetuadas usando ANOVA a dois fatores (*two-way analysis of variance*) seguido do teste de Bonferroni. Os efeitos significativos (p≤0,05) do do exercício (E), do tratamento (T) ou da sua interação (T x E) são exibidas no gráfico assim como os resultados não significativos (NS p > 0,05)

### 6.3 Potencial Transmembranar Mitocondrial

O potencial membranal mitocondrial foi avaliado usando G/M como substrato, encontrando-se os resultados apresentados na Tabela 6. O exercício físico (TR e RL) não alterou os parâmetros do potencial máximo e *lag phase* associada à fosforilação do ADP. Porém o TR parece ter melhorado significativamente a capacidade de

repolarização após adição de ADP, comparativamente ao grupo SED; o mesmo se verificou para o grupo RL.

Em relação ao efeito do diclofenac, o potencial máximo e a repolarização foram significativamente inferiores nos grupos SED e TR. O tratamento com diclofenac na concentração superior diminuiu o potencial máximo no grupo RL; contudo o mesmo não aconteceu para a repolarização. O TR parece ter conferido uma proteção adicional contra os efeitos nocivos induzidos pelo diclofenac para a concentração inferior.

**Tabela 6.** Efeito do treino em tapete rolante e da atividade física em roda livre nas flutuações do  $\Delta\psi$  em mitocôndrias de fígado.

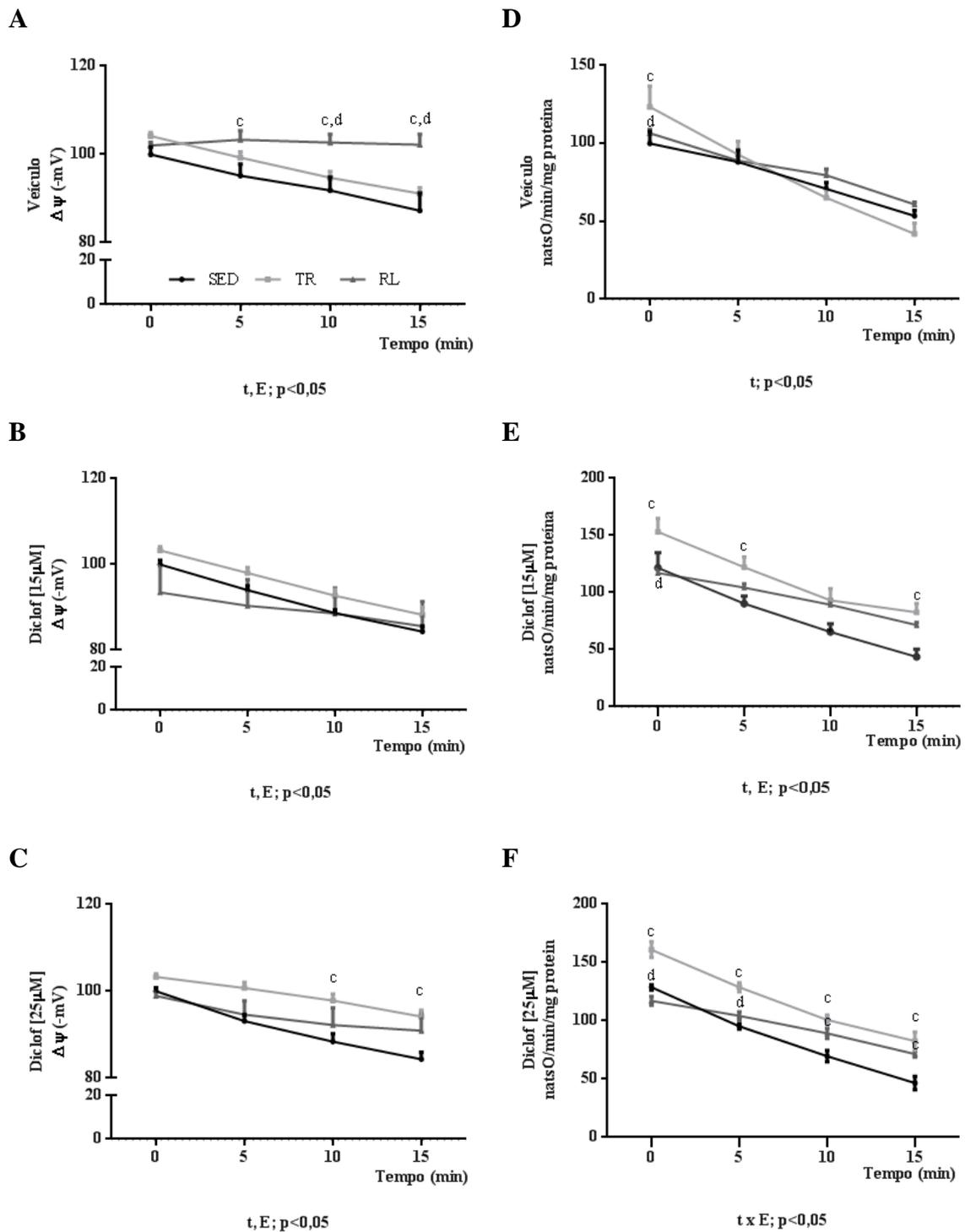
	<b>Grupos</b>	<b>Veículo</b>	<b>Diclof 15<math>\mu</math>M</b>	<b>Diclof 25<math>\mu</math>M</b>	<b>p *</b>
SED	Potencial máximo (-mV)	217,2 $\pm$ 0,91	209,70 $\pm$ 1,64 <sup>a</sup>	210,90 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	T, E
	Lag phase (s)	56,4 $\pm$ 4,78	66,8 $\pm$ 5,80	61,1 $\pm$ 3,78	E
	Repolarização (-mV)	213,10 $\pm$ 0,87	209,80 $\pm$ 2,60	211,50 $\pm$ 1,20	T x E
TR	Potencial máximo (-mV)	219,10 $\pm$ 0,75	214,00 $\pm$ 1,33 <sup>a,c</sup>	213,60 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup>	T, E
	Lag phase (s)	54,3 $\pm$ 5,03	54 $\pm$ 4,45	60,6 $\pm$ 5,48	E
	Repolarização (-mV)	218,60 $\pm$ 0,98 <sup>c</sup>	212,40 $\pm$ 1,33 <sup>a</sup>	212,90 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	T x E
RL	Potencial máximo (-mV)	216,5 $\pm$ 1,20	213,90 $\pm$ 0,83	209,60 $\pm$ 3,30 <sup>a</sup>	T, E
	Lag phase (s)	66 $\pm$ 3,72	67,5 $\pm$ 7,52	88,5 $\pm$ 9,55 <sup>a,c,d</sup>	E
	Repolarização (-mV)	214,30 $\pm$ 0,94 <sup>d</sup>	213,90 $\pm$ 0,35	210,10 $\pm$ 1,30	T x E

Os resultados do potencial máximo, *lagphase* (tempo de fosforilação do ADP) e o potencial de repolarização (capacidade da mitocôndria de restabelecer o  $\Delta\psi$  após fosforilação do ADP), avaliados em mitocôndrias de fígado, incubadas com duas concentrações de diclofenac (15 $\mu$ M e 25 $\mu$ M) ou veículo, são apresentados com média  $\pm$  SEM. As mitocôndrias de fígado (1mg/mL) foram energizadas com glutamato (5mM)/ malato (2,5mM). Após a energização, as mitocôndrias foram incubadas com o diclofenac (15 e 25 $\mu$ M) ou veículo. Veic – veículo; Diclof – Diclofenac (15 e 25 $\mu$ M); SED – Sedentário; TR – Treino de *endurance* em tapete rolante; RL

– Atividade física voluntária em roda livre. (a) vs. Veíc ( $p \leq 0.05$ ). (b) vs. 15 $\mu$ M Diclof ( $p \leq 0.05$ ). (c) vs. SED ( $p \leq 0.05$ ). (d) vs. TR ( $P \leq 0,05$ ). As comparações múltiplas foram efetuadas usando ANOVA a dois fatores (*two-way analysis of variance*) seguido do teste de Bonferroni. (\*) os resultados significativos ( $p \leq 0,05$ ) do efeito do exercício (E), do tratamento (T) ou da sua interação (T x E) são exibidos na tabela bem como os resultados não significativos (NS  $p > 0,05$ )

#### **6.4 Efeito do exercício físico na queda do $\Delta\psi$ e nas variações do consumo de $O_2$ de mitocôndrias hepáticas incubadas com diclofenac (15 e 25 $\mu$ M) e veículo ao longo do tempo (15min).**

Os resultados do potencial máximo para a condição veículo mostraram uma queda significativamente menos acentuada no grupo RL em comparação ao grupo SED. Na presença de [25 $\mu$ M] de Diclofenac (Fig. 3C), o grupo TR relativamente ao grupo SED apresentou um  $\Delta\psi$  mais elevado ao longo do tempo. Contudo, o mesmo não se verificou para a concentração inferior da droga nem para o grupo RL (Fig. 3B, C). Os valores apresentados para consumo de oxigénio ao longo do tempo sugerem que este parâmetro não é afetado pelo exercício na condição veículo. Contudo, na presença de diclofenac, o consumo de oxigénio foi significativamente superior nos primeiros 5 e aos 15 minutos para o grupo TR (Fig.3 E, F).

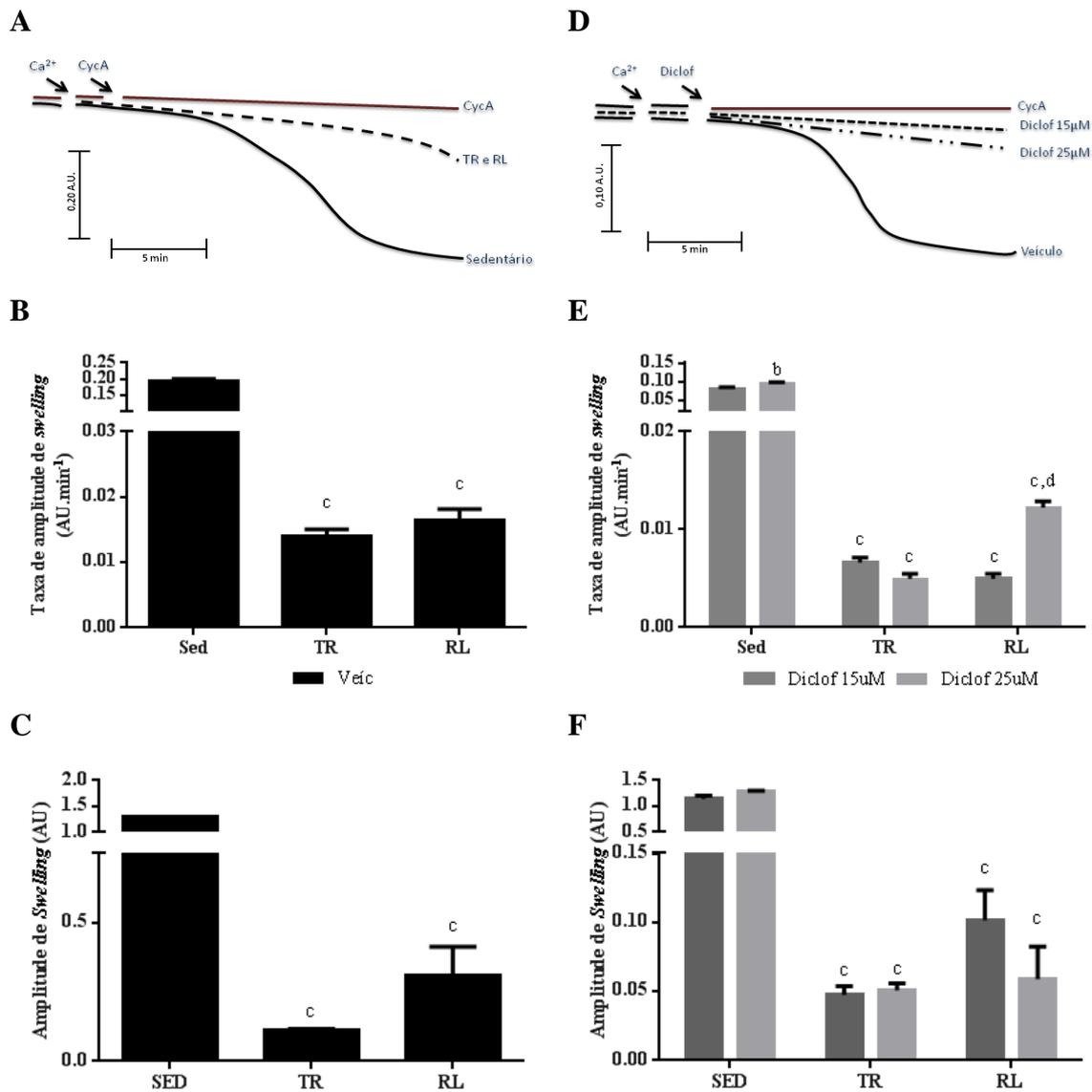


**Figura 3.** O efeito dos dois tipos de exercício físico na queda do potencial elétrico transmembranar (A-C) e no consumo de oxigênio mitocondrial (D-E) ao longo do tempo em mitocôndrias hepáticas na presença de duas concentrações (15 e 25 $\mu$ M) de diclofenac ou de veículo. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM. As mitocôndrias de fígado (1mg/mL) foram energizadas com glutamato (5mM)/ malato (2,5mM). Após a energização, as mitocôndrias foram incubadas com o diclofenac (15 e 25 $\mu$ M) ou veículo. Veíc – veículo; Diclof

– Diclofenac (15 e 25 $\mu$ M); SED – Sedentário; TR – Treino de *endurance* em tapete rolante; RL – Atividade física voluntária em roda livre. (c) vs. SED ( $p \leq 0.05$ ). (d) vs. TR ( $P \leq 0.05$ ). As comparações múltiplas foram efetuadas usando ANOVA a dois fatores (*two-way analysis of variance*) seguido do teste de Bonferroni. Os efeitos significativos ( $p \leq 0.05$ ) do exercício (E), do tempo (t) ou da sua interação (t x E) são exibidas no gráfico assim como os resultados não significativos (NS  $p > 0.05$ )

### **6.5 Suscetibilidade à abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial induzida por $Ca^{2+}$**

A suscetibilidade à abertura do PPTM foi avaliada através da análise de variação da absorvância da suspensão mitocondrial induzida por 80 nmol/mg de cálcio. Nos resultados apresentados na figura 4, podemos observar uma diminuição significativa para ambas as condições de exercício na taxa média (B) e amplitude (C) de *swelling*, o que poderá indicar que o exercício físico crônico, independentemente da tipologia, diminui a suscetibilidade à abertura do PPTM. Encontram-se descrito na literatura que o diclofenac aumenta a suscetibilidade a abertura do PPTM (Masubuchi, Nakayama et al. 2002, Gómez-Lechón, Ponsoda et al. 2003). Contudo, do nosso conhecimento, os efeitos do exercício contra este aumento em mitocôndrias hepáticas induzido pelo diclofenac não foi ainda explorado. Nesta condição, foram adicionados 20nmol/mg de cálcio. Os resultado referentes a taxa média (E) e amplitude (F) de *swelling* demonstram uma diminuição significativa em ambos os parâmetros para os grupos TR e RL comparativamente ao grupo SED. A susceptibilidade à abertura do PPTM foi inibida pela presença de CycA, um inibidor seletivo do PPTM, em todos os grupos e condições testadas.

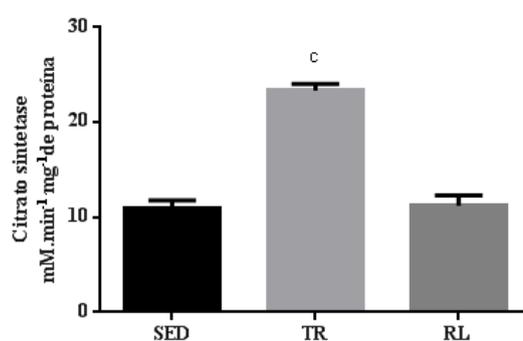


**Figura 4.** O efeito dos dois tipos de exercício físico crônico na indução do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM): **A e D**) traçado representativo dos ensaios de *swelling* 540 nm presença de veículo e de diclofenac, respectivamente; **B e C**) veículo e cálcio 80 nmol/mg e **E e F**) diclofenac (15 e 25 µM) e cálcio 20 nmol/mg. O ensaio foi seguido a 540nm. Resultados são apresentados com média ± SEM. Veíc – veículo; Diclof – Diclofenac (15 e 25µM); SED – Sedentário; TR – Treino de *endurance* em tapete rolante; RL – Atividade física voluntária em roda livre. (a) vs. Veíc ( $p \leq 0.05$ ). (b) vs. 15µM Diclof ( $p \leq 0.05$ ). (c) vs. SED ( $p \leq 0.05$ ). (d) vs. TR ( $P \leq 0,05$ ). As comparações múltiplas foram efetuadas **B e C**) usando uma ANOVA a um fator (*one-way analysis of variance*) e **E e F**) usando ANOVA a dois fatores (*two-way analysis of variance*), seguido do teste de *Bonferroni*. Os resultados significativos ( $p \leq 0,05$ ) do efeito do exercício (E), do tratamento (T) ou da sua interação (T x E) são exibidas no gráfico assim como os resultados não significativos (NS  $p > 0,05$ )

## 6.6 Efeito do exercício físico na atividade da citrato sintetase no músculo *soleus*

A análise da atividade da citrato sintetase no músculo *soleus* foi realizada de forma a avaliar a capacidade oxidativa do músculo esquelético dos animais exercitados. Os resultados mostraram que o treino de *endurance* aumentou significativamente a atividade da citrato sintetase. Este aumento não foi observado no grupo com atividade física voluntária.

A



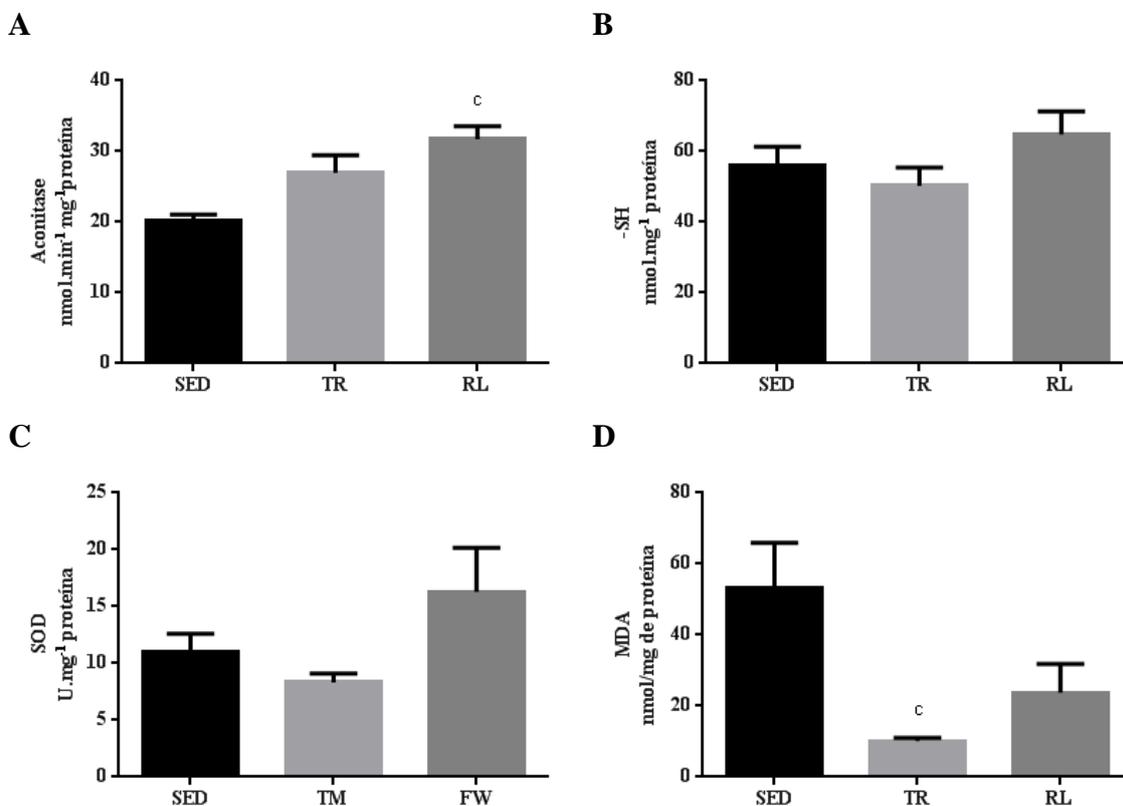
**Figura 5.** Efeitos de 2 tipos de exercício crônico na atividade mitocondrial da citrato sintetase no musculo solear (A). Resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM. SED – Sedentário; TR – Treino de *endurance* em tapete rolante; RL – Atividade física voluntária em roda livre. (c) vs. SED ( $p \leq 0,05$ ). (d) vs. TR ( $P \leq 0,05$ ). As comparações entre grupos foram analisadas recorrendo à ANOVA (*one-way analysis of variance*) seguido do teste de *Bonferroni*.

## 6.7 Efeito do exercício físico nos indicadores de stress e lesão oxidativa

A atividade da aconitase mitocondrial, uma enzima do ciclo de Krebs suscetível ao dano induzido pelo aumento de ROS, aumentou significativamente no grupo RL em relação ao grupo SED (Fig. 5A).

Em relação aos níveis MDA (Fig. 5D), observou-se uma diminuição significativa no grupo TR em relação ao grupo SED, não se verificando o mesmo para o grupo RL com significado estatístico mas apenas uma tendência para diminuir. O

conteúdo de grupos sulfidrilo (Fig. 5C) e a atividade da Mn-SOD (Fig. 5C) não foram alterados por qualquer dos modelos de exercício crônico estudados.

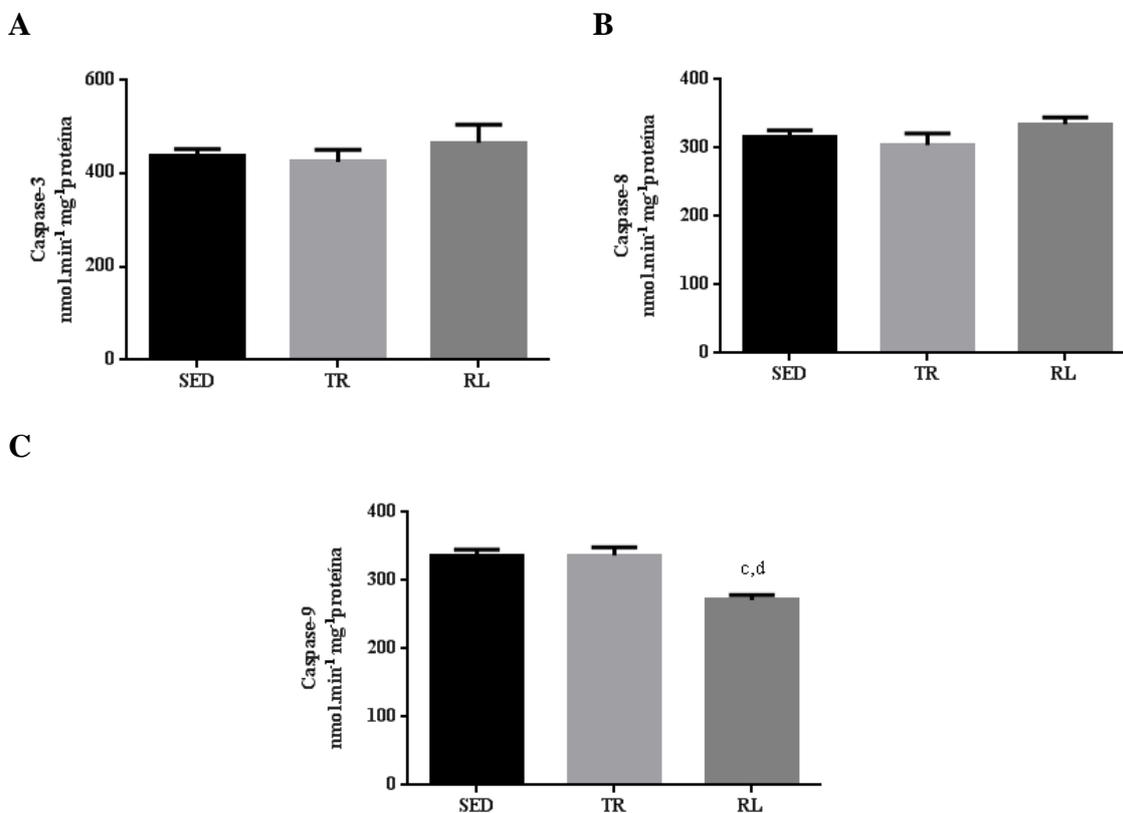


**Figura 6.** Efeitos de 2 tipos de exercício crônico na atividade mitocondrial da aconitase (A), conteúdo de grupos sulfidrilo (B), atividade da superóxido dismutase dependente do manganês (Mn-SOD, C), e conteúdo de malondialdeído (MDA, D). Resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM. SED – Sedentário; TR – Treino de *endurance* em tapete rolante; RL – Atividade física voluntária em roda livre. (c) vs. SED ( $p \leq 0.05$ ). (d) vs. TR ( $P \leq 0,05$ ). As comparações entre grupos foram analisadas recorrendo à ANOVA (*one-way analysis of variance*) seguido do teste de *Bonferroni*.

### 6.8 Efeito do exercício físico na atividade das caspases.

Relativamente à sinalização apoptótica, nomeadamente a atividade da caspase efetora (caspase-3) e iniciadoras (caspase-8 e 9). A atividade física voluntária promoveu

uma diminuição da atividade da caspase-9 em relação aos grupos SED e TR. Não foram observadas alterações nas restantes atividade nos grupos exercitados (Figura 6).

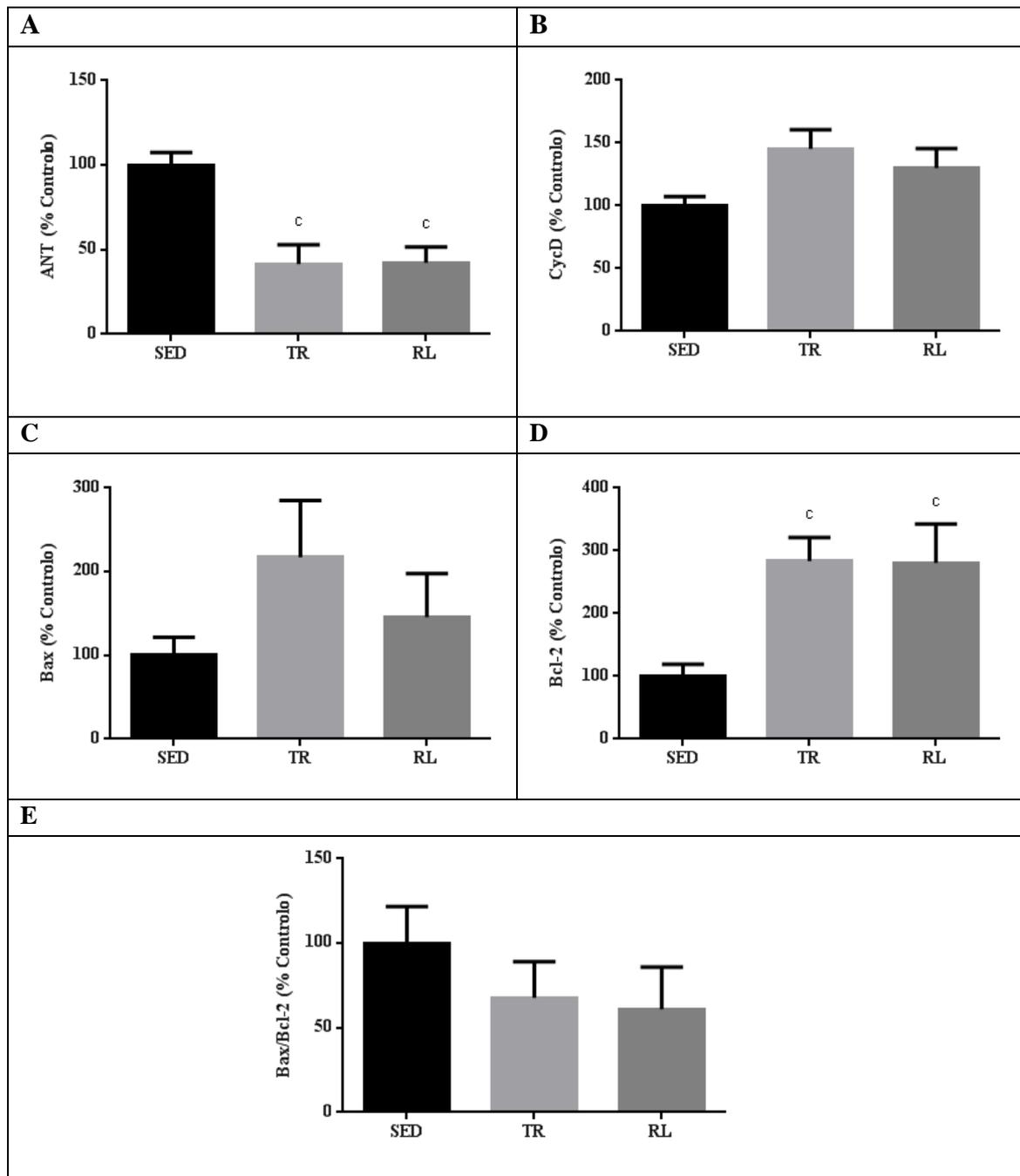


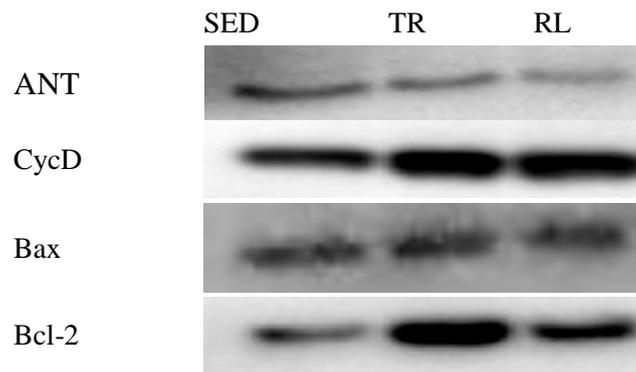
**Figura 7.** Efeito de 2 tipos de exercício crónico na atividade das caspases 3 (A), 8 (B) e 9 (C). Resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM. SED – Sedentário; TR – Treino de *endurance* em tapete rolante; RL – Atividade física voluntária em roda livre. (c) vs. SED ( $p \leq 0.05$ ). (d) vs. TR ( $P \leq 0,05$ ). As comparações entre grupos foram analisadas com recurso à ANOVA (*one-way analysis of variance*) seguido do teste de *Bonferroni*.

### 6.9 Efeito do exercício físico na expressão de ANT, CycD, Bcl-2 e Bax.

Foram semi-quantificadas proteínas associadas ao PPTM (ANT e CycD), e proteínas envolvidas na sinalização apoptótica mitocondrial como as pró- e anti-apoptóticas Bax e Bcl-2, respetivamente.

As doze semanas de treino e atividade física promoveram uma diminuição do conteúdo de Bcl-2 (Fig. 7D) e de ANT (Fig. 7A). Não foram encontradas alterações significativas no conteúdo de CycD e Bax (Fig.7B e C). O rácio entre proteínas pro e anti-apoptóticas (Fig.7E) também não foi alterado.





**Figura 8.** Efeito de 2 tipos de exercício crónico na semi-quantificação de proteínas associadas ao PPTM (A, B) e resposta apoptótica (C, D). Os *Western blots* representativos do ANT, CycD, Bax e Bcl-2 são apresentados para cada grupo. Resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM. SED – Sedentário; TR – Treino de *endurance* em tapete rolante; RL – Atividade física voluntária em roda livre. (c) vs. SED ( $p \leq 0.05$ ). (d) vs. TR ( $P \leq 0,05$ ). As comparações entre grupos foram analisadas com recurso à ANOVA (*one-way analysis of variance*) seguido do teste de *Bonferroni*.

## **7. Discussão dos Resultados**



## 7.1 Síntese dos principais achados

O interesse no estudo dos efeitos do exercício físico no contexto das diferentes doenças hepáticas tem sido emergente. Efetivamente, alguns estudos têm revelado que um estilo de vida inativo com ausência de prática de atividade física se traduz num fenótipo hepático mais suscetível às consequências deletérias associadas às complicações metabólicas (Rector and Thyfault 2011). Contudo, o papel do exercício nas alterações nefastas causadas pelo consumo de agentes farmacológicos tem sido menos estudado. No presente estudo, foram utilizadas mitocôndrias isoladas como modelo toxicológico para testar a hipótese de que os programas de TR e RL mitigam as consequências deletérias do diclofenac, uma NSAID amplamente utilizada. Os nossos resultados mostraram pela primeira vez que ambos os modelos de exercício atenuaram a disfunção mitocondrial hepática induzida pelo diclofenac, observadas nos parâmetros associados ao consumo de oxigénio e ao PPTM. Estas melhorias funcionais foram acompanhadas por adaptações favoráveis em marcadores de stress oxidativo e sinalização apoptótica avaliados em condições basais, embora sem alterações significativas na expressão de algumas proteínas associadas à composição/regulação do PPTM.

Apesar dos mecanismos subjacentes a este fenótipo aparentemente protetor não se encontrarem ainda esclarecidos, as alterações na homeostasia redox, nas quais a sinalização sistémica associada a mediadores inflamatórios e hormonais parece ter um papel relevante na remodelação hepática. Adicionalmente, o exercício crónico exerce efeitos benéficos que excedem a adaptação no tecido muscular estriado, provavelmente via nervos aferentes mecanosensitivos e libertação de  $\beta$ -endorfinas nos fluidos corporais que promovem alterações mitocondriais nos diferentes órgãos, incluindo o fígado

(Boveris and Navarro 2008, Little, Safdar et al. 2011). Em termos gerais, o fenótipo protetor das mitocôndrias hepáticas induzido pelo exercício contra os efeitos colaterais do diclofenac está de acordo com dados recentes do nosso grupo, nos quais a disfunção mitocondrial decorrente da ação do salicilato foi antagonizada por 5 semanas de treino de *endurance* em tapete rolante (Ascensao, Goncalves et al. 2012).

## 7.2 Discussão da metodologia

O diclofenac tem vindo a ser descrito como um indutor de hepatotoxicidade (Gomez-Lechon, Ponsoda et al. 2003, Mueller, Müller-Vieira et al. 2012), sendo que um dos mecanismos apontados para este dano é a disfunção mitocondrial. Alguns resultados mostram que o diclofenac altera a homeostase do  $Ca^{2+}$  citosólico, aumentando a susceptibilidade a abertura de PPTM, com consequente libertação de proteínas pro-apoptóticas (Masubuchi, Nakayama et al. 2002, Lim, Lim et al. 2006, Siu, Pun et al. 2008), mecanismos que, por sua vez, contribuem para incrementar os níveis de sinalização apoptótica nos hepatócitos.

Além de algumas estratégias farmacológicas, uma das formas sugeridas para aumentar a resistência do tecido hepático contra diversas condições nefastas a que está submetido, das quais são exemplo a sobrecarga associada às denominadas doenças metabólicas e a toxicidade induzida por drogas, parece ser o exercício físico. Esse hipotético fenótipo mais resistente à agressão decorrente do aumento dos níveis de atividade física parece estar associado, maioritariamente, a modificações de origem sistémica, indutoras de remodelação adaptativa do tecido hepático, aumentando assim, a sua resistência contra diversas condições fisiopatológicas. Desta forma, um estudo realizado por Rector, Thyfault et al. (2008) em ratos OLETF (modelo de obesidade e diabetes tipo II) revelou que a atividade física realizada em roda livre atenuou a

progressão da esteatose hepática, sendo que os mecanismos apontados para esta proteção incluem o incremento da oxidação hepática de ácidos gordos e a diminuição da atividade de enzimas chave ligadas a síntese de ácidos gordos. Estes resultados sugerem que a resistência adicional promovida pelo exercício físico crónico no tecido hepático, incluindo alterações na funcionalidade mitocondrial, parece ter um papel importante nos mecanismos associados às alterações metabólicas. Assim, no nosso estudo, optámos pela análise do efeito do exercício físico contra a toxicidade mitocondrial hepática *in vitro* induzida pelo diclofenac recorrendo a mitocôndrias isoladas como modelo de estudo da referida toxicidade e disfunção. Adicionalmente, na tentativa de que o desenho experimental possuísse uma validade ecológica mais elevada, foram criadas três condições que visam mimetizar um programa estruturado de treino (TR), a atividade física voluntária habitual (RL) e uma condição controlo sedentária (SED), esta última com limitações no modelo animal, em particular, nos que utilizaram ratos *wild-type*. Efetivamente, alguns trabalhos têm sugerido os modelos com acesso livre à prática regular de atividade física como controlos mais ajustados a esta estirpe, sendo que o SED uma condição experimental com estímulo adicional na ausência de sobrecarga mecânica e metabólica (Figueiredo, Powers et al. 2009)

De uma forma clássica, a efetividade dos programas de exercício crónico, nomeadamente os considerados no nosso estudo (TR e RL), é genericamente controlada através da análise de alguns indicadores fisiológicos, nos quais se incluem a atividade muscular e esquelética de enzimas oxidativas, o peso de órgãos como o coração e também a relação entre o peso dos órgãos e o peso corporal. Os resultados do nosso estudo revelaram que a atividade da citrato sintetase, enzima do ciclo de Krebs usualmente doseada para expressar/estimar alterações metabólicas, morfológicas e funcionais mitocondriais, aumenta no grupo TR, confirmando a efetividade do

programa de treino na indução da referida adaptação (Noble, Moraska et al. 1999, Ascensao, Magalhaes et al. 2005, Ascensao, Ferreira et al. 2006, Li, Muhlfield et al. 2011, Lumini-Oliveira, Magalhaes et al. 2011). Contudo, este incremento de atividade da citrato sintetase no músculo solear não foi observado no grupo RL, o que está de acordo com estudos anteriores (Noble, Moraska et al. 1999). É possível que as diferenças de intensidade entre os dois modelos de incremento de atividade física possam justificar esta ausência de resposta na atividade desta enzima no grupo RL.

Complementarmente, avaliámos os pesos dos fígados e coração, bem como a sua relação com o peso corporal dos animais. Neste sentido, e de acordo com a literatura (Ascensao, Magalhaes et al. 2005, Ascensao, Ferreira et al. 2006, Lumini-Oliveira, Magalhaes et al. 2011), verificou-se um incremento, do rácio peso coração/peso corporal nos grupos exercitados, indicativo, de uma forma geral, da efetividade dos programas na indução de adaptações cardiovasculares que deles decorrem. Apesar da tendência para diminuição do rácio peso fígado/peso corporal nos grupos exercitados por diminuição do peso corporal, não se observam diferenças significativas entre os grupos.

Em suma, estes indicadores suportam a efetividade dos dois modelos de exercício crónico, principalmente do TR, na indução de adaptações metabólicas a nível muscular esquelético bem como do ponto de vista cardíaco.

## **7.2 Efeito do diclofenac nas mitocôndrias hepáticas**

As alterações na funcionalidade mitocondrial, em geral, têm consequências diretas na integridade e funcionalidade dos tecidos e órgãos que integram. No caso específico do tecido hepático, mitocôndrias funcionais são fundamentais para a

produção de energia através do sistema fosforilativo, para sinalização redox-dependente e regulação dos destinos celulares, tornando-se imperativas na homeostase da função hepática. Desta forma, a funcionalidade mitocondrial apresenta-se como um modelo amplamente utilizado e com inúmeras vantagens para o estudo da ação tóxica de alguns fármacos.

A hepatotoxicidade causada pelo consumo de diclofenac tem sido amplamente reportada (Gomez-Lechon, Ponsoda et al. 2003, Mueller, Müller-Vieira et al. 2012). Das alterações induzidas pelo diclofenac ao nível mitocondrial, podemos destacar a dissipação do potencial transmembranar (Masubuchi, Nakayama et al. 2002, Lim, Lim et al. 2006), o desacoplamento da membrana interna mitocondrial associada à estimulação do estado 2 e 4, com consequente diminuição do índice de controlo respiratório (Petrescu and Tarba 1997), modificações no controlo da homeostase do ião  $Ca^{2+}$ , aumentando a susceptibilidade a abertura de PPTM e consequente libertação de proteínas pro-apoptóticas (Masubuchi, Nakayama et al. 2002, Lim, Lim et al. 2006, Siu, Pun et al. 2008). Estes mecanismos contribuem para o comprometimento da função mitocondrial hepática pela ação do diclofenac tendo consequências nefastas na estrutura e função dos hepatócitos.

De acordo com dados anteriormente publicados, os resultados do nosso estudo relativos ao consumo de oxigénio após a incubação com diclofenac revelam um aumento significativo do estado 2 e 4 com consequente diminuição do índice de controlo respiratório para ambas as concentrações de diclofenac estudadas (Fig.2), sugerindo que o diclofenac induz o desacoplamento da respiração basal e após a completa fosforilação de ADP. Tem sido igualmente descrito que o diclofenac compromete o funcionamento do sistema fosforilativo mitocondrial interagindo com a ATPase (Ponsoda, Bort et al. 1995, Moreno-Sanchez, Bravo et al. 1999) e/ou através da

interação com diversas proteínas do complexo III e IV da CTE (van Leeuwen, Orij et al. 2011), podendo ser sugerido um comprometimento da capacidade fosforilativa durante o estado 3. Contudo, nenhuma das concentrações estudadas induziu diminuição da taxa de consumo de oxigênio estimulado pela presença de ADP. Paralelamente, os nossos resultados sugerem que a diminuição da atividade respiratória é acompanhada pela diminuição do  $\Delta\psi$ , independentemente da concentração de diclofenac utilizada (Tabela 6). A este respeito, Masubuchi, Nakayama et al. (2002) mostrou que a diminuição de  $\Delta\psi$  induzida pelo diclofenac foi revertida por antioxidantes (por exemplo DPPD) e por Cyc A, mostrando que o declínio do  $\Delta\psi$  está relacionado com o aumento da produção de ROS e com o aumento da susceptibilidade à abertura do PPTM. Em suma e de acordo com a literatura, o nosso estudo confirma que o diclofenac *per se* altera a funcionalidade mitocondrial hepática comprometendo o consumo de oxigênio e o  $\Delta\psi$  mitocondrial.

O aumento da suscetibilidade para a abertura do PPTM e consequente libertação e ativação de proteínas pró-apoptóticas é considerado, por diversos autores como um dos eventos mais importantes pelos quais o diclofenac induz toxicidade mitocondrial hepática (Masubuchi, Nakayama et al. 2002, Kudo, Kori et al. 2003, Ng, Vincent et al. 2006, Siu, Pun et al. 2008).

Masubuchi, Nakayama et al. (2002) observaram que a amplitude de *swelling* em mitocôndrias hepáticas é dependente da concentração de diclofenac utilizada. No mesmo sentido, os nossos resultados mostram que o diclofenac aumenta a taxa e amplitude de *swelling* de forma proporcional à concentração (Fig. 4E e F). Adicionalmente, a menor expressão dos parâmetros de *swelling* estudados verificada após adição de Cyc A no meio revelam que as alterações induzidas pelo  $\text{Ca}^{2+}$  devem-se essencialmente à abertura do PPTM, sendo que o diclofenac aumenta a susceptibilidade

deste complexo multiproteico a uma conformação favorável à sua abertura. De facto, tem sido sugerido que o diclofenac promove alterações conformacionais no PPTM o que leva à sua abertura e conseqüente libertação de proteínas apoptóticas (González-Martin, Domínguez et al. 1997, Siu, Pun et al. 2008). A maior susceptibilidade ao PPTM induzido pelo diclofenac, pode também explicar os resultados funcionais obtidos, uma vez que a dissipação do  $\Delta\psi$ , com concomitante comprometimento da funcionalidade da CTE, está associado à abertura deste complexo proteico (Masubuchi, Nakayama et al. 2002).

Por fim, enfatizamos que a incubação do diclofenac foi efetuada *in vitro* em mitocôndrias isoladas de tecido hepático, o que não nos permite analisar alterações no conteúdo e funcionalidade proteica, na atividade de proteínas associadas à sinalização apoptótica e alterações oxidativas hipoteticamente induzidas por este fármaco *in vivo*.

### **7.3 Efeito isolado do treino de *endurance* em tapete rolante e da atividade física voluntária em roda livre nas mitocôndrias hepáticas**

O exercício físico crónico está associado a diversas adaptações fisiológicas e metabólicas a nível sistémico que resultam em alterações celulares e teciduais, incluindo melhorias consistentes na função mitocondrial, capazes de conferir proteção ou mesmo assumir um carácter terapêutico contra diversas fisiopatologias. Estas adaptações sistémicas parecem ter importantes repercussões não só nos tecidos musculares esquelético e cardíaco, mas também ao nível do tecido hepático, particularmente na melhoria da funcionalidade mitocondrial. Contudo, os efeitos do exercício físico crónico na função mitocondrial hepática não são todos concordantes. Enquanto alguns estudos sugerem que o exercício induz uma diminuição da quantidade de citocromo c

citossólico (Quiles, Huertas et al. 2001), melhorias no perfil lipídico mitocondrial (Quiles, Huertas et al. 1999, Quiles, Huertas et al. 2001), uma regulação favorável na peroxidação lipídica mitocondrial e na alteração oxidativa de proteínas (Navarro, Gomez et al. 2004, Navarro, Lopez-Cepero et al. 2008), outros referem que o exercício físico regular não induz melhorias significativas na função mitocondrial (Venditti and Di Meo 1996, Terblanche, Gohil et al. 2001).

Os nossos resultados sugerem que nem o protocolo de treino de *endurance* nem a atividade física voluntária promovem alterações ao nível do consumo de oxigénio e flutuações  $\Delta\psi$  nas mitocôndrias hepáticas em condições “veículo” controlo (i.e. sem diclofenac). Contrariamente, resultados publicados pelo nosso grupo e outros (Tate, Wolkowicz et al. 1982, Ascensao, Goncalves et al. 2012, Lima, Stamm et al. 2013), mostraram que o treino de *endurance* em tapete rolante, diminuiu o estado 3 e 4 em mitocôndrias hepáticas, associado a um aumento do  $\Delta\psi$ . Possíveis divergências metodológicas associadas à estirpe dos animais utilizados no estudo e ao protocolo de treino de *endurance* realizado, poderão estar na génese da discrepância dos resultados obtidos no presente estudo.

Paralelamente, o estudo da queda de potencial ao longo do tempo poderá fornecer a informação adicional sobre o (des)acoplamento da respiração mitocondrial induzido *in vitro* pelo diclofenac e de que forma cada um dos modelos crónicos de exercício poderão ter uma ação modeladora sobre esse desacoplamento. Os nossos resultados sugerem uma queda de  $\Delta\psi$  significativamente menos acentuada no grupo RL, o que parece indicar que a atividade física voluntária limita o referido desacoplamento. Contudo, esta menor diminuição não foi acompanhada por uma diminuição do consumo de oxigénio ao longo do tempo, bem como dos níveis de peroxidação lipídica mitocondrial.

Dado o potencial do exercício físico na modelação dos sistemas de defesa antioxidante, bem como do seu hipotético efeito na regulação da produção de ROS, uma das questões abordadas com frequência nos estudos sobre os efeitos do exercício físico centra-se na relação entre a atividade pró-oxidativa e antioxidante. Tem sido descrito que o exercício físico aumenta o consumo de oxigénio para colmatar o aumento das exigências energéticas, aumentando, desta forma, a produção de ROS e consequentemente de stress e lesão oxidativos em diversos tecidos. Para além do seu papel deletério nas estruturas celulares, nomeadamente pela interação com fosfolípidos, proteínas e ácidos nucleicos, é importante salientar que os ROS poderão assumir um papel fundamental na ativação de vias de sinalização associadas à síntese de moléculas antioxidantes e anti-apoptóticas. Efetivamente, tem sido sugerido que uma das modificações associadas a atividade física regular ao nível celular é a homeostase redox (Radak, Chung et al. 2004, Radak, Chung et al. 2008). Apesar de controversos, diversos estudos abordam o efeito do exercício físico na relação pró-oxidativa/antioxidante no tecido hepático o que poderá ser determinante no possível papel do exercício físico contra os efeitos de algumas patologias e/ou de drogas indutoras de stress oxidativo a nível hepático (Rector, Thyfault et al. 2008, da Luz, Frederico et al. 2011, Ascensao, Goncalves et al. 2012).

Os resultados do presente estudo sugerem uma diminuição nos marcadores de stress oxidativo nos grupos exercitados. Efetivamente, verificou-se um aumento significativo da atividade de aconitase (Fig. 4A) no grupo RL, uma enzima do ciclo de Krebs suscetível ao stress oxidativo e utilizada frequentemente como um indicador indireto da produção do anião superóxido. O aumento da sua atividade sugere que o exercício voluntário diminuiu o stress oxidativo mitocondrial hepático, não tendo sido detetadas neste grupo alterações nos restantes indicadores avaliados. Relativamente ao

treino de *endurance* em tapete rolante, verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo de MDA (Fig. 4D) mas não se verificaram alterações nos restantes parâmetros indicadores de lesão e stress oxidativo. Embora exista uma tendência para o aumento da atividade de aconitase no grupo TR e para uma diminuição do conteúdo de MDA no grupo RL, os resultados não foram significativos. Como referido anteriormente, uma das explicações apontadas em alguns estudos para a diminuição do stress oxidativo com exercício físico regular prende-se com uma sobre-regulação dos mecanismos antioxidantes (Ascensao, Lumini-Oliveira et al. 2011, Lumini-Oliveira, Magalhaes et al. 2011). Um estudo recente analisou o efeito do exercício crónico na regulação de antioxidantes, incluindo a Mn-SOD e outros não avaliados no presente estudo como o conteúdo de GSH. Os autores verificaram que o treino regular aumenta o conteúdo mitocondrial hepático de GSH, o rácio GSH/GSSG e atividade de Mn-SOD com consequente diminuição do conteúdo de TBARS (Lima, Stamm et al. 2013). Contrariamente, alguns estudos mostram que o treino não altera a atividade antioxidante do tecido hepático (Tiidus and Houston 1994, Gul, Laaksonen et al. 2002). Do nosso conhecimento, não existem muitos estudos que reportem o efeito da atividade física voluntária *per se* neste tipo de indicadores em condições de ausência de patologia. Alguns estudos do efeito do exercício contra o efeito nefasto de patologias (Rector, Thyfault et al. 2008, Rector, Uptergrove et al. 2011) mostram que a atividade física voluntária em ratos OLEFT promove um aumento da capacidade mitocondrial de oxidar ácidos gordos, acompanhado de diminuição dos níveis de lesão oxidativa.

Como referido anteriormente, um outro evento associado a variações dos níveis de ROS e à sobrecarga de  $Ca^{2+}$  é a abertura do PPTM e a modelação da sinalização apoptótica. É sugerido que, em resposta ao exercício físico regular, as mitocôndrias de tecidos como os músculos esquelético e cardíaco mostrem sinais adaptativos positivos,

diminuindo a sinalização apoptótica (Lee, Shyu et al. , Lee, Min et al. 2012, McMillan, Graham et al. 2012). Entre outras adaptações, destacam-se a redução dos níveis de citocromo c citosólico; redução de AIF nuclear, aumento do conteúdo de Bcl-2 e diminuição de Bax, aumento da expressão de HSP70 e diminuição de Fas. Estudos em tecido hepático (Thyfault, Rector et al. 2009, Ascensao, Goncalves et al. 2012) mostram uma diminuição da atividade de caspase-8 em resposta a 5 semanas de treino de *endurance* em tapete rolante e uma diminuição de citocromo c em ratos criados seletivamente com uma capacidade aeróbica baixa. Estes dados permitem-nos sugerir que ambos os protocolos de exercício físico estudados possam promover alterações no sistema oxidativo e na sinalização apoptótica do tecido hepático. Os nossos resultados mostram uma diminuição da atividade da caspase-9, acompanhada de um aumento significativo do conteúdo de Bcl-2 no grupo RL, o que parece (Radak, Chung et al. 2004, Nakamoto, Kaneko et al. 2007, Ascensao, Oliveira et al. 2012) sugerir, que o exercício físico regular promove adaptações benéficas nos sistemas anti-apoptóticos.

Os resultados do nosso trabalho mostram uma diminuição significativa da susceptibilidade à abertura do PPTM nos grupos TR e RL (Fig. 4B e C). Esta diminuição da suscetibilidade à abertura do PPTM em condições controlo (i.e. sem diclofenac), vem contrariar alguns dos resultados disponíveis na literatura que mostram que o treino de *endurance* (Ascensao, Oliveira et al. 2012) não altera a susceptibilidade ao PPTM em mitocôndrias hepáticas. Alargando a pesquisa a outros tecidos, nomeadamente ao músculo esquelético, alguns trabalhos parecem sugerir que o treino induz um aumento da susceptibilidade ao PPTM (Lumini-Oliveira, Magalhaes et al. 2011). Parece-nos que serão necessários estudos adicionais no sentido de melhor compreender a resposta mitocondrial de vários tecidos à indução do PPTM por sobrecarga de  $Ca^{2+}$ .

Inesperadamente, os nossos resultados mostram uma diminuição da expressão da isoforma hepática de ANT para os grupos exercitados. É sugerido que ANT tem um duplo papel na bioenergética mitocondrial, nomeadamente a sua determinante função na translocação de ADP/ATP e síntese de ATP e a sua hipotética participação na formação do PPTM (Zoratti and Szabò 1995, Duchen and Szabadkai 2010). Este resultado não vai de encontro aos resultados funcionais obtidos anteriormente o que sugere que seriam necessários mais estudos, como outras abordagens, para discutir e interpretar o significado desta diminuição da expressão de ANT com o exercício crónico. Em suma, os resultados obtidos sugerem que 12 semanas de exercício físico *per se* parecem promover alterações positivas no consumo de oxigénio mitocondrial, nos indicadores de lesão oxidativa e na sinalização apoptótica.

#### **7.4. Efeito do exercício físico contra a toxicidade *in vitro* induzida pelo diclofenac**

Dada a toxicidade mitocondrial hepática induzida pelo diclofenac, é premente o estudo de estratégias preventivas e terapêuticas capazes de mitigar os seus efeitos adversos. Neste sentido, o exercício físico regular tem demonstrado ser capaz de promover adaptações mitocondriais hepáticas que incluem o aumento da biogénese e a síntese de novos componentes da cadeia transportadora de eletrões de forma a responder ao aumento das exigências energéticas (Mikami and Kitagawa 2006, Sun, Shen et al. 2010, Haase, Ringholm et al. 2011). Desta forma, é possível sugerir que o exercício físico é capaz de atenuar a toxicidade mitocondrial hepática induzida pelo diclofenac. De facto, os resultados apresentados em seguida sugerem que ambos os modelos de exercício físico crónico estudados neste trabalho promovem um aumento da resistência mitocondrial à ação do fármaco, diminuindo desta forma o seu efeito tóxico.

Na sequência do anteriormente referido, os nossos resultados mostram uma diminuição do estado 2 e 4 para ambas as concentrações de diclofenac para os grupos TR e RL em comparação com o grupo SED. Contudo, o consequente aumento do RCR apenas se verificou significativo no grupo RL para 15 $\mu$ M de diclofenac (Fig.5). Apesar de, do nosso conhecimento, não existir nenhum estudo que utilize qualquer um dos modelos de exercício físico estudados no nosso trabalho para contrariar os efeitos adversos do diclofenac, Ascensao, Goncalves et al. (2012) observaram que 5 semanas de treino de *endurance* mitigaram o aumento do estado 2 induzido pelo salicilato, uma NSAID que promove toxicidade hepática com origem mitocondrial. Contrariamente ao esperado, os dois tipos de exercício físico estudados não alteraram o efeito do diclofenac no  $\Delta\psi$  máximo desenvolvido. Contudo, esta ausência de alterações no  $\Delta\psi$  poderá estar de acordo com o estudo de Lim, Lim et al. (2006) que observa que mesmo na presença de inibidores de PPTM, a diminuição do  $\Delta\psi$  causada por diclofenac não foi restaurada. Uma possível justificação para a não modificação do  $\Delta\psi$  decorrente do diclofenac por ação terapêutica ou preventiva, poderá estar associada à amina secundária (difenilamina) presente na estrutura molecular do diclofenac que promove um desacoplamento com diminuição do  $\Delta\psi$  mitocondrial (Boelsterli 2003) Os resultados relativos à queda do  $\Delta\psi$  (Fig 3. B,C) e do consumo de oxigénio (Fig 3. E, F) ao longo do tempo mostram uma queda significativamente menor no grupo TR comparativamente com os restantes (RL e SED) sugerindo, uma vez mais, que o efeito nefasto do diclofenac nos parâmetros respiratórios das mitocôndrias hepáticas é minimizado pelo exercício de endurance.

De forma a avaliar a susceptibilidade à abertura do PPTM induzida pela incubação com diclofenac, as mitocôndrias foram incubadas uma vez mais tendo em conta o balanço cinético das vias de entrada (MCU) e saída de  $Ca^{2+}$ . Uma vez que a

intenção do estudo é avaliar a toxicidade do diclofenac na susceptibilidade ao PPTM mitocondrial dos animais exercitados, as mitocôndrias foram incubadas com 20 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína. Uma concentração igual ao  $V_{\text{máx}}$  combinado das vias de efluxo que é de cerca de 20 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína, assumindo desta forma a relação entre a concentração fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  e o *swelling* induzido pelo diclofenac. Os dados mostram uma diminuição da taxa e amplitude de *swelling* nos grupos TR e RL em ambas as concentrações de diclofenac (Fig 4. E e F). Tendo em consideração os resultados obtidos para o exercício físico, podemos sugerir que a evidente diminuição do stress oxidativo (diminuição da atividade de aconitase no grupo RL e diminuição do conteúdo de MDA no grupo TR) bem como o aumento do conteúdo de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) em ambos os grupos exercitados, poderá estar associado à melhoria na resposta observada na susceptibilidade à abertura do PPTM induzida por diclofenac nos mesmos grupos.

## **8. Conclusões**

- ✓ Os nossos resultados confirmam que o diclofenac afeta a bioenergética mitocondrial hepática.
- ✓ Ambos os modelos de exercício crônico estudados não induziram, *per se*, alterações significativas na funcionalidade mitocondrial hepática avaliadas através de parâmetros associados ao consumo de oxigênio e potencial elétrico transmembranar.
- ✓ O exercício físico crônico aumenta a resistência das mitocôndrias de fígado à sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ -indutor de abertura do PPTM, na presença e ausência de diclofenac.
- ✓ É possível que o fenótipo protetor encontrado esteja associado à diminuição dos níveis de stress oxidativo e da sinalização apoptótica.

## **9. Bibliografia**



Abraham, M. C. and S. Shaham (2004). "Death without caspases, caspases without death." Trends Cell Biol **14**(4): 184-193.

Adams, J. M. and S. Cory (2001). "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family." Trends Biochem Sci **26**: 61-66.

Amin, A. and A. A. Hamza (2005). "Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: a possible role of DNA fragmentation." Toxicology **208**(3): 367-375.

Arundel, C. and J. H. Lewis (2007). "Drug-induced liver disease in 2006." Current opinion in gastroenterology **23**(3): 244-254.

Ascensao, A., R. Ferreira and J. Magalhaes (2007). "Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria." International journal of cardiology **117**(1): 16-30.

Ascensao, A., R. Ferreira, P. J. Oliveira and J. Magalhaes (2006). "Effects of endurance training and acute Doxorubicin treatment on rat heart mitochondrial alterations induced by in vitro anoxia-reoxygenation." Cardiovascular toxicology **6**(3-4): 159-172.

Ascensao, A., I. O. Goncalves, J. Lumini-Oliveira, I. Marques-Aleixo, E. Dos Passos, S. Rocha-Rodrigues, N. G. Machado, A. C. Moreira, P. J. Oliveira, J. R. Torrella and J. Magalhaes (2012). "Endurance training and chronic intermittent hypoxia modulate in vitro salicylate-induced hepatic mitochondrial dysfunction." Mitochondrion.

Ascensao, A., I. O. Goncalves, J. Lumini-Oliveira, I. Marques-Aleixo, E. Dos Passos, S. Rocha-Rodrigues, N. G. Machado, A. C. Moreira, P. J. Oliveira, J. R. Torrella and J. Magalhaes (2012). "Endurance training and chronic intermittent hypoxia modulate in vitro salicylate-induced hepatic mitochondrial dysfunction." Mitochondrion **12**(6): 607-616.

Ascensao, A., J. Lumini-Oliveira, N. G. Machado, R. M. Ferreira, I. O. Goncalves, A. C. Moreira, F. Marques, V. A. Sardao, P. J. Oliveira and J. Magalhaes (2011). "Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats." Clinical science **120**(1): 37-49.

Ascensao, A., J. Lumini-Oliveira, P. J. Oliveira and J. Magalhaes (2011). "Mitochondria as a target for exercise-induced cardioprotection." Current drug targets **12**(6): 860-871.

Ascensao, A., J. Magalhaes, J. M. Soares, R. Ferreira, M. J. Neuparth, F. Marques, P. J. Oliveira and J. A. Duarte (2005). "Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **289**(2): H722-731.

Ascensao, A., P. J. Oliveira and J. Magalhaes (2012). "Exercise as a beneficial adjunct therapy during Doxorubicin treatment--role of mitochondria in cardioprotection." International journal of cardiology **156**(1): 4-10.

Atalay, M., N. K. Oksala, D. E. Laaksonen, S. Khanna, C. Nakao, J. Lappalainen, S. Roy, O. Hanninen and C. K. Sen (2004). "Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats." J Appl Physiol **97**(2): 605-611.

Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1988). "Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor." Cell **53**(2): 211-217.

Bazil, J. N. and R. K. Dash (2011). "A minimal model for the mitochondrial rapid mode of Ca(2)+ uptake mechanism." PLoS One **6**(6): e21324.

Beger, R. D., J. Sun and L. K. Schnackenberg (2010). "Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity." Toxicology and applied pharmacology **243**(2): 154-166.

Begrache, K., A. Igoudjil, D. Pessayre and B. Fromenty (2006). "Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it." Mitochondrion **6**(1): 1-28.

Begrache, K., J. Massart, M.-A. Robin, A. Borgne-Sanchez and B. Fromenty (2011). "Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver." Journal of hepatology **54**(4): 773-794.

Benard, G. and R. Rossignol (2008). "Ultrastructure of the mitochondrial and its bearing on function and bioenergetics." Antioxidantes & redox signaling **10**(8): 1313-1342.

Benard, G. and R. Rossignol (2008). "Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics." Antioxid Redox Signal **10**(8): 1313-1342.

Bernardi, P., K. M. Broekemeier and D. R. Pfeiffer (1994). "Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane." J Bioenerg Biomembr **26**(5): 509-517.

Bernardi, P. and S. von Stockum (2012). "The permeability transition pore as a Ca<sup>2+</sup> release channel: New answers to an old question." Cell calcium **52**(1): 22-27.

Boelsterli, U. A. (2003). "Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity." Toxicology and applied pharmacology **192**(3): 307-322.

Bonora, M., A. Bononi, E. De Marchi, C. Giorgi, M. Lebedzinska, S. Marchi, S. Patergnani, A. Rimessi, J. M. Suski, A. Wojtala, M. R. Wieckowski, G. Kroemer, L. Galluzzi and P. Pinton (2013). "Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition." Cell Cycle **12**(4): 674-683.

Bort, R., K. Macé, A. Boobis, M. a.-J. Gómez-Lechón, A. Pfeifer and J. Castell (1999). "Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways." Biochemical pharmacology **58**(5): 787-796.

Bossy-Wetzell, E., D. D. Newmeyer and D. R. Green (1998). "Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization." EMBO J **17**(1): 37-49.

Boveris, A. and A. Navarro (2008). "Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents." Free Radical Biology and Medicine **44**(2): 224-229.

Boveris, A. and A. Navarro (2008). "Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents." Free radical biology & medicine **44**(2): 224-229.

Brown, G. C. and V. Borutaite (2002). "Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death." Free Radic Biol Med **33**(11): 1440-1450.

Brunelle, J. K. and A. Letai (2009). "Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family." Journal of cell science **122**(Pt 4): 437-441.

Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." Methods Enzymol **52**: 302-310.

Cadenas, E. (2004). "Mitochondrial free radical production and cell signaling." Mol Aspects Med **25**(1-2): 17-26.

Cheng, E. H., D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno and J. M. Hardwick (1997). "Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases." Science **278**(5345): 1966-1968.

Coffey, V. G., Z. Zhong, A. Shield, B. J. Canny, A. V. Chibalin, J. R. Zierath and J. A. Hawley (2006). "Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans." FASEB J **20**(1): 190-192.

Contreras, L., I. Drago, E. Zampese and T. Pozzan (2010). "Mitochondria: The calcium connection." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1797**(6-7): 607-618.

Coore, H. G., R. M. Denton, B. R. Martin and P. J. Randle (1971). "Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones." Biochem J **125**(1): 115-127.

Csordas, G., P. Varnai, T. Golenar, S. Roy, G. Purkins, T. G. Schneider, T. Balla and G. Hajnoczky (2010). "Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface." Mol Cell **39**(1): 121-132.

Custodio, J. B. A., A. J. M. Moreno and K. B. Wallace (1998). "Tamoxifen Inhibits Induction of the Mitochondrial Permeability Transition by Ca<sup>2+</sup> and Inorganic Phosphate." Toxicology and applied pharmacology **152**(1): 10-17.

da Luz, G., M. J. Frederico, S. da Silva, M. F. Vitto, P. A. Cesconetto, R. A. de Pinho, J. R. Pauli, A. S. Silva, D. E. Cintra, E. R. Ropelle and C. T. De Souza (2011). "Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats." European journal of applied physiology **111**(9): 2015-2023.

Daly, A. K., G. P. Aithal, J. B. Leathart, R. A. Swainsbury, T. S. Dang and C. P. Day (2007). "Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes." Gastroenterology **132**(1): 272-281.

Desagher, S. and J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." Trends Cell Biol **10**(9): 369-377.

Desplanches, D., L. Ecochard, B. Sempore, M. H. Mayet-Sornay and R. Favier (2004). "Skeletal muscle HSP72 response to mechanical unloading: influence of endurance training." Acta Physiol Scand **180**(4): 387-394.

Di Lisa, F., A. Carpi, V. Giorgio and P. Bernardi (2011). "The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1813**(7): 1316-1322.

Duchen, M. R. (2004). "Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology." Molecular aspects of medicine **25**(4): 365-451.

Duchen, M. R. and G. Szabadkai (2010). "Roles of mitochondria in human disease." Essays Biochem **47**: 115-137.

Duchen, M. R., A. Verkhatsky and S. Muallem (2008). "Mitochondria and calcium in health and disease." Cell Calcium **44**(1): 1-5.

Fernstrom, M., M. Tonkonogi and K. Sahlin (2004). "Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle." J Physiol **554**(Pt 3): 755-763.

Fiers, W., R. Beyaert, W. Declercq and P. Vandenabeele (1999). "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage." Oncogene **18**(54): 7719-7730.

Figueiredo, P. A., S. K. Powers, R. M. Ferreira, F. Amado, H. J. Appell and J. A. Duarte (2009). "Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(9): 927-939.

Finkel, T. (2001). "Reactive oxygen species and signal transduction." IUBMB Life **52**(1-2): 3-6.

Fluck, M. and H. Hoppeler (2003). "Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function." Rev Physiol Biochem Pharmacol **146**: 159-216.

Gáll, J., J. Škrha Jr, R. Buchal, E. Sedláčková, K. Verébová and J. Pláteník (2012). "Induction of the mitochondrial permeability transition (MPT) by micromolar iron: Liberation of calcium is more important than NAD(P)H oxidation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics(0).

Gauthier, M. S., K. Couturier, A. Charbonneau and J. M. Lavoie (2004). "Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile." Int J Obes Relat Metab Disord **28**(8): 1064-1071.

Giulivi, C., J. J. Poderoso and A. Boveris (1998). "Production of nitric oxide by mitochondria." J Biol Chem **273**(18): 11038-11043.

Gomez-Lechon, M. J., X. Ponsoda, E. O'Connor, T. Donato, R. Jover and J. V. Castell (2003). "Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes." Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA **17**(5-6): 675-680.

Gómez-Lechón, M. J., X. Ponsoda, E. O'Connor, T. Donato, J. V. Castell and R. Jover (2003). "Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS." Biochemical pharmacology **66**(11): 2155-2167.

González-Martin, G., A. R. Domínguez and A. Guevara (1997). "Pharmacokinetics and hepatotoxicity of diclofenac using an isolated perfused rat liver." Biomedicine & Pharmacotherapy **51**(4): 170-175.

Gore, M., R. Fiebig, J. Hollander, C. Leeuwenburgh, H. Ohno and L. L. Ji (1998). "Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle." Can J Physiol Pharmacol **76**(12): 1139-1145.

Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." The Journal of biological chemistry **177**(2): 751-766.

Grattagliano, I., L. Bonfrate, C. V. Diogo, H. H. Wang, D. Q. Wang and P. Portincasa (2009). "Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts." World journal of gastroenterology : WJG **15**(39): 4865-4876.

Green, D. R. and G. I. Evan (2002). "A matter of life and death." Cancer Cell **1**: 19-30.

Grooten, J., V. Goossens, B. Vanhaesebroeck and W. Fiers (1993). "Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity." Cytokine **5**(6): 546-555.

Gul, M., D. E. Laaksonen, M. Atalay, L. Vider and O. Hanninen (2002). "Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats." Scand J Med Sci Sports **12**(3): 163-170.

Gunter, T. E., D. I. Yule, K. K. Gunter, R. A. Eliseev and J. D. Salter (2004). "Calcium and mitochondria." FEBS Lett **567**(1): 96-102.

Haase, T. N., S. Ringholm, L. Leick, R. S. Bienso, K. Kiilerich, S. Johansen, M. M. Nielsen, J. F. Wojtaszewski, J. Hidalgo, P. A. Pedersen and H. Pilegaard (2011). "Role of PGC-1 $\alpha$  in exercise and fasting-induced adaptations in mouse liver." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology **301**(5): R1501-1509.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Press.

Hancock, J. T., R. Desikan and S. J. Neill (2001). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 345-350.

Higashida, K., M. Higuchi and S. Terada (2008). "Potential role of lipin-1 in exercise-induced mitochondrial biogenesis." Biochemical and biophysical research communications **374**(3): 587-591.

Hill, M. M., C. Adrian and S. J. Martin (2003). "Portrait of a killer: The mitochondrial apoptosome emerges from the shadows." Mol Interv **3**: 19.

Hollander, J., R. Fiebig, M. Gore, J. Bejma, T. Ookawara, H. Ohno and L. L. Ji (1999). "Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): R856-862.

Holloszy, J. O. (1967). "Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle." J Biol Chem **242**(9): 2278-2282.

Itoh, H., T. Ohkuwa, T. Yamamoto, Y. Sato, M. Miyamura and M. Naoi (1998). "Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues." Life sciences **63**(21): 1921-1929.

Ji, L. L. (2007). "Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling." Free Radic Biol Med **44**: 142-152.

Ji, L. L., M. C. Gomez-Cabrera, N. Steinhafel and J. Vina (2004). "Acute exercise activates nuclear factor (NF)- $\kappa$ B signaling pathway in rat skeletal muscle." Faseb J **18**(13): 1499-1506.

Johnson, N. A. and J. George (2010). "Fitness versus fatness: moving beyond weight loss in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **52**(1): 370-381.

Jones, D. P. and Y. M. Go (2010). "Redox compartmentalization and cellular stress." Diabetes Obes Metab **12 Suppl 2**: 116-125.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Gluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green and D. D. Newmeyer (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-1136.

Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho and A. E. Vercesi (2001). "Mitochondrial permeability transition and oxidative stress." FEBS Letters **495**(1-2): 12-15.

Kudo, C., M. Kori, K. Matsuzaki, K. Yamai, A. Nakajima, A. Shibuya, H. Niwa, Y. Kamisaki and K. Wada (2003). "Diclofenac inhibits proliferation and differentiation of neural stem cells." Biochemical pharmacology **66**(2): 289-295.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lal, N., J. Kumar, W. E. Erdahl, D. R. Pfeiffer, M. E. Gadd, G. Graff and J. M. Yanni (2009). "Differential effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on mitochondrial dysfunction during oxidative stress." Arch Biochem Biophys **490**(1): 1-8.

Lau, Y. S., G. Patki, K. Das-Panja, W. D. Le and S. O. Ahmad (2011). "Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration." The European journal of neuroscience **33**(7): 1264-1274.

Lawler, J. M., S. K. Powers, T. Visser, H. Van Dijk, M. J. Kordus and L. L. Ji (1993). "Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age." Am J Physiol **265**(6 Pt 2): R1344-1350.

Laye, M. J., R. S. Rector, S. J. Borengasser, S. P. Naples, G. M. Uptergrove, J. A. Ibdah, F. W. Booth and J. P. Thyfault (2009). "Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue." Journal of Applied Physiology **106**(1): 161-168.

Laye, M. J., R. S. Rector, S. J. Borengasser, S. P. Naples, G. M. Uptergrove, J. A. Ibdah, F. W. Booth and J. P. Thyfault (2009). "Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue." J Appl Physiol **106**(1): 161-168.

Lee, S. D., W. C. Shyu, I. S. Cheng, C. H. Kuo, Y. S. Chan, Y. M. Lin, C. Y. Tasi, C. H. Tsai, T. J. Ho and C. Y. Huang "Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats." Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases(0).

Lee, Y., K. Min, E. E. Talbert, A. N. Kavazis, A. J. Smuder, W. T. Willis and S. K. Powers (2012). "Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury." Med Sci Sports Exerc **44**(3): 397-405.

Lew, H. and A. Quintanilha (1991). "Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification." European journal of drug metabolism and pharmacokinetics **16**(1): 59-68.

Li, L., C. Muhlfeld, B. Niemann, R. Pan, R. Li, D. Hilfiker-Kleiner, Y. Chen and S. Rohrbach (2011). "Mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle." Basic research in cardiology **106**(6): 1221-1234.

Lim, M. S., P. L. Lim, R. Gupta and U. A. Boelsterli (2006). "Critical role of free cytosolic calcium, but not uncoupling, in mitochondrial permeability transition and cell death induced by diclofenac oxidative metabolites in immortalized human hepatocytes." Toxicology and applied pharmacology **217**(3): 322-331.

Lima, F. D., D. N. Stamm, I. D. Della-Pace, F. Dobrachinski, N. R. de Carvalho, L. F. Royes, F. A. Soares, J. B. Rocha, J. Gonzalez-Gallego and G. Bresciani (2013). "Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts." PLoS One **8**(2): e55668.

Little, J. P., A. Safdar, C. R. Benton and D. C. Wright (2011). "Skeletal muscle and beyond: the role of exercise as a mediator of systemic mitochondrial biogenesis." Appl Physiol Nutr Metab **36**(5): 598-607.

Little, J. P., A. Safdar, R. C. Benton and D. C. Wright (2012). "Skeletal muscle and beyond: the role of exercise as a mediator of systemic mitochondrial biogenesis." Appl. Physiol. Nutr. Metab. **36**.

Liu, J., H. C. Yeo, E. Overvik-Douki, T. Hagen, S. J. Doniger, D. W. Chu, G. A. Brooks and B. N. Ames (2000). "Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants." J Appl Physiol **89**(1): 21-28.

Liu, J., H. C. Yeo, E. Overvik-Douki, T. Hagen, S. J. Doniger, D. W. Chyu, G. A. Brooks and B. N. Ames (2000). "Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants." J Appl Physiol **89**(1): 21-28.

Locke, M., E. G. Noble and B. G. Atkinson (1990). "Exercising mammals synthesize stress proteins." Am J Physiol **258**(4 Pt 1): C723-729.

Lumini-Oliveira, J., J. Magalhaes, C. V. Pereira, A. C. Moreira, P. J. Oliveira and A. Ascensao (2011). "Endurance training reverts heart mitochondrial dysfunction, permeability transition and apoptotic signaling in long-term severe hyperglycemia." Mitochondrion **11**(1): 54-63.

Lumini, J. A., J. Magalhães, J. P. Oliveira and A. Ascensão (2008). "Beneficial effects of exercise on muscle mitochondrial function in diabetes mellitus." Sports Medicine **38**(9): 735-750.

Maddrey, W. C. (2005). "Drug-Induced Hepatotoxicity: 2005." Journal of Clinical Gastroenterology **39**(4): S83-S89.

Masubuchi, Y., S. Nakayama and T. Horie (2002). "Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats." Hepatology **35**(3): 544-551.

Masubuchi, Y., S. Yamada and T. Horie (1999). "Diphenylamine as an important structure of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation." Biochem Pharmacol **58**(5): 861-865.

Mataix, J., J. L. Quiles, J. R. Huertas, M. Battino and M. Manas (1998). "Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation." Free Radic Biol Med **24**(4): 511-521.

Matiello, R., R. T. Fukui, M. E. Silva, D. M. Rocha, B. L. Wajchenberg, S. Azhar and R. F. Santos (2010). "Differential regulation of PGC-1alpha expression in rat liver and skeletal muscle in response to voluntary running." Nutr Metab (Lond) **7**: 36.

McMillan, E. M., D. A. Graham, J. W. Rush and J. Quadrilatero (2012). "Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training." J Appl Physiol **113**(7): 1048-1057.

Meyer, M., H. L. Pahl and P. A. Baeuerle (1994). "Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes." Chem Biol Interact **91**(2-3): 91-100.

Mikami, T. and J. Kitagawa (2006). "Intense exercise induces the degradation of adenine nucleotide and purine nucleotide synthesis via de novo pathway in the rat liver." European journal of applied physiology **96**(5): 543-550.

Moreno-Sanchez, R., C. Bravo, C. Vasquez, G. Ayala, L. H. Silveira and M. Martinez-Lavin (1999). "Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart." Biochemical pharmacology **57**(7): 743-752.

Moreno, A. J., P. J. Oliveira, C. D. Nova, A. R. Alvaro, R. A. Moreira, S. M. Santos and T. Macedo (2007). "Unaltered hepatic oxidative phosphorylation and mitochondrial permeability transition in wistar rats treated with nimesulide: Relevance for nimesulide toxicity characterization." Journal of biochemical and molecular toxicology **21**(2): 53-61.

Mueller, D., U. Müller-Vieira, K. M. Biemel, G. Tascher, A. K. Nüssler and F. Noor (2012). "Biotransformation of diclofenac and effects on the metabolome of primary human hepatocytes upon repeated dose exposure." European Journal of Pharmaceutical Sciences **45**(5): 716-724.

Naito, H., S. K. Powers, H. A. Demirel and J. Aoki (2001). "Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats." *Med Sci Sports Exerc* **33**(5): 729-734.

Nakamoto, H., T. Kaneko, S. Tahara, E. Hayashi, H. Naito, Z. Radak and S. Goto (2007). "Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats." *Experimental gerontology* **42**(4): 287-295.

Navarro, A., C. Gomez, J. M. Lopez-Cepero and A. Boveris (2004). "Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer." *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **286**(3): R505-511.

Navarro, A., J. M. Lopez-Cepero, M. J. Bandez, M. J. Sanchez-Pino, C. Gomez, E. Cadenas and A. Boveris (2008). "Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging." *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **294**(2): R501-509.

Nemoto, S., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans and T. Finkel (2000). "Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7311-7318.

Ng, L. E., A. S. Vincent, B. Halliwell and K. P. Wong (2006). "Action of diclofenac on kidney mitochondria and cells." *Biochemical and biophysical research communications* **348**(2): 494-500.

Noble, E. G., A. Moraska, R. S. Mazzeo, D. A. Roth, M. C. Olsson, R. L. Moore and M. Fleshner (1999). "Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training." *J Appl Physiol* **86**(5): 1696-1701.

Oaks, J. L., M. Gilbert, M. Z. Virani, R. T. Watson, C. U. Meteyer, B. A. Rideout, H. L. Shivaprasad, S. Ahmed, M. J. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali and A. A. Khan (2004). "Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan." *Nature* **427**(6975): 630-633.

Ojuka, E. O. (2004). "Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle." *Proc Nutr Soc* **63**(2): 275-278.

Oliveira, P. J. (2011). "Mitochondria as a drug target in health and disease." *Current drug targets* **12**(6): 761.

Ortiz, M. I., J. E. Torres-López, G. Castañeda-Hernández, R. Rosas, G. C. Vidal-Cantú and V. Granados-Soto (2002). "Pharmacological evidence for the activation of K<sup>+</sup> channels by diclofenac." *European journal of pharmacology* **438**(1-2): 85-91.

Palty, R., W. F. Silverman, M. Hershfinkel, T. Caporale, S. L. Sensi, J. Parnis, C. Nolte, D. Fishman, V. Shoshan-Barmatz, S. Herrmann, D. Khananshvilii and I. Sekler (2010). "NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 436-441.

Paradies, G., G. Petrosillo, V. Paradies, R. J. Reiter and F. M. Ruggiero (2010). "Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease." *Journal of pineal research* **48**(4): 297-310.

Petrescu, I. and C. Tarba (1997). "Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat." *Biochim Biophys Acta* **1318**(3): 385-394.

Petrosillo, G., N. Moro, V. Paradies, F. M. Ruggiero and G. Paradies (2010). "Increased susceptibility to Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition and to cytochrome c release in rat heart mitochondria with aging: effect of melatonin." *Journal of pineal research* **48**(4): 340-346.

Poderoso, J. J., M. C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobo, F. Schopfer and A. Boveris (1996). "Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles." *Arch Biochem Biophys* **328**(1): 85-92.

Ponsoda, X., R. Bort, R. Jover, M. J. Gómez-lechón and J. V. Castell (1995). "Molecular mechanism of diclofenac hepatotoxicity: Association of cell injury with oxidative metabolism and decrease in ATP levels." *Toxicology in Vitro* **9**(4): 439-444.

Powers, S. K., D. Criswell, J. Lawler, L. L. Ji, D. Martin, R. A. Herb and G. Dudley (1994). "Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle." Am J Physiol **266**: R375-380.

Quiles, J. L., J. R. Huertas, M. Manas, M. Battino and J. Mataix (1999). "Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil." Br J Nutr **81**(1): 21-24.

Quiles, J. L., J. R. Huertas, M. Manas, J. J. Ochoa, M. Battino and J. Mataix (2001). "Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat." J Bioenerg Biomembr **33**(2): 127-134.

Radak, Z., H. Y. Chung, E. Koltai, A. W. Taylor and S. Goto (2008). "Exercise, oxidative stress and hormesis." Ageing Res Rev **7**(1): 34-42.

Radak, Z., H. Y. Chung, H. Naito, R. Takahashi, K. J. Jung, H. J. Kim and S. Goto (2004). "Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise." FASEB J **18**(6): 749-750.

Radi, R., A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano and L. Castro (2002). "Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria." Free Radic Biol Med **33**(11): 1451-1464.

Raturi, A. and T. Simmen (2012). "Where the Endoplasmic Reticulum and the Mitochondrion Tie the Knot: the Mitochondria-Associated Membrane (MAM)." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research(0).

Rector, R. S. and J. P. Thyfault (2011). "Does physical inactivity cause nonalcoholic fatty liver disease?" Journal of applied physiology **111**(6): 1828-1835.

Rector, R. S., J. P. Thyfault, M. J. Laye, R. T. Morris, S. J. Borengasser, G. M. Uptergrove, M. V. Chakravarthy, F. W. Booth and J. A. Ibdah (2008). "Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats." Journal of Physiology **586**(Pt 17): 4241-4249.

Rector, R. S., J. P. Thyfault, R. T. Morris, M. J. Laye, S. J. Borengasser, F. W. Booth and J. A. Ibdah (2008). "Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats." American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology **294**(3): G619-626.

Rector, R. S., G. M. Uptergrove, E. M. Morris, S. J. Borengasser, M. H. Laughlin, F. W. Booth, J. P. Thyfault and J. A. Ibdah (2011). "Daily exercise vs. caloric restriction for prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the OLETF rat model." American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology **300**(5): G874-883.

Richter, C. (1997). "Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis and respiration." Biosci Rep **17**(1): 53-66.

Sakamoto, K. and L. J. Goodyear (2002). "Exercise Effects on Muscle Insulin Signaling and Action Invited Review: Intracellular signaling in contracting skeletal muscle." J Appl Physiol **93**: 369-383.

Sardao, V. A., S. L. Pereira and P. J. Oliveira (2008). "Drug-induced mitochondrial dysfunction in cardiac and skeletal muscle injury." Expert opinion on drug safety **7**(2): 129-146.

Saris, N. E. and E. Carafoli (2005). "A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria." Biochemistry (Mosc) **70**(2): 187-194.

Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." Teratology **7**(3): 253-266.

Sen, C. K. and A. Goldfarb (2000). Antioxidants and physical exercise. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. C. K. Sen, L. Packer and O. Hanninen. Basel, Elsevier science B.V.: 297-320.

Sinha, K., J. Das, P. B. Pal and P. C. Sil (2013). "Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis." Arch Toxicol.

Siu, W. P., P. B. L. Pun, C. Latchoumycandane and U. A. Boelsterli (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." Toxicology and applied pharmacology **227**(3): 451-461.

Sun, L., W. Shen, Z. Liu, S. Guan, J. Liu and S. Ding (2010). "Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients." Life sciences **86**(1-2): 39-44.

Sutton, H. C. and C. C. Winterbourn (1989). "On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions." Free Radic Biol Med **6**(1): 53-60.

Tarnopolsky, M. A. and S. Raha (2005). "Mitochondrial myopathies: diagnosis, exercise intolerance, and treatment options." Med Sci Sports Exerc **37**(12): 2086-2093.

Tate, C. A., P. E. Wolkowicz and J. McMillin-Wood (1982). "Exercise-induced alterations of hepatic mitochondrial function." The Biochemical journal **208**(3): 695-701.

Taylor, R. P. and J. W. Starnes (2003). "Age, cell signalling and cardioprotection." Acta Physiol Scand **178**(2): 107-116.

Terblanche, S. E., K. Gohil, L. Packer, S. Henderson and G. A. Brooks (2001). "The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*)." Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology **128**(4): 889-896.

Terblanche, S. E., K. Gohil, L. Packer, S. Henderson and G. A. Brooks (2001). "The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*)." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **128**(4): 889-896.

Thyfault, J. P., R. S. Rector, G. M. Uptergrove, S. J. Borengasser, E. M. Morris, Y. Wei, M. J. Laye, C. F. Burant, N. R. Qi, S. E. Ridenhour, L. G. Koch, S. L. Britton and J. A. Ibdah (2009). "Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury." The Journal of physiology **587**(Pt 8): 1805-1816.

Thyfault, J. P., R. S. Rector, G. M. Uptergrove, S. J. Borengasser, E. M. Morris, Y. Wei, M. J. Laye, C. F. Burant, N. R. Qi, S. E. Ridenhour, L. G. Koch, S. L. Britton and J. A. Ibdah (2009). "Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury." J Physiol **587**(Pt 8): 1805-1816.

Tiidus, P. M. and M. E. Houston (1994). "Antioxidant and oxidative enzyme adaptations to vitamin E deprivation and training." Med Sci Sports Exerc **26**(3): 354-359.

Tonkonogi, M. and K. Sahlin (2002). "Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle." Exerc Sport Sci Rev **30**(3): 129-137.

Tsujimoto, Y. (2003). "Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria." J Cell Physiol **195**: 158-167.

van Leeuwen, J. S., R. Orij, M. A. Luttik, G. J. Smits, N. P. Vermeulen and J. C. Vos (2011). "Subunits Rip1p and Cox9p of the respiratory chain contribute to diclofenac-induced mitochondrial dysfunction." Microbiology **157**(Pt 3): 685-694.

van Leeuwen, J. S., B. Ünlü, N. P. E. Vermeulen and J. C. Vos (2012). "Differential involvement of mitochondrial dysfunction, cytochrome P450 activity, and active transport in the toxicity of structurally related NSAIDs." Toxicology in Vitro **26**(2): 197-205.

van Leeuwen, J. S., G. Vredenburg, S. Dragovic, T. F. Tjong, J. C. Vos and N. P. Vermeulen (2011). "Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system." Toxicology letters **200**(3): 162-168.

Venditti, P. and S. Di Meo (1996). "Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats." Archives of biochemistry and biophysics **331**(1): 63-68.

Wallace, D. C. (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." Science **283**(5407): 1482-1488.

- Wang, L., H. Mascher, N. Psilander, E. Blomstrand and K. Sahlin (2011). "Resistance exercise enhances the molecular signaling of mitochondrial biogenesis induced by endurance exercise in human skeletal muscle." J Appl Physiol **111**(5): 1335-1344.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." Genes Dev **15**(22): 2922-2933.
- Xu, J. J., P. V. Henstock, M. C. Dunn, A. R. Smith, J. R. Chabot and D. de Graaf (2008). "Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury." Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology **105**(1): 97-105.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones and X. Wang (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-1132.
- Yasari, S., D. Prud'homme, D. Wang, M. Jankowski, E. Levy, J. Gutkowska and J. M. Lavoie (2010). "Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats." Mol Cell Biochem **335**(1-2): 291-299.
- Zoratti, M. and I. Szabò (1995). "The mitochondrial permeability transition." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes **1241**(2): 139-176.