



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Efeitos do tratamento com Berberina na sinalização por AMPK e estimulação da função mitocondrial num modelo de obesidade induzida por dieta

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. O trabalho foi realizado sob a orientação científica do Professor Doutor Carlos Palmeira (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Anabela Rolo (Universidade de Aveiro)

Anabela Marques Simões

---

2010



## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Carlos Manuel Marques Palmeira, orientador desta tese, estou eternamente agradecida pelo modo estimulante e rigoroso como me orientou, pelo apoio e incentivo constante que me foi dando, pela amizade e por me mostrar o caminho da Ciência. Sem a sua ajuda e disponibilidade não seria possível finalizar o meu mestrado em Biologia Molecular e Celular. Obrigada por todo o apoio que sempre demonstrou ao longo deste dois anos.

À Professora Doutora Anabela Pinto Rolo, também orientadora desta tese estou também profundamente agradecida por toda a ajuda, apoio, orientação, paciência e transmissão de conhecimentos. Sem a sua presença, talvez não tivesse sido possível atingir esta etapa. Também por acreditar em mim, pelo incentivo constante e amizade que sempre demonstrou. Estou agradecida por estar sempre presente ao longo destes dois anos.

À Professora Doutora Emília Duarte o meu agradecimento por me ter aceite no curso de Mestrado. Sem a sua ajuda não teria conseguido alcançar esta fase da minha vida

Aos meus colegas de laboratório, Ana Gomes, Ana Varela, Filipe Valente e João Teodoro, estou muito agradecida pela ajuda e amizade que sempre ofereceram e que participaram directamente neste trabalho e ajudaram em todos os momentos. E também por serem quem são, ou seja, além de colegas de trabalho, considero-os como amigos verdadeiros que estão sempre presente quando é necessário. Obrigada por tudo do fundo do meu coração.

À minha mãe que tem sido incansável pois ela tem sido um grande apoio nesta fase. Sem ela também não estaria a finalizar mais uma etapa da minha vida, por isso agradeço-lhe do fundo do coração por tudo o que fez por mim. Sim, foste tu que me deste força para nunca desistir e para sempre seguir em frente e ultrapassar todos os obstáculos que se depararam ao longo da minha vida. Obrigada por acreditares em mim. Adoro-te mãezinha!!!

Aos meus irmãos também estou agradecida por todo o apoio que me ofereceram ao longo destes anos.

Ao meu namorado, Nuno, que ficou para último mas não menos importante estou profundamente agradecida pois foi uma das principais forças que me impulsionou e por estar sempre presente. Sem ele também teria sido difícil ultrapassar esta etapa pois sempre me deu o seu apoio perante os obstáculos com os quais me deparei ao longo destes anos. Também pela paciência e calma que me transmitiu pois sei que não é fácil falar comigo quando me sinto nervosa ou rabugenta. Sabes bem tudo o que sinto por ti por isso acho que não é preciso dizer mais nada. Muito obrigada por estares sempre presente e disponível

## Índice

<b>Lista de Tabelas</b>	III
<b>Lista de Figuras</b>	V
<b>Abreviaturas utilizadas</b>	VII
<b>Resumo</b>	XI
<b>Abstract</b>	XIII
<b>Capítulo I – Introdução geral</b>	1
<b>1 – A mitocôndria</b>	3
1.1 – Apresentação geral	3
1.2 – A cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa	6
1.3 – Teoria quimiosmótica	8
1.4 – Espécies reactivas de oxigénio, defesas antioxidantes e stresse oxidativo	11
1.5 – O papel da mitocôndria na homeostase do cálcio	13
1.6 – Permeabilidade transitória mitocondrial	15
<b>2 – Músculo esquelético</b>	17
<b>3 – O síndrome metabólico</b>	20
3.1 – A patologia	20
3.2 – A bioquímica da patologia	22
<b>4 – A Berberina</b>	27
<b>Objectivos</b>	31
<b>Capítulo II – Materiais e Métodos</b>	33
2.1 – Materiais	35
2.2 – Animais e dietas	35
2.3 – Análise dos parâmetros bioquímicos do plasma	36

2.4 – Determinação do conteúdo em triglicérides em tecido de músculo esquelético	36
2.5 – Isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético de rato	36
2.6 – Determinação da concentração de proteína mitocondrial	39
2.7 – Avaliação do potencial transmembranar nas mitocôndrias	39
2.8 – Determinação do consumo de oxigénio em preparações mitocondriais	41
2.9 – Detecção da indução da permeabilidade transitória mitocondrial	45
2.10 – Determinação do conteúdo em proteínas em tecido do músculo esquelético	45
2.11 – Análise e tratamento estatístico dos resultados	46
<b>Capítulo III – Resultados</b>	47
<b>3 – Caracterização do modelo animal</b>	49
3.1 – Pesos	49
3.2 – Parâmetros bioquímicos do plasma	51
3.3 – Conteúdo em triglicérides em tecido do músculo esquelético	52
3.4 – Bioenergética mitocondrial	53
3.4.1 – Potencial transmembranar	53
3.4.2 – Respiração mitocondrial	56
3.4.3 – Indução da permeabilidade transitória mitocondrial	59
3.4.4 – Conteúdo em proteínas no tecido de músculo esquelético	60
<b>Capítulo IV – Discussão</b>	63
<b>Referências</b>	73

## Lista de Tabelas

### Capítulo III – Resultados

<b>Tabela I</b>	Parâmetros bioquímicos do plasma sanguíneo dos animais	52
<b>Tabela II</b>	$\Delta\Psi$ e “lag phase” mitocondriais no modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura (HFD) e após tratamento com Berberina (Berberina)	54
<b>Tabela III</b>	Respiração mitocondrial no modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura (HFD) e tratamento com Berberina (Berberina)	57





## Lista de Figuras

### Capítulo I – Introdução geral

<b>Figura 1</b>	Diagrama representativo da mitocôndria	3
<b>Figura 2</b>	Estrutura da mitocôndria	4
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial e ATP sintetase	6
<b>Figura 4</b>	Fluxo de electrões através da cadeia transportadora de electrões a partir de NADH, succinato e FADH <sub>2</sub> até ao oxigénio molecular	8
<b>Figura 5</b>	Mecanismos de transporte de cálcio na mitocôndria	14
<b>Figura 6</b>	Os vários componentes do poro de permeabilidade transitória	16
<b>Figura 7</b>	Estrutura do tecido muscular esquelético	18
<b>Figura 8</b>	Estrutura da fibra muscular	19
<b>Figura 9</b>	Percentagem de população adulta obesa	21
<b>Figura 10</b>	Oxidação incompleta de ácidos gordos origina stresse oxidativo e medeia a resistência à insulina no músculo esquelético	23
<b>Figura 11</b>	Contribuição de PGC-1 $\alpha$ para a expressão e fenótipo de resistência à insulina e diabetes do tipo 2	25
<b>Figura 12</b>	Activadores da expressão de PGC-1 $\alpha$	27
<b>Figura 13</b>	Estrutura da beberina	28

### Capítulo II – Materiais e Métodos

<b>Figura 14</b>	Representação esquemática do isolamento da fracção mitocondrial de músculo esquelético de rato	37
<b>Figura 15</b>	Esquema do sistema de montagem do eléctrodo de TPP <sup>+</sup>	40
<b>Figura 16</b>	Eléctrodo de oxigénio de Clark	42

<b>Figura 17</b>	Câmara de reacção fechada e termostaticada usada na determinação do consumo de oxigénio	44
<b>Capítulo III – Resultados</b>		
<b>Figura 18</b>	Variação do peso total dos animais ao longo de 12 semanas	49
<b>Figura 19</b>	Variação do peso total dos animais após 4 semanas de tratamento oral com Berberina	50
<b>Figura 20</b>	Imagens dos animais após 16 semanas com alimentação rica em gordura e 4 semanas de tratamento oral com Berberina	50
<b>Figura 21</b>	Aspecto da cavidade abdominal dos animais	51
<b>Figura 22</b>	Conteúdo em triglicéridos do tecido do músculo esquelético expresso em mg triglicéridos/dL	53
<b>Figura 23</b>	Alterações no potencial transmembranar mitocondrial no modelo de obesidade induzida por dieta (HFD) e Berberina	55
<b>Figura 24</b>	Efeito da alimentação rica em gordura e do tratamento oral com Berberina na “lag phase” mitocondrial na presença de succinato	56
<b>Figura 25</b>	Efeito da alimentação rica em gordura (HFD) e tratamento oral com Berberina no índice de controlo respiratório (ICR)	58
<b>Figura 26</b>	Efeito da alimentação rica em gordura (HFD) e tratamento oral com Berberina (Berberina) na respiração mitocondrial	59
<b>Figura 27</b>	Susceptibilidade à indução da permeabilidade transitória mitocondrial	60
<b>Figura 28</b>	Efeito da alimentação no conteúdo em actina, AMPK, <i>p</i> -AMPK, PGC-1 $\alpha$ , COX I, COX IV, ATP sintetase e TFAM	61
<b>Capítulo IV – Discussão</b>		
<b>Figura 29</b>	Esquema representativo da transdução de sinal da adiponectina em células musculares na condição de síndrome metabólico	70



## Abreviaturas utilizadas

<b>ADP</b>	Adenosina 5'-difosfato
<b>AMPK</b>	Proteína cinase activada por AMP
<b>ANT</b>	Translocador de nucleótidos de adenina
<b>ATP</b>	Adenosina 5'- trifosfato
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CAT</b>	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
<b>COX I</b>	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade I
<b>COX IV</b>	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade IV
<b>CPT1</b>	Carnitina palmitoiltransferase 1
<b>CTE</b>	Cadeia transportadora de electrões
<b>CyA</b>	Ciclosporina A
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>e<sup>-</sup></b>	Electrões livres
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenoglicol-bis-(2-aminoéter-etílico) N, N' - tetracético
<b>ERK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavina adenina dinucleótido
<b>FCCP</b>	Biscianocarbonil-p-trifluoro-metozifenil- hidrazona
<b>FFA's</b>	Ácidos gordos livres
<b><i>g</i></b>	Aceleração da gravidade
<b>GSH</b>	Glutatião (forma reduzida)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio

<b>HEPES</b>	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-2- etanossulfónico
<b>ICR</b>	Índice de controlo respiratório
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baixa densidade
<b>LDLR</b>	Receptor lipoproteínas de baixa densidade
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)
<b>NRF-1</b>	Factor respiratório nuclear 1
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anião superóxido
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Coactivador 1 $\alpha$ do receptor activado por proliferadores do peroxisoma gama
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	Receptor $\alpha$ activado por proliferadores de peroxissoma
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	Receptor $\gamma$ activado por proliferadores de peroxissoma
<b>PTM</b>	Permeabilidade transitória mitochondrial
<b>Q</b>	Quinona
<b>QH<sub>2</sub></b>	Quinona reduzida
<b>RaM</b>	Transporte de cálcio de modo rápido
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio
<b>Sirt1</b>	Sirtuína 1
<b>TFAM</b>	Factor de transcrição mitocondrial A
<b>TIM/TOM</b>	Transportador da membrana interna/Transportador da membrana externa

<b>UCP's</b>	Proteínas desacopladoras
<b>VDAC</b>	Canal aniónico dependente da voltagem
<b><math>\Delta\mu_{H^+}</math></b>	Gradiente electroquímico de protões
<b><math>\Delta p</math></b>	Força protomotriz
<b><math>\Delta pH</math></b>	Gradiente de pH
<b><math>\Delta\Psi</math></b>	Potencial eléctrico da membrana mitocondrial



## Resumo

A obesidade é considerada como uma doença de alto risco e crónica, tendo a sua incidência atingido níveis alarmantes tanto em pessoas adultas como em crianças em todo o Mundo. A obesidade aumenta a susceptibilidade para o desenvolvimento de outras patologias associadas a esta condição como o desenvolvimento de diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, entre outras. Deste modo, existe uma necessidade constante pela descoberta de tratamentos eficazes de modo a evitar as consequências das doenças relativas a esta condição que preocupa toda a população em geral sendo já considerada como uma epidemia. Os tecidos que apresentam uma actividade metabólica elevada, como é o caso do músculo esquelético, várias doenças encontram-se associadas à disfunção mitocondrial. Assim, uma dieta rica em gordura origina um aumento do uptake de ácidos gordos contribuindo assim para a acumulação de lípidos, aumento do fluxo oxidativo mitocondrial, produção de espécies reactivas de oxigénio e por fim o desenvolvimento de resistência à insulina.

Uma característica importante da obesidade é a resistência à insulina que consiste numa diminuição da resposta dos tecidos periféricos à insulina. O desenvolvimento desta condição envolve uma disfunção mitocondrial acrescida de uma diminuição do conteúdo de DNA mitocondrial, redução de coactivador 1 $\alpha$  do receptor activado por proliferadores do peroxisoma gama (PGC-1 $\alpha$ ), deficiências na fosforilação oxidativa e diminuição da síntese de ATP. Consequentemente, a estimulação da biogénese mitocondrial pode diminuir ou até mesmo evitar o desenvolvimento de síndrome metabólico por aumento da actividade mitocondrial protegendo a célula contra o aumento de fluxo de substratos para a cadeia transportadora de electrões.

Este trabalho teve por objectivo avaliar se o tratamento com Berberina modula a biogénese mitocondrial do músculo esquelético em modelos de obesidade induzida por dieta rica em gordura. A Berberina é um produto natural que apresenta propriedades antidiabéticas. Neste trabalho foi verificado que este composto diminui o peso corporal e recupera a disfunção mitocondrial no músculo esquelético, em animais alimentados durante 16 semanas com dieta rica em gordura. Adicionalmente, o tratamento com Berberina estimulou a actividade de proteína cinase activada por AMP (AMPK), o que originou um aumento da capacidade oxidativa mitocondrial, do conteúdo em proteínas envolvidas na biogénese e função mitocondriais.

As mitocôndrias de músculo esquelético de animais *Sprague-Dawley* alimentados com dieta rica em gordura durante 16 semanas (animais HFD) apresentaram decréscimo significativo do potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), desenvolvido após energização relativamente aos animais controlo (Capítulo III – 3.4.1). A despolarização foi também inferior em relação aos animais controlo, estando a repolarização também afectada. Nos animais Berberina, foi observado superior  $\Delta\Psi$ , despolarização e também de



repolarização após o tratamento de 4 semanas com Berberina (Capítulo III – 3.4.1), comparativamente aos animais HFD, sendo muito semelhante ao valor obtido para os animais controlo. Os estados 3 e 4 respiratórios nas mitocôndrias de animais HFD foram estatisticamente inferiores relativamente aos animais controlo (Capítulo III – 3.4.2). Nos animais que receberam tratamento oral com Berberina (animais Berberina), estes parâmetros foram superiores em relação aos animais HFD, sendo semelhantes aos obtidos para os animais controlo (Capítulo III – 3.4.2). A respiração estimulada por FCCP nos animais HFD foi estatisticamente inferior relativamente aos animais controlo (Capítulo III – 3.4.2), sugerindo alterações ao nível da cadeia transportadora de electrões. Nos animais Berberina, este parâmetro foi superior em relação aos animais HFD. O índice de controlo respiratório (ICR) foi significativamente inferior nos animais HFD comparativamente aos animais controlo (Capítulo III – 3.4.2), enquanto que nos animais Berberina foi superior relativamente aos animais HFD.

Paralelamente, a “lag phase” foi superior nas mitocôndrias de animais HFD em relação aos animais controlo e inferior nos animais Berberina comparativamente aos animais HFD, sendo semelhante à dos animais controlo (Capítulo III – 3.4.1). Estas observações sugerem que nos animais HFD ocorreu uma diminuição da eficiência do sistema fosforilativo relativamente aos animais controlo, enquanto que nos animais Berberina há uma recuperação da eficiência por parte do sistema fosforilativo. Os animais HFD apresentaram maior susceptibilidade à indução da permeabilidade transitória mitocondrial (PTM) (Capítulo III – 3.4.3) relativamente aos animais controlo e Berberina. Adicionalmente, os animais HFD apresentaram uma redução no conteúdo em proteína cinase activada por AMP (AMPK), *p*-AMPK, PGC-1 $\alpha$ , citocromo *c* oxidase subunidade I (COX I), citocromo *c* oxidase subunidade IV (COX IV), factor de transcrição mitocondrial A (TFAM) e ATP sintetase (Capítulo III – 3.4.4) relativamente aos animais controlo enquanto que, nos animais Berberina, o conteúdo destas proteínas foi superior em relação aos animais HFD, sendo muito próximo do observado nos animais controlo.

De acordo com estes resultados, os efeitos da Berberina parecem envolver um mecanismo que aumenta a função e número mitocondriais podendo, deste modo, atenuar a disfunção mitocondrial que se verifica nas condições de síndrome metabólico e diabetes mellitus tipo 2.

Concluindo, este composto pode possibilitar o desenvolvimento de novas aplicações farmacológicas em pacientes obesos e diabéticos e também de estratégias que poderão modular a biogénese mitocondrial e assim melhorar o tratamento de doenças metabólicas.

## Abstract

Obesity is considered a chronic high risk disease, having its prevalence reached alarming levels, both in adults as well as in children, all over the world. Obesity increases the susceptibility to the development of other pathologies such as diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases, amongst others. As so, there is a constant necessity for the discovery of effective treatments as to avoid the consequences of the diseases associated with this condition. One of the main organs affected by this pathology is the skeletal muscle, since this organ presents a high metabolic activity, being on the main consumers of glucose. Due to this fact, mitochondrial activity is of vital importance to the skeletal muscle, so several pathologies that directly affect this organ are associated with mitochondrial dysfunction. As so, a fat rich diet causes an increase in the fatty acid uptake, leading to the accumulation of lipids, increased mitochondrial oxidative flow, reactive oxygen species production and finally the development of insulin resistance.

An important characteristic of obesity, insulin resistance is the result of a decrease in the response of peripheral tissues to insulin. The onset of this condition involves mitochondrial dysfunction: decreased mitochondrial DNA and PGC-1 $\alpha$  content, oxidative phosphorylation deficiencies and decreased ATP synthesis. As a result, the stimulation of the mitochondrial biogenesis can decrease or even avoid the development of the metabolic syndrome via an increase in mitochondrial activity, protecting the cell against the increase in the substrate flow through the electron transport chain.

This work had the objective of evaluation if treatment with Berberine, a natural product that presents antidiabetic properties, modulates mitochondria biogenesis in the skeletal muscle of animals fed a high-fat diet. This work demonstrates that this compound decreases the overall body weight and recovers mitochondrial function in skeletal muscle of animals fed a high-fat diet for 16 weeks. Also, treatment with Berberine stimulated AMPK activity, which generated an increase in mitochondrial oxidative capacity and in proteins involved in mitochondrial biogenesis and function.

Mitochondria isolated from skeletal muscle of *Sprague-Dawley* animals fed a high-fat diet for 16 weeks (HFD) exhibited statistically significant decrease in mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ), induced by energization with succinate (Chapter III – 3.4.1). Mitochondrial depolarization and repolarization were also decreased in HFD animals, when compared to control animals. In the treated group, mitochondrial membrane potential, depolarization and repolarization were increased after 4 weeks of administration of Berberine (Chapter III- 3.4.1), comparatively to HFD mitochondria. No differences were observed between mitochondria isolated from Berberine and control animals. State 3 and 4 respiration were statistically decreased in mitochondria from HFD animals when compared to mitochondria from both groups HFD and Berberine (Chapter III- 3.4.2). FCCP-stimulated oxygen consumption was statistically decreased in mitochondria from

HFD animals comparatively to the control group (Chapter III- 3.4.2), suggesting alterations at the level of the electron transport chain. Berberine administration prevented this impairment. Respiratory control ratio and the lag phase were statistically decreased in mitochondria from both control and Berberine groups (Chapter III- 3.4.2 and 3.4.1). These observations suggest that in the HFD animals there was an impairment of the phosphorylative system, comparatively to control animals. On the other hand, in the animals treated with Berberine there was a recovery of the efficiency of the phosphorylative system.

Mitochondria from HFD animals also exhibited increased susceptibility to the induction of the mitochondrial permeability transition (MPT), when compared to mitochondria from both control and Berberine groups. (Chapter III – 3.4.3). Additionally, in animals fed a high-fat diet for 16 weeks, comparatively to control animals, there was a decrease in the content of the following proteins: AMPK, *p*-AMPK, PGC-1 $\alpha$ , cytochrome oxidase subunit I (COX I), cytochrome oxidase subunit IV, mitochondrial transcription factor A (TFAM) and ATPsynthase (Chapter III – 3.4.4). In animals treated with Berberine there was a recovery since the content in these proteins was similar to control animals and higher than HFD animals.

Taking into account these results, it is suggested that Berberine action involves a mechanism of increased number and mitochondrial function. This will probably attenuate the mitochondrial dysfunction associated to metabolic syndrome and diabetes type 2.

In conclusion, Berberine is a promising therapeutic agent to be used in the development of pharmacological strategies in obese and diabetic patients, with the goal of modulation of mitochondrial biogenesis and prevention of the damage involved in metabolic diseases.





**Capítulo I**  
**Introdução Geral**



## 1 - A mitocôndria

### 1.1 - Apresentação geral

A mitocôndria é uma unidade produtora de energia existente nas células, sendo abundante nos locais onde ocorrem os processos que necessitam de energia como, por exemplo, no músculo esquelético (Johannsen et al., 2009). Existe em maior número em redor do retículo endoplasmático (Collins et al., 2002), apresentando um padrão de distribuição característico no interior da célula. As mitocôndrias fornecem a maioria da energia necessária para as células através da fosforilação oxidativa e são também extremamente importantes na homeostase celular (Wenz, 2009). É definida como o centro de produção de energia celular e de reacções metabólicas essenciais (John et al., 2005). É um organelo fortemente dinâmico com uma função central no metabolismo celular sendo constituído por um sistema de dupla membrana. Apresenta uma membrana externa lisa que envolve uma membrana interna de área de superfície significativamente grande que, por sua vez, envolve a matriz (Logan, 2006). Apresenta uma forma alongada e oval, com dois compartimentos, o espaço intermembranar e a matriz, delimitados pelo sistema de dupla membrana (Figura 1).

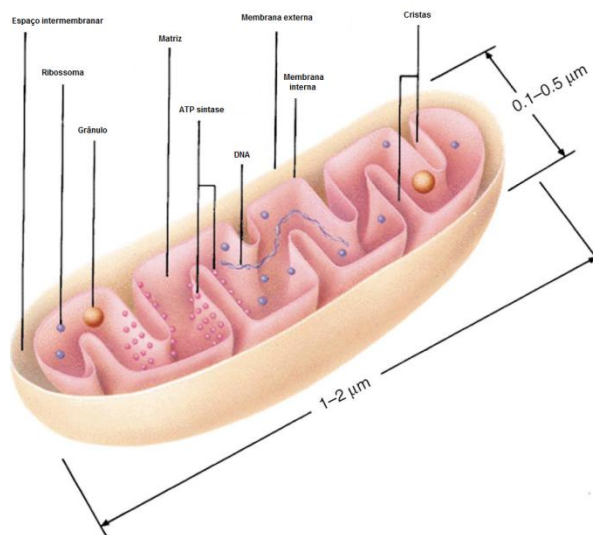


Figura 1 - Diagrama representativo da mitocôndria (adaptado de Frey & Mannella, 2000).

As cristas mitocondriais são estruturas independentes com uma natureza tubular extensa não estando sempre ligadas à membrana interna e não sendo apenas simples invaginações da membrana interna para a matriz (Mannella et al., 1998; Frey & Mannella, 2000; Mannella, 2000).

A morfologia mitocondrial varia de acordo com o estado metabólico das células. Tecidos metabolicamente mais exigentes, como o tecido muscular, apresentam mitocôndrias organizadas numa estrutura multiramificada. Ocorrem também alterações ao nível da forma e organização das cristas, de acordo com as variações nos conteúdos em ácidos gordos, lípidos e proteínas. Adicionalmente, uma mitocôndria com um número mais elevado de cristas, aumenta a área funcional e permite um número superior de proteínas da cadeia respiratória (Figura 2).

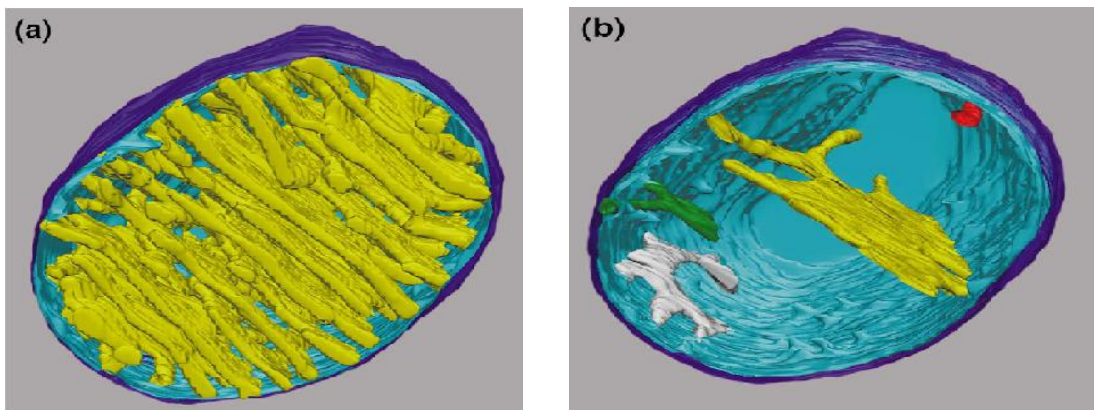


Figura 2 - Estrutura da mitocôndria. (a) Modelo produzido em computador a partir de tomogramas 3D de uma mitocôndria de cerebello de galinha. Com a coloração amarela estão representadas as cristas, a azul claro a membrana interna e a azul escuro a membrana externa. (b) Representação do mesmo modelo apresentando quatro cristas representativas com coloração diferente, além das membranas interna e externa (Frey & Mannella, 2000).

A mitocôndria possui a sua própria maquinaria de síntese proteica e o seu próprio genoma (Hock & Kralli, 2009). A maioria dos polipeptídeos mitocondriais é codificada no genoma nuclear, sintetizados no citosol e transportados para a mitocôndria. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a quase todas as moléculas polares e iões (Stryer, 1988) enquanto que a membrana externa é permeável à maioria dos iões e pequenas moléculas (Crompton et al., 1999). Deste modo, o movimento de solutos na membrana interna é controlado, sendo permitido apenas por proteínas membranares e canais controlados e selectivos.



A membrana interna deste organelo apresenta um elevado conteúdo de proteínas, sendo cerca de 80% do seu peso correspondente a estas proteínas (Darnell et al., 1990). É uma membrana muito rica em difosfatidilglicerol (fosfolípido cardiolipina) o que é extremamente importante para a função mitocondrial pois este fosfolípido reduz a permeabilidade da bicamada fosfolipídica a prótons. Também permite um bom funcionamento de proteínas mitocondriais como, por exemplo, o complexo citocromo-*c*-oxidase (complexo IV) e o translocador de nucleótidos de adenina (ANT) (Hoch, 1992; Paradies et al., 1998). Na membrana interna encontram-se ainda elementos das vias metabólicas, ou seja, pelos complexos proteicos da cadeia transportadora de electrões, os transportadores de ácidos di- e tricarbóxicos, a cadeia respiratória, o complexo ATP sintetase, a piruvato desidrogenase, as proteínas desacopladoras da família UCP e os sistemas de transporte e oxidação de ácidos gordos (Caldwell et al., 2004).

A membrana externa apresenta menor percentagem de peso seco em conteúdo proteico do que a membrana interna (50%), sendo a mais abundante o canal aniónico dependente da voltagem (VDAC). Existem outras proteínas associadas a esta membrana (hexocinase, creatina cinase e receptor periférico de benzodiazepinas), além dos complexos formados por várias subunidades proteicas (complexos TIM/TOM) que são transportadores da membrana interna/translocador da membrana externa e que transportam peptídeos para o interior da mitocôndria (Paschen & Neupert, 2001).

As enzimas responsáveis pelo metabolismo de aminoácidos, do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ou ciclo de Krebs), via de síntese dos grupos heme e ciclo da ureia situam-se na matriz mitocondrial. É também aqui que se encontram as múltiplas cópias do DNA mitocondrial (mtDNA), assim como os sistemas de transcrição e translação, o que torna a mitocôndria como sendo o único organelo de células animais que apresenta capacidade de autoreplicação (Anderson, 1981), no entanto, a maior parte das proteínas mitocondriais são codificadas pelo genoma nuclear (Wallace, 1994).

A mitocôndria está envolvida em vários processos metabólicos, sendo o mais relevante para a viabilidade celular a fosforilação oxidativa. Participa também nas vias de sinalização dependentes de cálcio, na manutenção do ambiente redox e na morte celular programada ou apoptose (Schatz, 1995).

Este organelo é muitas vezes designado por central energética da célula devido à sua eficiência e necessidade da fosforilação oxidativa para as funções celulares pois a maioria necessita de energia. A energia existente nas ligações de hidratos de carbono, aminoácidos e ácidos gordos é usada para a síntese de adenosina trifosfato (ATP). O rendimento desta conversão energética seria baixo se não ocorresse o processo de fosforilação oxidativa. Por exemplo, a degradação da glicose origina duas moléculas de piruvato através da via anaeróbia da glicólise, produzindo apenas duas moléculas de ATP. O piruvato é então aproveitado para o ciclo de Krebs formando nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e flavina adenina dinucleótido (FADH<sub>2</sub>) (equivalentes de redução) para serem utilizados na fosforilação oxidativa aeróbia, o que resulta na formação de 38 moléculas de ATP. Deste modo, a produção da maior parte do ATP necessário à célula é realizada pelas mitocôndrias (95% da quantidade de ATP necessária) (Erecinska &

Wilson, 1982). Ou seja, qualquer interferência na actividade mitocondrial prejudicará severamente as células (Duchen, 2004).

## 1.2 - A cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa

A mitocôndria apresenta na sua membrana interna 47 subunidades proteicas que constituem a cadeia respiratória mitocondrial (Hatefi, 1985). Uma proteína extrínseca de pequenas dimensões, o citocromo c, e uma quinona hidrofóbica, a ubiquinona, são designados por componentes móveis da cadeia respiratória, sendo as subunidades proteicas agrupadas em 4 complexos (Figura 3):

- complexo NADH:ubiquinona oxiredutase ou complexo I;
- complexo succinato desidrogenase ou complexo II
- complexo Ubiquinol:citocromo c oxiredutase ou complexo III
- complexo citocromo – c - oxidase ou complexo IV.

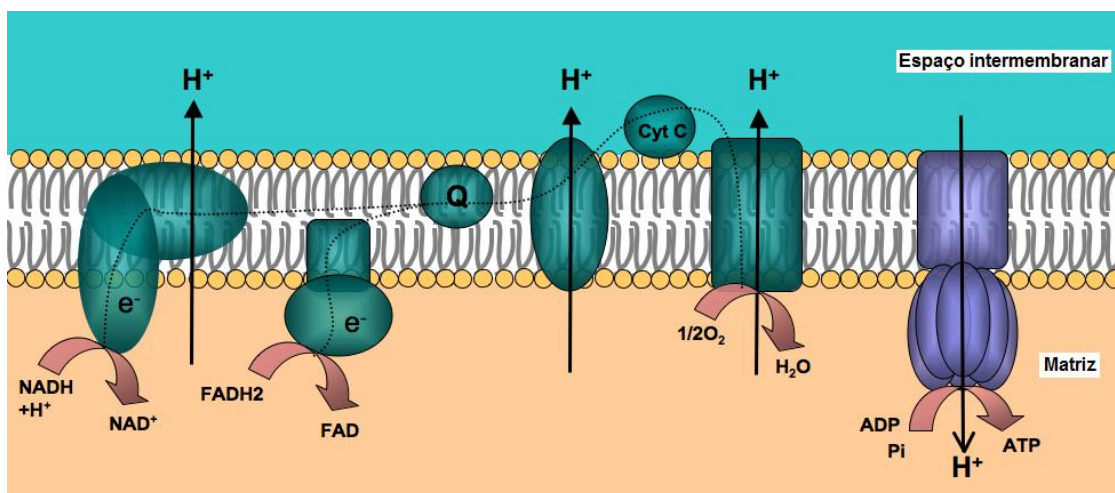


Figura 3 - Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial e ATP sintetase. A cadeia respiratória consiste em quatro complexos (complexos I, II, III e IV) e dois substratos intermediários (coenzima Q e citocromo c). O NADH + H<sup>+</sup> e FADH<sub>2</sub> produzidos pelo ciclo de Krebs são oxidados pela cadeia respiratória mitocondrial de modo a estabelecer um gradiente electroquímico de protões, que é finalmente utilizado pelo complexo V (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> – ATP sintetase) produzindo ATP (forma de energia usada pela célula) (adaptado de Bellance et al., 2009).

Os complexos proteicos referidos anteriormente possuem centros metálicos e estruturas quinóides (flavinas, quinonas), sendo estes proporcionadores da transferência sequencial de electrões até ao aceitador final, o oxigénio molecular.

O complexo I transfere os electrões que aceitou do NADH para o “pool” de ubiquinona, enquanto que o complexo II aceita electrões do succinato transferindo-os também para este “pool”. A molécula é então reduzida, passando a designar-se por ubiquinol e esta passagem envolve a semi-redução da ubiquinona – Q – por um electrão a semiquinona – QH<sup>•</sup> -, mas apenas quando um outro electrão alcança esta molécula é que ela atinge o seu estado de redução total, passando a designar-se por ubiquinol – QH<sub>2</sub>. Esta molécula móvel e hidrofóbica, o ubiquinol, é então capaz de transferir electrões para o complexo III, voltando novamente aos estados QH<sup>•</sup> e Q. Este ciclo é designado por ciclo Q ou ciclo da ubiquinona (Trumpower, 1990). No complexo III, os electrões são transferidos para o citocromo *c* e posteriormente para o complexo IV, sendo finalmente transferidos para o oxigénio molecular, onde origina uma molécula de água (H<sub>2</sub>O) juntamente com os protões.

Neste fluxo electrónico, os electrões fluem de complexo em complexo, o que é apenas possível devido ao facto de que cada complexo apresenta maior potencial “redox” do que o anterior (Figura 4).

O complexo V, vulgarmente designado por ATP sintetase, é constituído por dois componentes, F<sub>0</sub> e F<sub>1</sub>. A componente F<sub>0</sub> é formada por quatro tipos de cadeias polipeptídicas, sendo um segmento hidrofóbico que atravessa a membrana mitocondrial interna, formando um canal protónico. A componente F<sub>1</sub> é constituída por cinco tipos de cadeias polipeptídicas, fosforila o adenosina difosfato (ADP) e em certas situações hidrolisa o ATP na tentativa de repor o gradiente protónico. Esta molécula é inibida por oligomicina (Boyer, 1997; Boyer, 1998).

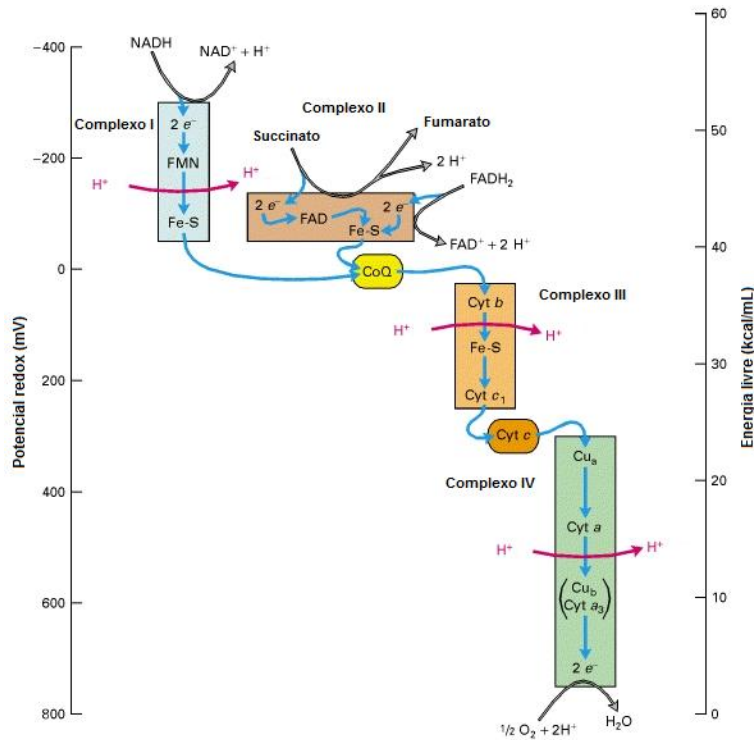


Figura 4 - Fluxo de electrões através da cadeia transportadora de electrões a partir de NADH, succinato e FADH<sub>2</sub> até ao oxigénio molecular. Cada um dos quatro complexos na cadeia está localizado na membrana mitocondrial interna e possui transportadores de electrões específicos. O citocromo c e coenzima Q transportam electrões entre os complexos. Os electrões atravessam em sequência desde os transportadores com menor potencial de redução até aos que possuem potencial mais positivo (superior). A escala da energia livre demonstra a redução correspondente da energia livre à medida que um par de electrões atravessa a cadeia. Quando os electrões fluem através dos três complexos, a energia libertada é suficiente para potenciar o bombeamento de iões H<sup>+</sup> através da membrana, estabelecendo uma força protomotriz (adaptado de Lodish et al., 2002).

### 1.3 - Teoria quimiosmótica

A fosforilação oxidativa situa-se no centro do metabolismo energético dos animais (Frey & Mannella., 2000). É um processo global que envolve a fosforilação de ADP a ATP que está associada ao transporte protónico e electrónico que é efectuado pela cadeia respiratória.

A teoria quimiosmótica foi proposta pela primeira vez em 1961 por Peter Mitchell (Mitchell, 1961). Esta teoria explica o mecanismo básico da produção de energia biológica. De acordo com este autor, existia um mecanismo de interligação entre as reacções de oxidação de substratos através da cadeia respiratória e de fosforilação de ADP. Assim, a função principal da cadeia respiratória é a ejeção vectorial de protões da matriz para o exterior que vão ser usados posteriormente para a síntese de ATP através da ATP sintetase durante o refluxo de  $H^+$  para a matriz (Figura 3). A energia resultante do gradiente electroquímico de protões pode também ser usada para o transporte iónico ou para a produção de calor (Stryer, 1988; Harris, 1995).

O gradiente de pH ( $\Delta pH$ , com pH alcalino na matriz) e o gradiente eléctrico ( $\Delta\Psi$ , negativo no interior da mitocôndria) são dois componentes do gradiente electroquímico de protões.

O movimento dos protões desde do espaço intermembranar até à matriz encontra-se associado a uma variação de energia livre  $\Delta G$  negativa, possuindo esta variação valor idêntico ao gradiente electroquímico de protões ( $\Delta\mu_{H^+}$ ). Desta forma:

$$\text{Equação 1: } \Delta G = \Delta\mu_{H^+} = nF\Delta\Psi + 2,3RT\log ([H^+]_d/[H^+]_i)$$

onde a designação  $n$  é o número de equivalentes (1),  $F$  é a constante de Faraday,  $R$  é a constante dos gases perfeitos,  $T$  é a temperatura absoluta ( $^{\circ}K$ ) e  $[H^+]_d$  e  $[H^+]_i$  são as concentrações de protões no interior e exterior da mitocôndria respectivamente (neste caso, como a membrana externa é permeável a protões, o exterior da mitocôndria é o espaço intermembranar). De acordo com a equação, pode-se definir  $\Delta\mu_{H^+}$  como sendo a diferença do potencial electroquímico de protões entre o interior e o exterior da mitocôndria. Assim, a equação pode ser representada numa forma mais simples, considerando que  $pH = -\log [H^+]$

$$\text{Equação 2: } \Delta G = \Delta\mu_{H^+} = nF\Delta\Psi + 2,3RT(pH_i - pH_d)$$

ou ainda

$$\text{Equação 3: } \Delta G = \Delta\mu_{H^+} = nF\Delta\Psi - 2,3RT \Delta pH$$

na qual

$$\text{Equação 4: } \Delta\text{pH} = \text{pH}_d - \text{pH}_f$$

Além desta expressão traduzir uma variação da energia livre do sistema sendo expressa em calorías (cal) ou Joules (J), normalmente é escrita sob a forma de uma diferença de potencial eléctrico e é expressa em volts (V) que são as unidades de potencial:

$$\text{Equação 5: } \Delta\mu_{\text{H}^+} / nF = \Delta\Psi - (2,3RT/F)\Delta\text{pH}$$

Tendo em consideração que à temperatura de 25°C, o factor 2,3RT/F possui o valor de 59 mV, a equação 5 pode ser escrita, em mV, como

$$\text{Equação 6: } \Delta\mu_{\text{H}^+} / nF = \Delta\Psi - 59\Delta\text{pH}$$

A força protomotriz ( $\Delta p$ ) é determinada através do quociente  $\Delta\mu_{\text{H}^+} / nF$

$$\text{Equação 7: } \Delta p = \Delta\mu_{\text{H}^+} / nF$$

O parâmetro  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  determina a variação da energia do sistema e  $\Delta p$  a variação do potencial eléctrico (por isso é que  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  é expresso em calorías ou Joules e  $\Delta p$  em Volts) mas, no entanto, ambos se referem à mesma grandeza que é a força responsável pelo fluxo de prótons para o interior da mitocôndria.

O potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), ou gradiente eléctrico, fornece a diferença de carga eléctrica entre o exterior e o interior da mitocôndria, sendo o potencial no interior negativo que é resultante da ejeção protónica produzida pela cadeia respiratória.

A membrana mitocondrial interna apresenta uma característica que é a sua baixa capacitância eléctrica. Mas, devido à existência de elevado número de proteínas e ácidos fracos e bases conjugadas respectivas, a matriz mitocondrial é altamente tamponizada. Logo, ocorre a produção de um potencial transmembranar de aproximadamente 200 mV durante a transferência de 1 nmol de  $\text{H}^+$ /mg de proteína para o exterior da mitocôndria. Mas o pH da matriz aumenta apenas 0,05 unidades, o que corresponde a 3 mV ( $59\Delta\text{pH} = 59 \times 0,05 \approx 3$  mV). Então, aproximadamente 99% do valor de  $\Delta p$  é representado pelo

potencial transmembranar. Dado que o influxo electroforético de iões potássio ( $K^+$ ) compensa, em parte, a transferência de cargas eléctricas que ocorre durante a ejeção de prótons, o valor de  $\Delta pH$  é superior (Czyz et al., 1995).

De acordo com o intermediário energético comum (a força protomotriz), a fosforilação oxidativa pode ser dividida em três subsistemas:

- a cadeia respiratória que produz a força protomotriz (resulta da ejeção de prótons para o espaço intermembranar);
- o sistema fosforilativo que utiliza  $\Delta p$  para sintetizar ATP de acordo com o refluxo de  $H^+$  para a matriz através da ATP sintetase. Este sistema é constituído por ATP sintetase, transportador de fosfato e ANT que são os elementos envolvidos na fosforilação de ADP a ATP;
- permeabilidade passiva a prótons da membrana mitocondrial interna (“leak” a prótons). Assim, existe um refluxo de prótons para a matriz.

Durante a fosforilação oxidativa, a força protomotriz utilizada pela ATP sintetase é dissipada devido ao aumento da permeabilidade a prótons da membrana mitocondrial interna. As UCP's são proteínas da família das “uncoupling proteins” existentes na membrana mitocondrial interna (Sluse et al., 2006). A sua função é a mediação do “leak” a prótons, ou seja, o desacoplamento da oxidação de substrato da síntese de ATP. Assim, ocorre a inibição da síntese de ATP sendo a energia libertada sob a forma de calor. A primeira UCP descrita e a mais abundante no tecido adiposo castanho é a UCP – 1. Em outros tecidos, como o fígado e músculo esquelético, foram identificadas as formas UCP – 2 e UCP – 3, respectivamente. A prevenção da acumulação excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ROS) é considerada como um efeito benéfico resultante do “leak” a prótons mediado por proteínas, apesar do aumento da expressão de UCP's no tecido, devido ao decréscimo da síntese de ATP, ter consequências graves para a função celular (Cannon et al., 2006).

#### **1.4 - Espécies reactivas de oxigénio, defesas antioxidantes e stresse oxidativo**

Em numerosas doenças, ocorre a formação de espécies químicas de elevada reactividade, resultantes do oxigénio (Cadet & Brannock, 1998; Wei, 1998; Schapira, 1999). Alguns exemplos de espécies reactivas de oxigénio (espécies radicalares e não radicalares derivadas do oxigénio) são anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radical hidróxilo ( $\bullet OH$ ).

A formação de ROS ocorre naturalmente na sequência de várias reacções metabólicas ou como resposta a estímulos (Fridovich, 1978), dado que estas espécies

desempenham uma função em processos como vias de transdução de sinal ou activação de factores de transcrição (Pinkus et al., 1996).

A fonte mais significativa de produção de ROS é a mitocôndria, sendo então o organelo mais susceptível de sofrer dano oxidativo.

A redução final do oxigénio molecular ocorre em duas fases:

- formação transiente de aniões  $O_2^{\cdot-}$  no local activo da enzima
- reacção de  $O_2^{\cdot-}$  com prótões matriciais, formando-se  $H_2O$

Devido à elevada afinidade da citocromo – c - oxidase, a formação do radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é evitada, dado não ocorrer a libertação de intermediários parcialmente reduzidos. A formação mitocondrial de ROS é um processo fisiológico e contínuo, resultante do metabolismo aeróbio (Boveris & Chance, 1973; Turrens, 1997). Verifica-se que durante a fosforilação oxidativa, cerca de 1 a 5% do oxigénio usado pela cadeia respiratória é parcialmente reduzido e convertido em superóxido.

A produção de ROS ocorre ao nível dos Complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial (Boveris et al., 1976; Takeshige & Minakami, 1979; Turrens et al., 1985). A produção mais significativa do radical anião superóxido ocorre ao nível da transferência de electrões do “pool” de ubiquinona para o Complexo III. Ocorre um aumento do radical livre semiubiquinona que resulta da inibição da cadeia respiratória mitocondrial devido ao decréscimo de oxigénio disponível ou através da utilização de inibidores como o cianeto (Complexo IV) ou antimicina A (Complexo III) (Turrens et al., 1985).

Em soluções aquosas, o anião superóxido é reactivo. Os seus níveis são regulados através da dismutação enzimática catalisada pela superóxido dismutase que produz peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). A acção de  $H_2O_2$  é nociva devido ao radical hidroxilo que é o produto da sua redução (Zhang et al., 1990). O principal responsável pelo dano molecular em sistemas biológicos é então este radical altamente reactivo (Halliwell & Gutteridge, 1990).

As células desenvolveram um sistema de defesas antioxidantes não enzimáticos (glutatião reduzido GSH) e antioxidantes enzimáticos (catalase e superóxido dismutase) (Sies, 1991), devido à formação do radical anião superóxido que é considerado um processo biológico contínuo. O sistema antioxidante eficiente da mitocôndria (revisto em Radi et al., 1991) é composto por superóxido dismutase, glutatião redutase, NADPH, GSH, glutatião peroxidase, vitamina C e a respiração mitocondrial (Guidot et al., 1995; Korshunov et al., 1999). A produção excessiva de radicais livres pela cadeia respiratória pode ser evitada através de ligeiras reduções no gradiente protónico (Korshunov et al., 1997; Skulachev, 1998).

Quando a produção mitocondrial de ROS aumenta de modo significativo, ocorre um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a elevada produção de ROS, resultando em stresse oxidativo. Neste caso, ocorre dano mitocondrial e consequente disfunção



celular. O músculo esquelético está sujeito a stresse oxidativo. Deste modo, os alvos da acção das espécies reactivas de oxigénio são as proteínas, lípidos e até o próprio DNA mitocondrial (mtDNA), e deste modo, o dano oxidativo resulta na perda irreversível das funções mitocondriais (fosforilação oxidativa e transporte de iões) (Zhan et al., 1990; Paradies et al., 1998; Brookes et al., 1999; Lu et al., 1999; Poderoso et al., 1999).

### **1.5 - O papel da mitocôndria na homeostase do cálcio**

Na maioria das células, a concentração citoplasmática de cálcio livre é regulada, sendo mantida entre os intervalos de 0.05 – 0.5  $\mu\text{M}$ . A membrana mitocondrial interna, assim como a membrana plasmática e o retículo endoplasmático, regulam a concentração citoplasmática de cálcio pois possuem um sistema transportador deste ião.

Durante os aumentos periódicos na concentração de cálcio, a mitocôndria capta cálcio devido a uma interacção com os canais iónicos da membrana plasmática ou com a libertação de cálcio do retículo endoplasmático. De acordo com os sistemas específicos de transporte de cálcio existentes na mitocôndria (Figura 5), a sua função na homeostase de cálcio citoplasmático é extremamente relevante (Gunter et al., 1975; Fiskum & Lehninger, 1979; Gunter & Pfeiffer, 1990; Gunter et al., 1994).

A entrada de cálcio para a matriz mitocondrial é mediado por um sistema do tipo uniporte, sendo promovido pelo gradiente electroquímico, sem estar associado ao cotransporte com outros iões ou moléculas ou à hidrólise de ATP (Crompton et al., 1978; Gunter & Pfeiffer, 1990; Gunter et al., 1994; Gunter & Gunter, 2001). Como o uniporte de cálcio é activado por cálcio externo, a remoção de cálcio extramitocondrial desactiva este transportador (Kröner, 1986). Existem vários moduladores que regulam a entrada de cálcio na mitocôndria como, por exemplo, os catiões divalentes (magnésio e bário) que competem com o cálcio pelo transporte via uniporte. Um inibidor específico do uniporte de cálcio é o ruténio (composto vermelho) (Gunter et al., 1994; Matlib et al., 1998).

O transporte de cálcio de modo rápido (RaM), inicialmente descrito em mitocôndrias de fígado, é um outro mecanismo responsável pela entrada de cálcio na mitocôndria (Sparagna et al., 1995; Gunter & Gunter, 2001). De acordo com alguns trabalhos realizados (Sparagna et al., 1994; Sparagna et al., 1995), a entrada de cálcio é mais eficaz quando o organelo é exposto a pulsos de cálcio e não a uma concentração constante e idêntica de cálcio.

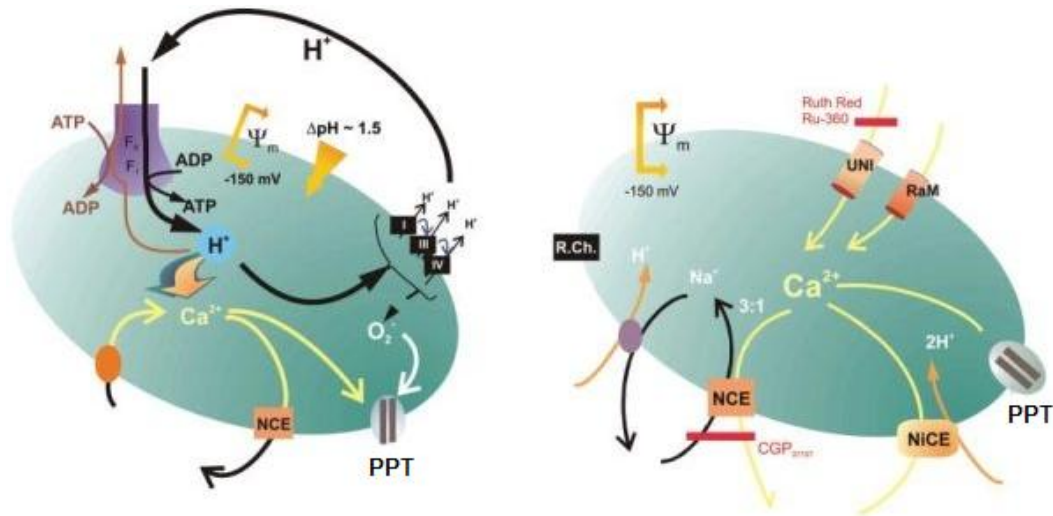


Figura 5 - Mecanismos de transporte de cálcio na mitocôndria. O gradiente electroquímico é estabelecido na mitocôndria através da actividade da cadeia respiratória mitocondrial, constituída pelos vários complexos (I,II,III e IV). A via principal para a entrada de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) está representada pelo uniporter de  $\text{Ca}^{2+}$  (UNI). O transportador de modo rápido (RaM) possui maior afinidade por cálcio e cinética de activação/inactivação mais rápida. O efluxo de cálcio ocorre por duas vias principais, uma mediada pelo gradiente de  $\text{Na}^+$ , trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCE) e outra via que é independente de  $\text{Na}^+$  - trocador  $\text{Ca}^{2+}$  independente de  $\text{Na}^+$  (NICE) que acopla a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  com o gradiente de prótons (adaptado de Toescu, 2007).

Existem duas vias distintas para o efluxo de cálcio da mitocôndria:

- dependente de sódio (Gunter & Pfeifer, 1990)
- independente de sódio (Puskin et al., 1976)

Estes dois sistemas requerem energia apesar de possuírem cinéticas diferentes, dado que o efluxo de cálcio ocorre contra o gradiente electroquímico. No coração, a saída de cálcio da mitocôndria ocorre principalmente através do antiporte dependente de sódio, possivelmente na estequiometria de  $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$  (Gunter et al., 1994).

Através destes sistemas, a taxa máxima de efluxo mitocondrial de cálcio é menor do que a de influxo, deste modo, as mitocôndrias são expostas a concentrações elevadas de cálcio quando a sua concentração aumenta no citoplasma.

## 1.6 - Permeabilidade transitória mitocondrial

A membrana mitocondrial interna é virtualmente impermeável a quase todos os iões e moléculas polares mas alguns factores, como a acumulação de cálcio, favorecem o aumento da permeabilidade desta membrana. Quando as mitocôndrias isoladas são expostas a concentrações supra-fisiológicas de cálcio, estas perdem a impermeabilidade a iões e moléculas da sua membrana interna (< 1500 Da). Isto origina um aumento de volume da matriz devido à entrada de água na tentativa de compensar o potencial osmótico (Bernardi, 1992; Gunter et al., 1994; Zoratti & Szabò, 1995; Bernardi, 1996). Este entumescimento mitocondrial leva à ruptura da membrana interna, despolarizando a mitocôndria e libertando cálcio (Zoratti & Szabò, 1995; Bernardi, 1999; Crompton, 1999).

A permeabilidade transitória mitocondrial (PTM) resulta da abertura de um canal proteico inespecífico de elevada dimensão (poro de permeabilidade transitória mitocondrial). A sua indução é fortemente regulada e as suas dimensões variam entre 2 e 2.6 nm (Crompton, 1999; Bernardi et al., 2001). A permeabilidade transitória mitocondrial é considerada como uma via adicional de saída de cálcio da mitocôndria.

A indução da PTM é caracterizada por (Zoratti & Tombola, 2001):

- de acordo com o tecido do qual as mitocôndrias foram isoladas, a presença de cálcio na matriz acima de uma determinada concentração.
- utilização de ciclosporina A (CyA) (peptídeo cíclico usado com finalidades terapêuticas como imunossupressor) (Galat, 1993), é também considerado como um inibidor específico da indução da PTM (Broekemeier et al., 1989).
- indução de PTM depende da voltagem sendo a despolarização mitocondrial um pré-requisito para a indução da PTM.
- na presença de ciclofilina D (proteína constituinte do canal), a existência de uma correlação entre o pH da matriz mitocondrial e a indução da PTM pois um pH ácido inibe a abertura do poro de PTM devido à protonação de resíduos de histidina (Bernardi, 1999).
- a indução da PTM é favorecida pelo aumento da fluidez membranar (Colell et al., 2003).

O poro de PTM apresenta dois estados de condutância: um de baixa condutância, reversível (está envolvido na libertação de cálcio para o exterior da mitocôndria, induzida por este ião) (Ichase & Mazat, 1998); um de alta condutância (ocorre devido à acumulação excessiva de cálcio na matriz, aumentando também o pH). O estado de alta condutância é irreversível, contribuindo para a libertação de factores pró-apoptóticos (como citocromo *c* e pró-caspases) e para o colapso do potencial transmembranar, devido ao entumescimento mitocondrial. Este estado está envolvido na via da morte celular programada (Bernardi, 1999; Bernardi et al., 2001). É necessária uma concentração superior de cálcio na matriz de modo a ocorrer a transição do poro de baixa condutância

para o poro de alta condutância (Ganitkevitch, 2003). Concentrações elevadas de cálcio, depleção de ATP, aumento dos níveis da proteína Bax (factor pró-apoptótico) na membrana mitocondrial, despolarização mitocondrial e stresse oxidativo são condições patofisiológicas indutoras da PTM.

Alguns dos componentes do poro de PTM já se encontram identificados mas no entanto a sua caracterização molecular ainda não está completa (Figura 6). Os seus componentes são ANT (translocador de nucleótidos de adenina da membrana interna), VDAC (canal aniônico dependente da voltagem da membrana externa), ciclofilina D na matriz, hexocinase II do citosol, receptor de benzodiazepinas da membrana externa, as proteínas Bax e Bcl-2 e a creatina cinase do espaço intermembranar (Crompton, 2000; Colell et al., 2003).

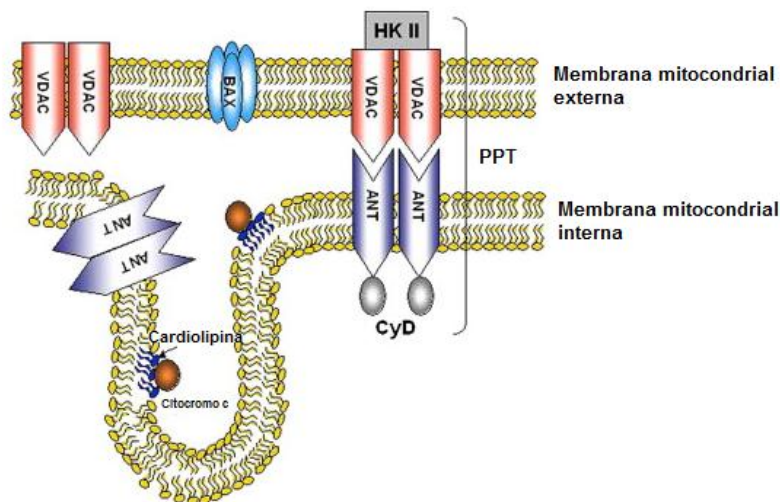


Figura 6 - Os vários componentes do poro de permeabilidade transitória. VDAC está localizada na membrana mitocondrial externa e ANT na membrana mitocondrial interna. Ciclofilina D (CyD) está ligada ao ANT no lado matricial. Quando VDAC e ANT se unem na mesma posição, formam o poro de PTM (adaptado de Kumarswamy & Chandna, 2009).

A proteína mais abundante na mitocôndria é o translocador de nucleótidos de adenina. Esta proteína possui três isoformas que são codificadas por genes diferentes (Doerner et al., 1997) sendo responsável pela saída do ATP produzido na matriz para o citosol em troca por ADP. A isoforma ANT – 2 é a mais abundante no fígado e no rim sendo nestes mais fáceis de ocorrer a indução da PTM (Crompton et al., 1999).

A proteína ANT funciona como um poro com duas conformações extremas, conformação c e conformação m, onde os locais de ligação do substrato situam-se, respectivamente, no lado citosólico ou no lado matricial da membrana interna. A conformação c é susceptível às alterações indutoras da PTM provocadas pela ligação de cálcio mas isto não acontece na conformação m (Crompton et al., 1999). A abertura do poro de PTM é inibida devido à existência de ATP ou ADP exógenos dado que estes induzem a conformação m. Na presença de cálcio, o ANT pode formar canais com múltiplos estados de subcondutância, isto de acordo com ensaios de electrofisiologia realizados (Vieira et al., 2000).

A isomerização cis– trans de ligações peptídicas é catalisada por ciclofilinas (Galat, 1993). Estas proteínas possuem várias isoformas: CyP-A existe no citosol, CyP-B e CyP-C no retículo endoplasmático e finalmente CyP-D existe na mitocôndria. Na presença de ciclosporina A (CyA), estas isoformas são inibidas e na presença deste inibidor possuem também a actividade de inibidores da fosfatase proteica calcineurina (Schreiber & Crabtree, 1992).

Um poro não selectivo existente na membrana mitocondrial externa e que permite a passagem de metabolitos e iões para o espaço intermembranar (MM  $\approx$  5 KDa) é designado por VDAC. Os metabolitos e iões podem ser posteriormente transportados, por transportadores específicos, através da membrana interna (Crompton et al., 1999). Foram identificadas, em mitocôndrias isoladas de rato, três isoformas do VDAC (Sampson et al., 1997). Esta é uma proteína que não é muito abundante e deste modo, apenas uma pequena fracção de ANT pode ser complexada pelo VDAC, com a finalidade de induzir a PTM. O VDAC situa-se nos pontos de contacto entre as membranas externa e interna, fortemente ligado ao ANT da membrana interna (McEnery et al., 1992; Mannella, 1996). Pode também ligar-se a proteínas solúveis (cinases) (Crompton et al., 1999) e às proteínas apoptóticas Bax e Bcl-2 (Shimizu et al., 1999; Shimizu et al., 2000) o que lhe permite formar um circuito possibilitando deste modo a passagem do citocromo c.

O receptor periférico de benzodiazepinas (proteína da membrana mitocondrial externa) funciona como um alvo farmacológico de determinadas drogas citotóxicas (Vieira et al., 2000; Crompton, 2000).

## **2 - Músculo esquelético**

O músculo esquelético é o principal tecido responsável por cerca de 70-80% da entrada de glicose no organismo, sendo o principal regulador do equilíbrio energético. É uma forma de tecido muscular estriado que se encontra sob o controlo do sistema nervoso somático. Este é um dos três tipos principais de músculos (outros são o músculo cardíaco e músculo liso).

A maioria deste tecido está ligada aos ossos através de fibras de colagénio designadas por tendões sendo constituído por centenas de fibras musculares cilíndricas e alongadas que se estendem desde o seu local de origem até ao extremo oposto. As fibras estão interligadas por tecido conectivo no qual se situam os vasos sanguíneos e os nervos e formam-se por fusão de mioblastos em desenvolvimento. O número de fibras é regulado por uma citocina sintetizada nas células musculares (miostatina).

Cada fibra muscular possui:

- miofibrilas;
- mitocôndrias;
- retículo endoplasmático extenso;
- vários núcleos.

As fibras são compostas por miofibrilas de actina (formam os filamentos mais finos) e miosina (compõem os filamentos grossos) repetidas num sarcomero (unidade básica das células responsável pelo aspecto estriado). Cada fibra muscular multinucleada está interligada às outras estando rodeadas por tecido conjuntivo (endomísio). Estas fibras estão agrupadas em feixes através de tecido conectivo que se designa por perimísio. O feixe de fibras é designado por fascículo (Figura 7).

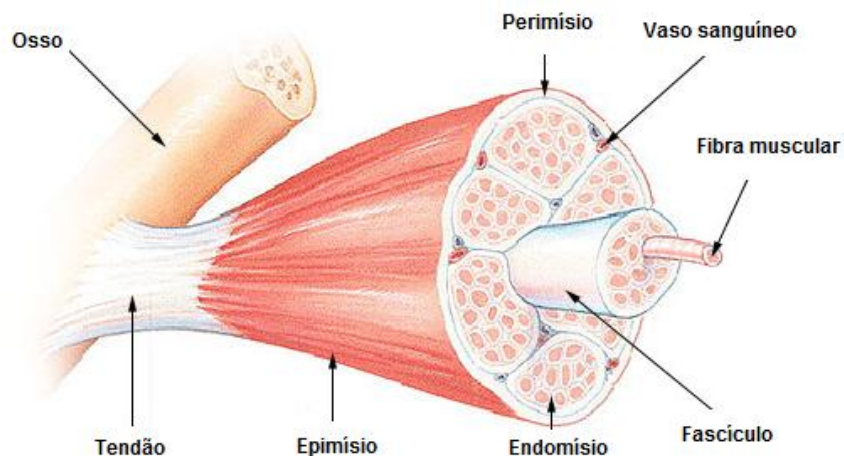


Figura 7 - Estrutura do tecido muscular esquelético (adaptado de [http://www.daviddarling.info/encyclopedia/S/skeletal\\_muscle.html](http://www.daviddarling.info/encyclopedia/S/skeletal_muscle.html)).

As fibras musculares são constituídas por sarcolema (membrana plasmática), retículo sarcoplasmático, sarcoplasma (citoplasma). Os núcleos e as mitocôndrias situam-se sob a membrana plasmática e o retículo endoplasmático entre as miofibrilas.

O aspecto estriado das fibras musculares deve-se ao padrão alternado de bandas escuras A e bandas claras I (Figura 8).

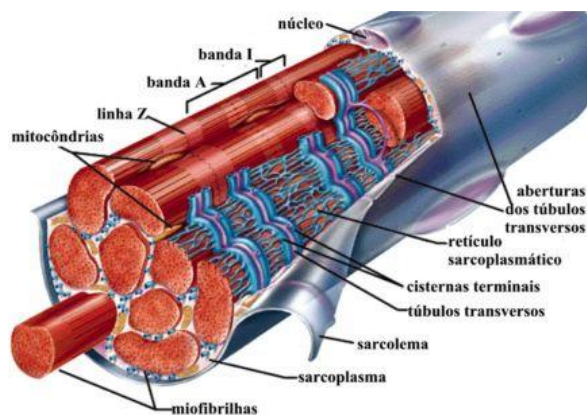


Figura 8 - Estrutura da fibra muscular (adaptado de <http://curlygirl.no.sapo.pt/imagens/fibramuscular.jpg>).

As bandas A são produzidas pelos filamentos mais finos. Quando estes filamentos não se sobrepõem com os filamentos finos formam a banda I.

A interacção da miosina e actina é responsável pela contracção muscular. A contracção ocorre devido a uma interacção das proteínas (actina e miosina) na presença de iões de cálcio e energia. A energia disponível para a contracção provém da hidrólise de ATP, sendo o cálcio libertado pelo retículo sarcoplasmático quando este é estimulado por despolarização. O impulso nervoso é que finaliza o processo de contracção. Quando este impulso é interrompido, o cálcio é armazenado no retículo sarcoplasmático após ter sido removido por uma bomba de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase).

O músculo esquelético pode ser dividido em duas categorias: tipo I e tipo II. As fibras do tipo I apresentam uma coloração avermelhada devido à presença de proteínas que ligam o oxigénio – mioglobina. Estas fibras utilizam o metabolismo oxidativo de modo a produzirem ATP. As fibras do tipo II são brancas devido a ausência de mioglobina. As fibras vermelhas apresentam mais mitocôndrias e vasos sanguíneos que as brancas.

A transição de metabolismo aeróbio para anaeróbio durante o exercício necessita que todos os sistemas estejam activos de modo a assegurar o fornecimento constante de ATP para os músculos. Isto inclui a utilização de hidratos de carbono como substratos, a redistribuição do

fluxo sanguíneo para o músculo e a remoção de vários produtos do metabolismo anaeróbio (dióxido de carbono e ácido láctico).

A molécula de ATP é a fonte imediata de energia para a contracção muscular. Embora esta fonte não seja inesgotável, ela é sempre restabelecida quando é necessário. Existem três fontes de fosfatos de alta energia para restabelecerem o ATP utilizado, que são a creatina fosfato, o glicogénio e a respiração celular que ocorre nas mitocôndrias existentes nas fibras musculares.

As fibras do músculo esquelético possuem cerca de 1% de glicogénio. As fibras musculares degradam este glicogénio através da glicogenólise originando glicose – 1 – fosfato. Esta molécula entra na via glicolítica produzindo duas moléculas de ATP por cada par de moléculas de ácido láctico produzidas. Na presença de oxigénio, a glicose pode ser oxidada a água e dióxido de carbono. Mas se não existe oxigénio, o processo pára com a conversão de glicose em ácido láctico. O ácido láctico pode sair das células musculares e acumular-se na corrente sanguínea. A disponibilidade de oxigénio depende da sua entrega pelo sangue; quando os músculos ficam activos, os produtos do seu metabolismo originam a dilatação dos vasos, o que permite um maior fluxo sanguíneo.

Além dos hidratos de carbono, os músculos utilizam ácidos gordos como substratos para a oxidação.

### **3 - O síndrome metabólico**

#### **3.1 - A patologia**

O síndrome metabólico/ pré diabetes tem sido considerado um problema de saúde público mundial devido à elevada incidência de obesidade que tem sido promovida pelo estilo de vida sedentário e também pelo consumo excessivo de alimentos ricos em gordura e açúcares (Krebs & Roden, 2004; Haslam & James, 2005).

Na comunidade global, a obesidade atingiu valores alarmantes sendo até mesmo considerada como uma epidemia global. Os níveis desta doença têm aumentado cada vez mais ao longo do tempo, principalmente em crianças (Figura 9).

O síndrome metabólico é uma condição multifactorial associada com elevada taxa de mortalidade, sendo caracterizada por combinações de várias características como a obesidade abdominal, hipertensão arterial, hiperglicemia, aumento dos níveis de triacilgliceróis, dislipidemia, resistência à insulina e aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose (Haslam & James, 2005). Esta condição é considerada como um factor de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cancro e enfartes, sendo



caracterizada por uma desregulação da homeostase de glicose podendo originar o desenvolvimento de diabetes do tipo 2.

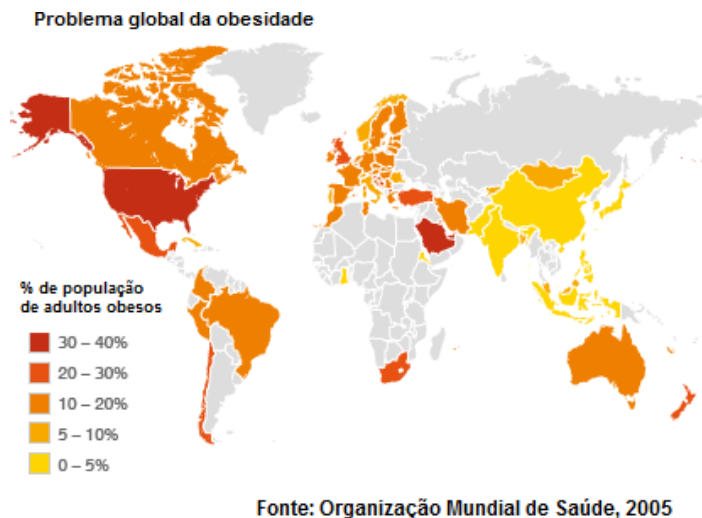


Figura 9 - Percentagem de população adulta obesa (adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2005).

Os principais factores de risco para o desenvolvimento desta condição incidem sobre uma dieta desequilibrada, juntamente com o estilo de vida sedentário que ocorre na população. Deste modo, ocorre um consumo excessivo de alimentos ricos em gordura que originam um desequilíbrio energético e por conseguinte o ganho de peso sob a forma de gordura corporal. Esta condição resulta de um balanço energético positivo no qual são consumidas maior quantidade de calorias do que a que é utilizada para o processo de oxidação, podendo originar diversas anomalias a nível do metabolismo de glicose e de lípidos em vários tecidos como no fígado, músculos e adipócitos (Carley & Severson, 2005).

Uma anomalia metabólica fulcral associada com o desenvolvimento de obesidade e diabetes do tipo 2 é a resistência à insulina (figura 11) sendo considerada como um factor patogénico comum do síndrome metabólico (Koh et al., 2005). A resistência à insulina representa uma incapacidade da insulina de exercer a sua função na homeostase da glicose e dos lípidos; sendo o desenvolvimento desta condição possível devido a um desequilíbrio energético. É uma condição na qual as células tornam-se menos sensíveis aos efeitos de diminuição da glicose pela hormona insulina. Na maioria dos humanos, os níveis normais de insulina no sangue tornam-se inadequados para manter os níveis normais de glicose no sangue. As células musculares e os adipócitos necessitam de insulina para poderem absorver as moléculas de glicose.

Uma das características comuns da obesidade induzida por dieta é a acumulação intracelular de lípidos que tem impacto negativo na saúde. Em humanos com estilos de vida sedentários, a acumulação de gordura no músculo esquelético está associada com o desenvolvimento de resistência à insulina, pré-disposição para o desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 (Schrauwen et al., 2010). Esta tem sido relacionada com a inibição da função das células  $\beta$  pancreáticas (Zhou & Grill, 1994) e com o desenvolvimento de resistência à insulina periférica e hepática em várias pessoas, como por exemplo, em pacientes diabéticos do tipo 2 (Shah et al., 2003; Huss & Kelly, 2005). No caso de diabetes do tipo 2, verifica-se um aumento dos níveis de lípidos intramiocelulares e resistência à insulina muscular (Goodpaster et al., 2001).

A resistência à insulina nas células musculares reduz a entrada de glicose nas células (assim como o armazenamento de glicose como glicogénio e triacilgliceróis, respectivamente).

As elevadas concentrações de ácidos gordos no sangue (associado com resistência a insulina e diabetes tipo 2), a reduzida entrada de glicose nos músculos e aumento da produção de glicose no fígado contribuem para os níveis elevados de glicose no sangue.

### **3.2 - A bioquímica da patologia**

O músculo esquelético apresenta uma elevada capacidade de transição entre os ácidos gordos e a glicose como substratos oxidativos que suportam a actividade de contracção deste tecido. Este adapta-se ou “responde” a várias alterações metabólicas através do ajuste da selecção de substrato de modo a corresponder às necessidades energéticas. A elevada oxidação de ácidos gordos inibe o metabolismo da glicose por inibição de várias enzimas como a hexocinase, fosfofrutocinase e piruvato cinase (Randle et al., 1963). Esta inibição origina por sua vez a diminuição do transporte de glicose estimulado por insulina (Frayn, 2003).

Num indivíduo com um metabolismo normal, níveis elevados de glicose no sangue induzem a libertação de insulina através das células beta localizadas no pâncreas. A insulina provoca a absorção de glicose pelos tecidos sensíveis a insulina (músculo e tecido adiposo), de modo a diminuir os níveis de glicose no sangue. As células beta reduzem o output de insulina à medida que os níveis de glicose diminuem para se manterem constantes aproximadamente em 5 mmol/L (90 mg/dL). Numa pessoa que é resistente a insulina, os níveis normais de insulina não apresentam o mesmo efeito no controlo dos níveis de glicose no sangue. Quando os níveis de glicose se tornam muito superiores aos normais, ocorre então diabetes tipo 2. Assim sendo, num estado de resistência à insulina, ocorre uma diminuição da utilização de glicose pelo músculo esquelético (Simoneau et al., 1997).

O aumento da entrada de ácidos gordos para o tecido muscular leva à acumulação de lípidos, produção de espécies reactivas de oxigénio e disfunção celular (Hegarty et al., 2003; Bonen et al., 2004; Krebs & Roden, 2004). Assim sendo, um elevado armazenamento intramuscular de triacilgliceróis é uma característica de estados de resistência à insulina e/ou de obesidade, tanto em animais como em humanos (Goodpaster & Kelley, 2002; Hulver et al., 2003). Estas reservas lipídicas acabam por competir com a glicose tal como um substrato oxidativo e/ou contribui para a síntese de outras entidades derivadas de lípidos que interferem directamente com a transdução de sinalização por parte da insulina (Shulman, 2000) (Figura 10). Deste modo, um aumento dos níveis de ácidos gordos livres no plasma devido a uma dieta rica em gorduras (Kraegen et al., 1986; Kim et al., 1996), origina uma diminuição da utilização de glicose afectando a oxidação de glicose e síntese de glicogénio no músculo esquelético (Roden et al., 1996; Kim et al., 2000).

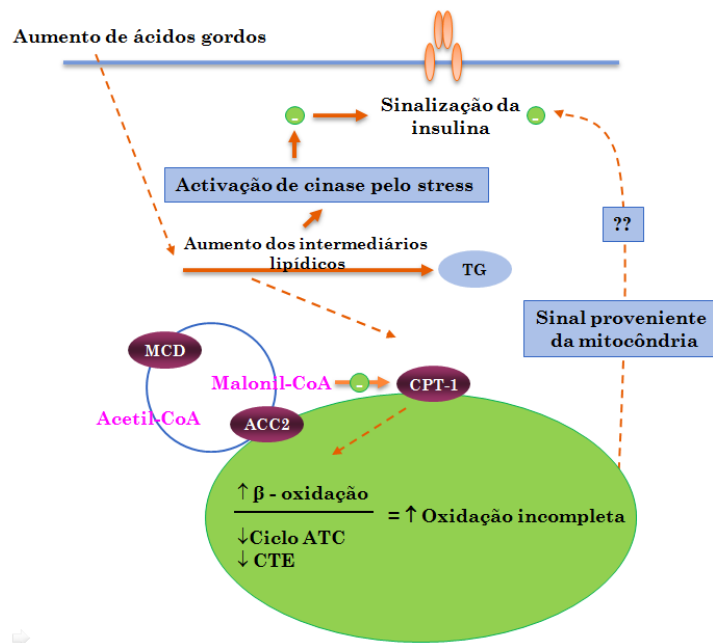


Figura 10 - Oxidação incompleta de ácidos gordos origina stresse oxidativo e medeia a resistência à insulina no músculo esquelético. Os ácidos gordos circulantes atravessam a membrana plasmática e são armazenados como triacilgliceróis (TG) ou transportados para a mitocôndria por carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1). Uma dieta rica em gorduras resulta em elevadas velocidades de  $\beta$  – oxidação excedendo a capacidade do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (CAT) e cadeia transportadora de electrões (CTE), resultando na oxidação incompleta de ácidos gordos e acumulação de acilcarnitinas na mitocôndria (adaptado de Watt & Hevener, 2008).

A acumulação net de lípidos no músculo esquelético obeso resulta do aumento da captação de ácidos gordos pelo músculo e/ou uma diminuição da capacidade de oxidação lipídica. A capacidade oxidativa do músculo esquelético depende principalmente da função mitocondrial e a resultante inibição da capacidade de oxidação de ácidos gordos está fortemente relacionada com a sensibilidade à insulina (Simoneau & Kelley, 1997; Petersen et al., 2004; Lowell & Shulman, 2005). Num estado de obesidade, a diminuição da capacidade do músculo esquelético para oxidar ácidos gordos parece ser função do reduzido conteúdo mitocondrial. Isto pode resultar da redução dos níveis de actividade física em indivíduos obesos e da redução ou inibição da biogénese mitocondrial (Momken et al., 2002; Nisoli et al., 2003; Sparks et al., 2005). É possível que a diminuição dos factores de transcrição que regulam a biogénese mitocondrial seja responsável pelo fenótipo de obesidade como resultado de uma pré disposição genética e/ou um estilo de vida sedentário. A entrada de ácidos gordos para a mitocôndria é regulada por uma enzima, CPT1, de modo a evitar a acumulação de ácidos gordos. Mas este sistema não evita a difusão de ácidos gordos não metabolizados para o interior da mitocôndria. No entanto, estes ácidos gordos não podem ser oxidados devido à falta da acil-CoA sintetase na matriz, sendo então incorporados na membrana mitocondrial interna onde se tornam susceptíveis ao dano oxidativo. Estes peróxidos lipídicos originam dano oxidativo mitocondrial, contribuindo para a diminuição da capacidade mitocondrial em pacientes pré-diabéticos (Kelley et al., 2002). Assim, uma dieta rica em gorduras induz uma disfunção mitocondrial que está associada com o aumento da produção de ROS (Bonnard et al., 2008). A disfunção mitocondrial pode provocar um mau funcionamento do tecido e até mesmo graves desordens patológicas. Deste modo, os tecidos que possuem elevadas necessidades energéticas, como é o caso do músculo esquelético, são os mais afectados.

Anomalias mitocondriais associadas à obesidade e/ou diminuição da sensibilidade à insulina, estão relacionadas com a diminuição da expressão e actividade de coactivador 1 $\alpha$  do receptor activado por proliferadores do peroxisoma gama (PGC-1 $\alpha$ ) (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003; Lowell & Shulman, 2005; Sparks et al., 2005; Koves et al., 2008). Também no músculo de pacientes diabéticos do tipo 2 e pré-diabéticos, se verifica uma diminuição da expressão de genes envolvidos na fosforilação oxidativa (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003) (Figura 11).

A expressão reduzida de PGC-1 $\alpha$  e factor respiratório nuclear 1 (NRF-1), reduções da expressão de genes relativos ao ciclo de Krebs, enzimas da cadeia transportadora de electrões, depleção de DNA mitocondrial e reduções da área e número de mitocôndrias, contribuem para a desregulação do metabolismo. Esta situação provoca a diminuição da capacidade da fosforilação oxidativa e origina um estado deficiente em energia no músculo de pacientes pré diabéticos e diabéticos, em obesidade e condições de dietas ricas em gordura. Em animais sujeitos a dietas ricas em gordura, a redução da biogénese mitocondrial está associada com uma diminuição do gasto energético e aumento do peso corporal (Nisoli et al., 2003; Sparks et al., 2005).

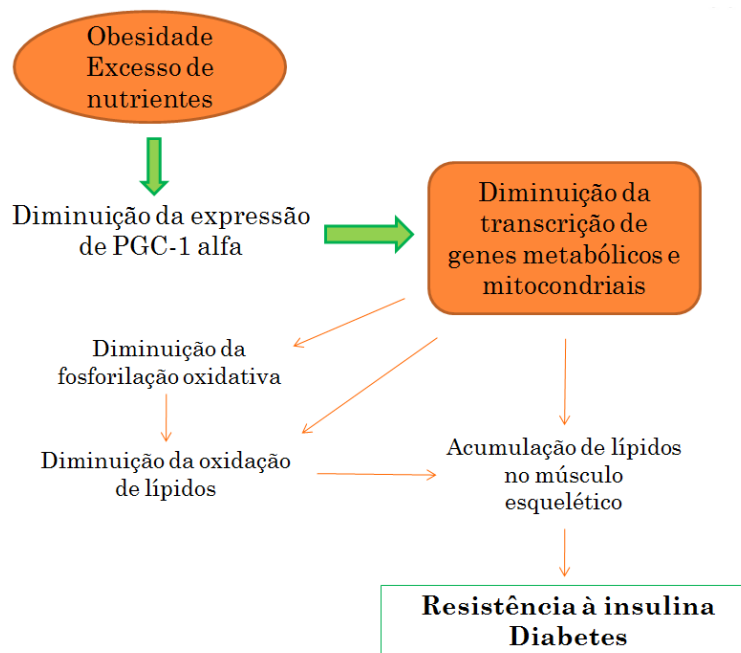


Figura 11 - Contribuição de PGC-1 $\alpha$  para a expressão e fenótipo de resistência à insulina e diabetes do tipo 2 (adaptado de Patti et al., 2003).

Estudos realizados demonstraram que pacientes diabéticos do tipo 2 possuem uma alteração morfológica mitocondrial, o que inclui uma diminuição da área mitocondrial e um elevado número de mitocôndrias danificadas (Kelley et al., 2002). A área mitocondrial está relacionada com a disponibilidade de glicose estimulada por insulina. Estes pacientes também apresentam uma redução da expressão de genes que codificam enzimas chave do metabolismo oxidativo mitocondrial (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003). A maioria destes genes estão sob o controle de PGC-1 $\alpha$ , estando a sua expressão diminuída no caso de diabetes do tipo 2 (Patti et al., 2003; Heilbronn et al., 2007; Mensink et al., 2007). Em pacientes diabéticos e/ou com resistência à insulina, verifica-se uma redução da função mitocondrial (Phielix et al., 2008). Estudos realizados (Bonen et al., 2004, Rolo & Palmeira, 2006; Bonnard et al., 2008) verificaram que o aumento da entrada de ácidos gordos para o músculo contribui para a acumulação de lípidos neste mesmo tecido, aumentando deste modo o fluxo oxidativo mitocondrial, a produção de ROS e a disfunção mitocondrial.

A biogénese mitocondrial em situações nas quais as divisões mitocondriais não estão relacionadas com o ciclo celular, permite que as mitocôndrias pré-existentes se possam dividir sob o controlo das vias de sinalização que culminam num aumento da expressão de genes respiratórios. É um processo complexo que necessita da síntese, importação e incorporação de proteínas e lípidos no retículo mitocondrial, assim como a replicação de DNA mitocondrial. Como o genoma mitocondrial apenas codifica 13

proteínas essenciais da fosforilação oxidativa, a comunicação entre os genomas nuclear e mitocondrial é essencial para a produção de um organelo funcional e estrutural (Hock & Kralli, 2009). A biogénese mitocondrial encontra-se sob o controlo de uma rede de factores de transcrição e coreguladores, que controlam a massa mitocondrial e a indução dos genes da fosforilação oxidativa, assim como as enzimas do metabolismo intermédio. Esta regulação garante a transcrição coordenada dos genomas nuclear e mitocondrial, a síntese de lípidos e proteínas e a estequiometria de complexos proteicos com multisubunidades numa cadeia respiratória funcional. No entanto, uma inibição de qualquer fase pode levar a um transporte anormal de electrões e consequente incapacidade para produzir ATP, originando um distúrbio da homeostase energética.

O principal regulador da biogénese mitocondrial é PGC-1 $\alpha$  (Puigserver & Spiegelman, 2003). O PGC-1 $\alpha$  interage com factores de transcrição de ligação de DNA o que é benéfico para a comunicação núcleo-mitocôndria e integra a expressão de genes nucleares num programa de biogénese mitocondrial (Puigserver et al., 1998; Lehman et al., 2000; Clementi & Nisoli, 2005; Scarpulla, R.C., 2006). Os factores NRF1 e NRF2 ligam-se e activam a expressão de vários genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriais assim como o factor de transcrição mitocondrial A (TFAM) que origina a expressão de genes mitocondriais. O PGC-1 $\alpha$  liga-se a NRF-1 e NRF-2 e coactiva a expressão dos seus genes alvo (Scarpulla R.C., 2006). A estimulação de PGC-1 $\alpha$  origina o aumento da massa e função mitocondrial, deste modo, este é considerado o principal regulador da biogénese mitocondrial. Várias vias de sinalização regulam a expressão de PGC-1 $\alpha$  que é mais elevada nos tecidos com elevada capacidade oxidativa como o coração e o músculo esquelético (Puigserver et al., 1998; Weitzel et al., 2003). Proteína cinase activada por AMP (AMPK) e sirtuína 1 (SirT 1) são dois sensores metabólicos que afectam directamente a actividade de PGC-1 $\alpha$  através da fosforilação e desacetilação (Figura 12).

Em pacientes obesos e roedores geneticamente obesos com resistência a insulina, a acumulação excessiva de lípidos associa-se a anomalias na sinalização de AMPK (Chen et al., 2005). Contrariamente, o aumento da actividade de AMPK durante os estados de maior utilização energética (exercício), induz a expressão de PGC-1 $\alpha$  (Zong et al., 2002). A activação de AMPK resulta na indução de PGC-1 $\alpha$  e na biogénese mitocondrial no músculo esquelético (Zong et al., 2002; Canto et al., 2009). AMPK detecta as deficiências energéticas celulares como o aumento da razão AMP/ATP. AMPK fosforila PGC-1 $\alpha$  e aumenta a sua actividade mas também activa outros factores de transcrição. Finalmente, AMPK é activada por outras hormonas e sinais que aumentam a biogénese e função mitocondrial como adiponectina, leptina, hormona da tiróide, o que sugere que AMPK desempenha uma função central nas múltiplas vias que regulam a biogénese mitocondrial.

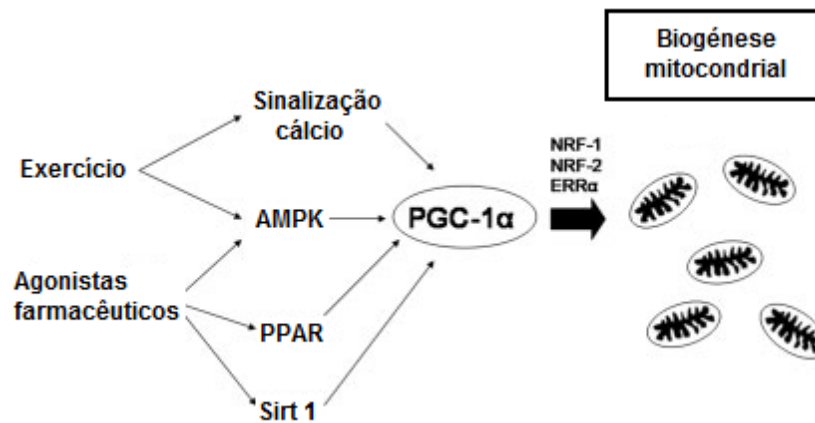


Figura 12 - Ativadores da expressão de PGC-1 $\alpha$ . Em todos os casos, a activação de PGC-1 $\alpha$  induz a biogénese mitocondrial (adaptado de Wenz, 2009).

O NRF-1 é um factor de transcrição ligado a um local regulador do promotor citocromo *c*. Os locais de ligação de NRF-1 estão conservados nos promotores de muitos genes mitocondriais. É um factor de transcrição que medeia a expressão de vários genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais, como por exemplo os factores necessários para a replicação e transcrição de DNA mitocondrial inclusivé TFAM (Virbasius & Scarpulla, 1994) e também subunidades dos complexos da cadeia respiratória (Scarpulla, R.C., 1997). PGC-1 $\alpha$  interage com NRF-1 para activar os genes envolvidos na cadeia respiratória, maquinaria de importação mitocondrial e factores de transcrição de DNA mitocondrial, como o TFAM (Gleyzer et al., 2005; Scarpulla R.C., 2006), coordenando assim o aumento da expressão de genes mitocondriais nucleares que aumentam a expressão e replicação de DNA mitocondrial.

#### 4 - A Berberina

Berberina é um produto natural com acção hipoglicémica e que reduz o peso corporal de animais obesos. A sua acção está associada com o aumento da actividade de AMPK, diminuição da expressão de genes envolvidos na lipogénese e aumento da expressão de genes envolvidos no gasto energético no tecido adiposo e músculo (Lee et al., 2006; Zhou et al., 2008). A Berberina é um alcalóide (Figura 13), presente em imensas plantas (*Berberis vulgaris*, *Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, *Arcanglisia flava*, *Berberis aquifolium* e *Berberis aristata*).

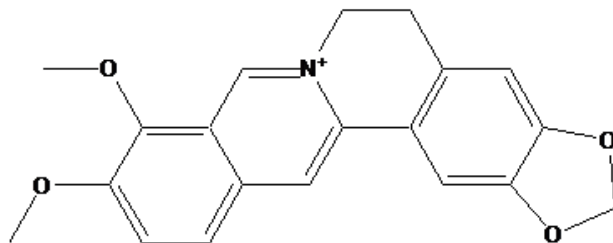


Figura 13 - Estrutura da Berberina.

Durante séculos, este produto tem sido utilizado na medicina tradicional chinesa, principalmente no tratamento de infecções gastrointestinais (Birdsall et al., 1997) mas além deste apresenta múltiplos efeitos farmacológicos sendo considerado como um potencial candidato para o tratamento de várias doenças como doença de Alzheimer (Zhu & Qian, 2006; Asai et al., 2007), depressão mental (Peng et al., 2007; Tarrago et al., 2007), esquizofrenia (Kulkarni & Dhir, 2008), cancro (Jantova et al., 2003; Choi et al., 2008), obesidade (Lee et al., 2006; Kim et al., 2009), diabetes (Yin et al., 2008; Zhang et al., 2008).

A Berberina é considerada um agente anticolesterolémico pois reduz o conteúdo de colesterol total no soro, de triglicérides assim como lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em pacientes e ratinhos (Kong et al., 2004). Os seus efeitos devem-se ao aumento do conteúdo de receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) no fígado num modo dependente de cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e depende também da activação de JNK (Lee et al., 2007). A Berberina possui a capacidade de inibir a síntese de lípidos por activação da AMPK (Brusq et al., 2006). Vários estudos realizados demonstraram uma redução do peso corporal, do conteúdo de colesterol e triacilgliceróis e da acumulação de gordura no fígado aumentando a sensibilidade à insulina em modelos de animais com resistência à insulina (Brusq et al., 2006; Kim et al., 2009). A Berberina exerce os seus efeitos por activação da AMPK em vários tecidos, como o tecido adiposo e o músculo, que origina um aumento da oxidação de ácidos gordos por aumento da actividade de PPAR $\alpha$  e PGC-1 $\alpha$  e também diminui a lipogénese e adipogénese por inibição de PPAR $\gamma$  (Lee et al., 2006).

Este composto exerce também alguns efeitos no metabolismo de glicose. Este aumenta a entrada e consumo de glicose em hepatócitos (Yin et al., 2002; Yin et al., 2008), miotúbulos (Cheng et al., 2006) e adipócitos (Kim et al., 2007; Zhou et al., 2007). Este aumento da entrada de glicose pela Berberina é independente da via da insulina (Cheng et al., 2006; Zhou et al., 2007) e dependente da activação de AMPK (Cheng et al., 2006). Estudos realizados por Ying e seus colaboradores demonstraram que o aumento



do metabolismo de glicose ocorre devido a um aumento da glicólise que está relacionada com uma diminuição da oxidação mitocondrial de glicose (Yin et al., 2008).



## **Objectivos**

Este trabalho teve como objectivo avaliar se o tratamento com este composto (Berberina) pode possibilitar o desenvolvimento de novas aplicações farmacológicas em pacientes obesos e diabéticos e também de estratégias que poderão modular a biogénese mitocondrial e assim melhorar o tratamento de doenças metabólicas. Para atingir esta finalidade, foi utilizado um modelo da patologia, um modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura, de modo a avaliar se o tratamento oral com Berberina modula ou não a biogénese mitocondrial.





**Capítulo II**  
**Materiais e Métodos**



## 2.1 - Materiais

A mistura de inibidores de proteases (SigmaFAST) foi obtida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os anticorpos anti-PGC-1  $\alpha$ , anti-AMPK e anti-p-AMPK foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EUA; os anticorpos anti-TFAM e ATP sintetase foram obtidos da Aviva Systems Biology, San Diego, CA, o anticorpo anti-Actina foi obtido da Sigma-Aldrich, Inc., USA e os anticorpos anti-Complexo IV subunidade I e anti-complexo IV, subunidade IV foram obtidos da MitoSciences Inc, USA. Os marcadores de peso molecular de proteínas foram obtidos da Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EUA enquanto que o WesternDot™ 625 Western Blot Kits foi obtido da Invitrogen, Ltd, UK. O composto utilizado neste trabalho, a Berberina foi obtido da Sigma – Aldrich, INC (St Louis, MO, USA).

Os restantes reagentes e compostos químicos utilizados apresentavam o grau de pureza comercialmente disponível mais elevado.

Na preparação das soluções utilizou-se água desionizada ultrapura, filtrada através do sistema Milli Q da Millipore (condutividade < 18  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) reduzindo-se assim a contaminação por iões metálicos, ao máximo.

## 2.2 - Animais e dietas

Este trabalho foi realizado com animais da estirpe *Sprague-Dawley*, divididos em 3 grupos experimentais tendo sido alimentados com uma dieta rica em gordura durante 16 semanas de modo a desenvolver obesidade.

Os animais utilizados neste trabalho foram adquiridos a Charles River Laboratories, França. Foram mantidos numa sala adequadamente ventilada, com ciclos de luz/escuro com durações de 12 horas, com temperatura controlada entre 22 e 24°C, com acesso livre a comida e a água (pH 5,5). O peso dos animais foi registado semanalmente durante o período de tratamento e no momento do sacrifício.

Neste estudo foram adquiridos ratos da estirpe *Sprague-Dawley*, com 5 semanas de idade e alimentados com dieta rica em gordura (High-Fat Diet) (animais HFD) ou dieta controlo (animais controlo). Estas dietas (D12266B e 118754) foram adquiridas a Research Diets, Inc, USA. Deste modo, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais:

1. Animais alimentados com dieta controlo durante 16 semanas (animais controlo);

2. Animais alimentados com dieta rica em gordura durante 16 semanas (animais HFD);
3. Animais alimentados com dieta rica em gordura durante 16 semanas e que receberam tratamento oral com Berberina (100 mg/Kg/dia) durante as últimas 4 semanas (animais Berberina).

### **2.3 - Análise dos parâmetros bioquímicos do plasma**

Após o sacrifício dos animais, foram recolhidas amostras de sangue para análise de vários parâmetros bioquímicos. Para a separação do plasma, as amostras de sangue foram previamente centrifugadas a 2300 xg numa centrífuga de bancada durante 9 minutos. As análises foram realizadas por intermédio de kits comerciais, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

### **2.4 – Determinação do conteúdo de triglicerídeos em tecido de músculo esquelético**

A determinação do conteúdo de triglicerídeos no tecido de músculo esquelético foi realizada através de um método enzimático colorimétrico Trigliceridos MR (Cromatest, Barcelona, Espanha).

Este método baseou-se na hidrólise enzimática de triglicerídeos em glicerol e ácidos gordos livres através de uma lipoproteína lipase. O glicerol resultante foi fosforilado em glicerol 3- fosfato (G-3-P) e ADP por acção de ATP e na presença de glicerol cinase (GK). Posteriormente, G-3-p foi oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e peróxido de hidrogénio através da enzima glicerofosfato oxidase (GPO). Na presença de peroxidase, ocorreu a condensação de fenol e 4-aminoantipirina por acção de peróxido de hidrogénio, formando-se uma coloração violeta proporcional à concentração de triglicerídeos no tecido de músculo esquelético.

Os triglicerídeos foram extraídos do músculo esquelético por homogeneização de cerca de 50 mg deste em 1mL de isopropanol. Posteriormente, centrifugou-se a 12.000 g, recolhendo-se o sobrenadante. O sobrenadante contendo os triglicerídeos foram então submetidos às reacções enzimáticas descritas anteriormente, permanecendo, de seguida, à temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, a absorvância das amostras foi avaliada a 500 nm e a concentração em mg/dL foi retirada tendo em consideração um padrão.

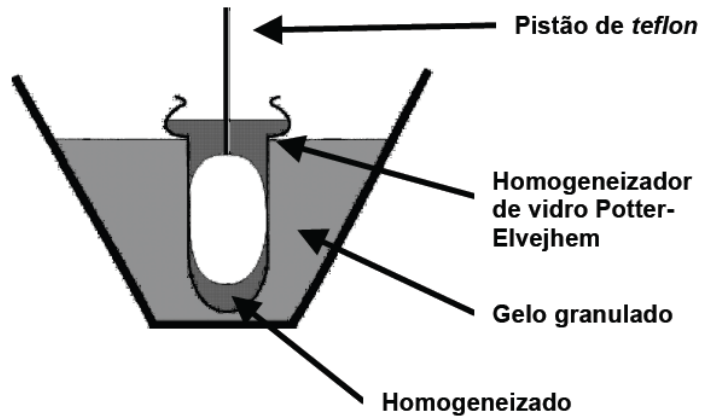
### **2.5 - Isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético de rato**

A fracção mitocondrial foi isolada a partir do músculo esquelético de rato de acordo com o método descrito por Palmeira e colaboradores com algumas modificações (Bhattacharya et al., 1991; Palmeira et al. 1999) (Figura 14). Este processo foi realizado com o material colocado em gelo granulado de modo a garantir a manutenção de uma temperatura baixa.

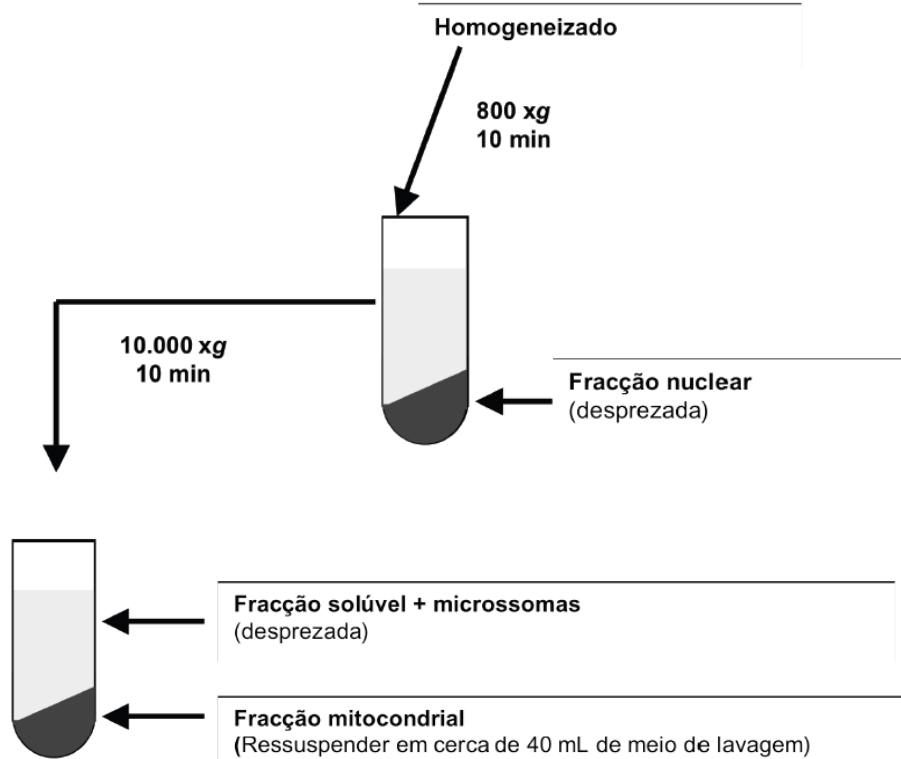


**1. Homogeneização**

O músculo, cortado em pedaços, é colocado em cerca de 60 mL de meio de homogeneização



**2. Centrifugação diferencial**



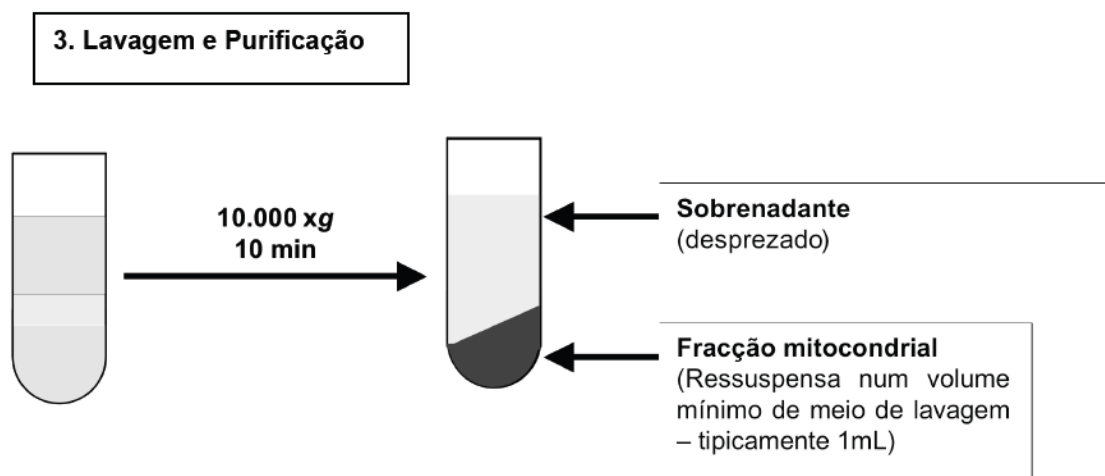


Figura 14 - Representação esquemática do isolamento da fracção mitocondrial de músculo esquelético de rato (adaptado de Palmeira, 1995).

O tecido muscular destinado ao isolamento mitocondrial, após a remoção de todo o tecido gordo e tecido conectivo existente, foi transferido para uma caixa de Petri contendo PBS (1.54 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 155.17 mM NaCl e 2.71 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.2). O tecido foi finamente cortado e colocado durante 15 minutos em tripsina (TrypLE Express GIBCO, Invitrogen, Ltd, UK) e posteriormente transferido para um copo contendo meio de homogeneização frio ( $4^\circ\text{C}$ ), sendo constituído por sacarose 250 mM, EGTA 0.5 mM, albumina sérica bovina deslipidada e HEPES 10 mM, pH 7,4. O tecido muscular foi lavado várias vezes com meio de homogeneização. Seguidamente, este tecido foi colocado num homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Elvehjem” com um pistão de teflon contendo cerca de 10 volumes de meio, tendo sido homogeneizado com o pistão rodando a 250 rpm obtendo-se no final uma suspensão homogênea.

Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 800 xg durante 10 minutos num rotor SS-34 e numa centrífuga refrigerada Sorvall RC-6, à temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Esta centrifugação tem como finalidade a remoção dos componentes mais densos do homogeneizado (núcleos, eritrócitos, células fragmentadas). Posteriormente, o sobrenadante foi decantado para novos tubos de centrífuga com o cuidado de não existir contaminação com as partículas sedimentadas. Este sobrenadante, diluído com meio de homogeneização, foi centrifugado a 10 000 xg durante 10 minutos, de modo a obter-se a fracção mitocondrial. O sedimento foi cuidadosamente ressuspensão com a ajuda de um pincel e num pequeno volume de meio de lavagem, constituído por sacarose 250 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4, diluído em cerca de 40 mL deste mesmo meio, sendo seguidamente colocado em novos tubos de centrífuga. Realizou-se uma nova centrifugação a 10 000 xg durante 10 minutos. Após a remoção da camada superior do sedimento de modo a eliminar as mitocôndrias danificadas e o excesso de matéria gorda, este procedimento foi repetido. No fim desta operação, a fracção mitocondrial purificada foi cuidadosamente ressuspensa em cerca de 1-2 mL de meio de lavagem e colocada em eppendorfs de 1,5 mL, mantidos em gelo granulado durante o período de ensaios com o

material fresco. Os ensaios com o material fresco decorreram durante as primeiras 6 horas após o processo de isolamento.

### **2.6 - Determinação da concentração de proteína mitocondrial**

O conteúdo de proteína mitocondrial foi determinado através do método colorimétrico do Biureto (Gornall et al., 1949). Uma pequena amostra de preparação mitocondrial (50  $\mu$ L) foi solubilizada através da adição de 50  $\mu$ L de DOC a 10%. Foi adicionada água desionizada (500  $\mu$ L), 50  $\mu$ L de meio de lavagem e, em seguida, 2 mL de reagente de biureto. Prepararam-se padrões de albumina sérica bovina (0; 1; 1,5 e 2 mg/mL) partindo de um stock de 0,4%, tendo sido adicionada água desionizada perfazendo um volume final de 0,5 mL. Seguidamente, foram adicionados 50  $\mu$ L de meio de lavagem, 50  $\mu$ L de DOC 10% e, por fim, 2 mL de reagente de biureto. Através de um vortex, os tubos foram sujeitos a agitação e colocados, durante 10 minutos, a uma temperatura de 37 °C. Posteriormente, determinou-se a absorvência dos padrões e das amostras num espectrofotómetro Thermo, série Helios Y.

### **2.7 - Avaliação do potencial transmembranar nas mitocôndrias**

O potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) foi determinado com base na monitorização da acumulação e libertação do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP<sup>+</sup>). Assim, utilizou-se um eléctrodo selectivo para TPP<sup>+</sup> como o descrito por Kamo e colaboradores (Kamo et al., 1979). Este eléctrodo foi preparado no nosso laboratório e utilizou-se um eléctrodo de referência de Ag/AgCl. Nas mitocôndrias, a entrada de TPP<sup>+</sup> foi avaliada através do decréscimo da sua concentração e do registo do potencial do eléctrodo (Figura 15).

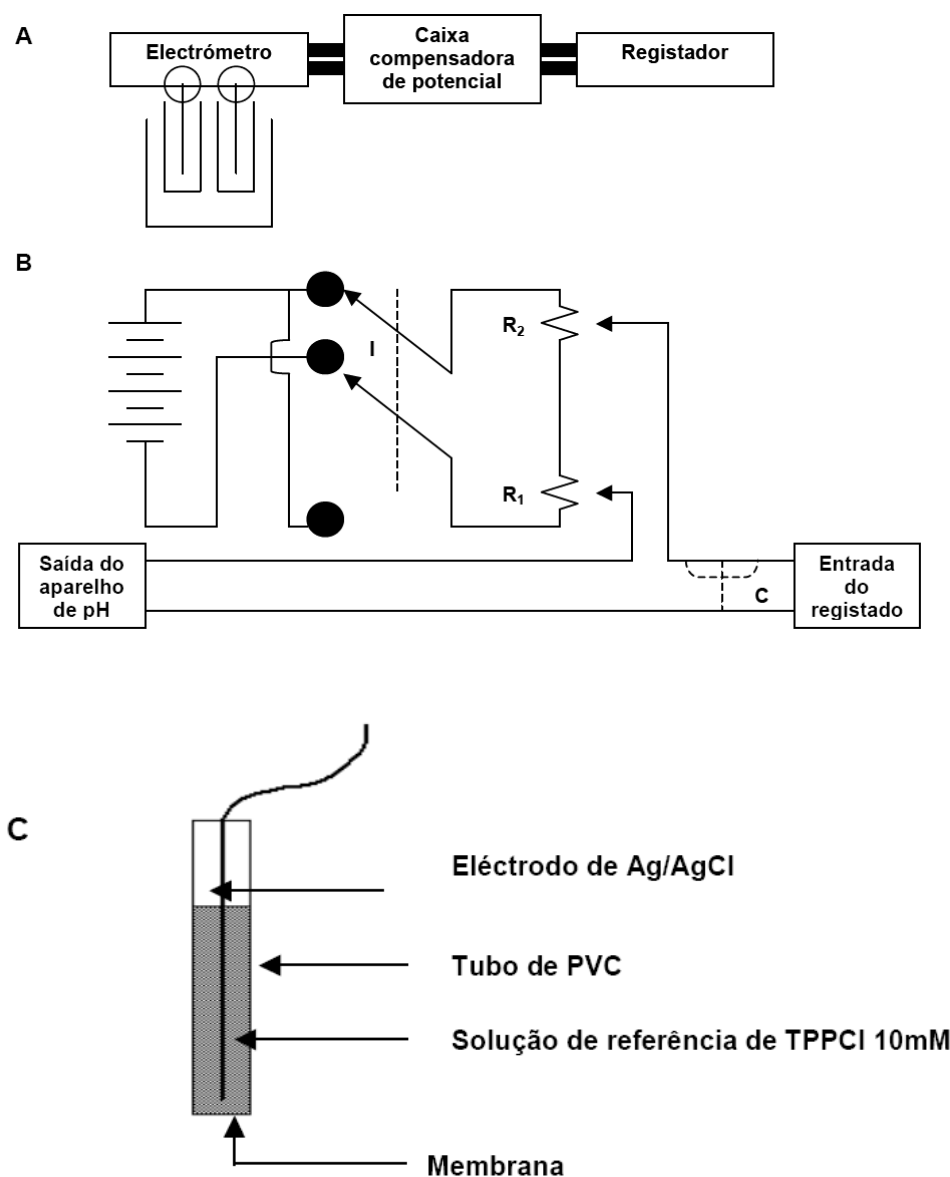


Figura 15 - (A) Esquema do sistema de montagem do eléctrodo de TPP<sup>+</sup>. Entre o electrómetro e o registador situa-se a caixa compensadora de potencial. (B) circuito eléctrico da caixa compensadora do potencial basal. R<sub>2</sub>, 10 KΩ, R<sub>1</sub>, 1 KΩ, I, inversor, C, condensador de 100 μF. (C) Eléctrodo de TPP<sup>+</sup>. A membrana sensível a TPP<sup>+</sup> é constituída por um filme de cloreto de polivinilo usando o tetrafenilborato como contra-íão. O eléctrodo fornece uma resposta que segue a equação de Nernst até à diminuição da concentração de TPP<sup>+</sup> para 10<sup>-6</sup> ou 10<sup>-7</sup> M. a diferença de potencial entre os dois eléctrodos é determinada por um electrómetro de alta impedância (adaptado de Palmeira, 1995).

A diferença de potencial gerada entre o eléctrodo de referência e o selectivo foi determinada por um electrómetro Jenway (modelo 3305) sendo o sinal debitado num

registador Kipp & Zonen, após atravessar um circuito de compensação de voltagem basal (Madeira, 1975).

Foram utilizados apenas os eléctrodos que apresentaram uma correlação linear com o algoritmo da concentração de TPP<sup>+</sup>, com uma inclinação de  $59 \pm 1$ , ou seja, com uma inclinação semelhante à prevista pela equação de Nerst.

As reacções ocorreram numa câmara de reacção aberta, a 25°C, com agitação magnética contínua e em 1 mL de meio de respiração (sacarose 130 mM, KCl 50 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 5 mM e EDTA 50 µM, pH 7,4) suplementado com 3 µM de TPP<sup>+</sup>. Esta concentração de TPP<sup>+</sup> foi utilizada nos ensaios porque permite uma elevada sensibilidade nas determinações, isto na ausência de efeitos tóxicos na mitocôndria (Jensen & Gunter, 1984; Wingrove & Gunter, 1985).

Os ensaios foram realizados com 1 mg de proteína e na presença de substratos respiratórios (succinato 5 mM). Os ensaios com succinato decorreram na presença de rotenona 3 µM (inibidor específico do Complexo I) de modo a evitar a contribuição do complexo I devido à utilização de possíveis substratos endógenos. A energização das mitocôndrias resultou no desenvolvimento de  $\Delta\Psi$  e na tomada de TPP<sup>+</sup> pelas mitocôndrias.

O  $\Delta\Psi$  foi determinado de acordo com a equação (25°C):

$$\Delta\Psi \text{ (mV)} = 59 \log (v/V) - 59 \log (10^{\Delta E/59} - 1),$$

de acordo com Kamo e colaboradores (Kamo et al., 1979) e Muratsugu e colaboradores (Muratsugu et al., 1977). Na equação,  $v, V$  e  $\Delta E$  representam, respectivamente, o volume mitocondrial, o volume do meio de incubação e a deflexão do potencial do eléctrodo desde a linha basal. De acordo com Masini e colaboradores (Masini et al., 1984), assumiu-se um volume matricial de mitocôndrias de 1,1 µL/mg de proteína. Dado que nos ensaios realizados estávamos interessados na determinação das alterações na determinação das alterações relativas dos potenciais e não nos valores absolutos, não foram realizadas correcções devidas à contribuição da ligação passiva de TPP<sup>+</sup> à membrana mitocondrial. No entanto, prevemos que os valores de  $\Delta\Psi$  aqui apresentados estejam avaliados por excesso. O valor da lag phase foi determinado de acordo com a medição do tempo decorrido desde o início do ciclo fosforilativo (que coincide com a adição de ADP) até ao seu final (restabelecimento do potencial de repouso).

## 2.8 - Determinação do consumo de oxigénio em preparações mitocondriais

O consumo de oxigénio foi avaliado polarograficamente através de um eléctrodo do tipo desenvolvido por Clark em 1956, de modo a determinar o nível de oxigénio em amostras de sangue. O eléctrodo de oxigénio é uma célula electroquímica constituída por dois eléctrodos: um eléctrodo de platina e um ânodo de prata que se encontram imersos num electrólito (Figura 16).

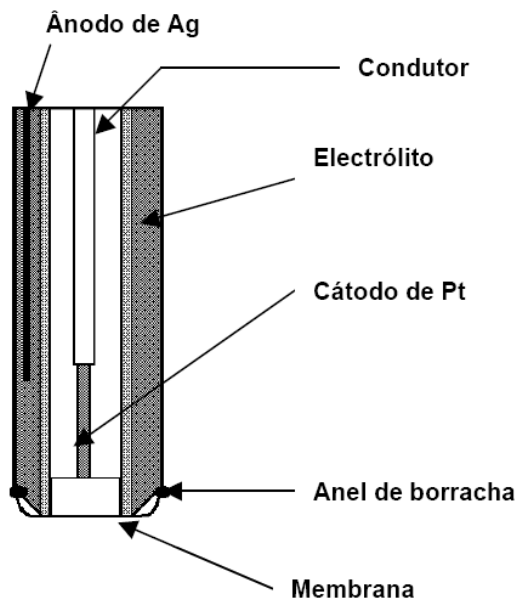
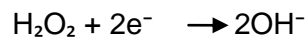
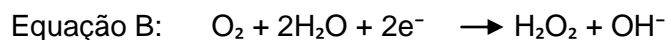
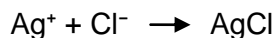


Figura 16 - Electrodo de oxigénio de Clark. O electrodo de Pt é polarizado negativamente em comparação com o electrodo de Ag. A nível do cátodo de Pt, a velocidade de redução do  $O_2$  é proporcional à concentração do  $O_2$  dissolvido no meio (adaptado de Palmeira, 1995).

Nos sistemas de electrodos de oxigénio, normalmente é utilizada uma solução de KCl 50% saturada. A aplicação de voltagem polarizante ioniza o electrolito iniciando um fluxo de corrente através de uma série de reacções electroquímicas. No decorrer destas reacções electroquímicas ocorre consumo de oxigénio, deste modo, a magnitude do fluxo de corrente relaciona-se com a concentração de oxigénio existente no meio circundante.

Quando o electrolito é KCl, ocorrem as seguintes reacções:



O consumo de oxigénio nas preparações mitocondriais frescas foi avaliado num electrodo do tipo Clark (Estabrook, 1967) ligado a um registador Kipp & Zonen através de uma caixa de voltagem desenvolvida no laboratório (Figura 17) e a calibração do electrodo foi realizada de acordo com o que foi descrito anteriormente (Rickwood et al., 1987). Os ensaios foram realizados numa câmara de reacção fechada, a 25°C,

termostatizada e num volume de 1,3 mL de meio de respiração (sacarose 130 mM, KCl 50 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, HEPES 5 mM e EDTA 50  $\mu\text{M}$ , pH 7,4), suplementado com 0,5 mg de proteína. Ao longo dos ensaios, a suspensão mitocondrial foi sujeita a agitação magnética contínua através de um pequeno magnete inserido na câmara. A respiração mitocondrial foi iniciada através da adição de succinato 5 mM que é um substrato respiratório. Nas experiências com succinato, o meio de reacção foi suplementado com rotenona 3  $\mu\text{M}$ . Após o registo do consumo de oxigénio induzido pela adição do substrato respiratório, foram adicionadas 200 nmoles de ADP desencadeando, deste modo, o estado respiratório 3. Quando o ADP adicionado foi totalmente fosforilado a ATP, a respiração voltou a assumir uma velocidade mais lenta, este estado é designado de estado respiratório 4. Os estados respiratórios foram determinados de acordo com Chance e Williams (Chance & Williams, 1956). O ICR (índice de controlo respiratório) foi avaliado pelo quociente entre o estado respiratório 3 e o 4 sendo usado como critério de integridade mitocondrial.

De acordo com Estabrook (Estabrook, 1967), determinou-se o quociente entre o ADP adicionado e o oxigénio consumido para fosforilar o ADP adicionado sendo este parâmetro designado por ADP/O.

A respiração mitocondrial foi também avaliada na presença de oligomicina 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína (condições não fosforilativas) sendo este um inibidor específico da ATP sintetase. Este parâmetro é designado por  $V_{\text{Oligomicina}}$ . Na presença de FCCP 2  $\mu\text{M}$  adicionado após o registo do consumo de oxigénio na presença de oligomicina avaliou-se a taxa máxima de respiração mitocondrial dissociada de fosforilação (respiração desacoplada, referida como  $V_{\text{FCCP}}$ ). O FCCP é um protonóforo que estimula a cadeia respiratória, dado que este permeabiliza a membrana mitocondrial a prótons.

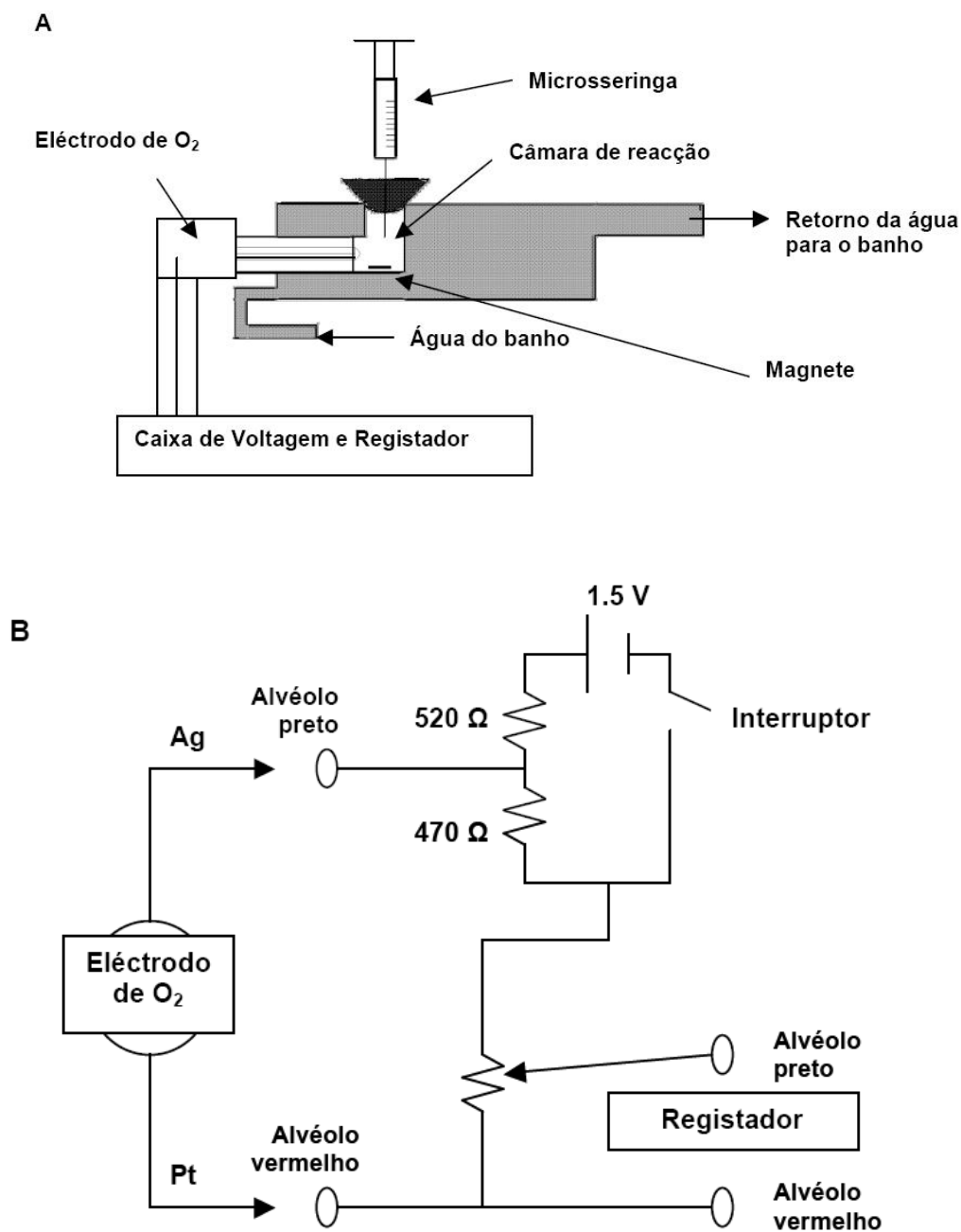


Figura 17 - (A) Câmara de reacção fechada termostatzada, usada na determinação do consumo de oxigénio nos ensaios de avaliação da actividade enzimática. De modo a evitar a difusão de O<sub>2</sub> do ar para o meio e vice-versa, o meio de reacção está isolado da atmosfera. As adições foram realizadas através de uma microseringa que penetra um pequeno orifício na tampa da câmara. A rápida estabilização térmica da câmara é permitida devido à contínua circulação de água em torno da câmara proveniente do banho térmico. (B) Diagrama do circuito eléctrico do sistema de controlo do eléctrodo de O<sub>2</sub>. A polarização do eléctrodo é de 0.71 V (situa-se dentro da gama de valores para os quais a



intensidade de corrente do eléctrodo é proporcional à actividade do O<sub>2</sub> dissolvido no meio) que é obtida devido a um circuito divisor da tensão (adaptado de Palmeira, 1995).

### 2.9 - Detecção da indução da permeabilidade transitória mitocondrial

A susceptibilidade de mitocôndrias de músculo de rato à indução da permeabilidade transitória mitocondrial foi determinada de acordo com o entumescimento mitocondrial induzido devido à acumulação de cálcio nas mitocôndrias. Este parâmetro foi avaliado através de mudanças na dispersão da luz que foram monitorizadas espectrofotometricamente a 540 nm como descrito previamente (Palmeira & Wallace., 1997). A constituição do meio de reacção foi sacarose 200 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, EGTA 10 µM e HEPES 10 mM, pH 7,4 e este meio foi posteriormente suplementado com succinato 5 mM e rotenona 3 µM. A reacção ocorreu num volume de 2 mL de meio de reacção a uma temperatura constante de 25°C tendo sido iniciada com a adição de 1 mg de suspensão mitocondrial. Foi adicionada uma concentração de Ca<sup>2+</sup> (como referido nos registos) após um breve período de reacção. Nos ensaios indicados, a reacção decorreu na presença de ciclosporina A 1µM (CyA) de modo a comprovar que o entumescimento mitocondrial ocorreu devido à indução da PTM dado que CyA é um inibidor específico da permeabilidade transitória mitocondrial (Broekemeier et al., 1989).

### 2.10 - Determinação do conteúdo em proteínas em tecido do músculo esquelético

O conteúdo proteico em proteínas AMPK, *p*-AMPK, actina, TFAM, PGC – 1α, citocromo *c* oxidase subunidade I (COX I), citocromo *c* oxidase subunidade IV (COX IV) e ATP sintetase foi avaliado por “western blot”.

O tecido de músculo esquelético congelado foi homogeneizado em tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton x – 100 1%, desoxicolato de sódio 1%, SDS 0,1% e inibidores de proteases) num homogeneizador de vidro a 4°C. Seguidamente, o homogeneizado foi centrifugado duas vezes a 10 000 xg durante 10 minutos e a 4°C tendo sido recolhido o sobrenadante. O conteúdo proteico foi determinado pelo ensaio de Bradford como descrito por Bradford (Bradford, 1976) calibrado com albumina do soro bovino. As amostras de proteína (50 µg) foram homogeneizadas em Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) e desnaturadas a 100°C durante 5 minutos. De seguida, as aliquotas foram separadas num gel de poliacrilamida 10%, num sistema de electroforese Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) a 100 V, durante 1 hora e 30 minutos, utilizando um tampão constituído por Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (w/v), pH 8,3 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA).

As proteínas foram electrotransferidas para membranas de PVDF (Hybond™ – P), a 100V, durante 1 hora e 30 minutos com tampão de transferência constituído por Tris 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol, pH 8,3 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) sob agitação magnética. A transferência ocorreu num sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad

Laboratories, Inc., CA, EUA) que foi colocado num recipiente com gelo (de modo a dissipar o calor produzido).

Seguidamente, as membranas foram lavadas em TBS-T (Tris-HCl 25 mM (pH 7.6) e NaCl 150 mM) e posteriormente incubadas com tampão de bloqueio TBS-T com Tween-20 (1%) e leite 5% (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA) durante uma hora à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as membranas foram novamente lavadas em TBS-T durante 5 minutos e depois incubadas com os anticorpos anti-AMPK (sc-25792), anti-p-AMPK (sc-33524-R), anti-PGC-1 $\alpha$  (sc-13067), anti-TFAM (ARP36993\_P050), anti-complexo IV subunidade I (MS404), anti-complexo IV subunidade IV (MS407), anti-ATP sintetase (ARP48185\_T100) e anti-actina (A5441), contra a forma desnaturada das proteínas. As diluições dos anticorpos foram 1:1000, 1:1000, 1:250, 1:2000, 1:1000, 1:10.000, respectivamente, em TBS-T suplementado com leite em pó 5%. A incubação foi realizada durante a noite, com agitação e a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 lavagens de 15, 10 e 5 minutos) e incubadas à temperatura ambiente e com agitação, durante 1 hora, com os anticorpos Biotin-XX goat anti-mouse (B2763) e Biotin-XX goat anti-rabbit (B2770) da Invitrogen, Ltd, UK na diluição recomendada no WesternDot™ Goat Anti-Mouse Kit e WesternDot™ Goat rabbit Kit em TBS-T suplementado com leite em pó 5%.

Finalmente, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 lavagens de 15, 5 e 5 minutos) e incubadas com o Qdot® 625 streptavidin conjugate do westernDot kit. A fluorescência foi detectada através da utilização de um sistema VersaDoc 1300 Series, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EUA. Foi possível determinar se a marcação proteica foi específica através da banda dos marcadores de peso molecular, verificando deste modo se a banda da proteína marcada correspondia ao peso molecular referido para a mesma.

A análise densitométrica das bandas foi realizada através do programa Image J.

### **2.11 – Análise e tratamento estatístico dos resultados**

Os dados foram apresentados sob a forma de média  $\pm$  SEM (erro-padrão da média) do número de ensaios referido nas respectivas figuras, tendo sido cada uma obtida através de um animal diferente e analisada em duplicado. A análise estatística foi realizada com o auxílio do Teste t para amostras emparelhadas, utilizando-se para esta finalidade o programa Windows Excel. Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado como estatisticamente significativo para todos os ensaios, por comparação entre os animais em estudo e o respectivo controlo.



### **Capítulo III**

### **Resultados**



### 3 - Caracterização do modelo animal

#### 3.1 – Pesos

Ao longo de 12 semanas de alimentação com dieta rica em gordura, os animais do grupo HFD apresentaram um aumento do peso corporal mais elevado do que os respectivos controlos (Figura 18).

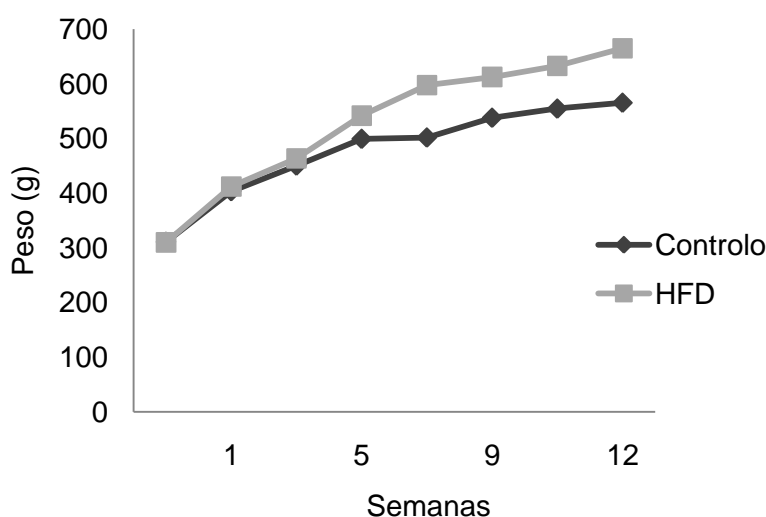


Figura 18 - Variação do peso total dos animais ao longo de 12 semanas. Os valores apresentados são médias  $\pm$  SEM (n=5) de animais alimentados durante 12 semanas com dieta rica em gordura (HFD) e animais controlo. Valores estatisticamente significativos: \*p <0.05 relativamente aos respectivos animais controlo.

Durante as 4 semanas de tratamento oral com Berberina, foi também avaliada a variação de peso corporal dos animais (Figura 19).

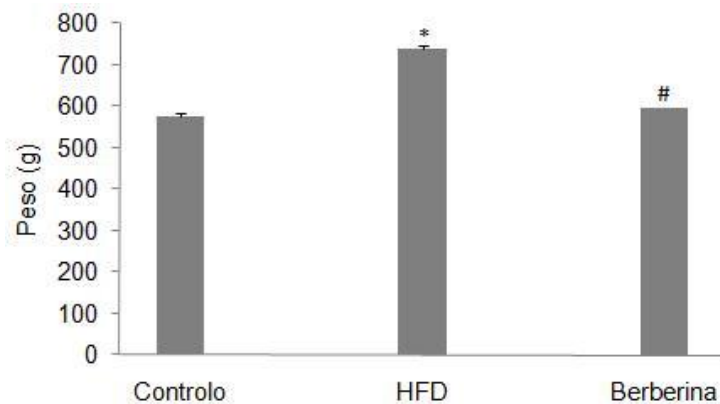


Figura 19 - Variação do peso total dos animais após 4 semanas de tratamento oral com Berberina. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  SEM (n=5) de animais alimentados com dieta rica em gordura (HFD) e tratamento com Berberina (Berberina). Valores estatisticamente significativos: \*p <0.05 relativamente aos animais controlo e #p <0.05 comparativamente aos animais HFD

Após 4 semanas do tratamento oral com Berberina, os animais (grupo Berberina) apresentaram peso corporal estatisticamente inferior ao dos animais HFD (Figuras 19 e 20).

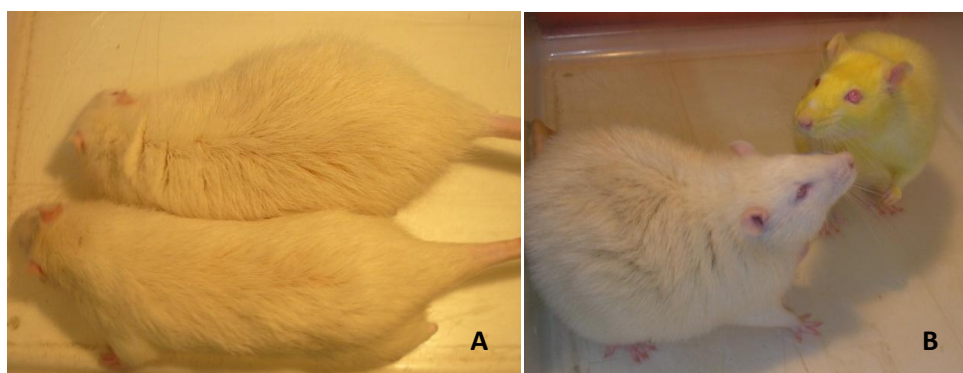


Figura 20 - Imagens dos animais após as 16 semanas com alimentação rica em gordura e 4 semanas de tratamento oral com Berberina. (A) animais controlo e HFD e (B) animais HFD e Berberina.

Após a morte e dissecação dos animais, verificou-se que os animais HFD apresentavam mais gordura na cavidade abdominal e também nos músculos relativamente aos animais controlo e Berberina (Figura 21).

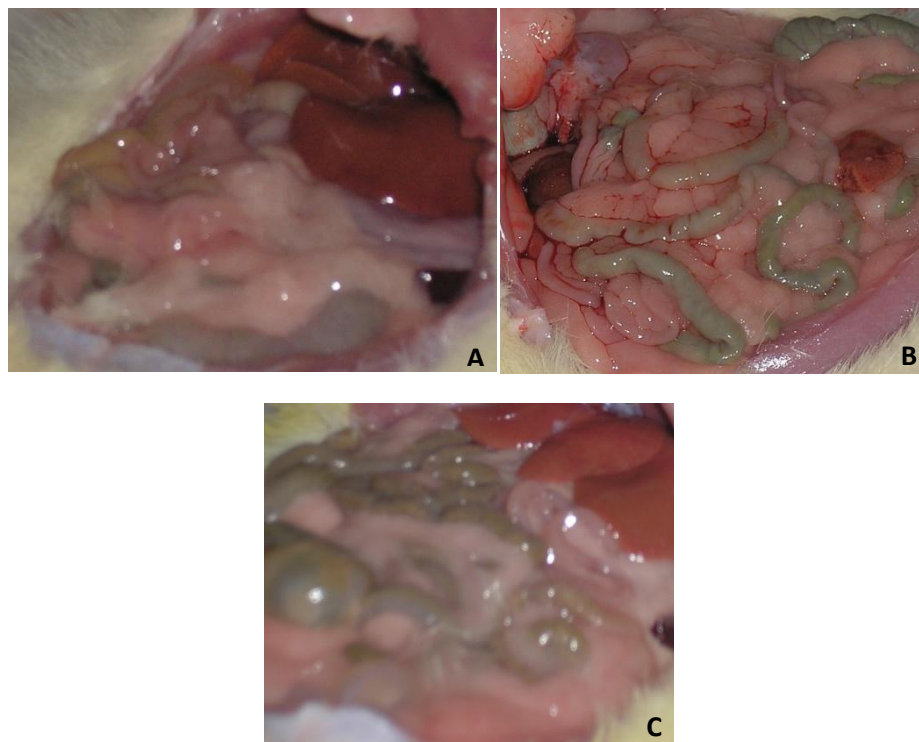


Figura 21 - Aspecto da cavidade abdominal dos animais. (A) Animal controlo, (B) animal HFD e (C) animal Berberina. As imagens foram captadas após o sacrifício dos animais.

### 3.2 - Parâmetros bioquímicos do plasma

O sangue para a análise de vários parâmetros bioquímicos foi recolhido logo após o sacrifício dos animais. Como descrito na Tabela I, os parâmetros bioquímicos do plasma evidenciaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de glicose, colesterol, triglicédeos e fosfolípidos nos animais Berberina relativamente aos animais HFD. Os níveis de glicose, colesterol, triglicédeos e fosfolípidos nos animais Berberina foram estatisticamente inferiores aos animais HFD.

**Tabela I – Parâmetros bioquímicos do plasma sanguíneo dos animais**

	Glicose	Colesterol	Triglicerídeos	Creatinina	Fosfolípidos
Animais Controlo	130.6 ± 5.48	67.1 ± 4.76	104.11 ± 20.78	0.52 ± 0.01	124.2 ± 10.63
Animais HFD	148.67 ± 9.16	95.11 ± 5.68*	94.89 ± 9.66	0.55 ± 0.02	158.5 ± 9.40
Animais Berberina	114.83 ± 4.00 #	68 ± 8.54 #	44.33 ± 5.75 #	0.55 ± 0.03	116.83 ± 7.78 #

Nota: Os valores apresentados são médias ± SEM (n=6) de animais alimentados com dieta rica em gordura durante 16 semanas (animais HFD) e com tratamento oral com Berberina durante 4 semanas (animais Berberina). O sangue dos animais dos três grupos experimentais (controlo, HFD, Berberina) foi recolhido imediatamente após o sacrifício às 16 semanas. Valores estatisticamente significativos: \*  $p < 0.05$  comparado com o respectivo grupo controlo e #  $p < 0.05$  comparado com o grupo HFD.

### 3.3 – Conteúdo em triglicerídeos em tecido do músculo esquelético

No músculo esquelético de animais alimentados com dieta rica em gordura, quantificou-se a acumulação de gordura através da análise do conteúdo em triglicerídeos no tecido de músculo esquelético. Os animais HFD apresentavam após 16 semanas de alimentação com dieta rica em gordura, valores de triglicerídeos muito superiores aos animais controlo (Figura 22). Isto indica que ocorreu uma acumulação de triglicerídeos no músculo esquelético nestes animais. Nos animais Berberina, o conteúdo em triglicerídeos foi inferior em relação aos animais HFD mas superior aos animais controlo.



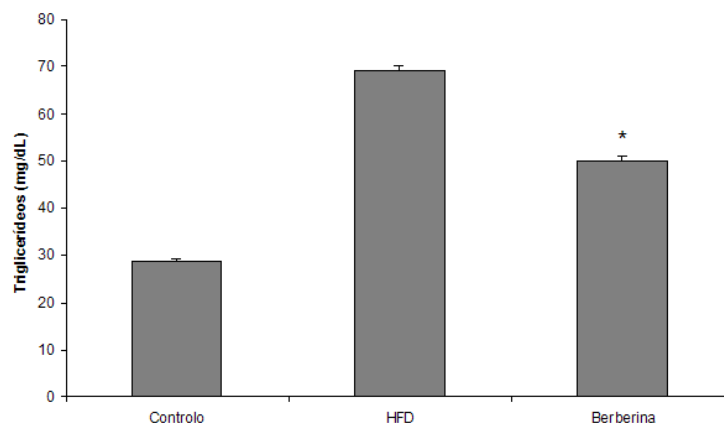


Figura 22 – Conteúdo em triglicéridos do tecido de músculo esquelético, expresso em mg triglicéridos/dL. Os valores apresentados são médias  $\pm$  SEM (n=4) de animais alimentados com dieta rica em gordura durante 16 semanas (animais HFD) e animais que receberam tratamento oral com Berberina durante 4 semanas (animais Berberina). Os triglicéridos foram extraídos do tecido do músculo esquelético com isopropanol e a quantificação executada como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos. Valores estatisticamente significativos: \*  $p < 0.05$  comparado com o respectivo controlo.

### 3.4 - Bioenergética mitocondrial

#### 3.4.1 - Potencial transmembranar

As variações do potencial transmembranar ( $\Delta\Psi$ ) associadas com a respiração e com o ciclo fosforilativo em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de animais controlo, animais obesos (HFD) e animais obesos aos quais foi administrada Berberina (Berberina) (Tabela II e Figura 23), foram analisadas de modo a verificar as alterações no metabolismo energético mitocondrial induzidas pela acumulação de gordura muscular (HFD) e por tratamento oral com Berberina (Berberina).

De acordo com os resultados, o  $\Delta\Psi$  desenvolvido na presença de succinato (utilizado como substrato respiratório) é significativamente inferior nos animais HFD relativamente aos animais controlo (Tabela II).

**Tabela II –  $\Delta\Psi$  e “lag phase” mitocondriais no modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura (HFD) e após tratamento com Berberina (Berberina)**

	Succinato		
	Controlo	HFD	Berberina
Potencial inicial (-mV)	194.44 ± 3.18	181.17 ± 3.37*	191.43 ± 4.99#
Despolarização (-mV)	30.73 ± 2.12	25.60 ± 2.24	28.99 ± 3.89
Repolarização (-mV)	184.04 ± 4.50	174.09 ± 3.67*	186.90 ± 5.80#
Lag phase (s)	57.90 ± 6.51	116.62 ± 15.66*	71.70 ± 15.14#

Nota: Os dados estão apresentados como as médias ± SEM (n=5) para as mitocôndrias do músculo esquelético isoladas de animais HFD e Berberina e respectivos controlos, tendo sido os ensaios realizados em duplicado. Como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos, o potencial transmembranar foi determinado através da utilização de um eléctrodo de TPP<sup>+</sup>. Os ensaios foram realizados a 25°C em 1 mL de meio (sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, EDTA 50 µM e HEPES 5 mM, pH 7,4) suplementado com 3 µM TPP<sup>+</sup> e rotenona 3 µM. As mitocôndrias (1 mg) foram energizadas com succinato 5 mM tendo sido induzida a fosforilação com 200 nmol de ADP. Valores estatisticamente significativos: \*  $p < 0.05$  comparado com o grupo controlo e #  $p < 0.05$  relativamente ao grupo HFD.

A diminuição no  $\Delta\Psi$  induzida pela adição de ADP nos animais HFD está relacionada com a energia utilizada pela ATP sintetase para fosforilar a quantidade de ADP que foi adicionada. A cinética do funcionamento do ciclo fosforilativo nos animais HFD estava também alterada dado que a despolarização induzida pela adição de ADP foi inferior nestas mitocôndrias (Tabela II) relativamente aos animais controlo. A repolarização (recuperação do valor inicial de  $\Delta\Psi$ ) também estava afectada nestes animais.

Nos animais Berberina, a análise das flutuações do  $\Delta\Psi$  associadas ao ciclo fosforilativo e à respiração indicou que as mitocôndrias isoladas do músculo esquelético apresentavam um comportamento semelhante ao das mitocôndrias dos animais controlo (Tabela II). Deste modo, verificou-se um aumento de  $\Delta\Psi$ , da despolarização e também da repolarização comparativamente aos animais HFD (Tabela II), o que indica que estes parâmetros nestes animais não estavam alterados.

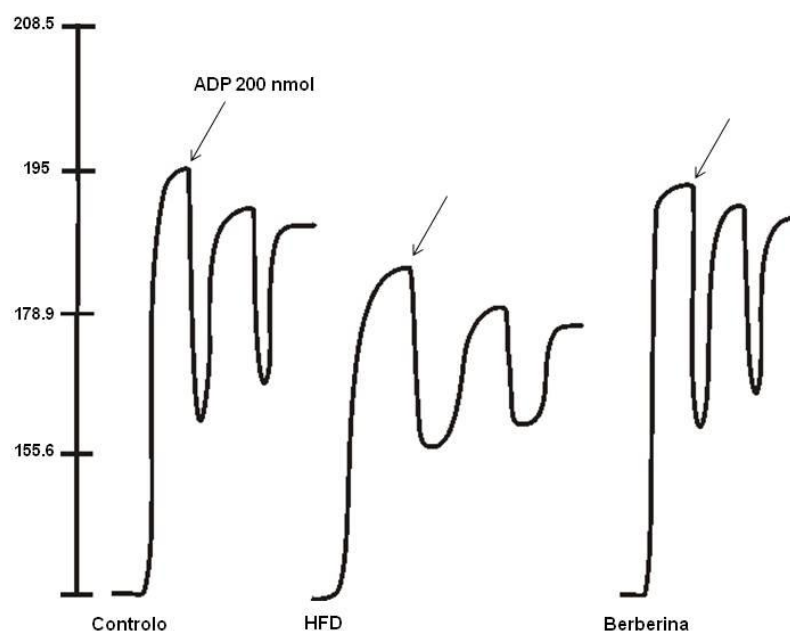


Figura 23 - Alterações no potencial transmembranar mitocondrial no modelo de obesidade induzida por dieta (HFD) e Berberina. Como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos, o potencial transmembranar foi determinado através da utilização de um eléctrodo de TPP<sup>+</sup>. Os ensaios foram realizados a 25°C em 1 mL de meio (sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, EDTA 50 µM e HEPES 5 mM, pH 7,4) suplementado com 3 µM TPP<sup>+</sup> e rotenona 3 µM. As mitocôndrias (1 mg) foram energizadas com succinato 5 mM tendo sido induzida a fosforilação com 200 nmol de ADP. Estes traços representam os registos obtidos a partir de dez ensaios independentes nos quais foram utilizadas cinco preparações mitocondriais diferentes de animais controlo, HFD e Berberina.

Relativamente ao tempo de espera que precede a repolarização, ou seja, a “lag phase” (parâmetro indicador da actividade do sistema fosforilativo), demonstrou-se superior nos animais HFD (Tabela II e Figura 23) indicando, deste modo, uma menor eficiência do sistema fosforilativo relativamente aos animais controlo. Já nos animais Berberina, este parâmetro revelou-se inferior comparativamente aos animais HFD. Adicionalmente, o valor da “lag phase” nestes animais foi relativamente próximo ao dos animais controlo, ou seja, houve uma recuperação de eficiência fosforilativa.

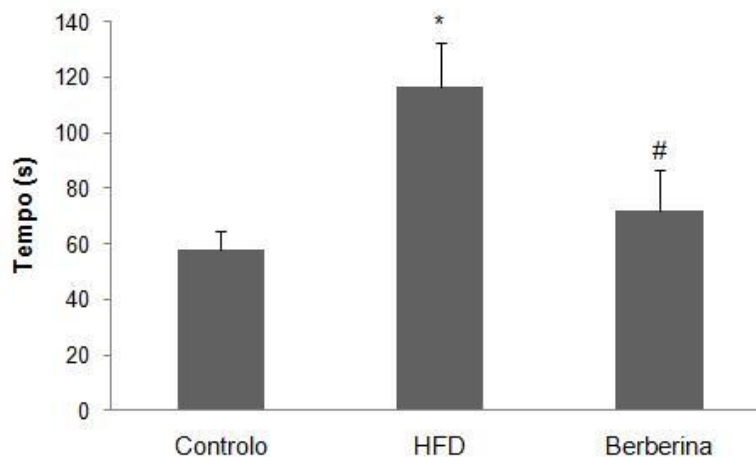


Figura 24 - Efeito da dieta rica em gordura e do tratamento oral com Berberina na “lag phase” mitocondrial na presença de succinato. As mitocôndrias foram isoladas de músculo esquelético de animais controlo, HFD e Berberina. Os resultados são representados como médias  $\pm$  SEM (n=5), tendo sido os ensaios realizados em duplicado. Como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos, a “lag phase” foi avaliada através da utilização de um eléctrodo de TPP<sup>+</sup>. Os ensaios foram realizados em 1 mL de meio (sacarose 13mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, EDTA 50  $\mu$ M e HEPES 5 mM, pH 7,4), suplementado com 3  $\mu$ M TPP<sup>+</sup>, a 25°C. Nestes ensaios, o meio de reacção foi suplementado com rotenona 3  $\mu$ M e as mitocôndrias (1 mg) energizadas com succinato 5 mM. A fosforilação foi induzida com 200 nmol de ADP. Valores estatisticamente significativos: \*p <0.05 relativamente aos animais controlo e #p <0.05 comparativamente aos animais HFD.

### 3.4.2 - Respiração mitocondrial

Foi determinada a respiração mitocondrial em estado 3, estado 4 e ICR (índice de controlo respiratório) de modo a avaliar as alterações na cadeia respiratória e no sistema fosforilativo provocadas pela obesidade induzida por dieta rica em gordura e por tratamento com Berberina. O substrato respiratório utilizado para a avaliação desta capacidade foi o succinato e os resultados obtidos estão representados na Tabela III.

**Tabela III- Respiração mitocondrial no modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura (HFD) e tratamento com Berberina (Berberina)**

	Succinato		
	Controlo	HFD	Berberina
Estado 3 (natoms O/min/mg proteína)	200.95 ± 23.68	137.44 ± 14.04*	226.20 ± 30.19#
Estado 4 (natoms O/min/mg proteína)	62.81 ± 5.14	42.61 ± 4.80*	70.49 ± 8.70#
ICR	3.28 ± 0.38	2.70 ± 0.19	3.29 ± 0.30
V Oligomicina (natoms O/min/mg proteína)	52.49 ± 4.66	30.30 ± 3.29*	42.38 ± 2.34#
V FCCP (natoms O/min/mg proteína)	207.31 ± 12.89	113.54 ± 10.81*	256.73 ± 61.42#

Nota: Os dados estão apresentados como as médias ± SEM (n=5) para mitocôndrias do músculo esquelético isoladas de animais HFD e Berberina e respectivos controlos, tendo sido os ensaios realizados em duplicado. As velocidades de respiração mitocondrial são indicadas como nanoátomos de O/min/mg de proteína. Como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos, o consumo de oxigénio foi determinado polarograficamente, tendo sido os ensaios realizados a 25°C em 1,3 mL de meio (sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, EDTA 50 µM e HEPES 5 mM, pH 7,4) suplementado com rotenona 3 µM. As mitocôndrias (0.5 mg) foram energizadas com succinato 5 mM. O estado 3 respiratório foi induzido com 200 nmol de ADP. Valores estatisticamente significativos: \*p <0.05 comparativamente com o grupo controlo e #p <0.05 relativamente ao grupo HFD.

Nas mitocôndrias de músculo esquelético de animais HFD, os estados 3 e 4 respiratórios revelaram-se estatisticamente inferiores e os valores de ICR foram inferiores relativamente aos dos animais controlo (Tabela III e Figura 25). Relativamente aos animais Berberina, os valores dos estados 3 e 4 respiratórios foram estatisticamente superiores e os valores de ICR foram também superiores comparativamente aos animais HFD, como indicado na Tabela III e Figura 25. Concluimos que estes parâmetros são relativamente próximos aos dos animais controlo, não havendo diferenças estatísticas entre estes.

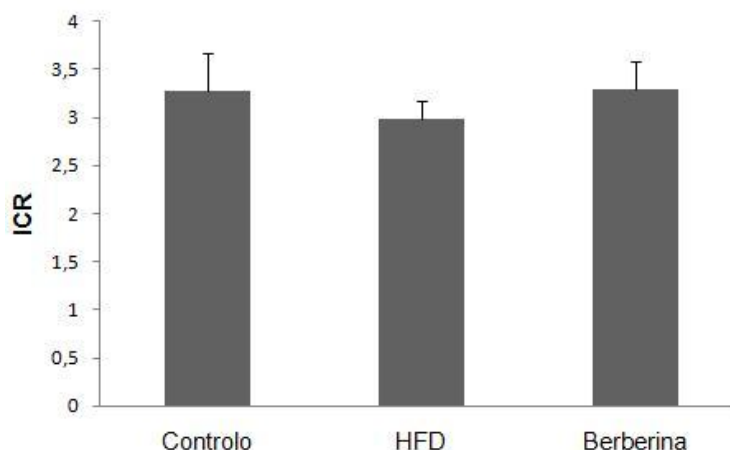


Figura 25 - Efeito da alimentação rica em gordura (HFD) e tratamento oral com Berberina (Berberina) no índice de controle respiratório (ICR), avaliado na presença de succinato. As mitocôndrias foram isoladas a partir do músculo esquelético de animais controlo, HFD e Berberina. Os dados são apresentados como as médias  $\pm$  SEM (n=5) e os ensaios foram realizados em duplicado. Como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos, o consumo de oxigénio foi avaliado polarograficamente.

O FCCP é um protonóforo que permeabiliza a membrana mitocondrial a prótons, o que resulta numa estimulação da cadeia respiratória a taxas máximas de consumo de oxigénio. Na presença de succinato, a estimulação da respiração mitocondrial com o desacoplador FCCP em condições não fosforilativas apresentou-se estatisticamente inferior nos animais HFD em relação aos animais controlo (Tabela III e Figura 26). A observação de que, na presença de FCCP, a respiração mitocondrial foi inferior nos animais HFD relativamente aos animais controlo, juntamente com os decréscimos do estado 3 respiratório, sugeriu a existência de alterações ao nível da cadeia transportadora de electrões.

Nos animais Berberina, este parâmetro revelou-se estatisticamente superior relativamente ao dos animais HFD (Tabela II e Figura 26).

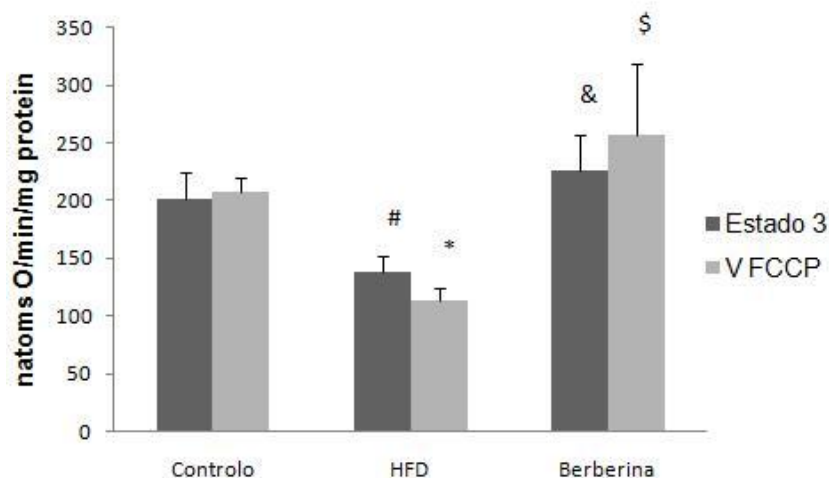


Figura 26 - Efeito da alimentação com dieta rica em gordura (HFD) e tratamento oral com Berberina (Berberina) na respiração mitocondrial na presença de succinato: estado 3 e V FCCP. As mitocôndrias foram isoladas a partir do músculo esquelético de animais controlo, HFD e Berberina. Os dados são apresentados como as médias  $\pm$  SEM (n=5) e os ensaios foram realizados em duplicado. Como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos, o consumo de oxigénio foi avaliado polarograficamente. As velocidades de respiração mitocondrial são referidas como nanoátomos de O/min/mg de proteína. Os valores estatisticamente significativos: <sup>#</sup> estado 3 e <sup>\*</sup> V FCCP dos animais HFD comparativamente aos animais controlo, <sup>&</sup> estado 3 e <sup>\$</sup> V FCCP dos animais Berberina relativamente aos animais HFD,  $p < 0.05$  comparado com o respectivo grupo de animais.

### 3.4.3 - Indução da permeabilidade transitória mitocondrial

Através da determinação do entumescimento mitocondrial induzido pela acumulação de cálcio nas mitocôndrias foi avaliada a susceptibilidade à indução de PTM de mitocôndrias do músculo esquelético de animais alimentados com dieta rica em gordura (HFD) e após tratamento com Berberina (Berberina) (Figura 27).

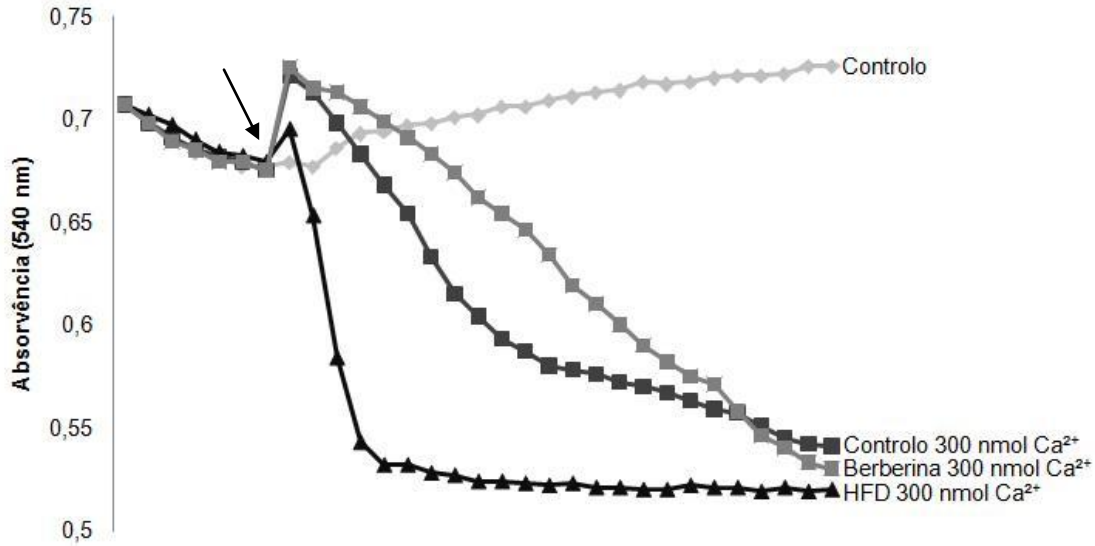


Figura 27 - Susceptibilidade à indução da permeabilidade transitória mitocondrial no modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura e tratamento oral com Berberina. Através da monitorização do entumescimento mitocondrial avaliou-se espectrofotometricamente a indução da PTM. Os ensaios foram efectuados em 2 mL de meio (sacarose 200 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM, EGTA 10  $\mu\text{M}$  e HEPES pH 7.4) a 25°C, suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$ , succinato 5 mM e 1 mg de suspensão mitocondrial. Uma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) foi adicionada após um breve período de reacção (indicado pela seta).

Nos animais HFD, as mitocôndrias isoladas de músculo esquelético apresentaram uma maior susceptibilidade na perda da homeostase mitocondrial de cálcio relativamente às mitocôndrias de animais controlo e Berberina.

#### 3.4.4 – Conteúdo em proteínas no tecido de músculo esquelético

Atendendo a que a análise da bioenergética mitocondrial sugeriu alterações no sistema fosforilativo de mitocôndrias isoladas de animais alimentados com dieta rica em gordura durante 16 semanas e uma recuperação da eficiência do sistema fosforilativo nos animais Berberina, foi avaliado o conteúdo em AMPK, p-AMPK, COX I, COX IV, TFAM, ATP sintetase, PGC-1 $\alpha$  e actina no tecido de músculo esquelético. Após 16 semanas de alimentação com dieta rica em gordura observou-se uma diminuição no conteúdo de PGC-1 $\alpha$  enquanto que o tratamento oral com Berberina durante 4 semanas restabeleceu o seu conteúdo a níveis idênticos aos animais controlo (Figura 28). A análise do conteúdo em AMPK demonstrou que este estava quase idêntico nos vários animais.



Adicionalmente, a análise do conteúdo em AMPK fosforilada (*p*-AMPK) revelou que estava aumentado nos animais Berberina relativamente aos animais HFD, sendo muito semelhante ao ocorrido nos animais controlo. Relativamente ao conteúdo em TFAM, a sua análise demonstrou um aumento nos animais Berberina em relação aos animais HFD. Finalmente, a análise do conteúdo em COX I, COX IV e ATP sintetase (componentes do sistema fosforilativo) indicou um aumento nos animais Berberina comparativamente aos animais HFD.

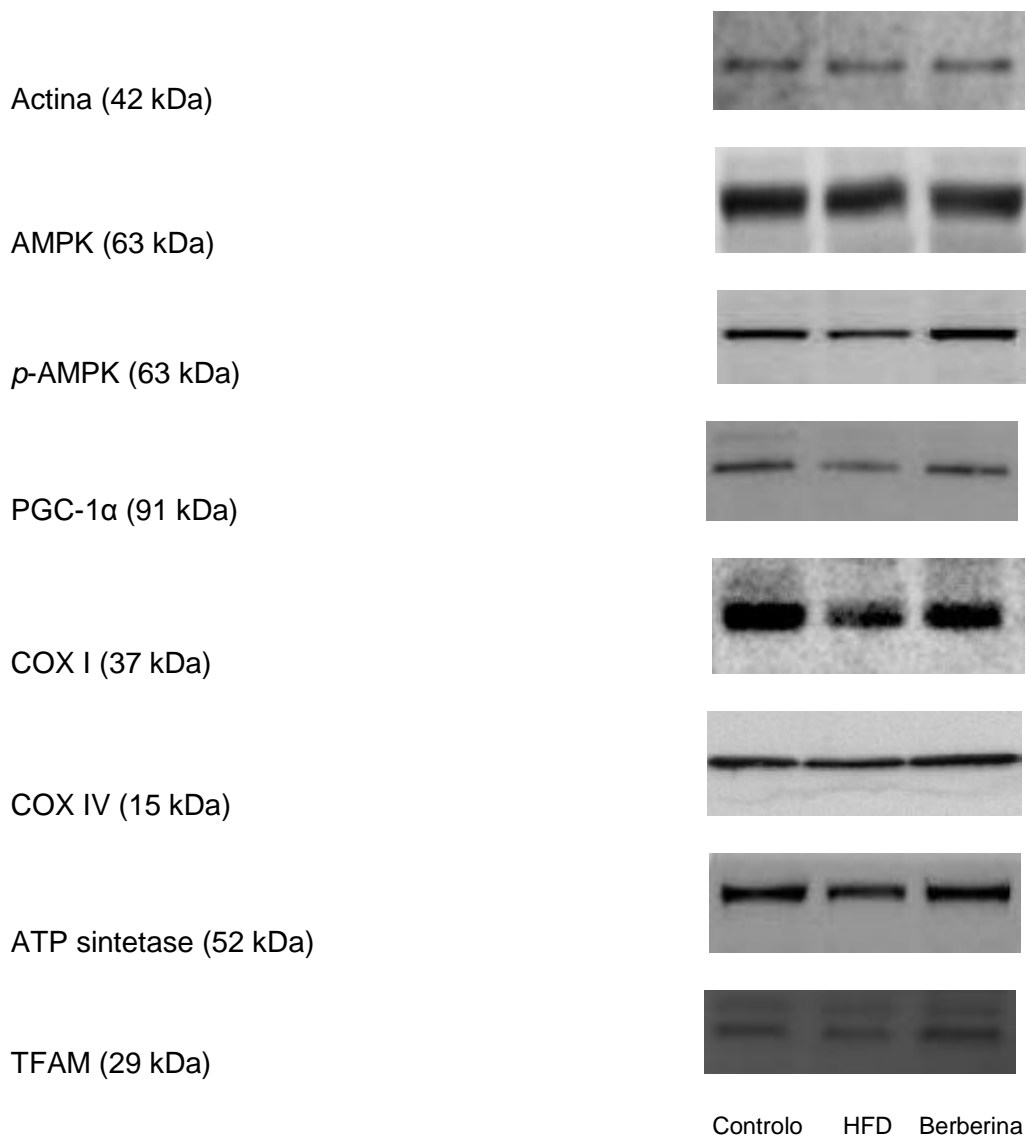


Figura 28 – Efeito da alimentação com dieta rica em gordura durante 16 semanas e do tratamento oral com Berberina durante 4 semanas no conteúdo em Actina, AMPK, *p*-AMPK, PGC-1 $\alpha$ , COX I, COX IV, ATP sintetase e TFAM em

tecido de músculo esquelético. A análise foi avaliada por “western blot” como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos.



**Capítulo IV**  
**Discussão**



O síndrome metabólico é uma condição multifactorial que constitui um problema público mundial. O seu desenvolvimento deve-se ao aumento da incidência de obesidade devido aos estilos de vida sedentários que ocorrem hoje em dia e também ao elevado consumo de alimentos ricos em gorduras e açúcares (Krebs & Roden, 2004; Haslam & James, 2005). É um factor de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Grundy, 2004), diabetes do tipo 2 e outras anomalias (Nicolson, 2007). É um síndrome complexo constituído por vários distúrbios na homeostase de glicose e lípidos (Fonseca, 2005). As condições associadas ao síndrome metabólico são a obesidade abdominal, aumento da pressão sanguínea (hipertensão), elevados níveis de colesterol, hiperglicemia, aumento dos níveis de triglicédeos, dislipidemia, resistência à insulina e aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose (Haslam & James, 2005). A resistência à insulina é um dos sinais iniciais no desenvolvimento de síndrome metabólico (Einhorn et al., 2003). A insulina secretada pelas células pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis de glicose circulante é essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase de glicose através da regulação da expressão de genes e metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e proteínas.

A obesidade contribui para o desenvolvimento de hipertensão, elevados níveis de colesterol e hiperglicemia, estando associada com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Grundy, 2004). Um elevado nível de ácidos gordos não esterificados no plasma sobrecarrega o tecido muscular e o fígado com lípidos, o que contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina. Quando um tecido muscular desenvolve resistência à insulina e está sobrecarregado com lípidos derivados dos níveis elevados de ácidos gordos não esterificados no plasma, o excesso destes ácidos gordos dirigem-se para o fígado, promovendo dislipidemia e desenvolvimento de fígado gordo. Um tecido muscular que desenvolve obesidade é caracterizado pela acumulação de gordura que é provocada pela tomada excessiva de ácidos gordos livres e consequente aumento da síntese de triglicédeos (Muoio & Koves, 2007). Este excesso de lípidos intracelulares desregula o metabolismo energético normal da célula. Com o intuito de eliminar o excesso de ácidos gordos livres, a taxa de  $\beta$ -oxidação aumenta, alterando o equilíbrio celular na mitocôndria. Este organelo celular possui uma função extremamente importante no metabolismo celular, dado que produz cerca de 90% do ATP que é consumido na célula, principalmente ao nível da fosforilação oxidativa e  $\beta$ -oxidação (fontes de produção de ROS).

A mitocôndria desempenha um papel primordial na oxidação de ácidos gordos como fonte de energia metabólica. De acordo com isto, qualquer alteração na função mitocondrial devido à acumulação intracelular de gordura no músculo esquelético, vai incidir e até mesmo alterar a função celular (Patti et al., 2003). Como já verificado anteriormente, em tecidos com elevada actividade metabólica, a disfunção mitocondrial está associada com diversas doenças (Koh et al., 2005). Trabalhos diversos têm reportado alterações ao nível da dinâmica mitocondrial induzidas por exposição celular a concentrações elevadas de ácidos gordos. No entanto, apesar da pesquisa intensiva nesta área em desenvolvimento, ainda restam diversas dúvidas relativamente aos mecanismos de modulação da biogénese mitocondrial no músculo esquelético e qual a

estratégia mais correcta para evitar o desenvolvimento da patologia. A Berberina tem sido considerada um agente antibacteriano e antihiperlipidémico (Zhang et al., 2008), tendo ainda sido verificado que diminui os níveis de triglicédeos em alguns tecidos. Com a finalidade de determinar quais as alterações mitocondriais associadas com o desenvolvimento de obesidade e qual o efeito do tratamento oral com Berberina nesta condição, foi seleccionado um modelo animal de obesidade induzida por dieta rica em gordura de modo a obter conclusões relevantes para esta condição em humanos.

A vantagem deste trabalho relativamente a outros realizados anteriormente é a avaliação do tratamento com Berberina na modulação da biogénese mitocondrial no músculo esquelético num modelo de obesidade induzida por dieta. Relativamente à avaliação do peso corporal, os animais HFD, que foram sujeitos a uma dieta rica em gordura durante 16 semanas, apresentaram pesos superiores aos animais controlo, ou seja, tornaram-se obesos. Em trabalhos realizados anteriormente verificou-se que a dieta rica em gordura origina um aumento do “uptake” de ácidos gordos para o músculo esquelético, contribuindo desta forma para a acumulação intracelular de lípidos (Patti et al., 2003). No entanto, nos animais que foram sujeitos a tratamento oral com Berberina, ocorreu uma diminuição do peso corporal. Como foi possível observar durante o sacrifício dos vários animais, os animais HFD apresentaram uma maior percentagem de gordura na zona abdominal. Nos animais Berberina, a quantidade de gordura abdominal era muito inferior, o que é compatível com a diminuição do peso corporal verificada durante as 4 semanas de tratamento.

Na análise da função de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de animais HFD verificou-se que a acumulação de gordura neste tecido está associada a alterações na bioenergética mitocondrial. Relativamente aos animais que foram sujeitos ao tratamento oral com Berberina durante 4 semanas (animais Berberina), todos os danos induzidos pela dieta rica em gordura foram revertidos.

Para uma avaliação da função mitocondrial é necessário determinar o potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) desenvolvido após a energização pois este parâmetro representa o principal componente do gradiente electroquímico de protões através da membrana e reflecte as diferenças no potencial eléctrico, contribuindo para a maioria da quantidade de energia disponível para a fosforilação oxidativa (Nicholls, 1982). Os parâmetros que se verificaram estarem alterados nas mitocôndrias de músculo esquelético dos animais HFD foram a capacidade de gerar  $\Delta\Psi$ , a recuperação após a fosforilação da quantidade de ADP adicionada e a manutenção de um potencial semelhante ao potencial inicial. Nos animais HFD verificou-se uma diminuição do  $\Delta\Psi$  gerado após a energização que pode dever-se a um aumento da permeabilidade passiva a protões da membrana mitocondrial interna (“leak” a protões) ou a uma diminuição do número de protões ejectados juntamente com o transporte de electrões ao longo da cadeia respiratória (Murphy, 1989; Brand, 1990). Contudo, o facto de animais HFD não apresentarem um aumento do estado 4 relativamente aos animais controlo e Berberina, não suporta esta explicação.

A avaliação do tempo de espera que precede a repolarização, ou seja, a “lag phase”, os animais HFD, apresentaram um aumento deste parâmetro relativamente aos animais controlo, o que sugeriu um desacoplamento da oxidação de substratos reduzidos pela cadeia transportadora de electrões (Varela et al., 2008). Nos animais Berberina este aumento foi revertido, sendo muito semelhante à dos animais controlo. Nos animais HFD, o estado 3 respiratório foi estatisticamente inferior em relação aos animais controlo. Deste modo, ocorreu uma perda da eficiência na capacidade fosforilativa e oxidativa nas mitocôndrias dos animais HFD, efeito revertido no grupo Berberina.

Analizou-se a respiração mitocondrial na presença de FCCP. O FCCP é um protonóforo que vai permeabilizar a membrana mitocondrial interna a prótons, originando assim taxas máximas de respiração. Na presença de FCCP, a análise da respiração mitocondrial nos animais HFD revelou que a taxa máxima de respiração era estatisticamente inferior relativamente aos animais controlo. Esta avaliação juntamente com a diminuição significativa do estado 3 respiratório sugeriu alterações ao nível dos complexos da cadeia respiratória (Du et al., 1998). Estas alterações podem reflectir uma alteração na associação dos complexos respiratórios provocada pela acumulação de gordura no músculo esquelético. No entanto, nos animais Berberina, a respiração mitocondrial na presença de FCCP foi estatisticamente superior comparativamente aos animais HFD e semelhante aos animais controlo, o que sugere que não ocorreram alterações ao nível da cadeia transportadora de electrões.

De acordo com a disfunção mitocondrial, as mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético de animais sujeitos a uma dieta rica em gordura revelaram uma maior susceptibilidade à indução da permeabilidade transitória mitocondrial por cálcio. A acumulação excessiva de cálcio na mitocôndria, despolarização mitocondrial, stress oxidativo e depleção do conteúdo celular em ATP são condições patológicas associadas à indução da permeabilidade transitória mitocondrial (Crompton, 1999; Bernardi et al., 2001). As mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de animais que receberam tratamento com Berberina (animais Berberina) apresentaram um registo de entumescimento induzido por cálcio semelhante ao da preparação controlo.

Os efeitos de uma dieta rica em gordura na função mitocondrial e a acção protectora da Berberina na eficiência da fosforilação oxidativa, sugeriram modificações ao nível da biogénese mitocondrial, designadamente um menor conteúdo em elementos chave do metabolismo como são os complexos da cadeia transportadora de electrões. O factor PGC-1 $\alpha$  é um regulador chave do conteúdo e função mitocondriais. Em 2002, Kelley e seus colaboradores foram os primeiros a considerar o desenvolvimento de disfunção mitocondrial na condição de diabetes do tipo 2. Os ácidos gordos e a glicose constituem os substratos oxidativos que suportam a actividade de contracção do músculo esquelético (Muoio & Newgard, 2006). Em condições normais, este tecido possui a capacidade de transitar entre os dois substratos. Assim, o músculo esquelético adapta a sua resposta através da selecção de substrato de modo a compensar a necessidade e fornecimento de energia.

O aumento da oxidação de ácidos gordos inibe a glicólise e a oxidação de glicose (Randle et al., 1963). Face a uma dieta com elevado conteúdo em gordura, há acumulação de ácidos gordos no tecido muscular o que resulta no desenvolvimento de resistência à insulina (Watt & Heverner, 2008). Esta situação desregula o metabolismo da glicose, também contribui para o aumento de produção de ROS e redução da função mitocondrial, o que potencia o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes em casos de obesidade. O “uptake” excessivo de ácidos gordos e a diminuição da oxidação de lípidos provocam a acumulação de metabolitos lipídicos (Holloway et al., 2009). A diminuição da expressão de carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1, enzima limitante de velocidade de entrada de ácidos gordos para a mitocôndria) e inibição da função mitocondrial (diminuição do número mitocondrial e da velocidade de síntese de ATP) ocorrem no músculo esquelético resistente à insulina, sendo concordante com a acumulação de lípidos neste tecido (Petersen et al., 2004; Befroy et al., 2007).

De acordo com o trabalho desenvolvido por Koves e seus colaboradores em 2008, existe uma relação metabólica entre o fornecimento de ácidos gordos e a resistência à insulina no músculo esquelético (Patti et al., 2003). Anteriormente foi observado que na condição de resistência à insulina ocorria uma diminuição da entrada de ácidos gordos para a mitocôndria e também uma diminuição da  $\beta$ -oxidação. No entanto, este trabalho concluiu que a velocidade da  $\beta$ -oxidação mitocondrial encontra-se elevada, excedendo deste modo o fluxo do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e também da cadeia transportadora de electrões. Isto origina uma oxidação incompleta de ácidos gordos provocando a acumulação de metabolitos, stresse oxidativo e o desenvolvimento de resistência à insulina.

No músculo esquelético, um aumento do nível de ácidos gordos livres induz stresse oxidativo (Fonseca, 2005). As mitocôndrias de pacientes com diabetes do tipo 2 possuem reduzidas capacidades da cadeia transportadora de electrões. Esta disfunção mitocondrial está interligada ao desenvolvimento de resistência à insulina, que origina uma redução da utilização de glicose, resultando num aumento do desacoplamento da respiração mitocondrial, na redução da actividade da cadeia transportadora de electrões e da produção de ATP (Schrauwen & Hesselink, 2004).

Kelley e colaboradores (2002) descreveram que a morfologia mitocondrial estava alterada nos pacientes diabéticos do tipo 2 e também apresentavam uma diminuição do número, bem como um maior número de mitocôndrias danificadas. Também verificaram que ocorreu uma redução da expressão de genes codificantes de enzimas chave do metabolismo oxidativo mitocondrial nestes pacientes diabéticos. A maioria destes genes encontram-se sob o controlo de um coactivador da transcrição, o PGC-1 $\alpha$ , e nestes pacientes a sua expressão estava diminuída. Esta diminuição da expressão de PGC-1 $\alpha$  também foi observada noutros trabalhos desenvolvidos (Heilbronn et al., 2007; Mensik et al., 2007). Em 1998, Puigserver e seus colaboradores identificaram PGC-1 $\alpha$  como uma proteína responsável pela regulação da função mitocondrial e homeostase energética. Verificaram que, no músculo esquelético, esta proteína estimulava a biogénese mitocondrial por coactivação do factor respiratório nuclear e regulava os genes envolvidos



na fosforilação oxidativa. Em 2004, McCarty demonstrou também uma diminuição da massa e função mitocondriais em vários tecidos, em situações de obesidade e diabetes (Ritov et al., 2005). Verificaram também uma redução dos níveis de adiponectina resultando numa diminuição da activação da via AMPK/PGC-1 $\alpha$  no tecido muscular. Após 16 semanas de alimentação com dieta rica em gordura, ocorreu uma diminuição no conteúdo de PGC-1 $\alpha$ , sendo que o tratamento com Berberina restabeleceu PGC-1 $\alpha$  a níveis idênticos ao grupo controlo. Este efeito da Berberina pode ser desencadeado pela acção activadora deste composto ao nível da AMPK.

No trabalho desenvolvido por Zhang e seus colaboradores (2008), foi investigado o efeito da Berberina no tratamento de pacientes diabéticos com dislipidemia. Foi observado que este composto natural apresentou um efeito benéfico na diminuição dos níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicérides. Verificaram que a Berberina activava a AMPK em adipócitos e miotúbulos e facilitava a translocação de GLUT4. Desta forma, a administração de Berberina em paralelo a uma dieta rica em gordura, ao estimular a proteína AMPK desencadeia um mecanismo adaptativo com a finalidade de ultrapassar a disfunção mitocondrial induzida pela acumulação de gordura no músculo esquelético. A AMPK é um dos principais factores que está envolvida na biogénese mitocondrial, regulando a actividade de PGC-1 $\alpha$  por fosforilação. Assim, a análise do conteúdo em AMPK revelou que este estava aproximadamente idêntico nos vários animais. No entanto, a análise do conteúdo em AMPK fosforilada indicou estar aumentado nos animais Berberina comparativamente aos animais HFD, sendo este aumento muito próximo do conteúdo observado nos animais controlo. Este resultado indica que a Berberina tem como alvo a AMPK fosforilada que por sua vez activa PGC-1 $\alpha$ , aumentando a sua expressão e desencadeando uma série de activações de factores de transcrição envolvidos na biogénese mitocondrial.

O PGC-1 $\alpha$  é um coactivador de factores de transcrição envolvidos na replicação e transcrição de DNA mitocondrial sendo um destes o TFAM. O TFAM é um factor codificado pelo núcleo, sendo translocado para a mitocôndria, activando a transcrição e replicação do DNA mitocondrial. A análise do seu conteúdo revelou que este estava aumentado nos animais Berberina comparativamente aos animais HFD. Deste modo, nos animais Berberina ocorreu uma coordenação especializada que permite um aumento da massa e função mitocondriais em resposta a uma situação na qual é necessária uma maior produção de ATP. Esta acção foi comprovada pelo aumento do conteúdo mitocondrial em COX I, COX IV e ATP sintetase, componentes do sistema de fosforilação oxidativa.

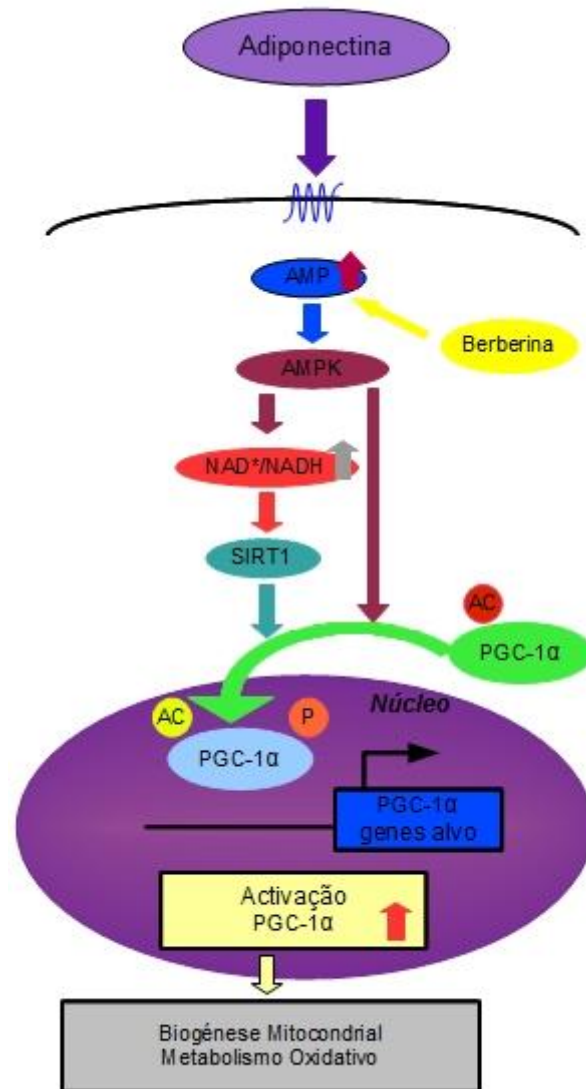


Figura 29 - Esquema representativo da transdução de sinal da adiponectina em células musculares na condição de síndrome metabólica (adaptado de Iwabu et al., 2010). AMPK e Sirt1 são necessárias para a ativação de PGC-1  $\alpha$ . A biogênese mitocondrial é modulada através da expressão de PGC-1  $\alpha$ . A AMPK ativa PGC-1  $\alpha$ , e este, por sua vez, ativa NRF e a expressão de TFAM e o início da replicação de DNA mitocondrial. Também ocorre a transcrição de genes da fosforilação oxidativa, induzida por NRF, após a migração de proteínas codificadas no núcleo para a mitocôndria (Nisoli et al., 2003; Reznick & Shulman, 2006). Em indivíduos obesos, a eficiência da fosforilação oxidativa tem sido considerada como um mecanismo responsável pela disfunção celular. No músculo esquelético de animais alimentados com dieta rica em gordura, ocorre um decréscimo na expressão de genes necessários para a fosforilação oxidativa e de factores envolvidos na biogênese mitocondrial (Patti et al., 2003; Sparks et al., 2005).

Este estudo confirma que a mitocôndria desempenha uma função fulcral no desenvolvimento do síndrome metabólico, principalmente ao nível da eficiência da fosforilação oxidativa. A Berberina pode ser então utilizada no tratamento desta patologia dado que este composto é responsável pela diminuição de vários factores que são fundamentais para o desenvolvimento desta patologia. A administração de Berberina origina uma diminuição do peso corporal, bem como dos níveis de glicose, triglicéridos, colesterol, fosfolípidos e de creatinina. É também capaz de modular a biogénese mitocondrial dado que activa a AMPK fosforilada (Turner et al., 2008) que por sua vez activa a PGC-1  $\alpha$ , activando por fim o TFAM. O factor codificado no núcleo (TFAM) é então translocado para a mitocôndria activando a transcrição e replicação deste organelo. Assim, ocorre um aumento da capacidade oxidativa mitocondrial, da expressão de PGC-1 $\alpha$  e de genes envolvidos na biogénese mitocondrial. Ocorre também uma diminuição da expressão de genes envolvidos na lipogénese e um aumento do número e da função mitocondriais e atenuação da disfunção mitocondrial que ocorre no desenvolvimento de síndrome metabólico.





**Referências**



- Anderson L. (1981). Identification of mitochondrial proteins and some of their precursors in two-dimensional electrophoretic maps of human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2407-2411.
- Asai M., Iwata N., Yoshikawa A., Aizaki Y., Ishiura S., Saido T.C. & K. Maruyama (2007). Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease A $\beta$  secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 352: 498-502.
- Befroy D.E., Petersen K.F., Dufour S., Mason G.F., Graaf R.A., Rothman D.L. & G.I. Shulman (2007). Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 56: 1376-1381.
- Bellance N., Lestienne P. & R. Rossignol (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosc.* 14: 4015-4034.
- Bernardi P. (1992). Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. *J. Biol. Chem.* 267: 8834-8839.
- Bernardi P. (1996). The permeability transition pore. Control points of a cyclosporine A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1275: 5-9.
- Bernardi P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79: 1127-1155.
- Bernardi P., Petronilli V., di Lisa F. & M. Forte (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 26: 112-117.
- Bhattacharya S.K., Thakar J.H., Johnson P.L. & D.R. Shanklin (1991). Isolation of skeletal muscle mitochondria from hamsters using an ionic medium containing ethylenediaminetetraacetic acid and nagarse. *Anal Biochem.* 192: 344-349.
- Birdsall T.C. & G.S. Kelly (1997). Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern. Med. Rev.* 2: 94-103.
- Bonen A., Parolin M.L., Steinberg G.R., Calles-Escandon J., Tandon N.N., Glatz J.F., Iuiken J.J., Heigenhauser G.J. & D.J. Dyck (2004). Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcomal FAT/CD36. *FASEB J.* 18: 1144-1146.

- Bonnard C., Durand A., Peyrol S., Chanseaume E., Chauvin M.A., Morio B., Vidal H. & J. Rieusset (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J.Clin. Invest.* 118: 789-800.
- Boveris A. & B. Chance (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716.
- Boveris A., Cadenas E. & A.O. Stoppani (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156: 435-444.
- Boyer P.D. (1997). The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 717-749.
- Boyer P.D. (1998). ATP synthase – past and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 3-9.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brand M.D. (1990). The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1018: 128-133.
- Broekemeier K.M., Dempsey M.E. & D.R. Pfeiffer (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264: 7826-7830.
- Brookes P.S., Bolanos J.P. & S.J. Heales (1999). The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct. *FEBS Lett.* 446: 261-263.
- Brusq J.M., Ancellin N., Grondin P., Guillard R., Martin S., Saintillan Y. & M. Issandou (2006). Inhibition of lipid synthesis through activation of AMPK kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. *J. Lipid Res.* 47: 1281-1288.
- Cadet J.L. & C. Brannock (1998). Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem. Int.* 32: 117-131.
- Caldwell S.H., Chang C.Y., Nakamoto R.K. & L. Krugner-Higby (2004). Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Liver Dis.* 8: 595-617.



- Cannon B., Shabalina I.G., Kramarovam T.V., Petrovic N. & J. Nedergaard (2006). Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species – or not? *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 449-458.
- Canto C., Gerhart-Hines Z., Feige J.N., Lagouge M., Noriega L., Milne J.C. Elliott P.J., Puigserver P. & J. Auwerx (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-1060.
- Carley A.N. & D. L. Severson (2005). Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochim. Biophys. Acta* 1734: 112-126.
- Chance B. & G.R. Williams (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* 17: 65-134.
- Chen M.B., McAinch A.J., Macaulay S.L., Castelli L.A., O'Brien P.E. & J.B. Dixon (2005). Impaired activation of AMP-kinase and fatty acid oxidation by globular adiponectin in cultured human skeletal muscle of obese type 2 diabetics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 3665-3672.
- Cheng Z., Pang T., Gu M., Gao A.H., xie C.M., Li J.A., Nan F.J. & J. Li (2006). Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 1682-1689.
- Choi M.S., Yulk D.Y., Oh J.H., Jung H.Y., Han S.B., Moon D.C. & J.T. Hong (2008). Berberine inhibits human neuroblastoma cell growth through induction of p53-dependent apoptosis. *Anticancer Reas.* 28: 3777-3784.
- Clementi E. & E. Nisoli (2005). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 142: 102-110.
- Colell A., Garcia-Ruiz C., Lluís J.M., Coll O., Mari M. & J.C. Fernandez-Checa (2003). Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J. Biol. Chem.* 276: 33928-33935.
- Collins T.J., Berridge M.J., Lipp P. & M.D. Bootman (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* 21: 1616-1627.
- Crompton M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341: 233-249.

- Crompton M. (2000). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J. Physiol.* 341: 233-249.
- Crompton M., Hediger M. & E. Carafoli (1978). The effects of inorganic phosphate on calcium influx into rat heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 80: 540-546.
- Crompton M., Virji S., Doyle V., Johnson N. & J. M. Ward (1999). The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem. Soc. Symp.* 66: 167-179.
- Czyz A., szewczyk A., Nalecz M.J. & L. Wojtczak (1995). The role of mitochondrial potassium fluxes in controlling the protonmotive force in energized mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210: 98-104.
- Darnell J.E., Lodish H. & D. Baltimore (1990). *Molecular Cell Biology* (2<sup>nd</sup> edition), Scientific American Books.
- Doerner A., Pauschinger M., Badorff A., Noutsias M., Giessen S., Schulze K., Bilger J., Rauch U. & H.P. Schultheiss (1997). Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Lett.* 414: 258-262.
- Du G., Mouithys-Mickalad A. & F.E. Sluse (1998). Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 1066-1074.
- Duchen M.R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* 25: 365-451.
- Einhorn D., Reaven G.M., Cobin R.H., Ford E., Ganda O.P., Handelsman Y., Hellman R., Jellinger P.S., Kendall D., Krauss R.M., Neufeld N.D., Petak S.M., Rodbard H.M., Seibel J.A., Smith D.A. & P.W. Wilson (2003). American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr. Pract.* 9: 237-252.
- Erecinska M. & B. Wilson (1982). Regulation of cellular energy metabolism. *J. Membr. Biol.* 70: 1-14.
- Estabrook R.W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP/O ratios. *Methods Enzymol.* 10: 41-47.
- Fiskum G. & A.L. Lehninger (1979). Regulated release of Ca<sup>2+</sup> from respiring mitochondria by Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport. *J. Biol. Chem.* 254: 6236-6239.

- Fonseca V.A. (2005). The metabolic syndrome, hyperlipidemia and insulin resistance. *Clin. Cornerstone* 7: 61-72.
- Frayn K.N. (2003). The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1115-1119.
- Frey T.G. & A.C. Mannella (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25: 319-324.
- Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Galat A. (1993). Peptidylproline cis-trans-isomerase: immunophilins. *Eur. J. Biochem.* 216: 689-707.
- Ganitkevitch V.Y. (2003). The role of mitochondria in Ca<sup>2+</sup> cycling. *Exp. Physiol.* 88: 91-97.
- Gleyzer N., vercauteren K. & R. C. Scarpulla (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Molecular and Cell Biology* 25: 1354-1366.
- Goodpaster B.H. & D.E. Kelley (2002). Skeletal muscle triglyceride: marker or mediator of obesity-induced insulin resistance in type 2 diabetes mellitus? *Curr. Diab. Rep.* 2: 216-222.
- Goodpaster B.H., He J., Watkins S. & D.E. Kelley (2001). Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 5755-5761.
- Gornall A.G., Bardawill C.J. & M.M. David (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
- Grundy S.M. (2004). Metabolic syndrome: part II. *Endocrinol. Metab. Clin. North AM.* 33: xi-xii.
- Gunter T.E. & D.R. Pfeiffer (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol* 258: C755-C786.
- Gunter T.E. & K.K. Gunter (2001). Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB Life* 52: 197-204.
- Gunter T.E., Gunter K.K., Sheu S.S. & C.E. Gavin (1994). Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.* 267: C313-C339.

- Gunter T.E., Puskin J.S. & P.R. Russell (1975). Quantitative magnetic resonance studies of manganese uptake by mitochondria. *Biophys. J.* 15: 319-333.
- Halliwell B. & J.M. Gutteridge (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
- Harris D.A. (1995). *Bioenergetics at a glance*. Blackwell Science, Ltd.
- Haslam D.W. & W.P. James (2005). Obesity. *Lancet* 366: 1197–1209.
- Hatefi Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann Rev Biochem.* 54: 1015-1069.
- Hegarty B. D., Furler S. M., Ye J., Cooney G. J. & E. W. Kraegen (2003). The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol. Scand.* 178: 373-383.
- Heilbronn L.K., Gan S.K., Turner N., Campbell L.V. & D.J. Chisholm (2007). Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 1467-1473.
- Hoch F.L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta* 1113: 71-133.
- Hock M. & B.A. Kralli (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu. Rev. Physiol.* 71: 177-203.
- Holloway G.p., Bonen A. & L.L. Spriet (2009). Regulation of skeletal muscle mitochondria fatty acid metabolism in lean and obese individuals. *Am. J. Clin. Nutri.* 89: 455S-462S.
- Hulver M.W., Berggren J.R., Cortright R.N., Dudek R.W., Thompson R.P., Pories W.J., MacDonald K.G., Cline G.W., Shulman G.I., Dohm G.L. & J.A. Houmard (2003). Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284: E741-E747.
- Huss J. M. & D. P. Kelly (2005). Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 547-555.
- Iwabu M., Yamauchi T., Okada-Iwabu M., Sato K., Nakagawa T., Funata M., Yamaguchi M., Namiki S., Nakayama R., Tabata M., Ogata H., Kubota N., Takamoto I., Hayashi Y., Yamauchi N., Waki H., Fukayama M., Nishino I., Tokuyama K., Ueki K., Oike Y., Ishii S., Hirose K., Shimizu T., Touhara K. &

- T. Kadowaki (2010). Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 $\alpha$  and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. *Nature* 464: 1313-1319.
- Jantova S., Cipak L., Cernakova M. & D. Kostalova (2003). Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in HeLa and L1210 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 55: 1143-1149.
- Jensen B.D. & T.E. Gunter (1984). The use of tetraphenyl phosphonium (TPP<sup>+</sup>) to measure membrane potentials in mitochondria: membrane binding and respiratory effects. *Biophys. J.* 45: 92a.
- Johannsen T.H., Kamstrup P.R., Andersen R.V., Jensen G.B., Sillesen H., Tybjaerg-Hansen A. & B.G. Nordestgaard (2009). Hepatic lipase, genetically elevated high-density lipoprotein and risk of ischemic cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 1264-1273.
- John G.B., Shang Y., Li L., Renken C., Mannella C.A., Selker J.M., Rangell L., Bennett M.J. & J. Zha (2005). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol. Biol. Cell* 16: 1543-1554.
- Kamo N., Muratsugu M., Hongoh R. & V. Kobatake (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* 49: 105-121.
- Kelley D. E., He J., Menshikova E. V. & V. B. Vladimir (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2944-2450.
- Kim J.Y., Hickner R.C., Cortright R.L., Dohm G.L. & J.A. Houmard (2000). Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E1039-E1044.
- Kim S.H., Shin E.J., Kim E.D., Bayaraa T., Frost S.C. & C.K. Hyun (2007). Berberine activates GLUT1-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 2120-2125.
- Kim W.R., Poterucha J.J., Porayko H.K., Dickson E.R., Steers J.L., Wiesner R.H. (1996). Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis following liver transplantation. *Transplantation* 62: 1802-1805.
- Kim W.S., lee Y.S., Cha S.H., Jeong H.W., Choe S.S., Lee M.R., Oh G.T., Park H.S., Lee K.U., Lane M.D. & J.B. Kim (2009). Berberine improves lipid

- dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: E812-E819.
- Koh K.K., Han S.H. & M.J. Quon (2005). Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46: 1978-1985.
- Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M., Inaba S., Li C., Wang Y., Wang Z., Si S., Pan H., Wang S., Wu J., Wang Y., Li Z., Liu J. & J.D. Jiang (2004). Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat. Med.* 10: 1344-1351.
- Korshunov S.S., Krasnikov B.F., Pereverzev M.O. & V.P. Skulachev (1999). The antioxidant functions of cytochrome c. *FEBS Lett.* 462: 192-198.
- Korshunov S.S., Skulachev V.P. & A.A. Starkov (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416: 15-18.
- Koves T.R., Ussher J.R., Noland R.C., Slentz D., Mosedale M., Ilkayeva O. Brain J., Stevens R., Dyck J.R., Newgard C.B., Lopaschuk G.D. & D.M. Muoio (2008). Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* 7: 45-46.
- Kraegen E.W., James D.E., Storlien L.H., Burleigh K.M. & D.J. Chisholm (1986). In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia* 29: 192-198.
- Krebs M. & M. Roden (2004). Nutrient-induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Curr. Med. Chem.* 11: 901-908.
- Kröner H. (1986).  $Ca^{2+}$  ions, an allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 525-535.
- Kulkarni S.K. & A. Dhir (2008). On the mechanism of antidepressant-like action of Berberine chloride. *Eur. J. Pharmacol.* 589: 163-172.
- Kumarswamy R. & Chandnas (2009). Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion* 9:1-8.
- Lee S., Lim H.J., Park J.H., Lee K.S., Jang Y. & H.Y. Park (2007). Berberine-induced LDLR up-regulation involves JNK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 362: 853-857.

- Lee Y.S., Kim W.S., Kim K.H., Yoon M.J., Cho H.J., Shen Y., Ye J.M., Lee C.H., Oh W.K., Kim C.T., Hohnen-Behrens C., Gosby A., Kraegen E.W., James D.E. & J.B. Kim (2006). Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* 55: 2256-2264.
- Lehman J.J., Barger P.M., Kovacs A., Saffitz J.E., Medeiros D.M. & D.P. Kelly (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.* 106: 847-856.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. & J. Darnell (2002). *Molecular cell biology*. 4<sup>th</sup> edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Logan D.C. (2006). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 57: 1225-1243.
- Lowell B. B. & G. I. Shulman (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307: 384-387.
- Lu C.Y., Lee H.C., Fahn H.J. & Y.H. Wei (1999). Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat. Res.* 423: 11-21.
- Madeira V.M.C. (1975). A rapid and ultrasensitive method to measure calcium movements across biological membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 64: 870-876.
- Mannella C.A. (1996). Mitochondrial channels revisited. *J. Bioenerg. Biomemb.* 31: 1-4.
- Mannella C.A. (2000). Introduction: Our changing views of mitochondria. *J. Bioenerg. Biomemb.* 32: 1-4.
- Mannella C.A., Buttle K.F., Rath B.K. & M. Marko (1998). Electron microscopic tomography of rat liver mitochondria and their interaction with endoplasmic reticulum. *Biofactors* 8: 225-228.
- Masini A., Ceccarelli-Stanzani D. & U. Muscatello (1984). An investigation on the effect of oligomycin on state 4 respiration in isolated rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 130-137.
- Matlib M.A., Zhou Z., Knight S., Ahmed S., Choi K.M., Krause-Bauer J., Phillips R., Altschuld R., Katsube Y., Sperelakis N. & D.M. Bers (1998). Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca<sup>2+</sup> uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 10223-10231.

- McCarty M.F. (2004). Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging. *Med. Hypothesis* 63: 334-339.
- McEnery M., Snowman A.M., Trifiletti R.R. & S.H. Snyder (1992). Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 3170-3174.
- Mensink M., Hesselink M.K., Russel A.P., Schaart G., Sels J.P. & P. Schrauwen (2007). Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1 alpha and PPAR beta/delta gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Obes.* 31: 1302-1310.
- Mitchell P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type mechanism. *Nature* 191: 144-145.
- Momken I., Fortin D., Serrurier B., Bigard X., Ventura-Clapier R. & V. Veksler (2002). Endothelial nitric oxide synthase (NOS) deficiency affects energy metabolism pattern in murine oxidative skeletal muscle. *Biochem. J.* 368: 341-347.
- Mootha V.K., Lindfren C.M., Eriksson K.F., Subramanian A., Sihag S., Lehar J., Puigserver P., Carlsson E., Ridderstrale M., Laurila E., Houstis N., Daly M.J., Patterson N., Mesirov J.P., Golub T.R., Tamaro P., Spiegelman B., Lander E.S., Hirschhorn J.N., Altshuler D. & L.C. Groop (2003). PGC-1 alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34: 267-273.
- Muoio D.M. & C.B. Newgard (2006). Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 367-401.
- Muoio D.M. & T.R. Koves (2007). Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 $\alpha$ : implications for metabolic disease. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32: 874-883.
- Muratsugu M., Kamo N., Kurihara K. & Y. Kobatake (1977). Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as a Na indicator of the membrane potential in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* 464: 613-619.
- Murphy M.P. (1989). Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 977: 123-141.



- Nicholls D.J. (1982). Bioenergetics. An introduction to Chemiosmotic Theory. Academic press, New York.
- Nicolson G.L. (2007). Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *Journal of Cellular Biochemistry* 100: 1352-1369.
- Nisoli E., Clementi E., Paolucci C., Cozzi V., Tonello C. Sciorati C., Bracale R., Valerio A., Francolini M., Moncada S. & M.O. Carruba (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299: 896-899.
- Palmeira C.M. & K.B. Wallace (1997). Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143: 338-347.
- Palmeira C.M. (1995). Alterações metabólicas em células hepáticas de rato induzidas por herbicidas de uso generalizado. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Palmeira CM., Ferreira F.M., Santos D.L., Ceiça R., Suzuki K. & M.S. Santos (1999). Higher efficiency of the liver phosphorylative system in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *FEBS Lett.* 458: 103-106.
- Paradies G., Ruggier F.M., petrosillo G. & E. Quagliariello (1998). Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alterations. *FEBS Lett.* 424: 155-158.
- Paschen S.A. & W. Neupert (2001). Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* 52: 101-112.
- Patti M. E., Butte A. J., Crunkhorn S., Cusi K., Berria R., Kashyap S., Miyazaki Y., Kohane i., Costello M., Saccone R., Landaker E. J., Goldfine A. B., Mun E., DeFronzo R., Finlayson J., kahn C. R. & L. J. Mandarino (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potencial role of *PGC1* and *NRF1*. *Proc. Natl. Acad. Sci* 100: 8466-8471.
- Peng W.H., Lo K.L., Lee Y.H., Hung T.H. & Y.C. Lin (2007). Berberine produces antidepressant-like effects in the forced swim test and in tail suspension test in mice. *Life Sci.* 81: 933-938.

- Petersen K.F., Dufour S., Befroy D., Garcia R. & G.I. Shulman (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 350: 664-671.
- Phielix E., Schrauwen-Hinderling V.B., Mensink M., Lenaers E., Meex R., Hoeks J., Kooi M.E., Moonen-Kornips E., Sels J.P., Hesselink M.K. & P. Schrauwen (2008). Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57: 2943-2949.
- Pinkus R., Weiner L.M. & V. Daniel (1996). Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB and glutathione S-transferase gene expression. *J. Biol. Chem.* 271: 13422-13429.
- Poderoso J.J., Carreras M.C., Schopfer F., Iisdero C.L., Riobo N.A., Giulivi C., Boveris A.D., Boveris A. & E. Cadenas (1999). The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 925-935.
- Puigserver P. & B.M. Spiegelman (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews* 24:78-90.
- Puigserver P., Wu Z., Park C. W., Graves R., Wright M. & B. M. Spiegelman (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839.
- Puskin J.S., Gunter T.E., Gunter K.K. & P.R. Russell (1976). Evidence for more than one Ca<sup>2+</sup> transport mechanism in mitochondria. *Biochemistry* 15: 3834-3842.
- Radi R., Turrens J.F., Chang L.Y., Bush K.M., Crap J.D. & B.A. Freeman (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261: 14024-14081.
- Randle P.J., Garland P.B., Hales C.N. & E.A. Newsholme (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789.
- Reznick R.M. & G.I. Shulman (2006). The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J. Physiol.* 574: 33-39.

- Rickwood D., Wilson M.T. & V.M. Darley-Usmar (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. *Mitochondria: a practical approach*. Ricwood D. & Hames B.D., Eds., IRL Press, Oxford, pp 1-16.
- Ritov V.B., Menshikova E.V., He J., Ferrell R.E., Goodpaster B.H. & D.E. Kelley (2005). Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 8-14.
- Roden M., Price T.B., Perseghin G., Petersen K.F., Rothman D.L., Cline G.W. & G.I. Shulman (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.* 98: 2859-2865.
- Rolo A. P. & C. M. Palmeira (2006). Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212: 167-178.
- Sampson M.J., Lovell R.S. & W.J. Craigen (1997). The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J. Biol. Chem.* 271: 18966-18973.
- Scarpulla R.C. (1997). Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29: 109-119.
- Scarpulla R.C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 97: 673-683.
- Schapira A.H. (1999). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim. Biophys. Acta* 1410: 159-167.
- Schatz G. (1995). Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 271: 123-126.
- Schrauwen P. & M.K. Hesselink (2004). Oxidative capacity, lipotoxicity and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 1412-1417.
- Schrauwen P., Schrauwen-Hinderling V., Hoeks J. & M.K. Hesselink (2010). Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 266-271
- Schreiber S.L. & G.R. Crabtree (1992). The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Immunol. Today* 13: 136-142.

- Shah P., Vella A., Basu A., Basu R., Adkins A., Schwenk W. F., Johnson C. M., Nair K. S., Jensen M. D. & R. A. Rizza (2003). Elevated free fatty acids impair glucose metabolism in women. *Diabetes* 52: 38-42.
- Shimizu S., Ide T., Yanagida T. & Y. Tsujimoto (2000). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 275: 12321-12325.
- Shimizu S., Narita M. & Y. Tsujimoto (1999). Bcl.2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487.
- Shulman G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106: 171-176.
- Sies H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91: 31S-38S.
- Simoneau J. A. & D. E. Kelley (1997). Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in MIDDM. *Journal of Applied Physiology* 83: 166-171.
- Skulachev V.P. (1998). Uncoupling: a new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1363: 100-124.
- Sluse F.E., Jarmuszkiewicz W., navet R., Douette P., Mathy G. & C.M. Sluse-Goffart (2006). Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 480-485.
- Sparagna G.C., Gunter K.K. & T.E. Gunter (1994). A system for producing and monitoring in vitro calcium pulses similar to those observed in vivo. *Anal. Biochem.* 219: 96-103.
- Sparagna G.C., Gunter K.K., Sheu S.S. & T.E. Gunter (1995). Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J. Biol. Chem.* 270: 27510-27515.
- Sparks L.M., Xie H., Koza R.A., Mynatt R., hulver M.W., Bray G.A. and smith S.R. (2005). A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54: 1926-1933.
- Stryer L. (1988). *Biochemistry* (3<sup>rd</sup> Edition). W.H. Freeman Company, New York, pp: 529-556.

- Takehige K. & S. Minakami (1979). NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADh-ubiquinone reductase preparation. *Biochem. J.* 180: 129-135.
- Tarrago T., Kichik N., Seguí J. & E. Giralt (2007). The natural product Berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *Chem. Med. Chem.* 2:354-359.
- Toescu E. C. (2007). Brain Aging, models, methods and mechanisms. *Frontiers in Neuroscience*. Taylor and Francis Group, LLC, CRC Press.
- Turner N., Li J.-Y., Gosby A., To S.W.C., Cheng Z., Miyoshi H., Taketo M.M., Cooney G.J., Kraegen E.W., James D.E., Hu L.-H., Li J. & J.-M. Ye (2008). Berberine and its more biologically available derivative, Dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I. A mechanism for the action of Berberine to activate AMP-Activated Kinase and improve insulin action. *Diabetes* 57: 1414-1418.
- Turrens J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17: 3-8.
- Turrens J.F., Alexandre A. & A.L. Lehninger (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237: 408-414.
- Varela A.T., Gomes A.P., Simões A.M., Teodoro J.S., Duarte F.V., Rolo A.P. & C.M. Palmeira (2008). Indirubin-3'-oxime impairs mitochondrial oxidative phosphorylation and prevents mitochondrial permeability transition induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233: 179-185.
- Vieira H.L.A., Haouzi D., El Hamel C., Jacotot E., Belzacq A.S., Brenner C. & G. Kroemer (2000). Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ.* 7: 1146-1154.
- Virbasius J.V. & R.C. Scarpulla (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1309-1313.
- Wallace D.C. (1994). Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. *J. Bioenerg. Biomemb.* 26: 241-250.
- Watt M.J. & A.L. Hevener (2008). Fluxing the mitochondria to insulin resistance. *Cell Metab.* 7: 5-6.

- Wei Y.H. (1998). Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217: 53-63.
- Weitzel J. M., Iwen K. A. H. & H. J. Seitz (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Experimental Physiology* 88.1: 121-128.
- Wenz T. (2009). PGC-1 alpha activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life* 61: 1051-1062.
- Yin J., Hu R., Chen M., Tang J., Li F., Yang Y. & J. Chen (2002). Effects of berberine on glucose metabolism in vitro. *Metabolism* 51: 1439-1443.
- Yin J., Xing H. & J. Ye (2008). Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 57: 712-717.
- Zhang Y., Li X., Zou D., Liu W., Yang J., Zhu N., Wang M., hong J., Wu P., Ren G. & G. Ning (2008). Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine. *J. Clin. Endocrinol. Metabo.* 93: 2559-2565.
- Zhang Y., Marcillat O., Giulivi C., Ernster L. & K.J. Davies (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 265: 16330-16336.
- Zhou L., Yang Y., Wang X., Liu S., Shang W., Yuan G., Li F., Tang J., Chen M. & J. Chen (2007). Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin. *Metabolism* 56: 405-412.
- Zhou X.Q., Zeng X.N., Kong H. & X.L. Sun (2008). Neuroprotective effects of berberine on stroke models in vitro and in vivo. *Neurosciences Letters* 447: 31-36.
- Zhou Y. P. & V. E. Grill (1994). Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J. Clin. Invest.* 93: 870-876.
- Zhu F. & C. Qian (2006). Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interlenkin-1 beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 7: 78.
- Zong H., Ren J.M., Young L.H., Pypaert M., Mu J., birnbaum M.J. & G.I. Shulman (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15983-15987.

Zoratti M. & F. Tombola (2001). Physiology of the permeability transition pore. Mitochondria in pathogenesis. Lemasters, J.J. & Nieminem, A.L. Eds, new York, Kluwer Academic, pp: 125-152.

Zoratti M. & I. Szabò (1995). The mitochondrial permeability transition. Biochim. Biophys. Acta 1241: 130-176.