



FELIPE GUSTAVO RAVAGNANI

**EFEITOS DO CONSUMO AGUDO E CRÔNICO DE  
ETANOL SOBRE AS FUNÇÕES MITOCONDRIAS:  
ESTUDOS EM RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

*CAMPINAS*

*2013*





UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FELIPE GUSTAVO RAVAGNANI

**EFEITOS DO CONSUMO AGUDO E CRÔNICO DE  
ETANOL SOBRE AS FUNÇÕES MITOCONDRIAS:  
ESTUDOS EM RATOS *WISTAR* (*Rattus norvegicus*)**

**Orientador: Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi**

**Co-orientador: Prof. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica. Área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.*

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Felipe Gustavo Ravagnani e orientada pelo Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi.

---

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS**

**2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R195e Ravagnani, Felipe Gustavo, 1984-  
Efeitos do consumo agudo e crônico de etanol sobre as funções mitocondriais : estudos em ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* / Felipe Gustavo Ravagnani. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Anibal Eugenio Vercesi.

Coorientador: Nadja Cristhina de Souza Pinto.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mitocôndrias. 2. Álcool - Metabolismo. 3. Transição de permeabilidade mitocondrial. 4. Cálcio. 5. DNA mitocondrial. I. Vercesi, Anibal Eugenio, 1946-. II. Pinto, Nadja Cristhina de Souza. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effects of short and long-term ethanol consumption on mitochondrial functions : studies in *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*)

**Palavras-chave em inglês:**

Mitochondria

Alcohol - Metabolism

Mitochondrial permeability transition

Calcium

Mitochondrial DNA

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Titulação:** Doutor em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Anibal Eugenio Vercesi [Orientador]

Antonio Galina Filho

José Roberto Meyer Fernandes

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Cecilia Amelia Fazzio Escanhoela

**Data de defesa:** 19-07-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

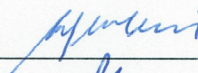
FELIPE GUSTAVO RAVAGNANI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANIBAL EUGENIO VERCESI

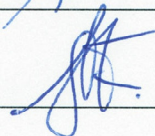
Co-orientador (a) PROF(A). DR(A). NADJA CRISTHINA DE SOUZA PINTO

### MEMBROS:

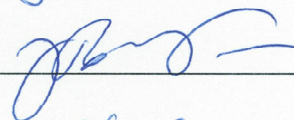
1. PROF(A). DR(A). ANIBAL EUGENIO VERCESI



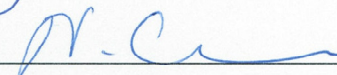
2. PROF(A). DR(A). ANTONIO GALINA FILHO



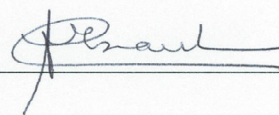
3. PROF(A). DR(A). JOSÉ ROBERTO MEYER FERNANDES



4. PROF(A).DR(A). NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO



5. PROF(A).DR(A). CECILIA AMELIA FAZZIO ESCANHOELA



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 19 de julho de 2013



O presente trabalho foi realizado nos seguintes locais:

- Laboratórios de Bioenergética, Laboratório de Metabolismo Energético em Neurodegeneração e Laboratório *Innovare* de Biomarcadores, todos situados no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): projetos temáticos (06/59786-0 e 11/50400-0), **bolsa de Doutorado Direto (08/54124-4)**, Auxílio Regular à Pesquisa (09/51948-9) e Instituto Nacional de Obesidade e Diabetes (08/57952-5).
- Laboratório de Genética Mitocondrial, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP/SP), sob a orientação da Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Redoxoma (08/57721-3) e projeto temático (10/51906-1).





## *AGRADECIMENTOS*

---

Ao meu orientador, Professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, pela orientação, discussões científicas, valiosos aprendizados e contribuição para meu desenvolvimento pessoal e científico.

À Professora Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto, pela orientação, discussões científicas sempre muito pertinentes, amizade e pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, ampliando meus horizontes pessoais e profissionais.

Ao professor Dr. Roger Frigério Castilho, pela orientação, discussões científicas, delineamentos experimentais e sugestões sempre muito claras e pautadas pelo profissionalismo e dedicação à pesquisa de alta qualidade.

Ao professor Dr. Rodrigo Ramos Catharino, pela amizade, orientação, discussões científicas e auxílio pessoal e profissional em momentos críticos, sempre de modo alegre e sensato.

À professora Dra. Helena C. F. Oliveira, pelas discussões científicas sempre muito pertinentes e proveitosas.

Aos professores membros da banca de qualificação e da banca de defesa, Dra. Carmen Veríssima Ferreira, Dr. Fábio Rogério, Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto, Dr. Antônio Galina Filho, Dr. José Roberto Meyer Fernandes, Dr. Marcelo Nicolás Muscará, Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, Dr. Gabriel Forato Anê e Dra. Silvia Elaine de Sousa Ferreira Carvalho de Melo, pelo aceite em participar da avaliação desse trabalho.

Aos meus pais e avós, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e apoiando minhas escolhas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão de bolsa para o desenvolvimento dessa tese (processo 54124-4/2008).



À Rute A. P. Costa, Daniela R. Melo, Natália M. Inada e Juliana A. Ronchi pela amizade, pelo carinho, compreensão e auxílio em momentos pessoais e profissionais extremamente difíceis.

A Paolo G. La Gardia, Carlos E. Benevento, Luiz Guilherme M. Bueno, Franco A. Rossato, Audrey de Moraes e Ana Carolina Marques pela amizade, discussões científicas, auxílio em momentos críticos e conversas sempre muito agradáveis.

Ao Dr. Tiago Rezende Figueira, pela amizade e discussões científicas sempre muito proveitosas, mesmo com pontos-de-vista divergentes em alguns momentos.

Às professora doutora Luciane Carla Alberici (USP) pela amizade, discussões científicas e momentos sempre alegres e proveitosos.

À professora Dra. Mariana Pinheiro Fernandes (UFPE), pela amizade, companheirismo, dedicação e enormes contribuições dadas ao longo desse Doutorado.

À professora Dra. Ana Catarina Rezende Leite (UFAL) pelo companheirismo e dedicação ao longo de boa parte desse Doutorado.

À Dra. Sonia A. Gurgueira, pela amizade, ensinamentos, conselhos, carinho e compreensão em momentos críticos e delicados.

À Dra. Karina G. Zecchin, pela amizade, carinho e por ser um exemplo pessoal e profissional para mim.

À Edilene de Souza Siqueira Santos, Roberto César Stahl e Elisângela Gomes pela amizade, carinho, auxílio em momentos críticos e no suporte técnico, sem os quais esse Doutorado não teria sido concluído.

À Dra. Márcia M. Fagian pela amizade, conselhos sempre muito pertinentes, ponderados e cheios de carinho e dedicação para o bem estar pessoal e profissional de todos ao seu redor.



À Camille C. Caldeira da Silva pelo auxílio técnico sempre muito profissional e atencioso.

À Adriana M. P. Wendel, pela amizade, pelos conselhos sempre muito coerentes, profissionais e sábios, além do carinho e auxílio sempre presentes em momentos pessoais e profissionais extremamente difíceis.

À Andressa P. Costa, pela amizade, carinho e conversas sempre muito agradáveis e divertidas, além do auxílio técnico sempre disponível e profissional.

A Gustavo Carvalho, Paulo Tonolli, Carolina Parga, Carolina Romagna, Valquíria Santos e Marlene F. Mendes pela amizade, pelas discussões científicas e ideológicas sempre muito pertinentes e, especialmente, pelos momentos únicos e extremamente agradáveis, que ampliaram meus horizontes pessoais e profissionais.

À Dra. Daniela T. Soltys, pela amizade, auxílio e ensinamentos de Biologia Molecular que enriqueceram esse trabalho.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para esse período de estudos e de aprendizado, o meu MUITO OBRIGADO!



*“Tudo que criamos para nós, de que não temos necessidade, se transforma em angústia, em depressão.”*

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*“Eu permito a todos serem como quiserem, e a mim como devo ser.”*

*Francisco de Paula Cândido Xavier (Chico Xavier)*

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”*

*Fernando Pessoa*





	<i>PÁG.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxxiii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxxix</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<i>45</i>
1.1. Metabolismo do etanol .....	<i>49</i>
1.2. Estresse oxidativo e mitocôndrias .....	<i>52</i>
1.3. Transição de permeabilidade mitocondrial e homeostasia de íons Ca <sup>2+</sup> .....	<i>56</i>
1.4. DNA mitocondrial (DNAm <sub>t</sub> ) e álcool .....	<i>61</i>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<i>65</i>
2.1. Objetivo geral .....	<i>67</i>
2.2. Objetivos específicos .....	<i>67</i>
2.2.1. Objetivos com abordagem em bioenergética .....	<i>67</i>
2.2.2. Objetivos com abordagem em biologia molecular (DNAm <sub>t</sub> ) .....	<i>67</i>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<i>69</i>
3.1. Reagentes .....	<i>71</i>
3.2. Animais de experimentação .....	<i>71</i>
3.3. Protocolos de experimentação animal .....	<i>71</i>
3.4. Isolamento de mitocôndrias hepáticas .....	<i>71</i>
3.5. Isolamento de linfócitos esplênicos .....	<i>72</i>
3.6. Determinação de proteínas .....	<i>72</i>
3.7. Meio de reação padrão .....	<i>73</i>
3.8. Medida do consumo de oxigênio .....	<i>73</i>
3.9. Medida da captação e retenção de íons cálcio .....	<i>73</i>
3.10. Medida de inchamento mitocondrial .....	<i>74</i>
3.11. Determinação do estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais .....	<i>74</i>
3.12. Medida da atividade da enzima Citocromo c Oxidase .....	<i>74</i>



3.13. Medida da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) .....	76
3.14. Medida da atividade da enzima Citrato Sintase .....	76
3.15. Estimativa da produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	77
3.16. Estimativa da produção de EROs em linfócitos esplênicos .....	78
3.17. Detecção e quantificação de nucleotídeos de piridina em HPLC .....	78
3.18. Detecção e quantificação de GSH e GSSG em UHPLC.....	79
3.19. <i>Western Blotting</i> para detecção de conteúdo protéico .....	80
3.20. Isolamento de DNA pela técnica de <i>salting out</i> .....	81
3.21. PCR quantitativa em tempo real .....	82
3.22. Análises estatísticas .....	84
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
4.1. <b>Parte A</b> – Efeitos do consumo de etanol sobre a massa corpórea, consumo de líquido e de ração .....	87
4.2. <b>Parte B</b> – Efeito do consumo de etanol sobre as funções bioenergéticas mitocondriais .....	90
4.3. <b>Parte C</b> -Efeito do consumo de etanol sobre a quantidade de DNA mitocondrial .....	114
4.4. <b>Parte D</b> – Efeito do consumo de etanol sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em linfócitos esplênicos.....	118
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>121</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>133</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>137</b>
<b>8. APÊNDICE.....</b>	<b>153</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>159</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AA</b>	Antimicina A
<b>AcAc</b>	Acetoacetato
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ALD</b>	Álcool desidrogenase
<b>ALDH</b>	Aldeído desidrogenase
<b>ALDH2</b>	Aldeído desidrogenase, forma mitocondrial
<b>ANT</b>	Translocador de nucleodídeo de adenina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>β-OH</b>	Beta hidróxi butirato
<b>BSA</b>	Albumina soro bovina
<b>COX1</b>	Subunidade 1 da enzima citocromo c oxidase (codificada pelo DNAm)
<b>COX4</b>	Subunidade 1 da enzima citocromo c oxidase (codificada pelo núcleo)
<b>CT</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>Ctr</b>	Controle
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CTE</b>	Cadeia de transporte de elétrons
<b>CypD</b>	Ciclofilina D
<b>CuZnSOD</b>	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
<b>Δψ</b>	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
<b>DCF</b>	Diclorofluoresceína, forma oxidada
<b>DHA</b>	Doença hepática alcohólica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNAm</b>	Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
<b>DPI</b>	<i>Diphenyleneiodonium</i>
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetra acético
<b>EGTA</b>	Ácido etileno glicol tetracético
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>EtOH</b>	Etanol



<b>FCCP</b>	Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase
<b>GR</b>	Glutathione reductase
<b>GSH</b>	Glutathione, reduced form
<b>GSSG</b>	Glutathione, oxidized form
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	Diacetate of dichlorofluorescein
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hydrogen peroxide
<b>HEPES</b>	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>Isoc</b>	Isocitrate
<b>MFR</b>	Mitochondria of rat liver
<b>MnSOD</b>	Manganese superoxide dismutase
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form
<b>NADH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
<b>NADK</b>	NAD <sup>+</sup> kinase
<b>Nampt</b>	Nicotinamide poly(ribose) phosphate transferase
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Sodium azide
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Superoxide anion radical
<b>OH<sup>-</sup></b>	Hydroxide anion
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hydroxyl radical
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PTP</b>	Permeability transition pore
<b>PDH</b>	Pyruvate dehydrogenase
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase
<b>Tert-BOOH</b>	Tert-butyl hydroperoxide
<b>TMPD</b>	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine





<b>TNB</b>	Ácido tionitrobenzóico
<b>TPM</b>	Transição de permeabilidade mitocondrial
<b>Ubiq</b>	Ubiquinol
<b>UHPLC</b>	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>VDAC</b>	Canal aniônico voltagem dependente



**LISTA DE TABELAS**

---

	<b>PÁG.</b>
<b>TABELA 1-</b> Procedimentos utilizados na PCR quantitativa em tempo real .....	83
<b>TABELA 2-</b> <i>Primers</i> utilizados para amplificação de gene mitocondrial (COX1) e nuclear (GAPDH) .....	84
<b>TABELA 3</b> – Compostos mais abundantes encontrados no etanol utilizado nessa tese após análises em espectrometria de massas .....	157



## LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS

---

	<i>PÁG.</i>
<b>ESQUEMA 1</b> – Principais vias oxidativas do metabolismo do etanol .....	51
<b>ESQUEMA 2</b> – Redução sequencial do oxigênio molecular à água em quatro passos de redução monoelétrica .....	53
<b>ESQUEMA 3</b> – Cadeia de transporte de elétrons (CTE), fosforilação oxidativa e sistemas de detoxificação de EROs em mitocôndrias.....	60
<b>FIGURA 1</b> - Massa corpórea dos animais .....	88
<b>FIGURA 2</b> - Consumo de líquido .....	89
<b>FIGURA 3</b> - Consumo de ração.....	89
<b>FIGURA 4</b> - Consumo de oxigênio mitocondrial e controle respiratório.....	92
<b>FIGURA 5</b> - Atividade enzimática de citocromo c oxidase .....	93
<b>FIGURA 6</b> – <i>Western Blotting</i> para o conteúdo protéico de COX4 .....	94
<b>FIGURA 7</b> - Captação e retenção de cálcio em mitocôndrias hepáticas .....	95
<b>FIGURA 8</b> - Cálcio acumulado em mitocôndrias hepáticas.....	96
<b>FIGURA 9</b> - Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) .....	98
<b>FIGURA 10</b> - Efeito da oxidação de nucleotídeos de piridina na suscetibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial .....	100
<b>FIGURA 11</b> - Oxidação de nucleotídeos de piridina.....	103
<b>FIGURA 12</b> – Efeito do estado redox de nucleotídeos de piridina na retenção de cálcio .....	105
<b>FIGURA 13</b> - Quantificação de nucleotídeos de piridina por HPLC .....	107
<b>FIGURA 14</b> - <i>Western Blotting</i> para o conteúdo protéico de Nampt.....	108
<b>FIGURA 15</b> - Produção de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias hepáticas.....	110



<b>FIGURA 16</b> - Atividade enzimática de glutathiona peroxidase (GPx) .....	111
<b>FIGURA 17</b> - Quantificação de GSH e GSSG em UHPLC .....	112
<b>FIGURA 18</b> - Atividade enzimática de citrato sintase .....	113
<b>FIGURA 19</b> - Razão normalizada de DNA mitocondrial/DNA nuclear .....	115
<b>FIGURA 20</b> - Razão normalizada DNA /atividade de citrato sintase .....	116
<b>FIGURA 21</b> - Mecanismo proposto para dano ao DNAm .....	117
<b>FIGURA 22</b> - Oxidação de H <sub>2</sub> -DCFDA em linfócitos esplênicos.....	119
<b>FIGURA 23</b> - Produção de radical ânion superóxido em linfócitos esplênicos .....	120
<b>FIGURA 24</b> - Espectro de massas do álcool etílico utilizado na tese.....	157





*Resumo*



O número de indivíduos que sofrem com patologias associadas ao consumo abusivo de etanol tem aumentado significativamente no último século. Como consequência desse fato, os custos associados ao tratamento do alcoolismo, bem como das doenças associadas a ele também têm aumentado, onerando o sistema de saúde e se tornando um problema de saúde pública de grande relevância atualmente. Os mecanismos moleculares que desencadeiam muitas dessas doenças não estão completamente esclarecidos. O tecido hepático é o mais afetado pelo etanol e as mitocôndrias têm sido apontadas como alvos cruciais na toxicidade hepática induzida pelo álcool. Logo, o objetivo desse trabalho foi investigar como o consumo de etanol afeta o estado redox e o metabolismo mitocondriais no fígado. Ratos *Wistar* machos adultos jovens e de meia-idade receberam *ad libitum* solução alcoólica 25% (v/v) como única fonte de líquido. Os grupos controle receberam somente água. Ambos os grupos receberam ração *ad libitum*. Mitocôndrias hepáticas foram isoladas usando técnicas padrão. O consumo de ração e de líquidos foi significativamente menor em animais que ingeriram álcool, resultando em menor ganho de massa corpórea nos protocolos utilizados. As mitocôndrias dos animais que consumiram etanol apresentaram menores níveis de respiração em condição basal e quando energizadas com substratos respiratórios. A atividade e os níveis protéicos de citocromo c oxidase foram menores nos grupos tratados com etanol. Independente da duração do período de tratamento, mitocôndrias hepáticas de animais que ingeriram álcool foram menos susceptíveis à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por cálcio, quando comparadas às mitocôndrias dos animais do grupo controle. Esse efeito foi revertido pela adição de oxidantes de nucleotídeos de piridina (acetoacetato, diamida ou tert butil-hidroperóxido) ou em mitocôndrias desacopladas. Também houve aumento em nucleotídeos de piridina na forma reduzida e aumento na razão  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  em mitôndrias hepáticas de ratos consumidores de etanol. Em concordância a esses dados, houve aumento na capacidade de retenção de cálcio, processo que é dependente do estado redox intramitocondrial. Por outro lado, não houve diferença na produção de espécies reativas de oxigênio entre os grupos controle e tratados com álcool. A atividade de glutathione peroxidase e as quantidades de GSH e de GSSG também não sofreram alterações. Entretanto, houve redução nos níveis de DNA mitocondrial nos tratamentos agudos, porém com tendência para retornar aos níveis



normais nos tratamentos crônicos, indicando uma resposta adaptativa à injúria induzida pelo etanol. Em conjunto, nossos resultados indicam que o consumo de etanol modula o estado redox mitocondrial e de sistemas antioxidantes, prevenindo a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A presença desse xenobiótico no fígado também altera significativamente os níveis de NADP reduzido, agente redutor final para o sistema glutathione redutase/peroxidase que detoxifica  $H_2O_2$  na matriz mitocondrial. Além disso, a resposta adaptativa ao álcool observada no DNA mitocondrial pode contribuir para compreender melhor os mecanismos envolvidos no reparo de lesões a biomoléculas e os estágios iniciais de adaptação a esse xenobiótico, etapas que precedem a morte celular, hepatite alcoólica ou carcinogênese em tecido hepático exposto cronicamente ao etanol.



*Abstract*





The number of people suffering from alcoholism has increased significantly over the last century. As a result, costs associated with treating the addiction itself as well as the associated pathologies have also increased, such that this is considered as public health issue. Furthermore, the molecular events leading to several of these diseases are not yet clearly understood. Hepatic tissue is the most affected by alcohol, and mitochondria have been suggested to be a crucial target in alcohol-induced liver toxicity. Thus, the aim of our study was to investigate how ethanol consumption affects the redox state and mitochondrial metabolism in the liver. Young adult and middle-aged male *Wistar* rats were given a 25 % (v/v) ethanol solution as the only source of drinking water. Control groups received water only. Liver mitochondria were isolated using standard techniques. Food and water intake was significantly lower in alcohol-drinking rats, resulting in lower weight gain during the treatment regimes. Mitochondria from the alcohol-drinking group had lower respiration under levels in basal condition, when energized by substrates feeding electrons into complexes I and IV. Cytochrome c oxidase activity and protein levels were lower in the alcohol group as well. Additionally, regardless of the length of the treatment, liver mitochondria from the alcohol-treated animals were more resistant to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition (MPT), when compared to mitochondria from control animals. This effect was abrogated by oxidizing agents of pyridine nucleotides (acetoacetate, diamide or tert butylhydroperoxide) or in uncoupled mitochondria. We also found that liver mitochondria from the alcohol-drinking rats had a more reduced pyridine nucleotide pool and higher NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> ratios. In addition, Nampt (an enzyme of the NAD<sup>+</sup> synthetic pathway) protein levels did not differ after alcohol consumption. Accordingly, the calcium retention capacity of the isolated mitochondria, which is dependent upon intramitochondrial redox state, was higher in the alcohol group. On the other hand, levels of reactive oxygen species showed no differences between the control and alcohol groups, both in mitochondria and in splenic lymphocytes. Glutathione peroxidase activity and the amounts of GSH and GSSG were also not changed. However, mitochondrial DNA levels were decreased in the short term treatments, but tended to go back up to normal levels in the chronic treatments, indicating an adaptative response to ethanol-induced injury. Together, our results indicate that ethanol consumption modulates



the mitochondrial redox state and the antioxidant systems, protecting against  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial pore transition permeability opening. The presence of this xenobiotic can significantly change the levels of reduced NADP, the ultimate reducing agent in the glutathione reductase/peroxidase system that detoxifies  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the mitochondrial matrix. In addition, the adaptative response to ethanol, seen in mitochondrial DNA, may contribute to further understand the mechanisms related to lesions in biomolecules and the initial steps that precede cell death, alcoholic hepatitis or carcinogenic process in hepatic tissue exposed chronically to ethanol.



## *1. Introdução*



A doença alcoólica hepática (DAH), ou seja, a hepatopatia induzida pelo etanol e/ou seus metabólitos, apresenta alta incidência em quase todos os países, inclusive no Brasil, afetando adultos, crianças e o próprio feto. O dano hepático relacionado ao consumo de etanol foi reconhecido pelos antigos egípcios e chineses, embora a primeira descrição mais detalhada de cirrose alcoólica seja atribuída a John Brown, um cirurgião de Norfolk, em 1685 (Mincis, 2001).

O consumo e o abuso de bebidas alcoólicas, bem como o alcoolismo gera um ônus à sociedade, tal como ocorre nos EUA, onde os custos econômicos atribuídos ao abuso do álcool e ao alcoolismo são estimados em US\$ 148 bilhões/ano, dos quais aproximadamente US\$ 18 bilhões/ano são gastos nos serviços de assistência e cuidados à saúde dos alcoólatras (Lang et al., 2001).

No Brasil, o consumo e a dependência de etanol têm aumentado significativamente (Galduroz e Caetano, 2004), gerando um ônus de milhões de reais. Segundo dados do DATASUS de 2003, o governo brasileiro gastou cerca de R\$ 82 milhões por ano com o tratamento de problemas relacionados ao uso de drogas, dos quais R\$ 70 milhões dizem respeito apenas ao álcool. No entanto, sabe-se que esse valor é apenas parte do custo ao sistema de saúde relacionado ao uso de álcool. Outros cálculos apontam para um encargo anual situado em torno de R\$ 180 milhões (Teixeira, 2004).

Em estudo realizado no Rio Grande do Sul, pesquisadores apontaram que os grupos que apresentam maior consumo abusivo de álcool são: homens, idosos, indivíduos afro-descendentes ou pardos, de nível social mais baixo, fumantes com consumo pesado de cigarros e que apresentam alguma doença crônica (Costa et al., 2004). Além disso, o consumo elevado de álcool acarreta inúmeras conseqüências negativas para a saúde e a qualidade de vida dos indivíduos (Costa et al., 2004), estando relacionado intimamente com taxas de violência e com as de acidentes de trânsito, afinal, o álcool é a substância mais barata, mais acessível e com o maior uso abusivo (Rouquayrol e Filho, 1999).

Há vários tipos de neoplasias associadas ao consumo crônico de álcool tais como as que se originam na cavidade oral, na faringe, na laringe, no esôfago, no fígado, na região colorretal, na mama e no pâncreas, sendo que 25 a 80% dessas neoplasias têm o álcool

como fator de risco bem definido (Brown, 2005; Bofetta, 2005; Bofetta e Hashibe, 2006). O consumo desse xenobiótico é a principal causa de diversos tipos de injúria e durante a gravidez está associado com vários efeitos adversos incluindo síndrome alcoólica fetal, aborto espontâneo, baixo peso ao nascimento, nascimento prematuro e retardo no crescimento intra-uterino (Bofetta e Hashibe, 2006).

Em consumidores crônicos de etanol as primeiras alterações no fígado que afetam sua função normal ocorrem nas mitocôndrias. As mudanças incluem alterações ultra-estruturais e redução na fosforilação oxidativa. Tais mudanças são importantes devido ao papel central que a mitocôndria desempenha no estado energético hepático. Estudos têm apontado para o fato de que a depressão na função mitocondrial causada pelo álcool pode ser mediada, pelo menos em parte, pelo aumento do dano oxidativo às proteínas mitocondriais, lipídeos e DNA (Cahill et al., 2002). Ocorre aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e redução nos sistemas antioxidantes, sendo o fígado o principal alvo dessas perturbações por ser o principal órgão metabolizador de álcool (Hoek et al., 2002).

Dentre as alterações mitocondriais ocasionadas pelo álcool estão: decréscimo na respiração mitocondrial, na síntese de adenosina trifosfato (ATP), no estado energético, depleção antioxidante, redução no transporte de glutatona, anormalidades estruturais, modificação oxidativa do DNA mitocondrial, disfunção mitocondrial e injúria celular. Todas essas alterações podem promover tanto apoptose quanto morte celular por necrose, contribuindo para o desenvolvimento da doença alcoólica hepática (DHA) (Das e Vasudevan, 2007).

A compreensão de como a bioenergética mitocondrial é afetada pelo consumo de etanol permite que sejam melhor compreendidos os mecanismos associados com o dano hepático, bem como a outros órgãos (Hoek et al., 2002).



## 1.1. Metabolismo do etanol

Os fatores de risco para a DAH são: quantidade de álcool ingerido, duração (tempo) de ingestão, continuidade do uso, gênero (masculino ou feminino), desnutrição, substâncias hepatotóxicas em bebidas alcoólicas, outras condições patológicas (obesidade, deposição de ferro), hepatites virais B e C e predisposição genética (Mincis,1994,1995, apud Mincis, 2001).

Segundo Lieber (1997, p.60):

“O álcool permeia todos os tecidos do corpo e afeta a maioria das funções vitais já que é uma molécula solúvel tanto em água como em lipídeos (Lieber,1992). O fígado é o órgão mais severamente afetado pelo alcoolismo. Em algumas áreas urbanas, a cirrose (uma complicação comum do alcoolismo) é a quarta causa mais freqüente de morte entre pessoas na faixa de 25 a 64 anos (Bureau of Health Statistics and Analysis,1986). [...]

Primeiro acreditava-se que a patogênese dessa desordem [a cirrose] era exclusivamente nutricional. Contudo, ao contrário de outras drogas, o etanol é uma substância fonte de energia, com 7,1 kcal (29,7 kJ) por grama, um valor que excede a energia contida em carboidratos ou proteínas”.

Além disso, o álcool promove a degradação de nutrientes, como exemplificado pelos efeitos sobre a vitamina A e ácido fólico (Lieber, 1992, apud Lieber,1997).

Somente 2 a 10 % do etanol absorvido é eliminado através dos rins e pulmões (Guz, 2001; Lieber, 1997); o restante é oxidado no corpo, principalmente no fígado. Exceto no estômago, o metabolismo extra-hepático do etanol é pequeno. Essa relativa especificidade orgânica, somada ao alto conteúdo energético do etanol e à perda do controle de *feedback* efetivo da taxa de metabolismo hepático, pode resultar em uma diminuição de até 90% do metabolismo natural de substratos e provavelmente explica por que o etanol produz desequilíbrio no catabolismo hepático (Lieber, 1997).

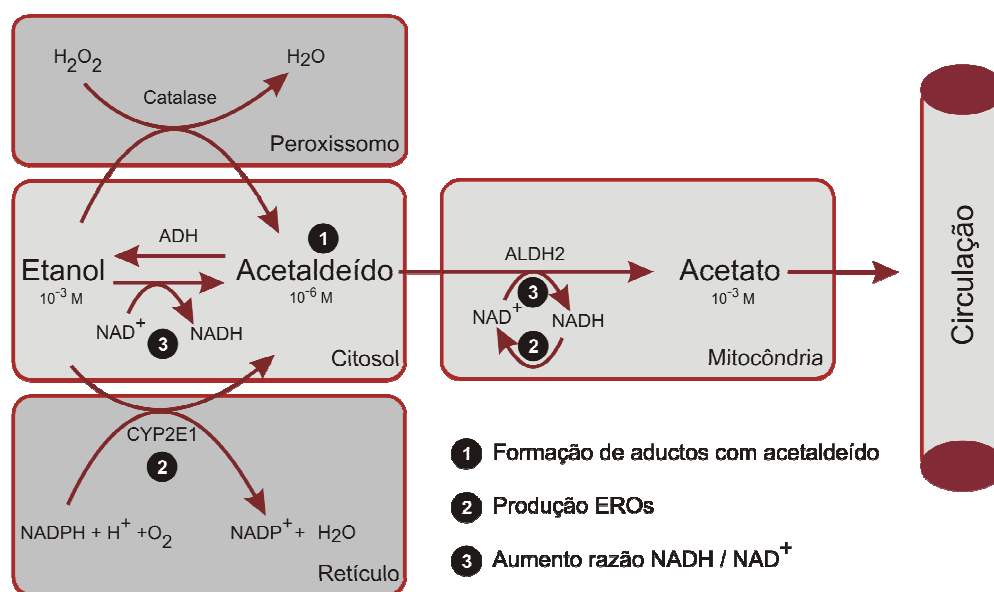
Os hepatócitos contêm três vias metabólicas para o etanol, cada uma localizada em diferentes compartimentos celulares: (1) a via da enzima álcool desidrogenase (ADH) do citoplasma ou das frações solúveis da célula, (2) o sistema microsomal de oxidação,

localizado no retículo endoplasmático liso, e (3) a catalase, localizada nos peroxissomos (Lieber,1991, apud Lieber,1997). Cada uma das vias produz um metabólito específico e um distúrbio tóxico e todas as três vias resultam na produção de acetaldeído, metabólito altamente tóxico (Lieber,1997).

No fígado, independente da via metabólica, o etanol é oxidado enzimaticamente em aldeído acético (acetaldeído) e depois em acetato. O acetato é lançado na circulação sanguínea sendo rapidamente biotransformado nos tecidos extra-hepáticos em dióxido de carbono e água (Guz, 2001).

A principal via de biotransformação do etanol envolve a enzima álcool desidrogenase (ADH), uma das enzimas que oxida etanol a acetaldeído (Rang et al., 2001; Masters, 2003). Ela é uma enzima citoplasmática solúvel, que oxida o etanol, ao mesmo tempo em que reduz  $\text{NAD}^+$  a NADH (Rang et al., 2001). A subsequente oxidação do acetaldeído a acetato é catalisada pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH). Durante a conversão do etanol em acetaldeído, ocorre transferência de elétrons do álcool para o co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo,  $\text{NAD}^+$ , formando NADH. Como resultado final, a oxidação do álcool produz um excesso de equivalentes redutores no fígado, principalmente na forma de NADH. A produção excessiva de NADH parece estar ligada aos distúrbios metabólicos que acompanham o alcoolismo crônico (Masters, 2003). A eficiência desses processos de oxidação é determinada pelas famílias de genes da ADH e da ALDH. Diferenças individuais na exposição ao acetaldeído são resultado de variações gênicas funcionais (Bofetta e Hashibe, 2006). O polimorfismo gênico que existe para essas enzimas metabolizadoras de etanol influencia também no consumo de etanol e na predisposição a certos tipos de neoplasias induzidas pelo álcool (Bofetta e Hashibe, 2006).

Nos peroxissomos o etanol é oxidado pela ação da catalase, enzima responsável pela quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. No metabolismo do etanol, a catalase atua como uma desidrogenase, retirando  $\text{H}_2$  da molécula de etanol e unindo-o à molécula de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que após ser metabolizado pela catalase gera duas moléculas de água para cada molécula de etanol oxidada (Caballería, 2003) (**ver Esquema 1**).



**Esquema 1. Principais vias oxidativas do metabolismo do etanol.** As enzimas álcool desidrogenase (ADH), catalase e complexo P450 2E1 (CYP2E1) contribuem para o metabolismo oxidativo do etanol. ADH, presente no citosol, converte etanol a acetaldeído. A reação envolve NAD<sup>+</sup> como aceptor de elétrons, que é reduzido a por dois elétrons a NADH. Catalase, localizada em peroxissomos, requer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidação o álcool. CYP2E1, presente no retículo endoplasmático liso, tem papel importante na metabolização de grandes quantidades de etanol. Aldeído é metabolizado principalmente pela aldeído desidrogenase 2 (ALDH 2). EROs, espécies reativas de oxigênio (Adaptado de Zakhari, 2006).

Em situações de injúria prolongada, como a causada pelo consumo crônico de álcool etílico, a resposta inicial do organismo é a mobilização dos estoques de glicogênio hepático e muscular. Após a rápida exaustão do glicogênio, nova glicose é formada a partir de precursores neoglicogênicos, principalmente advindos de proteínas do músculo esquelético (Hill e Hill, 1998). Músculo e fígado interagem essencialmente no metabolismo de aminoácidos e açúcares e essa interação é dinâmica em condições de catabolismo (Argilés, 2001).

## 1.2. Estresse oxidativo e mitocôndrias

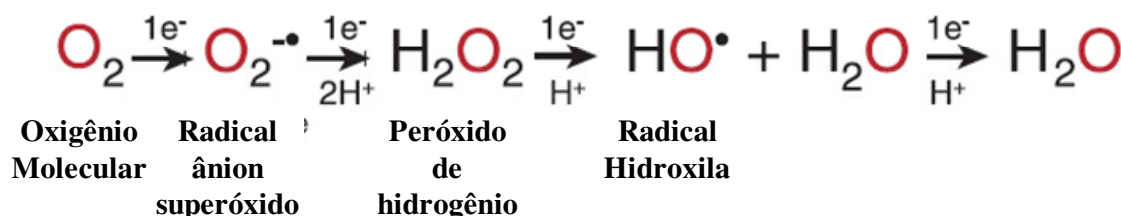
Os efeitos diretos do oxigênio sobre os organismos aeróbios variam consideravelmente com o tipo de organismo, com seu estado fisiológico e com a dieta. Logo, tecidos distintos de um mesmo animal também são afetados de maneira distinta.

Considera-se radical livre qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desapareados (Bianchi e Antunes, 1999; Llesuy, 2002) ou, segundo Ferreira e Matsubara (1997), que contenha um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. A presença de elétrons desapareados na última camada eletrônica confere a essas espécies, na maior parte dos casos, grande reatividade e uma meia-vida curta (Ferreira e Matsubara, 1997; Llesuy, 2002), variando de nano a microssegundos (Simm e Brömme, 2005). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio de formação (Bianchi e Antunes, 1999).

Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar as espécies reativas de oxigênio, pois algumas delas não apresentam elétrons desapareados em sua última camada elétrons. Como, em sua maioria, são derivados do metabolismo de oxigênio ( $O_2$ ), no decorrer desse texto utilizaremos o termo espécies reativas de oxigênio (EROs).

EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com o recebimento de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperóxido ( $HO_2^{\bullet}$ ) e ânion ou radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$  ou  $HO^-$ ). Normalmente, a redução completa do  $O_2$  ocorre nas mitocôndrias e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada de quatro elétrons. O  $H_2O_2$  não é considerado um radical livre, pois não possui elétrons desapareados na sua última camada eletrônica, embora seja um metabólito extremamente deletério porque participa da reação que produz o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (Ferreira e Matsubara, 1997), bem

como é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (Bianchi e Antunes, 1999).



**Esquema 2. Redução sequencial do oxigênio molecular à água em quatro passos de redução monoelétrica.** A adição de um elétron ao oxigênio produz o radical ânion superóxido. Se o superóxido é reduzido por outro elétron, então, peróxido de hidrogênio é produzido. O peróxido de hidrogênio pode aceitar outro elétron e esse passo ocorre naturalmente como resultado da transferência de elétrons na presença de metal bivalente, em reações do tipo Fenton (normalmente com cobre ou ferro). Quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aceita o elétron doado, ele é convertido ao radical hidroxila (HO<sup>•</sup>) e ânion hidroxila (HO<sup>-</sup>) que, quando combinados com hidrogênio, produzem água (Adaptado de Koop, 2004).

A vida em aerobiose se caracteriza pela contínua produção de EROS, sendo contrabalanceada pelo consumo de defesas antioxidantes não-enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Dessa maneira, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém em equilíbrio. Quando esse balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo se encontra sob “estresse oxidativo”, com potenciais danos (Belló-Klein, 2002).

Além de terem papel no controle de diversas funções fisiológicas como controle do tônus vascular, sinalização intracelular e resposta imune fagocitária (Dröge, 2001; Belló-Klein, 2002; Splettstoesser e Schuff-Werner, 2002), as EROs têm papel no desenvolvimento de várias doenças, tais como aterosclerose, diabetes, infecção por HPV, injúria de isquemia-reperfusão, doença de Parkinson, artrite reumatóide, catarata, enfisema, dentre outras (Belló-Klein, 2002) e também no alcoolismo (Wu e Cederbaum, 2003). Em todas elas, a injúria inicial (isquemia, trauma, toxinas, radiação, infecção, etc) determina alterações intracelulares, como recrutamento de macrófagos, dano mitocondrial, alterações nas defesas antioxidantes e aumento do cálcio intracelular. Essas alterações geram estresse

oxidativo, levando o organismo a três possibilidades: 1) adaptação, por aumento na atividade dos sistemas antioxidantes, que pode gerar proteção da célula contra danos oxidativos futuros; 2) dano tecidual por lesão a lipídeos, carboidratos e proteínas; 3) morte celular, seja por necrose ou apoptose (Belló-Klein, 2002).

Um importante sítio de produção de EROs é a mitocôndria (para revisão, ver Figueira et al., 2013). O papel primário dessa organela celular é a produção de ATP através da fosforilação oxidativa e do consumo de oxigênio. As mitocôndrias possuem duas membranas compostas por uma bicamada lipoprotéica: uma externa e uma interna, sendo que a membrana interna é composta por uma superfície maior, impermeável a quase todas as moléculas e contém as enzimas responsáveis pela fosforilação oxidativa. Para a formação do ATP mitocondrial, ocorre passagem de elétrons, derivados predominantemente de intermediários do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (também chamado de Ciclo do Ácido Cítrico ou Ciclo de Krebs), por um complexo multienzimático denominado cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Fariss et al., 2005).

Acoplados à passagem de elétrons, prótons são bombeados através dos complexos I (NADH desidrogenase), III (complexo citocromo bc1) e IV (citocromo c oxidase) para o espaço intermembranas, criando um potencial eletroquímico. Esse potencial é a força protomotora ( $\Delta p$ ), composta de um gradiente de pH ( $\Delta pH$ ) e de um potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta \psi$ ), que impulsiona a enzima ATP sintase a fosforilar o ADP, gerando ATP, quando do retorno dos prótons à matriz mitocondrial, sendo o ATP exportado para o citoplasma através de um translocador de nucleotídeos de adenina, também conhecido por translocador ATP/ADP. Como acceptor final dos elétrons da CTE está o oxigênio ( $O_2$ ), sendo esse reduzido e dando origem à molécula de água. Durante a transferência de elétrons através da CTE, um elétron pode sofrer desvio e resultar em uma redução eletrônica simples do oxigênio molecular, levando à formação do radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), que pode levar à formação de  $H_2O_2$ , o qual, na presença do íon ferroso ou de outros metais bivalentes, através de reação de Fenton ou do tipo Fenton, pode resultar em radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) altamente reativos (Halliwell e Gutteridge, 1997). O  $H_2O_2$  é uma espécie química permeável através de membranas e mais estável, podendo ser removida por diferentes enzimas com atividade de peroxidase. Estima-se, embora haja controvérsias

sobre o valor, que cerca de 1% de todo o oxigênio consumido resulta na formação de EROs (Harper et al., 2004; Fariss et al., 2005; O'Rourke, 2005; Figueira et al., 2013). Uma vez que a capacidade antioxidante mitocondrial seja sobrecarregada pela presença de EROs, dano oxidativo e morte celular podem ocorrer (Fariss et al., 2005; O'Rourke, 2005).

O  $H_2O_2$  é formado na mitocôndria a partir do superóxido (Boveris e Chance, 1973; Chance et al., 1979), através da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (Fridovich, 1978), cuja isoforma mitocondrial é uma metaloenzima ligada a manganês (MnSOD), enquanto que sua isoforma citoplasmática é dependente de cobre e zinco (CuZnSOD) (Fridovich, 1978).

Outra enzima responsável pela detoxificação de  $H_2O_2$  é a glutathione peroxidase (GPx), primeira enzima antioxidante mitocondrial caracterizada (Flohe et al., 1973; Green e O'Brien, 1970). A remoção mitocondrial de  $H_2O_2$  pode também ser realizada pela catalase (descrita até o presente momento em mitocôndrias de coração e fígado; Radi et al., 1991; Salvi et al., 2007) e tioredoxina peroxidase (TPx) (Rhee et al., 1994). Todas essas enzimas evitam o acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$  e de  $H_2O_2$  e a consequente produção do  $OH^{\bullet}$ , contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa. Em situações de estresse oxidativo aumentado, pode ocorrer a formação de  $OH^{\bullet}$ , levando à oxidação de componentes mitocondriais como lipídeos e tióis de membranas (Kowaltowski et al., 2001). O aumento de espécies reativas de oxigênio pode levar à agregação de proteínas e/ou fragmentação de cadeias polipeptídicas (Stadtman, 1990).

Estima-se que em hepatócitos, apesar da grande capacidade antioxidante na neutralização das EROs, aproximadamente  $10^4$  radicais hidroxila são formados por segundo, por célula (Simm e Brömme, 2005).

Tanto a exposição aguda quanto a crônica de etanol podem aumentar a produção de EROs, bem como a peroxidação de lipídeos, proteínas e DNA, como têm sido demonstrado em grande variedade de sistemas, células e espécies, incluindo humanos (Wu e Cederbaum, 2003).

Muitos processos e fatores estão envolvidos no estresse oxidativo induzido pelo álcool, incluindo: (a) mudanças na razão  $NAD^+/NADH$  em células, como resultado do

metabolismo do etanol, que através da ação das enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, leva à formação de uma molécula de NADH a cada passo da metabolização, fornecendo substrato para um aumento na atividade da CTE, aumentando o consumo de O<sub>2</sub> e a formação de EROs; (b) Dano à mitocôndria resultando em decréscimo na produção de ATP; (c) Deficiência de oxigênio induzida pelo álcool em tecidos, especialmente em certas regiões do fígado (regiões centrolobulares); (d) Aumento nos níveis de ferro livre induzido pelo álcool, o qual pode promover a geração de EROs; (e) Aumento na atividade de xantina oxidase, podendo gerar EROs; dentre outros fatores (Wu e Cederbaum, 2003).

Os hepatócitos têm um aumento na produção de EROs em resposta ao etanol, levando à ativação de cascatas de sinalização, desencadeando o processo de fibrose hepática e podendo ter toxicidade direta em hepatócitos, particularmente pela formação de peroxinitrito e radical  $\alpha$ -hidróxi-etil (Bedard e Krause, 2007).

### **1.3. Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) e homeostasia de íons cálcio**

Nos últimos anos, o papel da mitocôndria nos processos apoptóticos e necróticos tem recebido grande atenção (para revisão ver Figueira et al., 2013). Um aumento na transição de permeabilidade mitocondrial é um dos eventos-chaves no processo de morte celular (Crompton et al., 2000; Kowaltowski et al., 2001). A TPM é um evento dependente do aumento de Ca<sup>+2</sup> mitocondrial, que leva à perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), inchamento mitocondrial e ruptura da membrana externa das mitocôndrias, ocorrendo após a abertura de um canal conhecido como poro de transição de permeabilidade (PTP), cuja composição ainda é controversa na literatura. Tem sido sugerida a participação de proteínas da matriz e de proteínas da membrana interna e externa mitocondriais na composição do poro de transição. Os componentes mais citados são os canais de ânions voltagem-dependentes (VDACs), o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), ciclofilina D (Cyp D), dentre outras moléculas (Tsujimoto e Shimizu, 2007; Lemasters et al., 2009). Trabalho recente do próprio laboratório (Ronchi et al., 2011)



demonstrou, em mitoplastos, organelas semelhantes às mitocôndrias, porém com ausência da membrana externa, que nem todas essas proteínas são componentes essenciais do poro de transição.

Em 1976, Hunter e colaboradores trataram mitocôndrias isoladas com  $\text{Ca}^{2+}$  e propuseram que o acúmulo mitocondrial deste cátion resultava na permeabilização da organela devido à formação de um poro na membrana interna. Devido ao fato desse processo ser parcialmente revertido através da remoção do  $\text{Ca}^{2+}$ , esse fenômeno foi denominado transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (Hunter e Haworth, 1979). Segundo esses trabalhos, o cálcio induz alterações na homeostasia mitocondrial, induzindo o desacoplamento da fosforilação oxidativa, com associação ao inchamento da organela.

Posteriormente, demonstrou-se que quantidades excessivas de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias isoladas induziam uma permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna, mediada por estresse oxidativo e acúmulo de excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial (Kowaltowski et al., 2001)

Alterações em grupos de proteínas da membrana mitocondrial interna levariam à formação do PTP mitocondrial, com a formação de agregados devido a alterações estruturais (He e Lemasters, 2002). O aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e produção de EROs induziriam a oxidação de resíduos de cisteína e permitiriam a formação de ligações cruzadas S-S (Fagian et al., 1990; Castilho et al., 1996), levando à uma permeabilização não-específica da membrana mitocondrial interna (Vercesi et al., 1997; Kowaltowski et al., 2001).

Alterações no transporte de íons podem ocorrer devido a modificações em lipídeos e proteínas de membranas, com aumento nos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dawson e Dawson, 1996). A distribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é controlada por processos de transporte desse cátion através da membrana plasmática e de membranas de várias organelas ou regiões celulares, como o retículo endoplasmático liso, o núcleo e a mitocôndria (Carafoli, 1987; Gunter e Gunter, 1994). Em 2010, Perocchi e colaboradores mostraram a primeira evidência do gene que codifica o transportador de cálcio mitocondrial (MICU1, de

*mitochondrial calcium uptake 1*), através de experimentos com RNA de interferência para os RNAs mensageiros de 13 genes candidatos que são conservados em eucariotos e cinetoplastídeos, porém ausentes em *S. cerevisiae*. Para estudo, foram empregados dados prévios de fisiologia comparativa, genômica evolucionária e proteômica de organelas (Perocchi et al., 2010; Collins e Meyer, 2010). Em eucariotos, as concentrações extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  oscilam em torno de 1 a 2 mM e as concentrações intracelulares em torno de 50 a 100 nM (Carafoli, 1987).

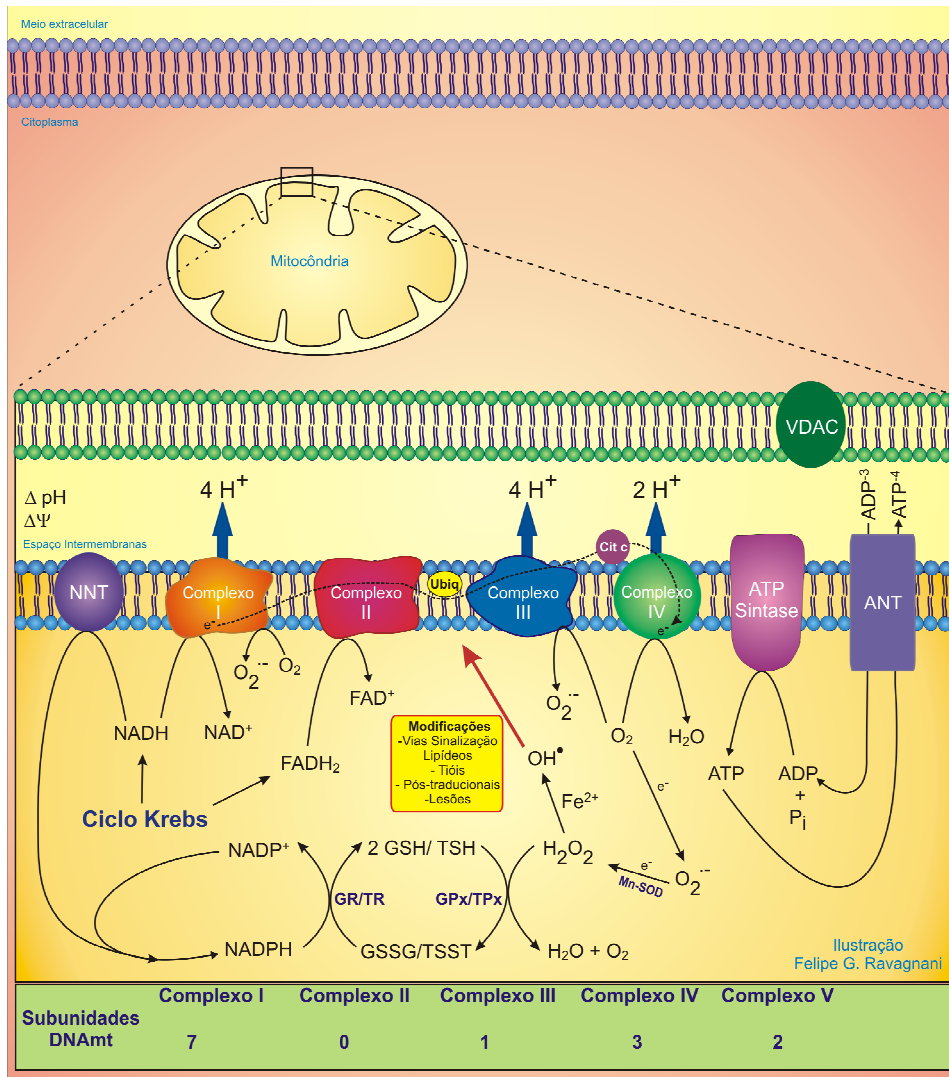
Outro fator que pode modular a suscetibilidade à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial é o estado redox de nucleotídeos de piridina. A primeira evidência desse fenômeno foi descrita por Lehninger e colaboradores (1978), que demonstraram que o poder redutor elevado aumenta a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias. Posteriormente, trabalhos complementares demonstraram que oxidação de NADPH mitocondrial reduzia a capacidade antioxidante dessa organela, induzindo estresse oxidativo e levando à polimerização de proteínas de membrana via ligação cruzada de grupamentos tiólicos de membrana. (Fagian et al., 1990).

Vaseva e colaboradores (2012) mostraram também que a proteína p53 é capaz de migrar para a matriz mitocondrial e formar um complexo com a ciclofilina D (reguladora do poro de transição de permeabilidade), mas não com VDAC ou com o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) e está relacionada à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A formação do complexo Cyp-p53 é capaz de induzir a abertura do PTP mitocondrial.

Mais recentemente, Giorgio e colaboradores (2013) mostraram que dímeros purificados de ATP sintase e reconstituídos em bicamadas lipídicas podem ter a função semelhante ao poro de transição de permeabilidade (PTP), com mudanças nos padrões eletrofisiológicos capazes de induzir a abertura de um canal equivalente ao PTP. Além disso, esses autores mostraram interação da Cyp D com a ATP sintase na regulação desse poro. Todos esses resultados mostram um papel duplo para a ATP sintase: síntese de ATP e controle da transição de permeabilidade mitocondrial (Giorgio et al., 2013; Bernardi, 2013).

A exposição crônica ao etanol é conhecida por estar associada a vários processos de estresse intracelulares, os quais comprometem a função mitocondrial. Eles incluem estresse oxidativo, decréscimo dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, degradação de DNA mitocondrial, depleção de GSH (glutathiona reduzida) mitocondrial e formação de aductos com acetaldeído, todas essas condições capazes de induzir a abertura de poro de TPM (Pastorino et al., 1999). Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram que mitocôndrias de ratos tratados com etanol são mais susceptíveis à indução de TPM, com um aumento de 2 a 10 vezes nessa sensibilidade, variando de acordo com os agentes indutores de TPM testados.

Além disso, mitocôndrias de ratos tratados com etanol têm uma atividade respiratória menor, bem como uma atividade reduzida da ATP sintase. Propriedades de membrana mitocondrial são afetadas pelo consumo crônico de etanol. A potencialização da TPM pelo etanol é multifatorial. Isso tem grande importância para os estudos da doença alcoólica hepática (DHA), uma vez que na injúria hepática alcoólica há predominância de necrose centrolobular de hepatócitos. A área centrolobular é uma região com tensão menor de oxigênio no lóbulo hepático. O etanol tende a exacerbar a hipóxia centrolubular. Tem-se demonstrado a abertura de PTP em hepatócitos sob hipóxia *in vitro*. Logo, a combinação do metabolismo de etanol com a hipóxia pode conduzir à TPM e subsequente necrose de hepatócitos (Pastorino et al., 1999).



**Esquema 3. Cadeia de transporte de elétrons (CTE), fosforilação oxidativa e sistemas de detoxificação de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias.** Elétrons ( $e^-$ ) do NADH e FADH<sub>2</sub> são doados aos complexos I e II, respectivamente, então ao complexo III via ubiquinol. O citocromo c transfere os elétrons do complexo III para o complexo IV, o qual reduz O<sub>2</sub> à H<sub>2</sub>O. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons (H<sup>+</sup>) através dos complexos I, III e IV, gerando um gradiente com componentes elétrico ( $\Delta\psi$ ) e químico ( $\Delta\text{pH}$ ). Os prótons do espaço intermembranar retornam à matriz mitocondrial através da ATP sintase (complexo V), gerando a força próton-motora para a síntese de ATP. A força próton-motora também direciona a troca ATP-ADP no translocador de nucleotídeos de adenina (ANT). Quando ocorre o retorno de elétrons através da CTE, ele pode ser doado ao oxigênio molecular e gerar radical ânion superóxido (especialmente nos complexos I e III). O superóxido é dismutado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela enzima superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD) na matriz mitocondrial. Peróxido de hidrogênio é reduzido à H<sub>2</sub>O pela enzima glutatona peroxidase (GPx) usando GSH como doador de elétrons e a glutatona oxidada (GSSG) é reduzida novamente à GSH pela glutatona redutase (GR). O NADP<sup>+</sup> pode ser reduzido a NADPH pela NADP transhidrogenase (NNT), às custas da oxidação de NADH. A reação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais bivalentes doadores de elétrons (Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>) leva à formação de radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) em reações de Fenton ou tipo-Fenton. O OH<sup>•</sup> é extremamente reativo e pode causar a oxidação de lipídeos e/ou de grupos tiólicos de membrana, levando à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP). (Adaptado de Kowaltowski et al. (2001), Madamanchi e Runge (2007) e Figueira et al. (2013))

#### **1.4. DNA mitocondrial (DNAMt) e consumo de etanol**

Após a descoberta da estrutura do DNA nuclear no início da década de 50 do século XX, foram desenvolvidos vários métodos para a investigação da ultra-estrutura celular (principalmente a microscopia eletrônica), levando à descoberta do DNA mitocondrial (DNAMt) no início da década de 60 do mesmo século. Após duas décadas de expansão na pesquisa mitocondrial, duas direções foram seguidas: (1) o estudo da genética mitocondrial humana e sua conexão com estados patológicos e terapias e (2) genética, ecologia e demografia populacionais (Mounolou e Lacroute, 2005).

Mitocôndrias são as únicas organelas dos mamíferos que possuem seu próprio DNA e que podem sintetizar alguns dos seus próprios polipeptídeos funcionais. O DNAMt é uma dupla-fita circular de 16,3 a 16,5 quilobases (Kb) de tamanho, o qual codifica 2 RNAs ribossomais, 22 RNAs transportadores e 13 RNAs mensageiros para a síntese de polipeptídeos sintetizados em ribossomos mitocondriais (Cahill et al., 1999; Cederbaum, 1999). Esses polipeptídeos incluem 7 subunidades do complexo NADH desidrogenase, citocromo b, 3 subunidades do complexo citocromo c oxidase e as subunidades 6 e 8 do complexo ATP sintase. Cada mitocôndria pode conter de 4 a 10 moléculas de DNAMt (Cederbaum, 1999).

O consumo crônico de etanol tem sido relacionado com um decréscimo na síntese de proteínas mitocondriais. O etanol reduz o conteúdo de proteínas codificadas por mitocôndrias (citocromos a, a3, b, subunidades da NADH desidrogenase e ATP sintase) sem afetar o conteúdo de proteínas codificadas pelo DNA nuclear (citocromos c, c1, F1 da ATP sintase e succinato desidrogenase). Esse fato tem levado os estudos na direção de como o álcool altera a transcrição e a tradução do DNAMt. (Cederbaum, 1999). Embora os ribossomos mitocondriais sejam completamente funcionais, o conteúdo desses ribossomos é de 30 a 40% menor em ratos tratados cronicamente com etanol (Cederbaum, 1999).

Acredita-se que o DNAMt é mais susceptível aos danos ocasionados por EROS devido: (1) a sua localização (próximo à CTE, uma grande produtora de EROs), (2) à perda

de histonas protetoras e (3) a um sistema de reparo pouco eficiente (Cederbaum, 1999). Experimentos têm mostrado que tanto o consumo agudo quanto crônico de etanol podem afetar o DNA mitocondrial, produzindo aumento na quantidade da base oxidada 8-hidróxi-desóxi-guanosina no DNAm, além de deleções em seqüências codificadoras, podendo tornar as alterações no DNAm boas marcadoras para o abuso de álcool (Cahill et al., 1997; Cahill et al., 1999; Cederbaum, 1999; Kang e Hamasaki, 2005).

O alcoolismo crônico causa uma severa disfunção mitocondrial, principalmente no fígado, sendo acompanhada por aumento no estresse oxidativo intramitocondrial e acúmulo de lesões oxidativas no DNA mitocondrial (DNAm) (Hoek et al., 2002), embora outros órgãos também sofram danos similares (Mansouri et al., 2001). Estudos anteriores demonstraram um aumento nos níveis da base oxidada 8-hidroxi-desóxi-guanosina (8-OH-dG) no DNAm hepático de ratos mantidos com consumo de álcool por períodos curtos (40-70 dias) (Cahill et al., 1997). Além de lesão oxidativa, a diminuição nos níveis de DNA mitocondrial no fígado e o aumento do número de bases oxidadas foram detectados em protocolos de consumo crônico de etanol (6 meses) (Cahill et al., 1999). Apesar da óbvia implicação do estresse oxidativo, o mecanismo molecular que leva ao aumento em lesões no DNAm e as conseqüências funcionais dessas lesões ainda não estão claramente estabelecidos.

Lesões oxidativas são, em sua maioria, removidas do genoma por uma via molecular chamada Reparo de Excisão de Bases (REB) (Wilson et al., 2003), que envolve a ação seqüencial de quatro enzimas que: 1) removem a base modificada (DNA glicosilase); 2) clivam o sítio abásico gerado pela ação glicolítica anterior (AP-endonuclease); 3) “limpam” o terminal 5’, removendo grupos residuais e incorporando um novo nucleotídeo; 4) ligam a quebra de fita simples, reconstituindo assim o DNA nativo. Essa via de reparo de DNA opera tanto no núcleo quanto em mitocôndrias (Bohr et al., 2002), e de fato, o grupo ao qual a colaboradora desse projeto faz parte, demonstrou que REB iniciado pela DNA glicosilase 8-oxoguanine glicosilase (OGG1) é a única via de reparo de 8-OH-dG em mitocôndrias de camundongos (de Souza-Pinto et al., 2001).

O acúmulo de lesões oxidativas em DNA pode ser causado pelo aumento na velocidade de formação dessas modificações e pela diminuição na velocidade de remoção

ou na de reparo. Em modelos animais para alcoolismo, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas mitocôndrias está alterada, sugerindo aumento na formação de lesões oxidativas. Entretanto, a análise da atividade de algumas das enzimas componentes de REB em núcleo de hepatócitos obtidos de animais submetidos à protocolos de consumo crônico de álcool sugeriu alterações na eficiência e acoplamento das enzimas de REB (Navasumrit et al., 2001). Uma vez que o DNAm<sup>t</sup> acumula mais lesões oxidativas do que o DNA nuclear, é razoável imaginar que alterações nas enzimas de reparo de lesões oxidativas em mitocôndrias contribuem para o acúmulo preferencial de lesões nessas organelas.





## *2. Objetivos*



## **Objetivo Geral**

O objetivo geral dessa tese foi avaliar como o consumo agudo e crônico de álcool etílico (etanol) afetam as funções mitocondriais e como alterações bioquímicas e moleculares induzidas pelo etanol em mitocôndrias contribuem para o desenvolvimento da doença hepática alcoólica.

### **2.1. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos a seguir valem para todos os grupos experimentais tratados com etanol e para seus respectivos grupos controles, todos descritos no item Material e Métodos.

#### **2.1.1. Objetivos com abordagem em bionergética**

- a) Avaliar a respiração mitocondrial
- b) Avaliar a suscetibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por cálcio em mitocôndrias hepáticas isoladas
- c) Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO<sub>s</sub>) em mitocôndrias hepáticas e linfócitos esplênicos isolados, a fim de averiguar alterações de estado redox
- d) Verificar a participação e modulação de sistemas antioxidantes, especialmente os ligados à glutatona e a nucleotídeos de piridina – NAD(P)<sup>+</sup> e NAD(P)H

#### **2.1.2. Objetivos com abordagem utilizando técnicas de biologia molecular (DNAmt)**

- a) Analisar a quantidade de DNAmt de fígado em resposta ao consumo de etanol



### *3. Material e Métodos*



**3.1. Reagentes** – A maioria dos produtos químicos utilizados nessa tese foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), Life Technologies (Nova Iorque, EUA) e Merck (Darmstadt, Germany). Todos os reagentes utilizados nos experimentos dessa tese foram de alto grau de pureza.

**3.2. Animais de experimentação** – Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA), FCM/UNICAMP, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (protocolo nº 1539-1 de 2008). Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos, adultos, pesando 250 - 300 g de peso inicial, obtidos no biotério central da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica). Os animais foram alojados em gaiolas mantidas em sala climatizada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo de 12 horas claro e escuro, com livre acesso a água e ração (CR1, Nuvital Nutrientes, Paraná, Brasil).

**3.3. Protocolos de experimentação animal** - Foram colocadas nos bebedouros dos grupos tratados soluções de água filtrada com etanol em concentração de 25 % (v/v) de álcool etílico (etanol), sendo oferecidas *ad libitum* aos ratos. Para o grupo controle foi oferecida água filtrada, também *ad libitum*. Cada rato foi pesado durante 12 semanas para o controle da massa corpórea. Também foi feito o controle, mediante pesagem, do consumo de ração e de líquido consumidos.

Os protocolos foram divididos da seguinte maneira: **Protocolo 1:** Ratos Adultos Jovens (9-12 semanas) em tratamento agudo (2 semanas) e crônico (6 semanas, 12 semanas e 36 semanas); **Protocolo 2:** Ratos Adultos de Meia Idade (12-15 meses) em tratamento agudo (2 semanas) e crônico (12 semanas). Todos os protocolos tiveram um grupo tratado com etanol e outro grupo controle com água filtrada. O tratamento de 2 semanas foi considerado como “agudo” em oposição aos tratamentos mais longos (6-36 semanas). Entretanto, pode-se considerá-lo também como subcrônico.

**3.4. Isolamento de mitocôndrias hepáticas** – Os ratos foram sacrificados por decapitação. No isolamento de mitocôndrias de fígado foi utilizado o método de

centrifugação diferencial de Schneider e Hogeboom (1951) com algumas modificações. O fígado foi rapidamente removido (aproximadamente 2 minutos) e imerso em 50 mL de solução contendo sacarose 250 mM, EGTA-K<sup>+</sup> 0,5 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM (pH 7,2), mantida em banho de gelo. O órgão foi cortado em pequenos fragmentos, lavado extensivamente nesta solução e submetido à disrupção física em homogeneizador do tipo *Potter-Elvehjem* de vidro, com pistilo de teflon conectado a um motor de velocidade regulável (10 vezes). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 2500 g. Após esta primeira centrifugação, o sobrenadante foi recentrifugado por 10 minutos a 8000 g em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA). O sobrenadante da segunda centrifugação foi descartado e o *pellet* mitocondrial formado foi separado em gradientes isosmóticos de percoll, contendo 7%, 19%, 52% e 62% de percoll. Após centrifugação durante 10 minutos a 8000 g, com o auxílio de pipeta do tipo Pasteur de vidro, foi recolhido o material que se encontrava entre os gradientes de 19% e 52%. O restante do material foi descartado. Esse material recolhido foi ressuspense em 50 mL de solução de sacarose 250 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, pH 7,2 e EGTA-K<sup>+</sup> 0,3 mM e novamente centrifugados durante 10 minutos a 8000 g com a finalidade de retirar o percoll residual. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. As frações mitocondriais foram ressuspensas na mesma solução, porém isenta de EGTA, obtendo-se uma concentração final de 40 - 50 mg proteína/mL.

**3.5. Isolamento de linfócitos esplênicos** - O baço, retirado após a morte do animal por decapitação, foi colocado em 40 mL de tampão PBS e homogeneizado em homogeneizador *Potter-Elvehjem*. Os resíduos de baço restantes foram novamente homogeneizados em 4 mL de PBS. A suspensão de células (9 mL) foi então transferida em um tubo de 15 mL contendo 2 mL de histopaque e centrifugadas a 1200 g por 25 minutos a temperatura ambiente. Os linfócitos foram removidos da interface, lavados duas vezes com 10 mL de PBS e ressuspensos em 3 mL do mesmo. Os linfócitos foram contados em hemocítômetro e a viabilidade determinada pelo método de exclusão com azul de tripan 0,1%. Todas as preparações linfocitárias apresentaram viabilidade superior a 98%.

**3.6. Determinação de Proteínas** – As concentrações de proteína dos homogenatos e suspensões mitocondriais foram determinadas pelo método de Biureto (Gornall et al., 1949) na presença de colato 1 % (Kaplan e Pedersen, 1983) ou de Bradford (Bradford, 1976). O



princípio do método baseia-se na formação de ligações peptídicas com íons cúpricos, em meio alcalino, dando origem a um complexo com tonalidade violeta, quantificado a 540 nm em espectrofotômetro. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Soluções de BSA foram utilizadas como padrões.

**3.7. Meio de reação padrão** – o meio de reação padrão possui a seguinte composição: sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM,  $K_2HPO_4$  2 mM,  $MgCl_2$  2 mM. Esse meio foi mantido a 28°C e pH 7,2 para todos os experimentos envolvendo mitocôndrias isoladas.

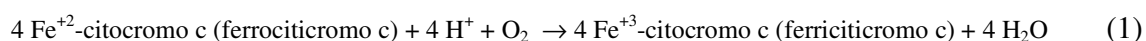
**3.8. Medida do consumo de oxigênio** – O consumo de  $O_2$  em suspensões de mitocôndrias hepáticas isoladas foi monitorado em oxígrafo de alta resolução Oxygraph-2k, marca Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) com o uso do programa ao software DataLab versão 4.2.0.73 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). Considerou-se que a solubilidade do  $O_2$  em água é 240  $\mu$ moles/L, a 28°C e 1 atm (Robinson e Cooper, 1970). As suspensões mitocondriais foram adicionadas ao meio de reação padrão e mantidas em câmara de vidro fechada (2 mL), sob agitação constante. A qualidade das mitocôndrias foi testada pelo cálculo da razão entre as velocidades de consumo de  $O_2$  nos estados de fosforilação oxidativa (V3) e de repouso (V4), obtendo-se o controle respiratório (CR). A suspensão mitocondrial foi considerada adequada para o uso quando esta razão foi superior a 5,0 utilizando uma solução contendo os seguintes doadores de elétrons para o complexo I mitocondrial, em concentrações equimolares de 5 mM: glutamato,  $\alpha$ -cetoglutarato, malato e piruvato.

**3.9. Medida da captação e retenção de íons  $Ca^{2+}$**  - Mitocôndrias de fígado de rato (MFR) (0,5 mg/mL) foram adicionadas em meio de reação contendo *Calcium Green* 0,2  $\mu$ M, um marcador fluorescente que se liga ao cálcio presente no meio. Quando esse marcador está ligado ao  $Ca^{2+}$ , ocorre aumento na fluorescência de emissão. Experimentos foram conduzidos em espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (Hitachi, Tóquio, Japão) com excitação a 506 nm e emissão a 532 nm, com largura de fenda de 2,5 nm.

**3.10. Medida de inchamento mitocondrial** – Mudanças no espalhamento de luz da suspensão mitocondrial devido à entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e o conseqüente inchamento das mitocôndrias (0,5 mg de proteína /mL) foram acompanhados durante 10-20 minutos em um espectrofotômetro Hitachi U3000 (Hitachi, Tóquio, Japão) termostatizado e com leitura em 520 nm, sob agitação constante (Beavis et al., 1985).

**3.11. Determinação do estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais** - A oxidação ou redução de nucleotídeos de piridina (NP) em suspensões mitocondriais (0,5 mg/mL) foram monitoradas em espectrofluorímetro Hitachi F-7000 (Hitachi, Tóquio, Japão) nos comprimentos de onda de 366 nm e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente, com largura de fenda de 5 nm. Os experimentos foram conduzidos em meio de reação padrão. Calibrações foram realizadas por adições de concentrações conhecidas de NADH.

**3.12. Medida da atividade da enzima Citocromo c Oxidase** - As medidas de atividade da citocromo c oxidase foram feitas com base no protocolo do kit comercial para esse ensaio enzimático (Sigma Product Information®, Cytochrome c Oxidase Assay Kit, Technical Bulletin), modificado pela adição de Triton 0,01% (Tyler e Nathanailides, 1995). O princípio desse ensaio enzimático consiste em monitorar a queda no valor de absorbância em 550 nm, devido à oxidação, via atividade da citocromo c oxidase, do citocromo c reduzido adicionado ao ensaio. A reação a seguir (1) mostra o que ocorre com o citocromo em sua oxidação de ferrocitocromo c a ferricitocromo c.



Para a realização desse ensaio, foram utilizados entre 10 e 20 mg de tecido hepático homogeneizado em homogeneizador de vidro do tipo Potter, padronizando-se a extração com tampão fosfato (PBS) gelado contendo Triton X-100 0,01%. Foi utilizado um homogenato contendo 10 mg de tecido hepático/mL de tampão. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 2 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para as análises enzimáticas.

Em cubeta de 1,5 mL, com caminho óptico de 1 cm, a 25°C, foram adicionados tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM , pH 7,0) com KCl 120 mM, tampão de diluição de amostra ou de enzima Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) contendo sacarose 250 mM. Para a redução do ferrocitocromo c a ferricitocromo c foi adicionado DTT (ditiotreitól) 500 µM à solução estoque de ferrocitocromo c 0,22 mM. Após uma hora de incubação, uma alíquota diluída 20 vezes foi monitorada em dois comprimentos de onda (550 e 565 nm). A razão entre os valores de absorbância nesses dois comprimentos de onda (A550/A565) deve estar entre 10 e 20 para que o reagente alcance uma taxa de redução apropriada para seu uso nesse ensaio. Aos tampões do ensaio foi adicionado citocromo c reduzido 1 µM e monitorada a variação de absorbância em função do tempo em 550 nm. A diferença nos coeficientes de absorvidade molares ( $\Delta\epsilon$ ) entre o estado reduzido e oxidado do citocromo c é de 21,84 mM. O volume final do ensaio foi de 1,1 mL.

Após a obtenção da variação de absorbância por minuto, aplicamos a fórmula geral para ensaios enzimáticos mostrada a seguir (2).

$$(U/L) = \frac{\Delta Abs \times VT \times 1000}{\epsilon \times c \times VA} \quad (2)$$

Sendo:

$\Delta Abs/min$  = Abs amostra/min – Abs branco/min

VT = Volume total do ensaio (mL)

1000 = fator de diluição para converter a L

$\epsilon$  = coeficiente de absorvidade molar, em  $mM^{-1} \times cm^{-1}$

c = caminho óptico, em cm

VA= Volume da amostra adicionada, em mL

Omitimos o fator de diluição 1000 para a conversão a litro (L). Dessa forma, tem-se o valor de atividade enzimática em U/mL, o que facilita a divisão pela concentração de proteína, que está em mg/mL, anulando o termo mL.

Os dados de U/mL foram normalizados em relação à quantidade de proteína (em mg) adicionada ao ensaio e a atividade final foi apresentada em mU/mg de proteína (nmoles/min/mg proteína).

**3.13. Medida da atividade da enzima Glutathiona Peroxidase (GPx)** - O ensaio para a atividade da enzima glutathiona peroxidase foi realizado com base em Lawrence e Burk (1976). Foram utilizados entre 30 e 40 mg de tecido hepático, homogeneizando-os em 1 mL de tampão fosfato (PBS) gelado contendo Triton X-100 0,01%. Foi utilizado um homogenato contendo 10 mg de tecido hepático/mL de tampão. Foram utilizados 25 µL do homogenato para os ensaios, representando, aproximadamente, 100 µg de proteína.

Em cubeta de quartzo de 1,5 mL, com caminho óptico de 1 cm, a 25°C, foram adicionados tampão fosfato dibásico de potássio 100 mM (pH 7,7), EGTA 1 mM, NaN<sub>3</sub> 1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 µM, NADPH 150 µM, glutathiona redutase (GR) 60 mU/mL e glutathiona reduzida (GSH) 5 mM. O volume final do ensaio foi 1,0 mL.

Após a adição dos reagentes descritos, exceto GSH, monitorou-se o branco da reação na presença de excesso de GR, em 340 nm. Em seguida, adicionou-se GSH e foi monitorada, durante 1 minuto, a queda na absorbância de NADPH devido à atividade da enzima GR. Foram adicionados 25 µL de homogenato hepático (aproximadamente 100 µg de proteína) a fim de monitorar a atividade total (GR+GPx). Como havíamos monitorado a atividade da enzima GR anteriormente, com excesso da mesma, a fim de que ela não fosse fator limitante para a reação, descontamos sua atividade da atividade total, obtendo a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx).

Para os cálculos da atividade, em mU/mg de proteína, foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a atividade de Citocromo c Oxidase.

**3.14. Medida da atividade da enzima Citrato Sintase** - A reação catalizada pela citrato sintase consiste na reação que envolve a reação de condensação do oxaloacetato à molécula de acetil-coenzima A e água, formando citrato mais CoA-SH. O ensaio para atividade da enzima consiste em promover a reação irreversível na qual o CoA-SH gerado reagirá com o DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)), produzindo o TNB (ácido tionitrobenzóico) mais CoA-S-S-TNB.

Esse ensaio enzimático foi adaptado à microplaca com base nos protocolos da empresa Oroboros® Instruments (Oroboros, 2010) e disponíveis *on-line* no site da própria

empresa. Para a realização desse ensaio, foram utilizados entre 10 e 20 mg de tecido hepático homogeneizado em homogeneizador de vidro do tipo *Potter-Elvehjem* (10 mg de tecido hepático/mL de tampão), padronizando-se a extração em tampão fosfato (PBS) gelado contendo Triton X-100 0,01%. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 2 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para as análises enzimáticas. Em microplaca para espectro visível, foram pipetadas cerca de 3,0 µg de amostra em cada poço, sobre as quais foi adicionado um mix de reagentes contendo Tris-HCl 0,1 M (pH 7,1), oxaloacetato 250 µM, DNTB 100 µM e acetil-coenzima A 50 µM. Durante 5 minutos foi monitorada a absorbância em 412 nm, a 30 °C, e calculada a inclinação por minuto do branco e das amostras.

Em seguida, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar para o TNB ( $13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ), foram efetuados os cálculos até que se obtivesse o valor da atividade enzimática em mU/mL. Foi feita a correção para o caminho óptico referente ao volume de 0,2 mL utilizado nesse ensaio. Após a dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976), os dados foram normalizados em relação à quantidade de proteína adicionada ao ensaio e a atividade final foi apresentada em mU/mg de proteína (nmoles/min/mg proteína).

**3.15. Estimativa da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mitocondrial** - A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondriais foi monitorada espectrofluorimetricamente em espectrofluorímetro RF-5301 (Shimadzu, Japão) usando Amplex Red® (N-acetil-3,7-dihydroxyphenoxazine) 10 µM e na presença de peroxidase 1 U/mL (Zhou et al., 1997). A fluorescência foi monitorada em 563 nm para excitação e 587 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 nm. Calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio. Os experimentos foram conduzidos a 28°C em meio de reação padrão.

O cálculo das velocidades foi realizado considerando-se os dois minutos finais de traçado, nos quais é feita a regressão linear e, a partir da equação da reta obtida para o intervalo de tempo adotado, são calculadas as variações de fluorescência por unidade de tempo. Com a calibração feita com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AmplexRed®, na presença de peroxidase (HRP), os valores de fluorescência por unidade de tempo (unidades arbitrárias/min) foram

convertidos a valores de quantidade por unidade de tempo (pmol/min). A seguir, os valores foram corrigidos para 1 mg de proteína/mL, obtendo-se os valores finais de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em pmol/min/mg proteína.

**3.16. Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linfócitos esplênicos** - O estado oxidativo de linfócitos esplênicos foi monitorado espectrofluorimetricamente usando o corante permeável à membrana H<sub>2</sub>-DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína) 4 μM (Lebel et al., 1992). A fluorescência foi monitorada em espectrofluorímetro Hitachi F-4010 (Hitachi, Tóquio, Japão), com 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com largura de fenda de 5 nm. A calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), produto da oxidação do H<sub>2</sub>-DCFDA, que apresenta fluorescência a 525 nm quando excitado a 488 nm. Foi utilizado DPI 5 μM (diphenyleneiodonium chloride), inibidor de flavoproteínas, dentre as quais está a NADPH oxidase. O cálculo das velocidades de oxidação do H<sub>2</sub>-DCFDA foi idêntico ao cálculo para as velocidades de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando AmplexRed®.

**3.17. Detecção e quantificação de nucleotídeos de piridina oxidados (NAD(P)<sup>+</sup>) e reduzidos (NAD(P)H) em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)** – Nucleotídeos de piridina foram detectados e mensurados em sistema cromatográfico Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por sistemas de entrega de solventes modelos LC-10AVP (bombas) e SIL-10AVP (injetor automático de amostras) e detector de fluorescência modelo RF-10AXL utilizando os comprimentos de onda de 330nm e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente. Todos os módulos foram controlados pelo *software* CLASS-VP versão 6.14 SP2. Os procedimentos para análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para os nucleotídeos de piridina foram conduzidos segundo Klaidman et al. (1995), com alterações mínimas. Foram analisadas alíquotas (4 mg de proteína) de mitocôndrias hepáticas isoladas com gradiente de percoll, conforme descrito anteriormente. Foi utilizada coluna analítica Luna 250 x 4.6 mm, C18 (2) 100A, com partícula de 5 μm (Phenomenex, Torrance, USA). As análises foram conduzidas em corrida única de 50 min, utilizando gradientes ao longo do tempo. Curvas de calibração foram construídas com quantidades conhecidas de cada um dos nucleotídeos de piridina citados.

A integração das áreas dos picos e a quantificação foram feitas pelo software OriginPro versão 8.0724 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

**3.18. Detecção e quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC)** - Para a detecção e quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Germany), com detector de arranjo diodo (Infinity DAD, 64212A), módulo para coluna cromatográfica (Infinity TCC,61316C), injetor automático (Infinity sampler, 64226A) e sistema de bombas automático (Infinity Bin Pump, 64220A). Para as análises de glutathiona foi utilizada coluna cromatográfica (ou analítica) Agilent Eclipse Plus C18, RRHD 1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50 mm, acoplada a coluna de guarda com filtro para amostras. A fase móvel utilizada em modo isocrático consistiu de KCl 20 mM (pH 2,5, ajustado com ácido ortofosfórico) com fluxo de 0,3 mL/min, com pressão entre 430-470 bar, termostalizada a 25 °C.

A metodologia de extração de GSH e GSSH utilizada foi a mesma empregada por Yilmaz et al. (2009), com algumas adaptações às amostras utilizadas. Foram utilizados entre 20 e 30 mg de tecido hepático homogeneizados com 500  $\mu\text{L}$  do tampão de extração contendo EDTA 10 mM,  $\text{NaClO}_4$  50 mM e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,01%. Em seguida foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de ácido metafosfórico 5% (v/v) para a precipitação de proteínas. Após centrifugação a 8000 g por 10 min (4°C), o sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtro hidrofílico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro e 1  $\mu\text{L}$  do filtrado foi injetado no sistema cromatográfico descrito.

Após a obtenção dos cromatogramas das amostras, as áreas sob os picos cromatográficos correspondentes ao analitos citados (GSH e GSSG) foram integradas. Foram realizadas as calibrações dos padrões de GSH e de GSSG, com o intuito de converter a área sob os picos cromatográficos em número de moles. Esses procedimentos foram realizados no software ChemStation 3D System® do próprio cromatógrafo (Agilent Technologies, Germany, 2001-2009). Foram calculadas as regressões lineares das curvas analíticas contendo cinco pontos, em triplicata cada, obtendo-se as seguintes retas e coeficientes de regressão linear: (1) para GSH,  $y = 0,80288x - 41,93795$  ( $R^2 = 0,99199$ ); (2)

para GSSG,  $y = 1,92556x - 0,68322$  ( $R^2 = 0,99938$ ). Os tempos de retenção para GSH e GSSG foram, em min,  $0,62 \pm 0,02$  e  $1,87 \pm 0,10$ , respectivamente.

**3.19. Western Blotting para detecção do conteúdo portéico de citocromo c oxidase (COX4) e de Nampt (nicotimamida polirribosil transferase)** - Cerca de 60 mg de tecido hepático foram homogeneizados em tampão PBS utilizando homogeneizador do tipo *Potter-Elvehjem* de vidro, com pistilo de vidro (10 vezes). Foram adicionados inibidores de protease (coquetel inibidor de proteases, Sigma Aldrich) ao PBS imediatamente antes do uso. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 500 g, a 4°C, por 1 min. O sobrenadante foi recolhido para dosagem de proteínas e o *pellet* foi descartado. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e as amostras foram diluídas para 4mg/mL. O homogenato foi mantido no gelo até a adição do tampão de amostras redutor Laemmli 2X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%, DTT 500 mM). As amostras de homogenato foram diluídas 1:1 com o tampão Laemmli, resultando em um estoque 2mg/mL de proteína. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 min e então separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e tampão contendo Tris-HCl 2,5mM (pH 8,0), Glicina 19 mM e SDS 0,3 mM. Em seguida, amostras foram transferidas para membrana de PVDF (Sigma Aldrich) em tampão contendo Tris-HCl 1,2 mM (pH 8,0), Glicina 9,6 mM e metanol 20%. A eficácia da transferência foi verificada através da coloração das membranas pelo corante reversível Ponceau S (Sigma Aldrich), seguida do bloqueio em uma solução contendo leite em pó desnatado 5% (m/v) (Nestlé, Brasil) dissolvido em Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM e 0,05% (v/v) de Tween 20 (TBST) por 2 horas em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários diluídos em TBS (sem Tween 20) com leite em pó desnatado 1% (m/v) ou de BSA: anti-Visfatin 1:1000 (mesmo que anti-Nampt) (Abcam, MA, EUA), anti-COX4 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e anti-piruvato desidrogenase-subunidade E1 $\alpha$  1:1000 (Abcam, MA, EUA). A incubação foi feita por 2 horas à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C, sob agitação constante. Foram realizadas 4 lavagens de 15 min cada com TBST, seguidas de incubação em solução de leite desnatado ou BSA 5% contendo anticorpos secundários anti-rabbit (1:2000) e anti-mouse (1:5000) conjugados com peroxidase (HRP) (Santa Cruz



Biotechnology, CA, EUA) durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação constante. As membranas foram lavadas novamente com TBST conforme descrito anteriormente e reveladas em fotodocumentador de géis com módulo de quimioluminescência Uvitec Cambridge (Uvitec Limited, Cambridge, Reino Unido). O padrão de peso molecular foi visualizado no módulo visível do mesmo leitor e as imagens dos dois módulos citados foram unidas pelo software Alliance versão 2.7 do próprio equipamento. As imagens foram salvas no formato bitmap 8 bits e as áreas das bandas foram mensuradas pelo software Image J versão 1.46r (National Institutes of Health, EUA).

**3.20. Isolamento de DNA pela técnica de *salting out*** - Para o isolamento de DNA, utilizamos o procedimento de *salting out*, com modificações a partir de Miller et al. (1988). Esse procedimento consiste em aumentar a salinidade (solução saturada de NaCl) a fim de diminuir a associação de proteínas ao DNA, permitindo a extração dessa molécula.

Cerca de 50 mg de tecido hepático foi homogeneizado, em homogeneizador de vidro, com 1 mL de meio MSHE 1X pH 7,4 (manitol 210 mM, sacarose 70 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, EDTA 2 mM, DTT 5 mM) contendo deferoxamina 100 µM. A seguir, foi adicionado tampão de lise pH 8,2 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM, SDS 0,5%) e proteinase K 0,1 mg/mL. Após digestão a 55°C durante 1 hora, com agitação constante em banho-seco, foi adicionado ¼ do volume de solução saturada de NaCl 6 M e mantido a 55° C até atingir o equilíbrio térmico.

Em seguida, os tubos plásticos de 15 mL foram transferidos para um banho de gelo até que ocorresse a formação de um precipitado esbranquiçado. Após esse passo, os tubos foram centrifugados a 10000 g por 10 min a 4°C. Verificada a ausência de precipitados esbranquiçados no sobrenadante, esse foi transferido para outro tubo de 15 mL ao qual foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto P.A. gelado, misturando-se bem. Os tubos foram mantidos a -20°C por, pelo menos, duas horas para garantir a precipitação do DNA.

Realizada a etapa de precipitação do DNA em etanol gelado, os tubos foram centrifugados novamente a 10000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi seco sob jato de N<sub>2</sub>. Uma vez completamente seco, o *pellet* foi

ressuspensão em 500 µl de tampão TE pH 8,1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) na presença de RNase 100 µg/mL. Incubou-se durante 1 hora a 37°C para digestão de RNAs presentes na amostra. Em seguida foi adicionado novamente tampão de lise e se inicia uma segunda etapa de digestão por proteinase K, adição de solução saturada de NaCl e precipitação com etanol absoluto gelado, como descrito anteriormente. Após centrifugação de 10000 g, o pellet final foi ressuspensão em 200 µL de água deionizada autoclavada. Em espectrofotômetro de microvolumes Nanodrop® foi obtido o espectro da amostra e o valor da razão A260/A280 (absorbância em 260 nm/ absorbância em 280 nm) e da razão A260/A230. A primeira razão indica a pureza da amostra de DNA com relação à contaminação por proteínas e deve estar sempre acima de 1,8 para a determinação de lesões oxidativas. A segunda razão indica uma possível contaminação por solventes, principalmente, o etanol da etapa de precipitação. A concentração de DNA foi obtida em ng/µL.

**3.21. PCR quantitativa em tempo real para análise do número de cópias dos genomas mitocondrial e nuclear** – Análises em PCR quantitativa em tempo real foram realizadas utilizando o reagente PCR Master Mix Power SYBR® Green (Life Technologies, NY, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados 20 ng de DNA total na presença de 200 nM de *primers* específicos para um gene mitocondrial (COX1) e para um gene específico nuclear (GAPDH) (ver **Tabela 2**) para um volume de reação de 25 µL. Cada reação de amplificação foi preparada em triplicata e a amplificação e leitura de fluorescência foram realizadas em equipamento de PCR tempo real ABI 7300 (Life Technologies, NY, EUA) com software Sequence Detection Software (SDS) versão 1.4.0.25.

Empregando o método matemático desenvolvido por Pfaffl (Pfaffl, 2001), a partir dos dados de *cycle threshold* (CT) para cada par de *primers*, já padronizada anteriormente, foi calculada a eficiência de amplificação dos *primers*, conforme descrito na equação (3), onde *slope* é inclinação da reta resultante da plotagem de CT x massa de DNA, e E corresponde à eficiência do *primer*.

$$E_{\text{primer}} = 10^{-1/\text{Slope}} \quad (3)$$

A amplificação relativa para cada uma das amostras foi obtida através do uso da equação (4). No caso da análise relativa do número de cópias de DNAm<sub>t</sub>, a normalização dos dados foi feita calculando a eficiência de amplificação de uma sequência mitocondrial (COX1) relativa a amplificação de uma sequência nuclear (GAPDH) (**equação 4**). Os ciclos de amplificação utilizados estão na **tabela 1** e os *primers* utilizados estão na **tabela 2**.

$$\text{Amplificação relativa} = \frac{E_{\text{mtDNA}}^{(Ct_{\text{Controle-DNAmt}} - Ct_{\text{amostra-DNAmt}})}}{E_{\text{GAPDH}}^{(Ct_{\text{Controle-GAPDH}} - Ct_{\text{amostra-GAPDH}})}} \quad (4)$$

**Tabela 1.** Procedimentos utilizados na PCR quantitativa em tempo real.

Etapa	Evento	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Ciclos
1	Aquecimento bloco	50	120	1
2	Desnaturação dupla hélice	95	600	1
3	Desnaturação dupla hélice	95	60	40
	Anelamento <i>Primers</i> /Extensão/Leitura	60	30	40
4	Análise curva <i>melting</i>	95	15	1
		60	60	1
		95	15	1

**Tabela 2.** *Primers* utilizados para amplificação de gene mitocondrial (COX1) e nuclear (GAPDH).

Genoma	<i>Primers</i> (sentido 5'-3')
Mitocondrial	<b>Forward (sense):</b> CCT CCC ATT CAT TAT CGC CGC CCT TGC
	<b>Reverse (antisense):</b> GTC TGG GTC TCC TAG TAG GTC TGG GAA
Nuclear	<b>Forward (sense):</b> GGG AGG GGC TCC CCT TCT GG
	<b>Reverse (antisense):</b> TCG GAC CTG GGG AAG GCT CG

**3.22. Análises estatísticas** – As análises estatísticas foram determinadas utilizando-se os softwares Prisma GraphPad versão 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) ou SigmaStat versão 3.5 (Systat Software, Chicago, IL, EUA). Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores  $\pm$  erro ou desvio padrão da média (média  $\pm$  d.p.m. ou e.p.m.), submetidos ao teste *t-Student* não-pareado. Todas as figuras apresentadas nos resultados são representativas de pelo menos três experimentos independentes. Foi considerados  $p < 0,05$  como diferença estatisticamente significativa.

## *4. Resultados*



#### **4.1. Parte A: Efeitos do consumo de etanol sobre a massa corpórea, consumo de líquido e de ração**

Na primeira parte desse trabalho, procuramos validar o modelo experimental utilizado, reproduzindo os dados obtidos anteriormente por Ravagnani (2007) em sua monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas – Modalidade Médica (UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil).

Os dados relacionados ao efeito do consumo de etanol sobre a massa corpórea, consumo de líquido e de ração obtidos nesse trabalho de Doutorado são semelhantes aos obtidos em trabalho anterior e são apresentados a seguir.

##### **4.1.1. Efeito do consumo de etanol sobre a sobre a massa corpórea**

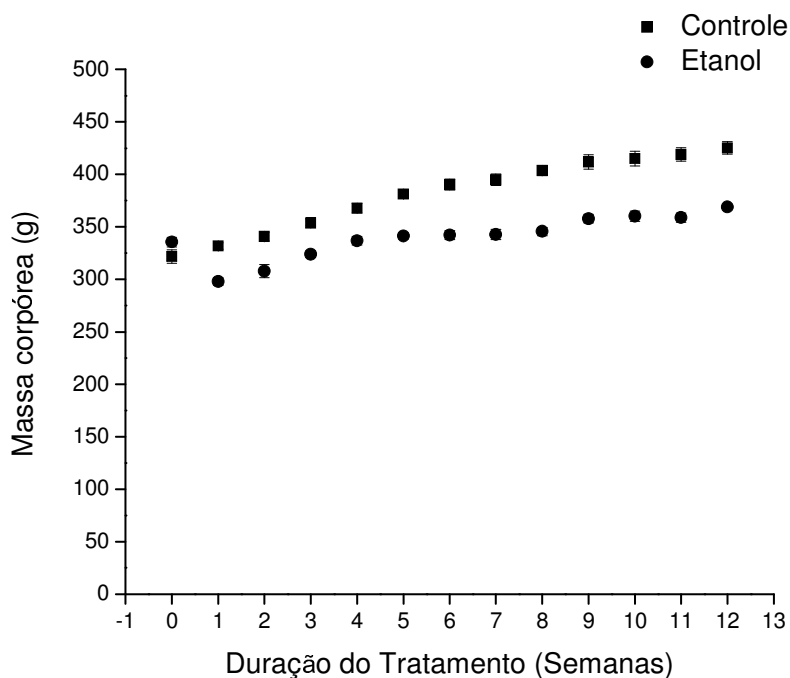
Na **Figura 1**, podemos observar que, inicialmente, não havia diferença entre a massa corpórea dos animais dos grupos controle e tratados com etanol. A partir da 1ª semana de tratamento até a 12ª semana houve redução estatisticamente significativa no ganho de peso dos animais do grupo tratado com etanol (redução de até 14% na última semana analisada). A queda inicial nos valores de massa corpórea para os animais que ingeriram etanol se deve, provavelmente, à mudança na palatabilidade ocorrida quando da troca de água pela solução alcoólica 25% (v/v).

##### **4.1.2. Efeito da ingestão de etanol sobre o consumo de líquido**

Na **Figura 2**, podemos notar que houve redução na ingestão de líquido (em torno de 47%) pelos animais que consumiram etanol, com diferença estatisticamente significativa ao longo de todo o período de tratamento analisado (12 semanas).

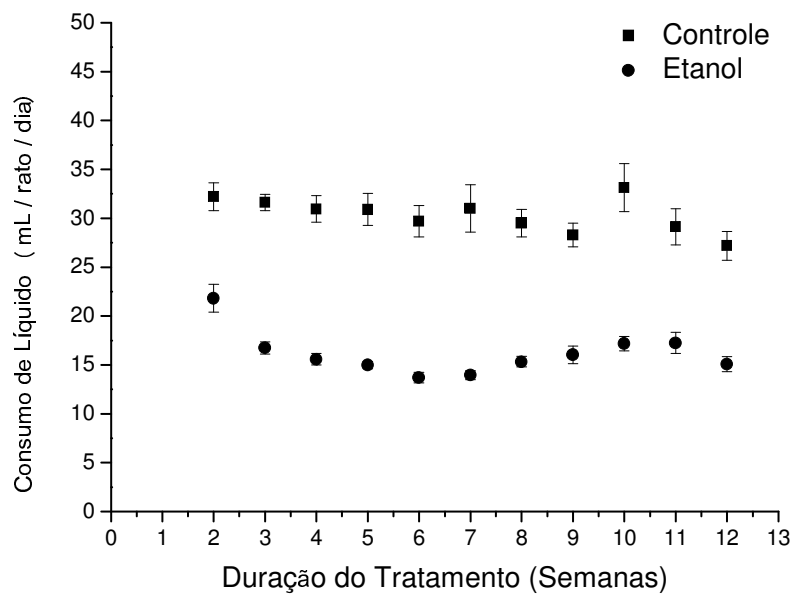
#### 4.1.3. Efeito da ingestão de etanol sobre o consumo de ração

Na **Figura 3**, podemos notar que também houve redução na ingestão de ração pelos animais que consumiram etanol (em torno de 35%), com diferença estatisticamente significativa ao longo de todo o período de tratamento analisado (12 semanas). Essa diferença pode ser explicada, em parte, devido ao fato de o etanol representar boa parte do consumo energético diário de calorías (em torno de 40% do conteúdo calórico total). O etanol excede, em calorías (7,1 kcal/g), a energia contida em carboidratos ou proteínas (Lieber, 1997).

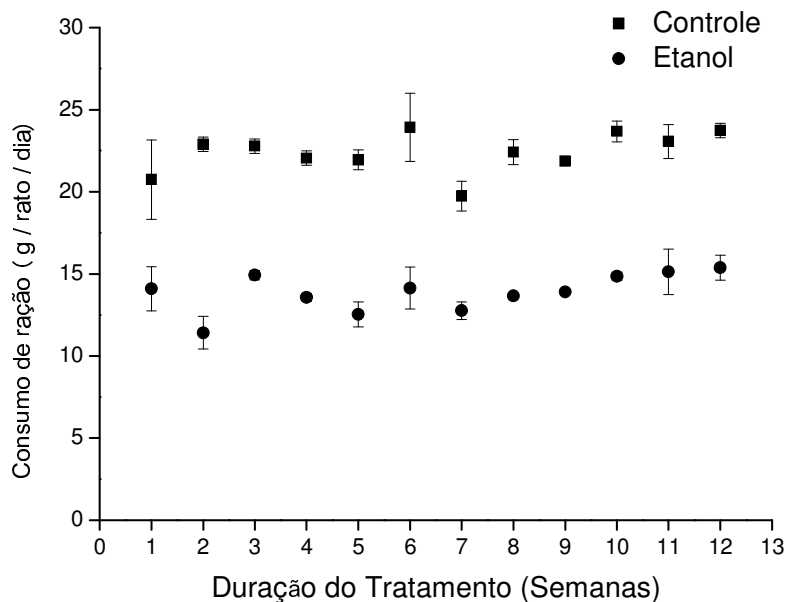


**Figura 1.** Massa corpórea dos animais ao longo de 12 semanas. Valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. Houve diferença estatisticamente significativa a partir da 1ª semana de tratamento para todas as semanas analisadas (n = 15-40).





**Figura 2. Consumo de líquidos pelos animais ao longo de 12 semanas.** Valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. Houve diferença estatisticamente significativa em todas as semanas de tratamento com etanol (n = 3-16).



**Figura 3. Consumo de ração pelos animais ao longo de 12 semanas.** Valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. Houve diferença estatisticamente significativa em todas as semanas de tratamento com etanol (n = 3-12).

## **4.2. Parte B: Efeito do consumo de etanol sobre as funções bioenergéticas mitocondriais**

Na segunda parte dos resultados dessa tese, avaliamos o efeito do etanol sobre as funções mitocondriais, dentre elas a respiração mitocondrial, a suscetibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), a captação de cálcio, a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade antioxidante mediada por glutathione. Dados da literatura indicam que há danos às mitocôndrias hepáticas expostas ao etanol, com maior suscetibilidade à TPM e aumento no estresse oxidativo (Fernández-Checa et al., 1997; Wu e Cederbaum, 2003; Cederbaum et al., 2009; Wu e Cederbaum, 2009; King et al., 2010).

### **4.2.1. Respiração mitocondrial**

Inicialmente, monitoramos o efeito da ingestão de etanol no consumo de oxigênio ( $O_2$ ) *in vitro* por mitocôndrias isoladas de fígado de rato (MFR) na presença de substratos para os complexos I, II e IV da cadeia de transporte de elétrons (**Figura 4A**). O consumo de oxigênio mitocondrial também foi monitorado no estado respiratório 3, no qual ocorre fosforilação oxidativa de ADP, estimulando o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias.

Podemos observar redução no consumo de oxigênio na presença de substratos para o complexo I (concentrações equimolares de 5 mM de: piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato, malato e glutamato) tanto na velocidade basal, quanto na estimulada por ADP (estado 3) ou por FCCP. Também observamos redução quando na presença de oligomicina (inibidor da ATP sintase, estado 4). Quando as mitocôndrias foram energizadas com succinato (doador de elétrons para o complexo II), na presença de rotenona (inibidor do complexo I), não houve diferença entre as velocidades de respiração entre as mitocôndrias dos animais controle e às dos que consumiram etanol. Também não houve diferença quando na presença de antimicina A (inibidor do complexo III). Entretanto, quando as mitocôndrias foram

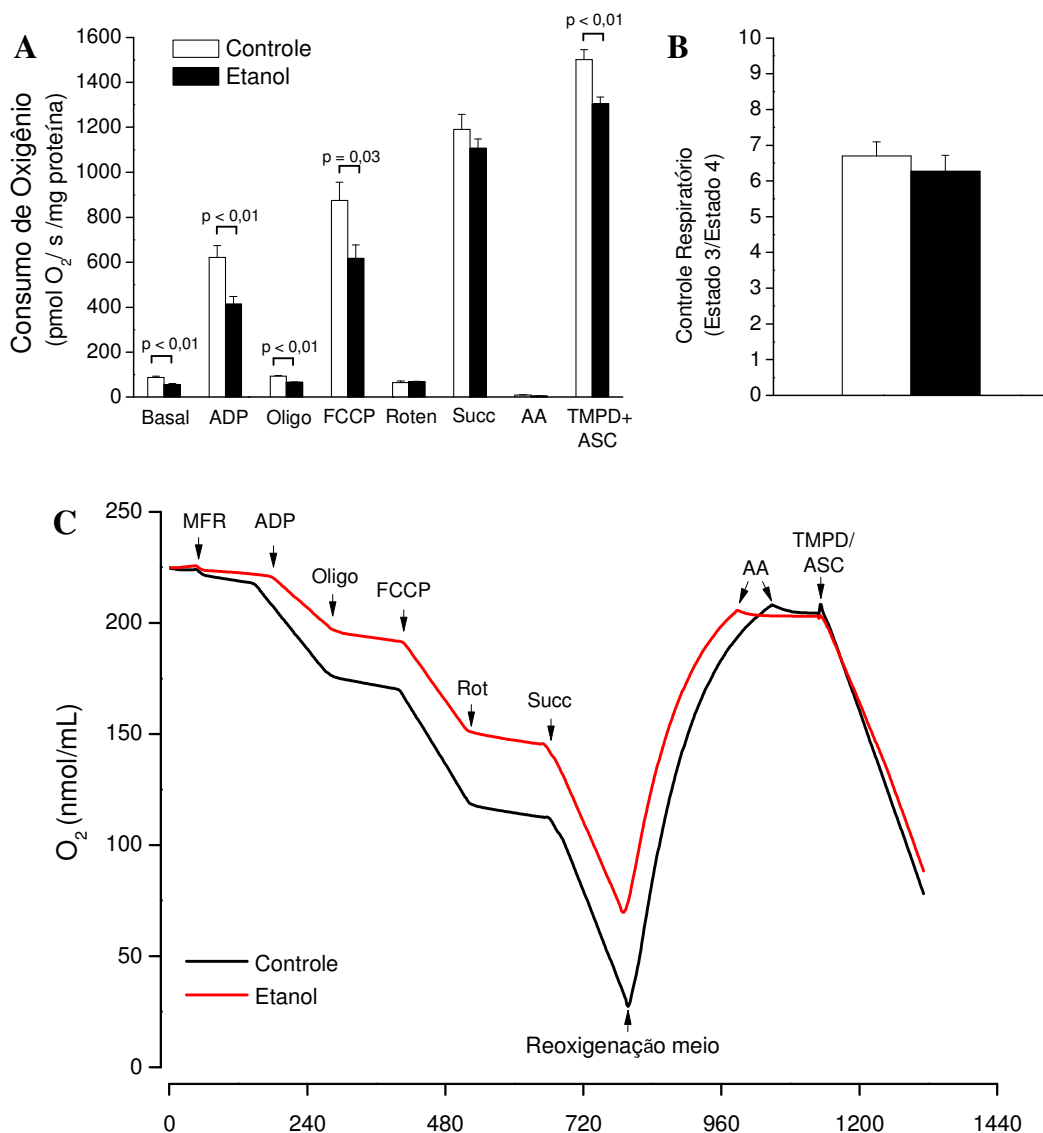
energizadas com substratos doadores de elétrons para o complexo IV (TMPD/Ascorbato), houve redução estatisticamente significativa na velocidade do consumo de oxigênio por esse complexo, no qual o oxigênio é reduzido à água. Não houve diferença estatisticamente significativa no controle respiratório (estado 3/estado 4) entre os grupos analisados (**Figura 4B**). Na **Figura 4C** temos o gráfico representativo para as condições descritas para a **Figura 4A**. Esses dados indicam que há algum fator limitante na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e/ou na síntese de ATP (ATP sintase) que influenciam diretamente nas velocidades de consumo de oxigênio por mitocôndrias hepáticas isoladas de animais expostos ao consumo de álcool.

#### **4.2.2. Atividade e expressão da enzima citocromo c oxidase (Complexo IV)**

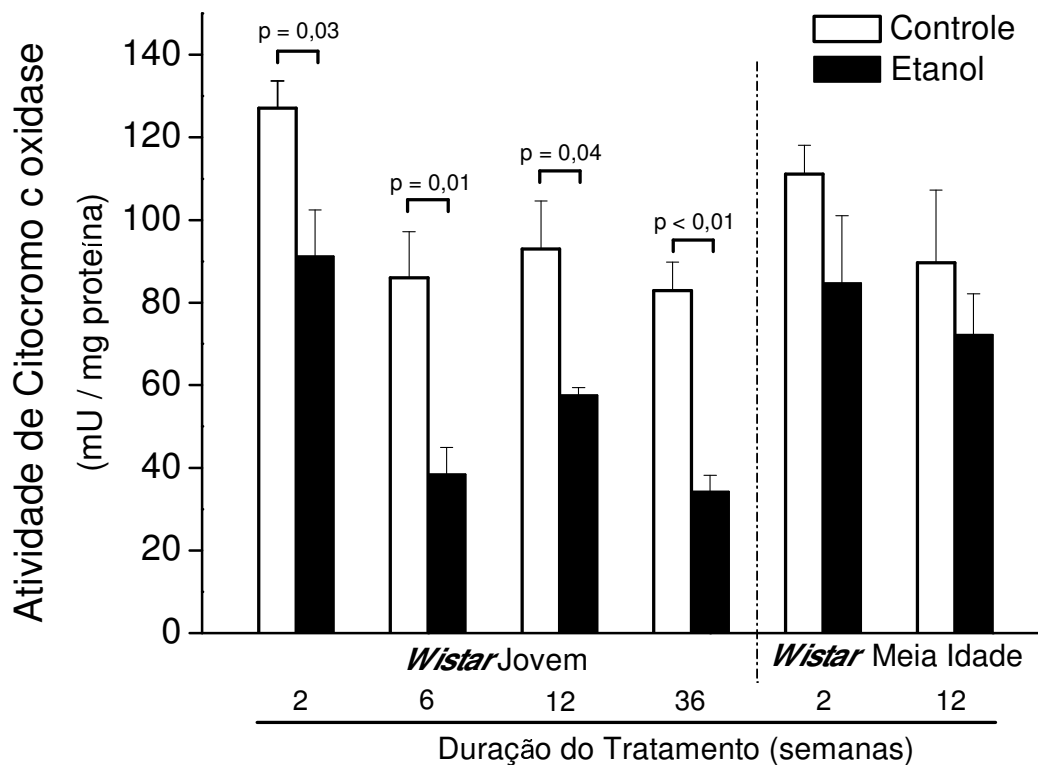
Como observamos alteração na velocidade de consumo de oxigênio com substratos doadores de elétrons para o complexo IV, decidimos medir a atividade da enzima citocromo c oxidase (complexo IV) (**Figura 5**) e de sua quantidade total em extrato de fígado de rato (**Figura 6**).

Na **Figura 5**, observamos que há redução na atividade específica de citocromo c oxidase a partir da 2ª semana de tratamento (redução de 30%), tornando-se mais acentuada a inibição a partir da 6ª semana de tratamento (redução de 55%) e persistindo até o tratamento crônico de 36 semanas (redução de 59%). Essa inibição foi significativa para os animais jovens, entretanto, não observamos esse efeito em animais de meia-idade.

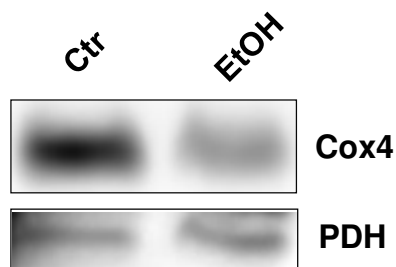
Como havíamos observado redução mais acentuada da atividade de citocromo c oxidase a partir da 6ª semana, decidimos avaliar a quantidade de COX4 (subunidade da citocromo c oxidase) em homogenatos de fígado de ratos. Na **Figura 6**, podemos observar redução na expressão dessa subunidade (em torno de 70%) em ratos que consumiram etanol durante 6 semanas.



**Figura 4. Consumo de oxigênio por mitocôndrias hepáticas isoladas de ratos na 6ª semana de tratamento com etanol.** Em meio de reação padrão, com agitação constante, foram adicionadas mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,5 mg/mL) na presença de substratos para Complexo I e de EGTA 300 μM. Foram utilizados ADP 300 μM para estimular a fosforilação oxidativa (estado 3), Oligomicina 1 μg/mL para inibição da ATP sintase, FCCP 0,5 μM para desacoplamento (velocidade máxima de respiração), Rotenona (Rot) 1 μM para a inibição do complexo I, Succinato (Succ) 10 mM para a estimulação da respiração via complexo II, Antimicina A 1 μM (AA) para inibição do complexo III e TMPD 200 μM e Ascorbato 20 mM para estimulação da respiração via complexo IV. **Painel A:** Velocidades de consumo de Oxigênio (pmol O<sub>2</sub>/s/mg proteína). **Painel B:** Controle respiratório (estado 3/estado 4). **Painel C:** Gráfico representativo das condições descritas para o Painel A. Valores são apresentados como média ± e.p.m. (n = 6).



**Figura 5. Atividade de citocromo c oxidase (mU/mg de proteína) com idade inicial dos animais e duração dos tratamentos.** Foram adicionadas cerca de 10  $\mu$ g de proteína total de homogenato de fígado em tampão de ensaio contendo citocromo c 1  $\mu$ M reduzido por DTT 0,5 mM. A redução nos valores de absorbância devido à oxidação do ferrocitocromo c a ferricitocromo c foi monitorada em 550 nm em espectrofotômetro Shimadzu termostaticado a 25 °C. Os dados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n = 3-5) para *Wistars* jovens (9-12 semanas) e *Wistars* de meia idade (12-15 meses). Valores de *p*-value estão indicados quando há diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *t-Student*).



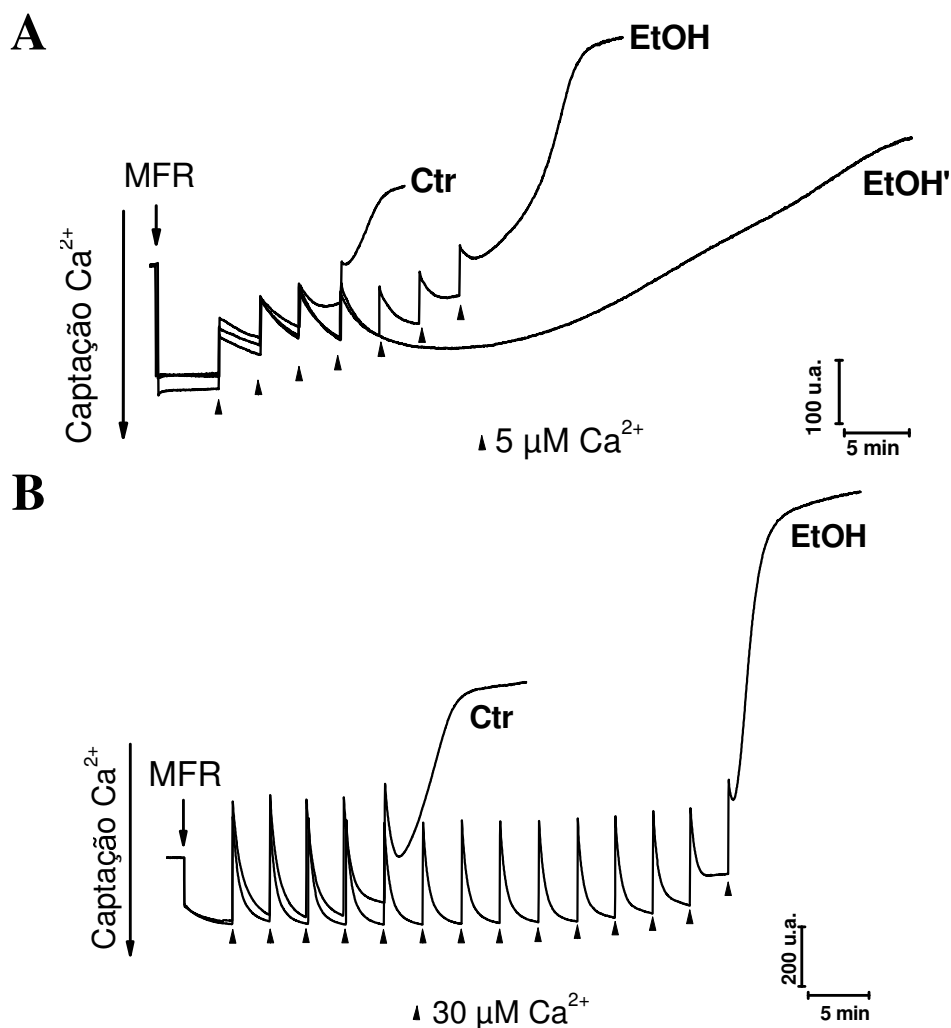
**Figura 6. Western Blotting para quantificação de COX4 em homogenato de fígado de animais jovens tratados durante 6 semanas com etanol.** Após separação eletroforética em gel de poliacrilamida 15%, a membrana foi incubada com anticorpo primário anti-COX4 (1:500) e anti- piruvato desidrogenase (1:1000). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-mouse (1:5000) e anti-rabbit (1:2000), ambos conjugados à HRP, e revelada em módulo de quimioluminescência em fotodocumentar de géis (n = 6).

#### 4.2.3. Captação e retenção de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )

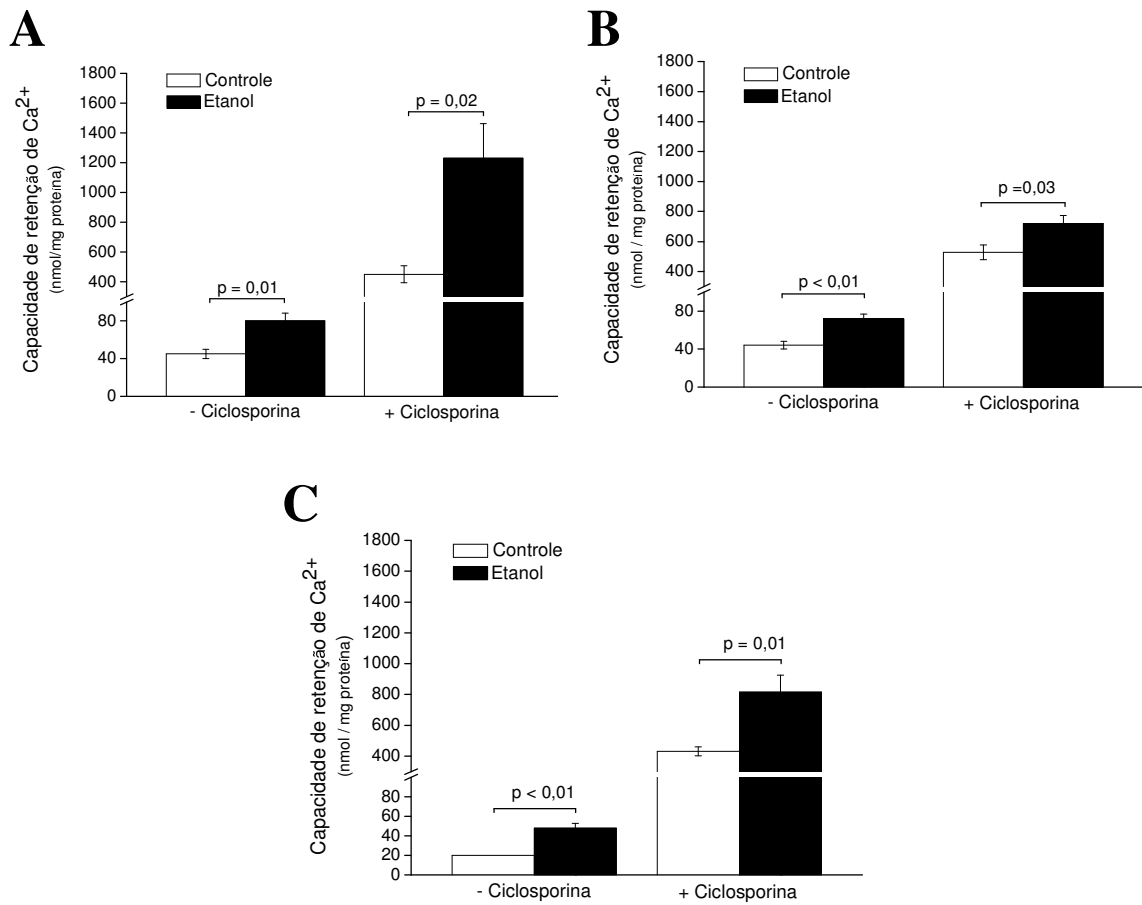
Avaliou-se a capacidade de captação e de retenção *in vitro* de mitocôndrias hepáticas isoladas, com adições consecutivas de cálcio, na presença e na ausência de ciclosporina A (inibidor da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial).

Os perfis de captação e de retenção de cálcio foram idênticos em todos os períodos de tratamento analisados.

As mitocôndrias dos animais tratados com etanol (**Figura 7A, linha EtOH**) suportaram maior número de adições consecutivas de  $\text{Ca}^{2+}$  em relação às mitocôndrias do animal controle (**Figura 7A, linha Ctr**) ou retiveram por tempo muito maior o cálcio captado (comparar as **linhas Ctr e EtOH** da **Figura 7A**). Na presença de ciclosporina A, inibidor da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, também houve aumento na capacidade de retenção de cálcio, mantendo a diferença entre os dois grupos (**Figura 7B, linhas Ctr e EtOH**). Os perfis de captação e retenção de cálcio, na ausência ou presença de ciclosporina, também foram similares em todos os protocolos de tratamento com etanol realizados.



**Figura 7. Aumento na retenção de cálcio em mitocôndrias de animais tratados com etanol.** Mitocôndrias hepáticas de rato (MFR) (0,5 mg/mL) foram adicionadas em meio de reação padrão contendo substratos para o complexo respiratório I e *Calcium Green* 0,2 μM. **Painel A:** Na presença de cálcio (10 μM), a captação Ca<sup>2+</sup> pelas mitocôndrias do controle (**Ctr**) e do tratado com etanol (**EtOH**) após adições consecutivas de 5 μM desse cátion. A **linha ETOH'** representa maior tempo de liberação de cálcio pelas mitocôndrias do animal tratado com etanol (**comparar com Ctr**). **Painel B:** Na presença de ciclosporina A 1 μM e de cálcio 10 μM, mitocôndrias do controle (**Ctr**) e do tratado com etanol (**EtOH**) após adições consecutivas de 30 μM de cálcio. Perfis similares foram verificados em todos os períodos de tratamento com etanol. O gráfico é representativo de n ≥ 4.



**Figura 8. Aumento na quantidade de cálcio acumulado em mitocôndrias de ratos tratados com etanol .** Quantidade (pmol/ mg de proteína mitocondrial) de cálcio acumulado considerado até o *setpoint* (ponto de equilíbrio entre a liberação e a captação desse cátion). **Painéis A, B e C:** tratamento de 36 semanas com etanol em ratos jovens (**Painel A**) e de 2 semanas e 12 semanas em ratos de meia idade (**Painéis B e C**, respectivamente) . Nos outros períodos de tratamento houve o mesmo perfil de captação de cálcio na ausência ou presença de ciclosporina. Diferenças estatísticas significativas estão indicadas (n = 4-5).



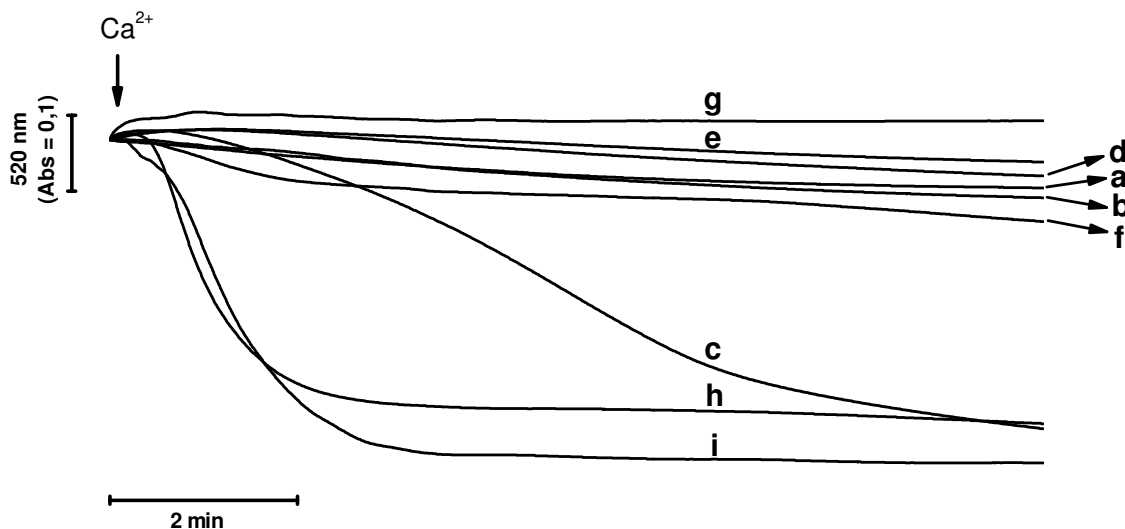
Nas **Figuras 8A, 8B e 8C** são apresentados os dados de cálcio acumulado pelas mitocôndrias dos animais controle e tratados com etanol, na presença e ausência de ciclosporina, em alguns dos protocolos de tratamento, como indicado nas figuras citadas.

Em resumo, os resultados da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  indicaram que as mitocôndrias isoladas de animais tratados com etanol apresentaram maior capacidade de retenção de cálcio, ou seja, foram menos susceptíveis à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial em todos os protocolos analisados.

#### **4.2.4. Inchamento mitocondrial (Transição de Permeabilidade Mitocondrial) e estado redox de nucleotídeos de piridina**

Os experimentos de inchamento mostram que as mitocôndrias dos animais tratados com etanol, em todos os períodos de tratamento analisados, estão menos suscetíveis à transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (**Figura 9**). Na presença de cálcio do próprio de meio de reação ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ) e de substratos para o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, não houve diferença na suscetibilidade à TPM entre as mitocôndrias dos animais controle (**Figura 9, linha a**) e as dos animais tratados com etanol (**Figura 9, linha b**). Entretanto, quando submetidas à concentração de  $30 \mu\text{M}$  de cálcio, as mitocôndrias dos animais tratados com etanol (**Figura 9, linha d**) são menos suscetíveis à TPM induzida por cálcio que as do grupo controle (**Figura 9, linha c**). A maior suscetibilidade à TPM induzida por cálcio nas mitocôndrias do grupo controle foi revertida na presença de ciclosporina A (**Figura 9, linha e**).

Quando na presença de rotenona e de succinato (Coelho et al., 1980) e de Cálcio  $30 \mu\text{M}$ , as mitocôndrias do grupo controle (**Figura 9, linha f**) e tratados com etanol (**Figura 9, linha g**) mantiveram-se protegidas da TPM induzida por cálcio.



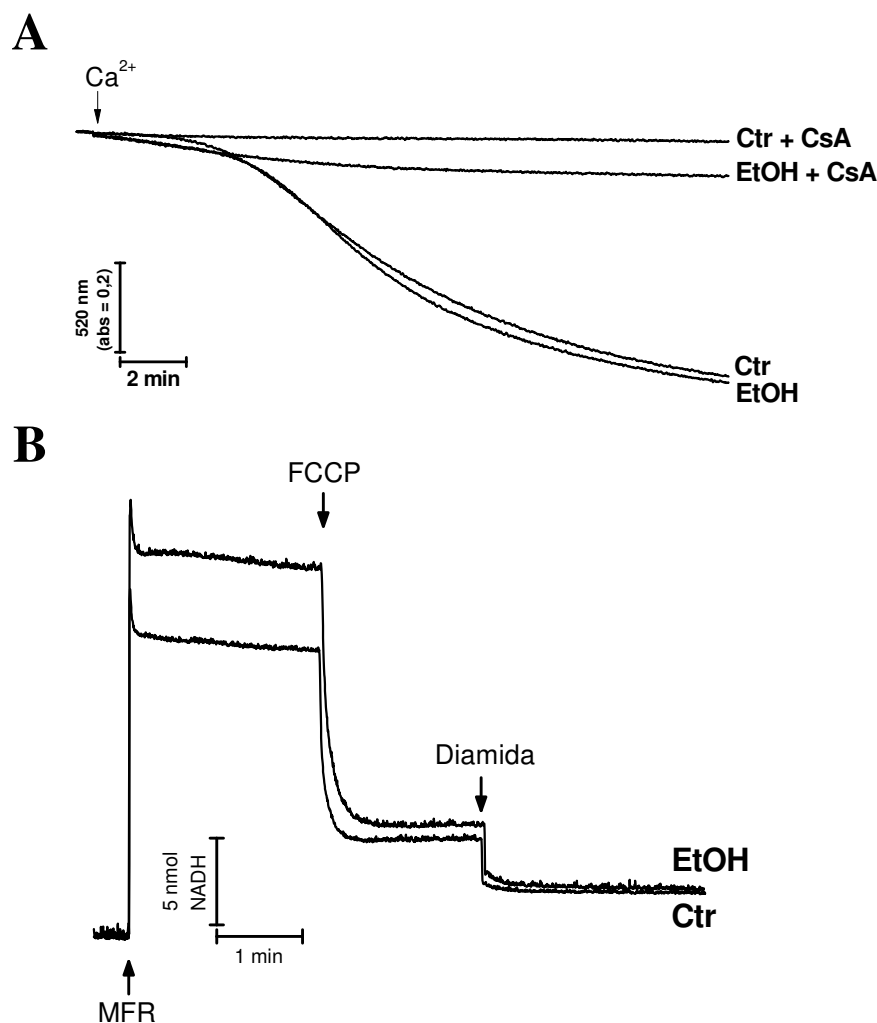
**Figura 9. Menor suscetibilidade de transição de permeabilidade mitocondrial em animais tratados com etanol.** Mitocôndrias hepáticas (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão com substratos para complexos respiratórios I ou II. **Linhas a e b** mostram, respectivamente, as mitocôndrias do animal controle e do animal tratado com etanol na presença de cálcio 10  $\mu\text{M}$ . **Linhas c e d**, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  30  $\mu\text{M}$ , para mitocôndrias do controle e do tratado, respectivamente. Na presença de ciclosporina A 1  $\mu\text{M}$  e de cálcio, é mostrado o controle (**linha e**). Com succinato e rotenona, na presença de cálcio 30  $\mu\text{M}$ , estão o controle (**linha f**) e o tratado com etanol (**linha g**). Na presença de diamida 500  $\mu\text{M}$  e de  $\text{Ca}^{2+}$  30  $\mu\text{M}$ , estão o controle (**linha h**) e tratado (**linha i**). O gráfico é representativo de  $n \geq 4$ .

Os resultados de transporte de cálcio apresentados na **Figura 7**, estão em concordância com os experimentos de inchamento mitocondrial, que comprovaram que o tratamento com etanol tornou as mitocôndrias menos sensíveis à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Como pode ser observado, o inchamento foi maior nas mitocôndrias dos animais controle. Na presença de diamida, agente oxidante de NAD(P)H e de grupamentos tiólicos (Oliveira et al., 2005), e de cálcio, desapareceu a diferença entre os dois grupos (**Figura 9, linhas h e i**, controle e tratado com etanol, respectivamente), isto é, ficam com a mesma suscetibilidade à abertura do poro de transição.

Essa última condição, na presença de diamida, sugeria que a diferença em relação à TPM poderia estar relacionada ao estado redox de nucleotídeos de piridina, uma vez que, quando esses se encontravam no estado completamente oxidado, pela presença de diamida (oxidando GSH e levando à oxidação de NADH e NADPH), havia a mesma suscetibilidade à TPM nos dois grupos pesquisados.

Inicialmente, utilizamos diamida como agente para a oxidação indireta dos nucleotídeos de piridina via oxidação de GSH. Entretanto, como a diamida não atua somente sobre GSH, mas sobre grupamentos tiólicos em geral, decidimos utilizar mitocôndrias desacopladas pelo protonóforo FCCP (**Figura 10A**) e avaliar o processo de transição de permeabilidade mitocondrial nessa condição. Contudo, como tínhamos mitocôndrias desacopladas, a entrada de cálcio somente foi possível pela presença de um ionóforo de cálcio (calcimicina, A23187).

Em meio de reação padrão contendo substratos para complexo I, FCCP e ionóforo de cálcio, foram adicionadas mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,5 mg/mL) e, após 30 segundos de experimento, foram adicionados 500  $\mu$ M de cálcio ao meio. Durante 20 minutos foi monitorada a variação de absorvância relacionada à transição de permeabilidade induzida por cálcio. Verificamos que, quando os nucleotídeos de piridina estão completamente oxidados, não houve diferença na suscetibilidade à TPM entre as mitocôndrias hepáticas dos animais tratados com etanol (**Figura 10A, EtOH**) em relação às do grupo controle (**Figura 10A, Ctr**). Quando na presença de ciclosporina, houve proteção semelhante entre os dois grupos (**Figura 10A, linhas Ctr + CsA e EtOH + CsA**).



**Figura 10. Efeitos da oxidação de nucleotídeos de piridina na suscetibilidade à TPM na 6ª semana de tratamento com etanol. Painel A:** Transição de permeabilidade mitocondrial em mitocôndrias desacopladas. Mitocôndrias hepáticas (0,5 mg/mL) foram incubadas na presença de substratos para complexo I, FCCP 0,5  $\mu$ M e calcimicina 1  $\mu$ M. Após o início do experimento, foi adicionado Ca<sup>2+</sup> 500  $\mu$ M. **Painel A:** Na ausência (**linhas Ctr e EtOH**) ou presença (**linhas Ctr + CsA e EtOH + CsA**) de Ciclosporina A 1  $\mu$ M, temos as mitocôndrias dos animais controle e as do tratado com etanol, respectivamente. **Painel B:** em condições iniciais idênticas às do **Painel A**, exceto pela ausência de calcimicina, foi adicionado FCCP, dando início à oxidação dos nucleotídeos de piridina, seguido da adição de diamida 500  $\mu$ M, em mitocôndrias dos animais controle (**Ctrl**) e dos animais tratados com etanol (**EtOH**). Os gráficos são representativos de  $n \geq 4$ .

Como constatamos que as mitôndrias de animais que consumiram etanol eram menos suscetíveis à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por cálcio, com aumento significativo na capacidade de retenção desse cátion, decidimos avaliar o estado redox de nucleotídeos de piridina ( $\text{NAD(P)}^+$  e  $\text{NAD(P)H}$ ), bem como sua influência sobre a TPM e sobre a captação de cálcio. Escolhemos a 6ª semana de tratamento para esses experimentos.

Na **Figura 10B**, monitoramos os valores de fluorescência de nucleotídeos de piridina na presença dos mesmos oxidantes utilizados no inchamento mitocondrial, diamida e FCCP (**Figuras 9 e 10A**, respectivamente).

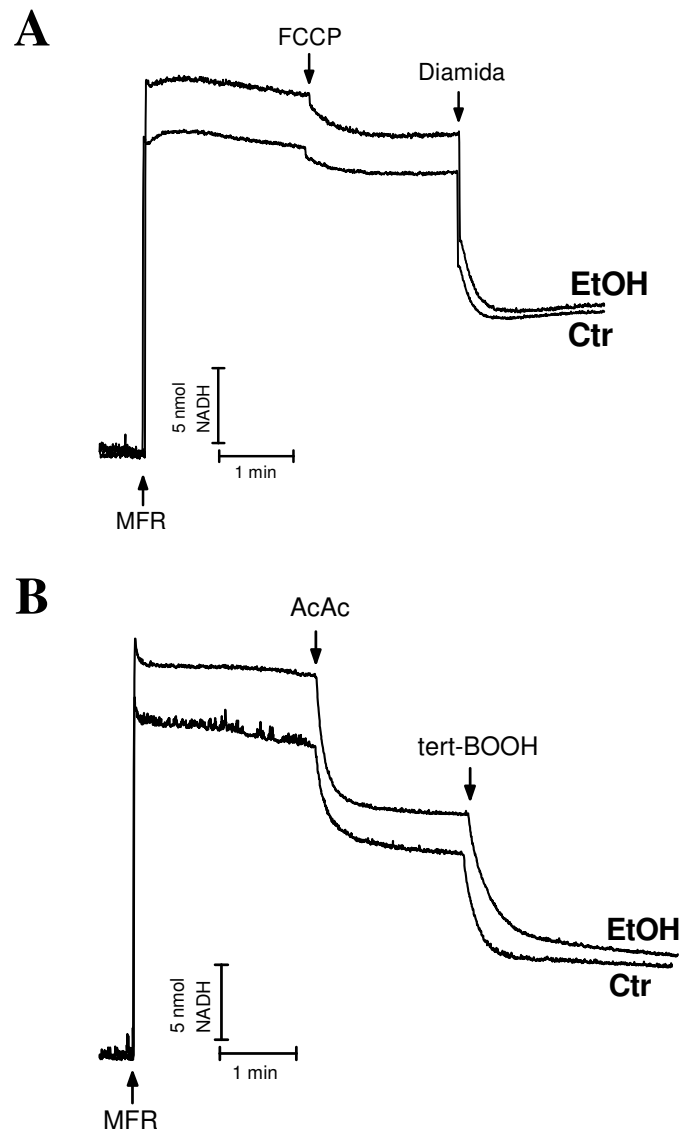
Logo após a adição de mitocôndrias ao meio de reação padrão, contendo substratos energéticos doadores de elétrons para o complexo I, notamos uma diferença entre os dois grupos pesquisados, com um valor mais elevado de fluorescência inicial nas mitocôndrias dos grupos tratados com etanol (**Figura 10B, EtOH**) em relação às do controle (**Figura 10B, Ctr**). Em seguida, foi adicionado FCCP ao meio, oxidando os nucleotídeos de piridina e, praticamente, igualando os valores de fluorescência entre os dois grupos. Por fim, foi adicionada diamida para completar a oxidação de nucleotídeos de piridina via depleção de GSH.

Na **Figura 11**, após a adição de mitocôndrias hepáticas isoladas ao meio de reação padrão contendo substratos doadores de elétrons para os complexos I e II (malato, piruvato e succinato, em concentrações equimolares de 5 mM) e de rotenona, adicionamos FCCP e notamos uma pequena redução no valor de fluorescência devido, provavelmente, à mudanças estruturais derivadas do colapso do potencial de membrana mitocondrial. Entretanto, nota-se uma variação maior de fluorescência nas mitocôndrias de animais tratados com etanol (**Figura 11A, EtOH**) em relação às do controle (**Figura 11A, Ctr**). Após a adição de FCCP, adicionou-se diamida para promover a oxidação de nucleotídeos de piridina via oxidação de GSH. Os resultados mostram que houve uma variação maior de fluorescência nas mitocôndrias dos ratos tratados com etanol (**Figura 11A, EtOH**), igualando os valores de fluorescência aos valores das mitocôndrias do grupo controle (**Figura 11A, Ctr**), mostrando que há diferença no estado redox de nucleotídeos de piridina.

Com a finalidade de promover uma oxidação mais específica para esses nucleotídeos, utilizamos dois outros agentes oxidantes (acetoacetato e tert butil

hidroperóxido) (**Figura 11B**). Após a adição de mitocôndrias em meio contendo succinato 5mM e rotenona 1  $\mu$ M, foi feita a adição de acetoacetato para que ocorresse a oxidação de NADH a  $\text{NAD}^+$  via conversão de acetocetato a beta hidróxi-butirato ( $\beta$ -OH). Notamos que houve uma variação maior de fluorescência nas mitocôndrias dos animais tratados com etanol (**Figura 11B, EtOH**) em relação às do controle (**Figura 11B, Ctr**), indicando maior quantidade de NADH presente. Em seguida, foi feita a adição de tert butil hidroperóxido com a finalidade de oxidar NADPH via detoxificação do hidroperóxido pela enzima glutathione peroxidase, que utiliza NADPH como doador de elétrons para reduzir glutathione oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH). Observamos o mesmo efeito na variação de fluorescência, relacionada diretamente à quantidade de nucleotídeos de piridina, com amplitude maior nas mitocôndrias dos animais tratados com álcool (**Figura 11B, EtOH**) em relação às do grupo controle (**Figura 11B, Ctr**). Esse resultado sugeria aumento também na quantidade de NADPH em mitocôndrias tratadas com etanol.

Uma vez que verificamos que as mitocôndrias isoladas de fígado de ratos tratados com etanol tinham alterações no estado redox de nucleotídeos de piridina, decidimos avaliar, em condição de estado redox completamente reduzido, como se comportaria a captação de cálcio pelas mitocôndrias, pois ainda poderia haver uma diferença na quantidade desses nucleotídeos, além da mudança de estado redox verificada. Com esse propósito, fizemos os experimentos da **Figura 12**.



**Figura 11. Oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias de animais tratados por 6 semanas com etanol.** Em meio de reação padrão, com agitação constante, foram adicionadas mitocôndrias (0,5 mg/mL). **Painel A:** na presença de malato 5 mM, piruvato 10 mM, succinato 5 mM e rotenona 1 $\mu$ M, foram adicionados FCCP 0,5  $\mu$ M e Diamida 500  $\mu$ M, em mitocôndrias dos animais controle (**Ctrl**) e dos animais tratados com etanol (**EtOH**). **No painel B,** na presença de succinato 5 mM e de rotenona 1  $\mu$ M, foram adicionados acetoacetato 1mM e tert-butil hidroperóxido 100  $\mu$ M, para oxidação de NADH e de NADPH em mitocôndrias dos animais controle (**Ctrl**) e dos animais tratados com etanol (**EtOH**). Os gráficos são representativos de  $n \geq 4$ .

Em meio de reação padrão contendo malato, piruvato e succinato na presença de rotenona, foram adicionadas mitocôndrias hepáticas isoladas dos animais controle (**Figura 12, Ctr**) e dos que ingeriram etanol (**Figura 12, EtOH**). Em seguida, foram adicionados beta hidróxi-butilato ( $\beta$ -OH) e isocitrato (Isoc). O primeiro gerará NADH a partir de estimulação da atividade da enzima beta hidróxi-butilato desidrogenase e o segundo estimulará a atividade enzimática da isocitrato desidrogenase, gerando NADH e NADPH. Essas adições tiveram a finalidade de garantir que os nucleotídeos de piridina estavam no estado redox completamente reduzido, ou seja, não deveria haver alteração significativa nos valores de fluorescência após as adições descritas, conforme foi observado.

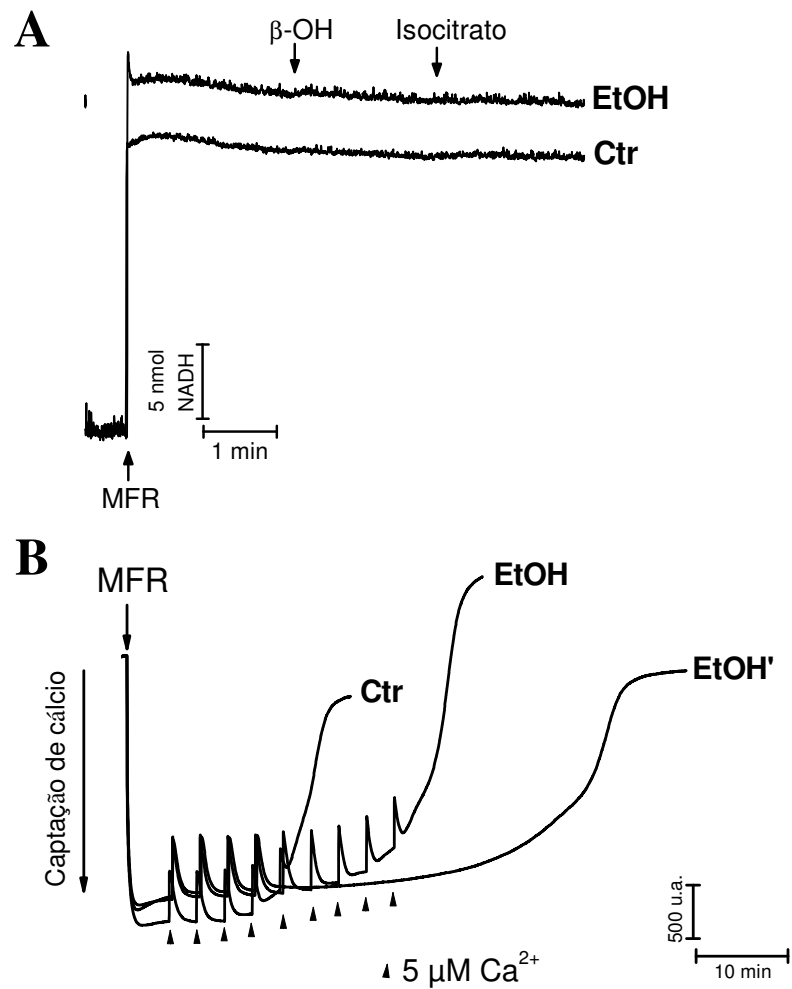
Uma vez comprovado o estado completamente reduzido de  $\text{NAD(P)}^+$ , fizemos o experimento de retenção de cálcio (**Figura 12B**) nas condições descritas para o experimento de estado redox (**Figura 12A**). Nessas condições, verificamos o mesmo perfil de captação e de retenção de cálcio apresentado e descrito anteriormente para a **Figura 7A**. Como não havia diferença quanto ao estado redox dos nucleotídeos de piridina, pois estavam completamente reduzidos, esse dado indicou aumento na quantidade de nucleotídeos na forma reduzida nas mitocôndrias dos animais tratados com etanol.

#### **4.2.5. Quantificação de nucleotídeos de piridina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Fizemos vários experimentos modulando o estado redox de nucleotídeos de piridina e verificando o efeito sobre a transição de permeabilidade mitocondrial e sobre a capacidade de captação de cálcio. Entretanto, houve a necessidade de quantificar os nucleotídeos de piridina em mitocôndrias isoladas para avaliar o estado redox e a razão entre as formas oxidadas ( $\text{NAD(P)}^+$ ) e as reduzidas ( $\text{NAD(P)H}$ ), bem como seus conteúdos totais.

Com esse objetivo, utilizando um cromatógrafo líquido com detector de fluorescência, detectamos e quantificamos os nucleotídeos de interesse citados.





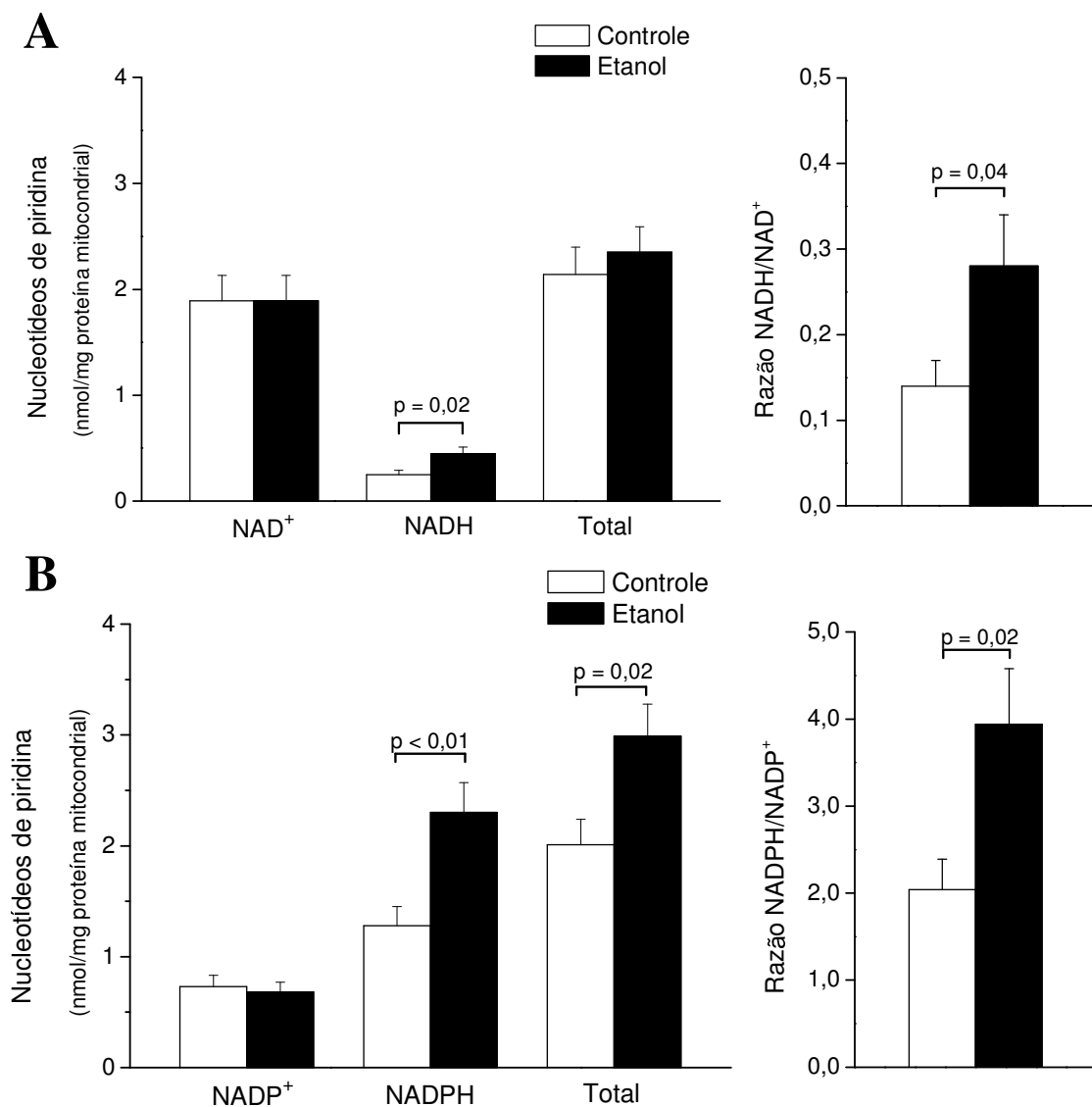
**Figura 12. Efeito do estado redox de nucleotídeos de piridina na retenção de cálcio em animais jovens tratados com etanol durante 6 semanas .** Em meio de reação padrão, com agitação constante, foram adicionadas mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,5 mg/mL). **Painel A:** na presença de malato 5 mM, piruvato 10 mM, succinato 5 mM e rotenona 1 $\mu$ M , foram adicionados beta hidróxi-butirato ( $\beta$ -OH) 5mM e isocitrato (Isoc) 1 mM, em mitocôndrias dos animais controle (**Ctr**) e dos animais tratados com etanol (**EtOH**). **Painel B:** nas mesmas condições experimentais iniciais do **Painel A**, na presença de *Calcium Green* 0,2  $\mu$ M, foram adicionadas mitocôndrias dos animais controle (**Ctr**) e dos animais tratados com etanol (**EtOH**), com adições consecutivas de 5  $\mu$ M de cálcio. A **Linha EtOH'** representa maior tempo de retenção de cálcio pelas mitocôndrias do animal tratado com etanol (**comparar com Ctr**). Os gráficos são representativos de  $n \geq 4$ .

Na **Figura 13**, podemos observar que há aumento na quantidade de NADH e de NADPH, bem como no total de  $\text{NADP}^+ + \text{NADPH}$ . Há aumento também nas duas razões entre as formas oxidadas e reduzidas ( $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  e  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ ). O poder redutor elevado aumenta a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias (Lehninger et al., 1978; Macedo et al., 1998; Zago et al., 2000). Além disso, o aumento na capacidade de captação de cálcio pelas mitocôndrias hepáticas dos animais tratados com etanol, possibilita menor suscetibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial, condição verificada e apresentada na **Figura 9**.

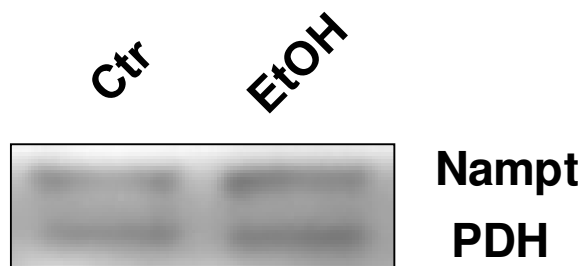
#### 4.2.6. Detecção do conteúdo protéico total de Nampt

Uma vez comprovado o aumento na quantidade de nucleotídeos de piridina pelas análises cromatográficas, avaliamos, através de *Western Blot*, o conteúdo proteico total da enzima Nampt (nicotinamida fosforibosil transferase), enzima pertencente à via biossintética de  $\text{NAD}^+$ .

Na **Figura 14**, temos as amostras em gel de poliacríamida 15% com a respectiva proteína normalizadora (PDH, piruvato desidrogenase-subunidade E1 $\alpha$ ). Verificamos que não houve diferença no conteúdo protéico de Nampt entre o grupo controle e o tratado com etanol, o que está de acordo com os dados da quantificação nucleotídeos (**Figura 13**), uma vez que não foram significativas as diferenças de  $\text{NAD}^+$  e de  $\text{NADP}^+$  entre os dois grupos.



**Figura 13. Quantificação de nucleotídeos de piridina, NAD(P)<sup>+</sup> e NAD(P)H, por HPLC, em mitocôndrias hepáticas de animais jovens da 6<sup>a</sup> semana de tratamento com etanol.** Experimentos foram realizados em condições cromatográficas adaptadas de Klaidman et al. (1995). Os dados são apresentados como média ± e.p.m. (n = 8-12). Diferenças estatisticamente significativas estão indicadas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14. Western Blotting para quantificação de Nampt em homogenato de fígado de animais com 6 semanas de tratamento com etanol.** Após separação eletroforética em gel de poliacrilamida 15%, a membrana de PVDF foi incubada com anticorpo primário anti-Nampt (1:1000) e anti-piruvato desidrogenase (1:1000). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à HRP (1:2000) e revelada em módulo de quimioluminescência em fotodocumentar de géis (n = 6).

#### 4.2.7. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Uma vez verificado aumento na quantidade de nucleotídeos de piridina na forma reduzida e aumento na razão NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H, decidimos avaliar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, espécie reativa de oxigênio cuja detoxificação depende, em parte, do estado redox de NADPH, utilizado na regeneração do sistema glutathione redutase/glutathione peroxidase, responsável pela detoxificação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Com o objetivo de avaliar o estado oxidativo em mitocôndrias hepáticas tratadas com etanol, calculamos as velocidades de produção de peróxido de hidrogênio utilizando o fluoróforo AmplexRed®, na presença de peroxidase (**Figura 15**).

Nos **painéis A-C** estão as velocidades de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em animais jovens tratados com etanol durante 2, 6 e 36 semanas, respectivamente, enquanto que no **painel D** estão as mitocôndrias dos animais de meia idade tratados durante 2 semanas. Em todos os protocolos mostrados não houve diferenças estatisticamente significativas nas velocidades de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas condições experimentais utilizadas (com substrato para complexo I ou com succinato mais rotenona, na ausência ou presença de EGTA 100 μM).

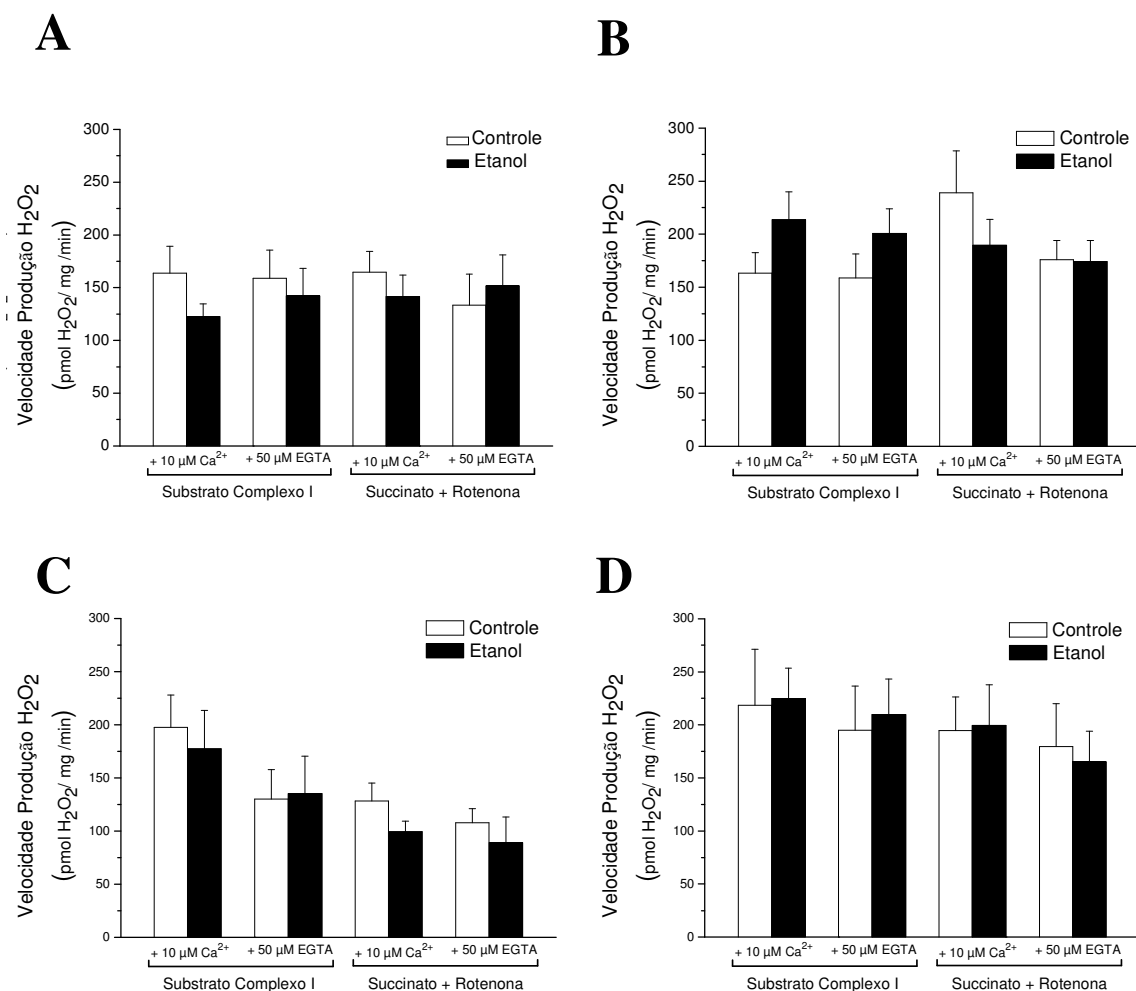
Em resumo, esses dados indicam que as mitocôndrias dos animais tratados com etanol não estão produzindo mais peróxido de hidrogênio que às dos animais controle, ou seja, na estão em uma condição de aumento de estresse oxidativo que envolva H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **4.2.8. Atividade enzimática de glutathiona peroxidase (GPx) e quantificação de glutathiona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH)**

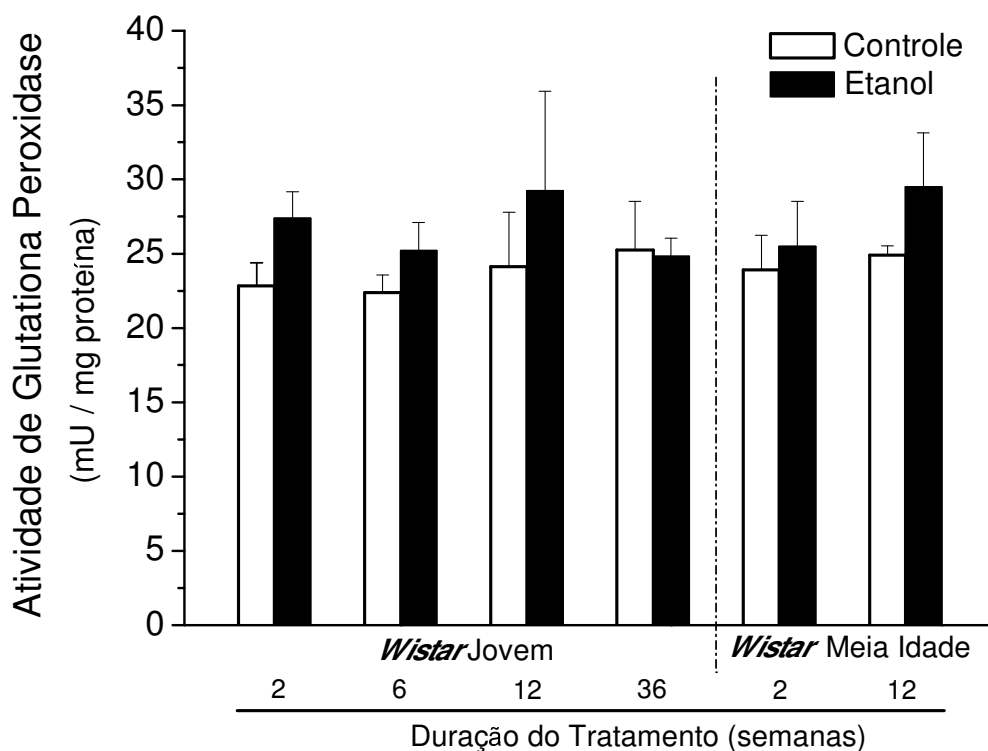
Após a quantificação da produção de peróxido de hidrogênio, ainda havia o questionamento sobre a atividade de glutathiona peroxidase, pois as mitocôndrias dos animais tratados com etanol poderiam ter uma capacidade de detoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais elevada, o que manteria a homeostasia e impedia a elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio mitocondriais. Com o intuito de responder a essa dúvida, realizamos o ensaio enzimático para glutathiona peroxidase (**Figura 16**) e constatamos que não houve diferença significativa na atividade dessa enzima em nenhum dos períodos de tratamento com etanol analisados, tanto para animais jovens, quando para animais de meia-idade.

Entretanto, a atividade de glutathiona peroxidase poderia estar limitada pela falta de substrato necessário (GSH) para a detoxificação de peróxidos. Com a finalidade de responder à essa dúvida, foram dosadas glutathiona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados são mostrados na **Figura 17**.

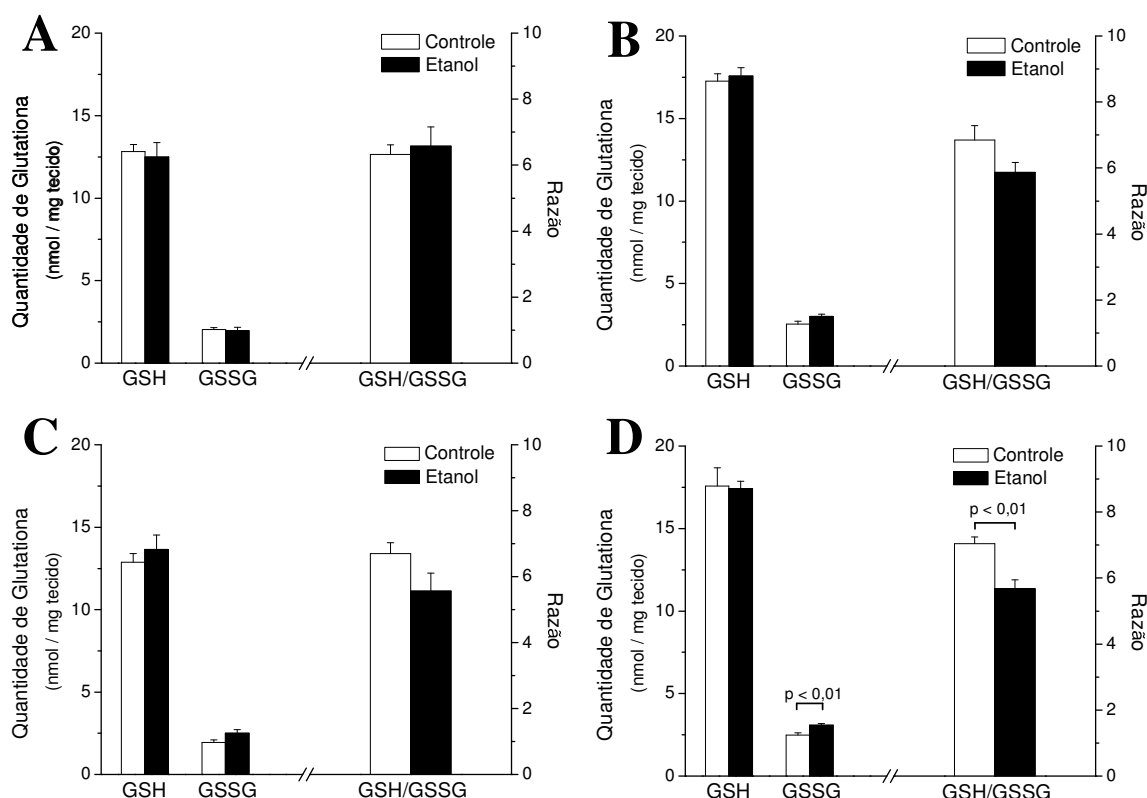
Observamos que não houve alteração nos níveis de GSH e de GSSG ou na razão GSH/GSSG em mitocôndrias hepáticas de animais tratados com etanol, exceto na quantidade de GSSG e na razão GSH/GSSG em animais de meia idade com 2 semanas de tratamento com etanol. Entretanto, devido a serem animais de meia idade, pode haver um efeito somatório de fatores: idade e consumo de etanol. Essa diferença ocorreu apenas no tratamento agudo (2 semanas), retornando aos níveis normais após 12 semanas de tratamento com etanol para animais de meia idade.



**Figura 15. Velocidades de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em mitocôndrias hepáticas de animais tratados com etanol são idênticas às dos controles.** Mitocôndrias de fígado de rato (0,5 mg/mL) foram adicionadas em meio de reação padrão, na presença de Amplex Red® (10 μM) e peroxidase (HRP) (1 U/mL). Foram calculadas as velocidades na presença de substrato para complexo I mitocondrial ou de succinato mais rotenona, na presença cálcio do meio do próprio meio de reação padrão (~10 μM) ou na presença de EGTA 100 μM. Mitocôndrias hepáticas de animais jovens (**Painéis A, B e C**) tratados durante 2, 6 e 36 semanas, respectivamente, ou de animais de meia idade tratados durante 2 semanas (**Painel D**). Os dados são apresentados como média ± e.p.m. (n=4).



**Figura 16. Atividade de glutathione peroxidase (mU/mg de proteína) com idade inicial dos animais e duração dos tratamentos.** Foram adicionadas cerca de 100  $\mu$ g de proteína tecidual hepática total em tampão fosfato dibásico de potássio 100 mM (pH 7,7), EGTA 1 mM,  $\text{NaN}_3$  1 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  250  $\mu$ M, NADPH 150  $\mu$ M, glutathione redutase (GR) 60 mU/mL e glutathione reduzida (GSH) 5 mM. A redução nos valores de absorbância devido à oxidação do NADPH a  $\text{NADP}^+$  foi monitorada em 340 nm em espectrofotômetro Shimadzu termostatizado a 25 °C. Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n = 3-6) para *Wistars* jovens (9-12 semanas) e *Wistars* de meia idade (12-15 meses). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos analisados.

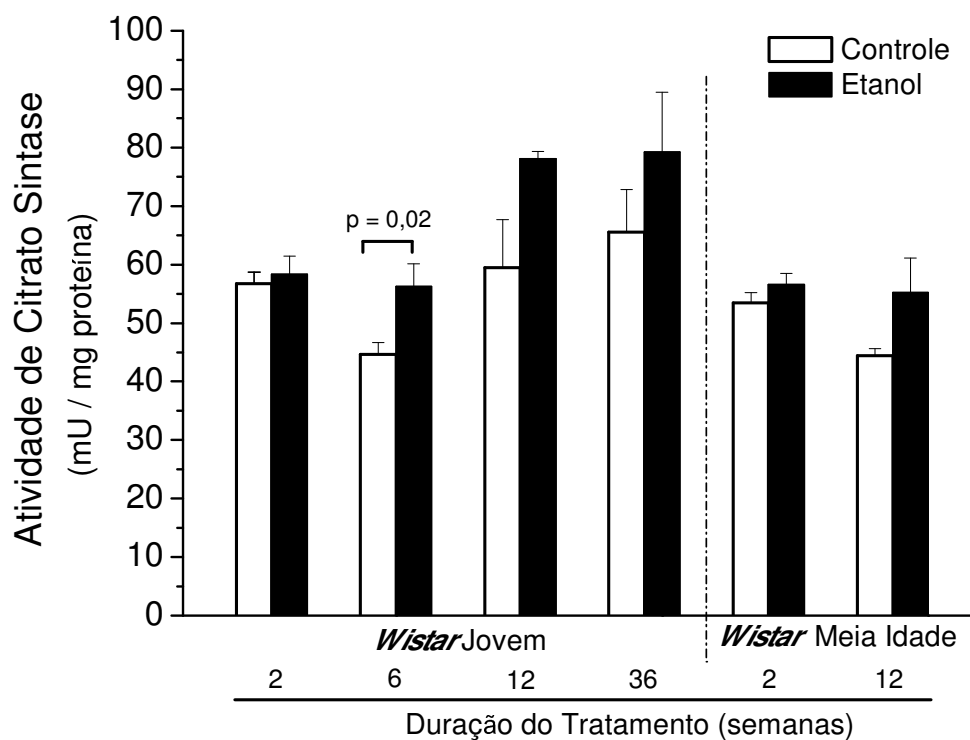


**Figura 17. Quantificação de glutaciona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em UHPLC (nmol/mg de tecido) e razão GSH/GSSG em tecido hepático.** Foram homogeneizados entre 20 e 30 mg de tecido hepático em tampão EDTA 10 mM, NaClO<sub>4</sub> 50 mM e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,01%, seguida a adição de ácido metafosfórico 5 % (v/v). Após centrifugação a 8000 g durante 10 min (4°C), o sobrenadante foi filtrado e injetado em UHPLC Agilent. Foi utilizada coluna cromatográfica Agilent Eclipse Plus C18, RRHD 1.8 μm, 2.1 x 50 mm, acoplada a coluna de guarda com filtro para amostras. A fase móvel utilizada em modo isocrático consistiu de KCl 20 mM (pH 2,5, ajustado com ácido ortofosfórico) com fluxo de 0,3 mL/min, termostatizada a 25 °C. **Painéis A-C:** homogenato hepático de *Wistars* jovens tratados com álcool durante 2, 6 e 36 semanas, respectivamente. **Painel D:** homogenato hepático de *Wistars* de meia idade tratados com álcool durante 2 semanas. Diferenças estatisticamente significativas estão indicadas. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n = 3-5).



#### 4.2.9. Atividade enzimática de citrato sintase

Com o objetivo de verificar se havia o mesmo número de mitocôndrias nos tecidos hepáticos analisados, fizemos o ensaio enzimático de citrato sintase (**Figura 18**) e observamos que, para quase todos os tratamentos estudados, não houve diferença estatisticamente significativa exceto, para as os tecidos hepáticos dos animais jovens com 6 semanas de tratamento, período no qual houve aumento na densidade de mitôndrias por miligrama de proteína hepática total, sugerindo um mecanismo de adaptação em resposta à presença do etanol, com estímulo à biogênese mitocondrial.



**Figura 18. Atividade de citrato sintase (mU/mg de proteína) com idade inicial dos animais e duração dos tratamentos.** Em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), a 30°C, foi monitorada, durante 5 minutos (412 nm), a conversão de DTNB a TNB pela enzima citrato sintase. Cerca de 3,0 µg de proteína total de homogenato de fígado foram utilizadas para o ensaio. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. para *Wistars* jovens (9-12 semanas) e *Wistars* de meia idade (12-15 meses). (n = 3-9).

#### 4.3. Parte C: Efeito do consumo de etanol sobre a quantidade de DNA mitocondrial

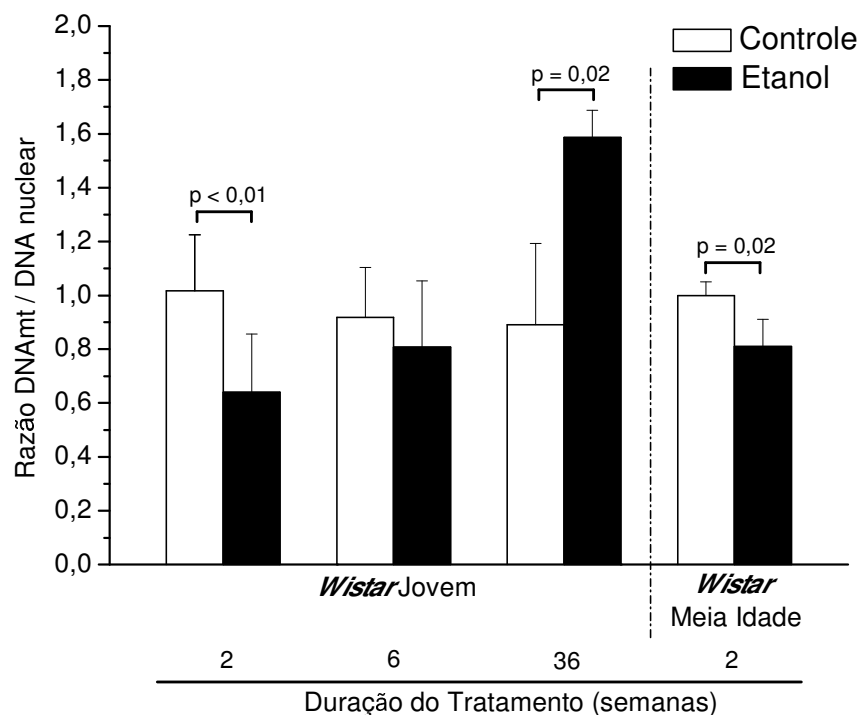
Na terceira parte dessa tese, procuramos caracterizar os efeitos do consumo de etanol sobre o DNA mitocondrial, investigando alterações no número de cópias.

Utilizando PCR quantitativa em tempo real, na presença de *primers* específicos para um gene mitocondrial (COX1) e para um gene nuclear de cópia única (GAPDH), realizamos a amplificação de 20 ng de DNA genômico total obtido a partir da técnica de *salting out* (Miller et al., 1988).

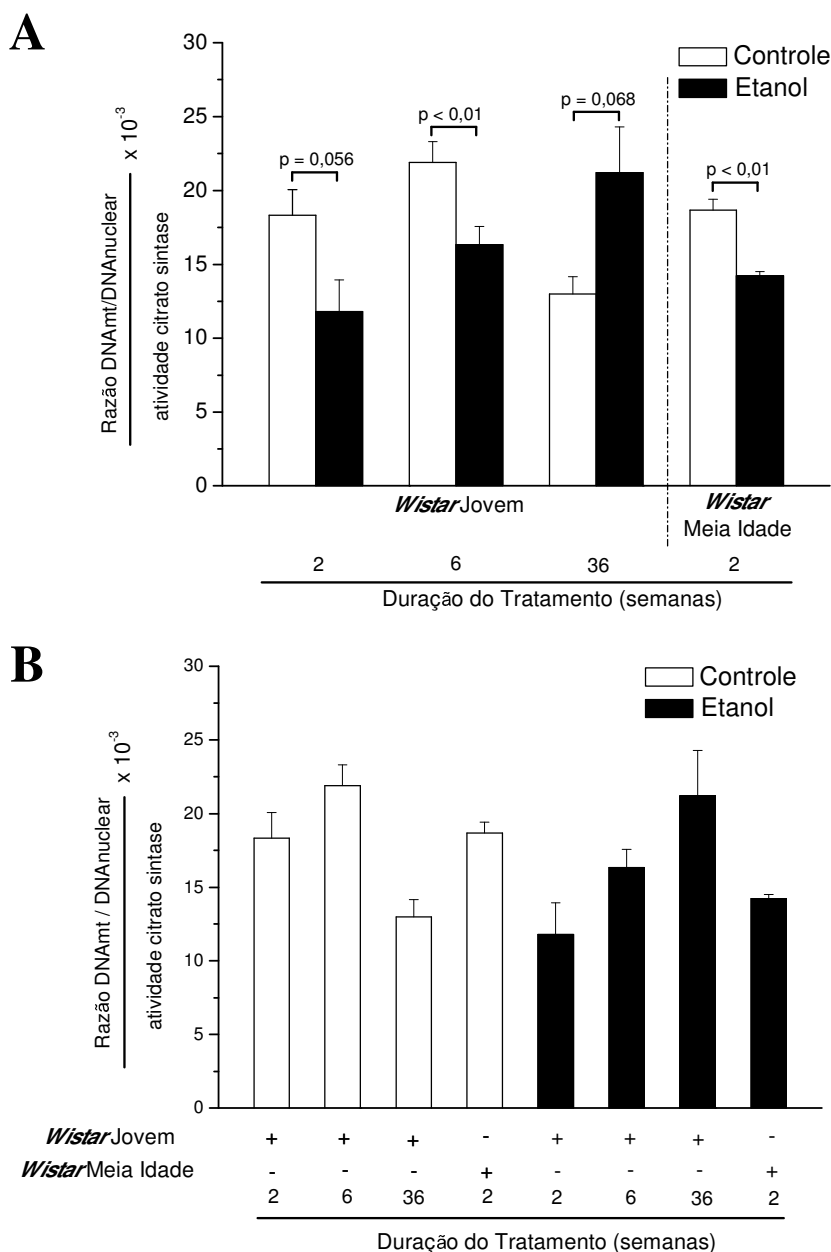
Na **Figura 19** são mostrados os resultados com os valores normalizados da razão entre o DNA mitocondrial e o DNA nuclear.

Podemos observar, em animais jovens e de meia idade, que houve redução na quantidade de DNA mitocondrial na 2ª semana de tratamento com etanol. Entretanto, em animais jovens, a partir da 6ª semana houve o reestabelecimento da quantidade de DNAMt, com aumento significativo em 36 semanas de tratamento com etanol, sugerindo um mecanismo de adaptação da quantidade de DNA mitocondrial em tecido hepático de ratos que consumiram etanol.

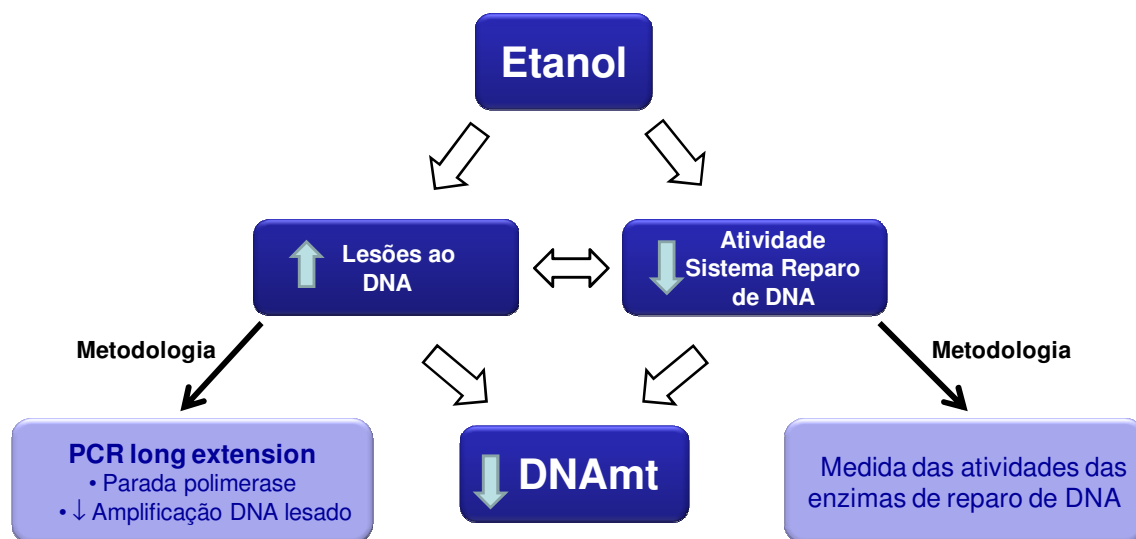
Quando normalizamos a razão entre DNAMt/DNA nuclear da **Figura 19** em relação à respectiva atividade específica de citrato sintase (**Figura 20**), podemos visualizar a variação de DNA em relação à quantidade mitocôndrias presentes. Nota-se que na 6ª semana de tratamento, mesmo como o aumento na atividade de citrato sintase, tivemos uma quantidade menor de DNA mitocondrial presente no tecido hepático de ratos tratados com etanol. Na **Figura 20B**, temos os mesmos resultados da **Figura 20A**, porém com a separação entre os grupos controle e tratados com etanol aguda e cronicamente, com a finalidade permitir uma melhor visualização do aumento tempo-dependente de DNA mitocondrial em relação ao conteúdo de mitocôndrias em animais jovens tratados com etanol.



**Figura 19. Razão normalizada DNAmitocondrial / DNAnuclear.** O DNA total de tecido hepático, obtido pelo método de *salting out*, foi amplificado em PCR quantitativa em tempo real, utilizando *SYBR Green*, 20 ng de DNA total e 200 nM de *primers* específicos para COX1 (mitocondrial) e GAPDH (nuclear). Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. (n = 3-11).



**Figura 20. Razão normalizada entre a razão de DNAm/DNA nuclear por atividade de citrato sintase. Painel A:** Os valores da razão DNAm/DNA nuclear apresentados na **Figura 18** foram normalizados pela respectiva atividade de citrato sintase. **Painel B:** os resultados apresentados no **painel A** foram separados entre os grupos controles e tratados com etanol para visualização da resposta adaptativa no aumento do conteúdo de DNA em relação à quantidade de mitocôndrias, em função do tempo de tratamento. Os valores são apresentados como média  $\pm$  e.p.m. ( n = 3-9).



**Figura 21. Mecanismo proposto para a redução de DNA mitocondrial no tratamento com etanol.** O etanol pode aumentar o número de lesões ao DNA ou reduzir a atividade do sistema de reparo de DNA. Em ambos os casos, haveria redução na quantidade de DNAmT devido ao acúmulo de lesões. Para verificação do aumento na quantidade de lesões ao DNAmT pode ser utilizada a *PCR long extension* e para avaliar a redução no sistema de reparo podem ser mensuradas as atividades das enzimas envolvidas no reparo de DNA.

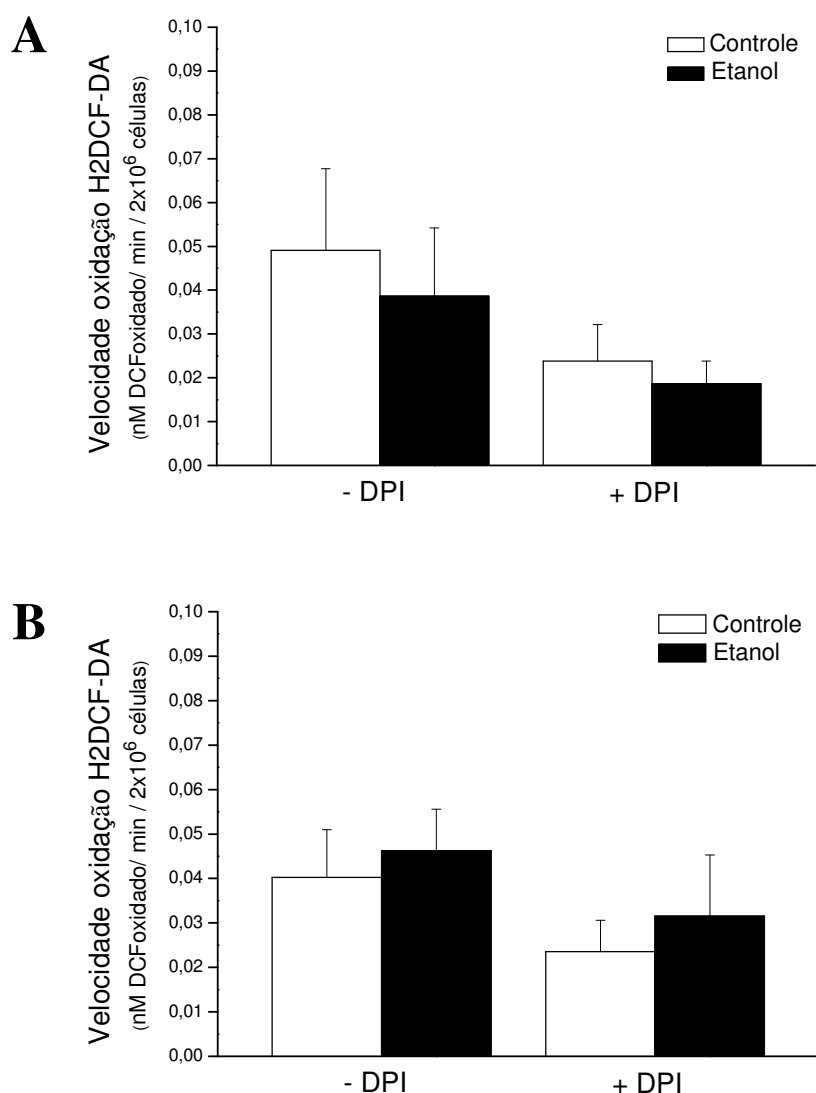
#### 4.4. **Parte D: Efeito do consumo de etanol sobre a produção de EROs em linfócitos esplênicos**

Na quarta parte dessa tese, apresentamos os resultados relacionados ao estado redox de linfócitos esplênicos isolados. Foi escolhido esse modelo celular por não são serem células que têm por função primária metabolizar etanol ou outros xenobióticos, como os hepatócitos, dos quais foram isoladas as mitocôndrias utilizadas nos experimentos da **Parte B** dessa tese.

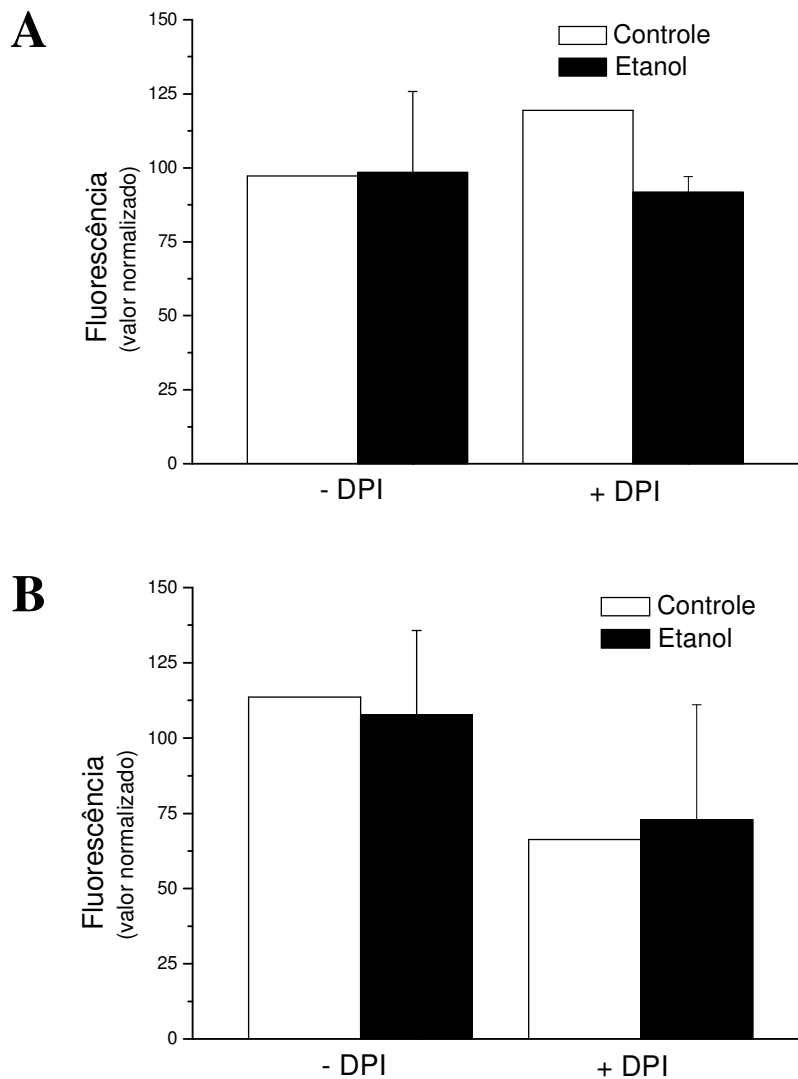
Na **Figura 22**, podemos observar que não houve alterações na velocidade de oxidação do fluoróforo H<sub>2</sub>-DCFDA, tanto na ausência ou presença de DPI, inibidor de flavoproteínas, dentre as quais está a NADPH oxidase. O H<sub>2</sub>-DCFDA é um fluoróforo inespecífico, com alta taxa de autooxidação. Entretanto, tem sido relatada sua relativa especificidade para a detecção de estresse oxidativo envolvendo enzimas lisossomais (Karlsson et al., 2010).

Como a enzima NADPH oxidase está envolvida na produção de radical ânion superóxido, realizamos os experimentos com linfócitos isolados avaliando a produção desse radical, empregando o fluoróforo MitoSox, em experimentos de citometria de fluxo. Esses resultados são apresentados na **Figura 23**.

Podemos observar que não houve alterações significativas na produção de superóxido em linfócitos esplênicos de animais tratados com etanol em relação aos seus respectivos grupos contoroles, na ausência ou presença de DPI.



**Figura 22. Velocidades de oxidação de H<sub>2</sub>DCFDA em linfócitos esplênicos de rato.** Linfócitos esplênicos ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram adicionados em tampão fosfato PBS (pH 7,4; 37 °C) com H<sub>2</sub>-DCF-DA 4  $\mu$ M. Velocidades de oxidação do na ausência e presença de DPI 5  $\mu$ M em linfócitos de animais do grupo controle e do grupo tratado com etanol em animais jovens. **Painel A:** 2<sup>a</sup> semana de tratamento com etanol. **Painel B:** 6<sup>a</sup> semana de tratamento com etanol. Experimentos com linfócitos realizados em fluorímetro Hitachi F-4010. Os dados são apresentados como média  $\pm$  d.p.m. (n = 4). Não houve diferença estatística significativa.



**Figura 23. Produção de ânion superóxido em linfócitos esplênicos de rato.** Linfócitos ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram adicionados em meio RPMI com MitoSox Red  $5 \mu\text{M}$  e incubados por 10 min em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , na ausência ou presença de DPI  $5 \mu\text{M}$ . A fluorescência foi monitorada no canal FL-2 (510 nm para excitação e 580 nm para emissão) de citômetro de Fluxo FACSCalibur. **Painel A:** 2ª semana de tratamento com etanol. **Painel B:** 6ª semana de tratamento com etanol. Os dados são apresentados como média  $\pm$  d.p.m. ( $n = 4$ ). Não houve diferença estatística significativa.



## *5. Discussão*



Na primeira parte desse trabalho, avaliamos parâmetros relacionados ao consumo de ração e de líquidos pelos animais estudados e como esses parâmetros influenciaram no ganho de massa corpórea (**Figura 1**). Houve redução no consumo de líquidos e de ração (**Figuras 2 e 3**, respectivamente). Essa redução pode ser multifatorial e estar relacionada ao conteúdo calórico fornecido pelo etanol na dieta, a alterações na secreção de insulina (Cha et al., 2000), neuropeptídeos Y (Thiele e Badia-Elder, 2003) ou de vias metabólicas (Lefèvre et al., 1970; Rodrigo et al., 1971; Bunout, 1999; Lieber, 2003; Aagaard et al., 2004) e, inclusive, à um processo de desidratação, inerente ao consumo de etanol.

Outros grupos já relataram que animais que consumiram etanol tiveram menor ganho de massa corpórea (Strbak et al., 1998, Griffith e Schenker, 2006; Petitpas et al., 2013). O *déficit* calórico relacionado ao menor consumo de ração é compensado pela ingestão de etanol. O etanol é capaz de gerar 7,1 Kcal/g (Lieber, 1997). O metabolismo do etanol pode fornecer energia utilizável pela célula através da geração de citrato a partir do acetato produzido durante a biotransformação do etanol. Essa via envolve: (a) a participação da aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2), (b) a conversão de acetato a acetil-CoA e (c) a reação de condensação de oxaloacetato a acetil-CoA para a formação de citrato, primeiro componente do ciclo do ácido cítrico (Mitchell e Herlong, 1986). O uso do termo “caloria vazia” para o etanol se refere ao fato de possuir calorias que não estão associadas a nutrientes essenciais, como vitaminas e minerais.

Outro fator a ser considerado está relacionado ao estado nutricional dos consumidores de etanol, sejam animais de experimentação ou humanos. O consumo de etanol pode estar associado à má absorção de nutrientes, principalmente de aminoácidos e de vitaminas, potencializando o efeito do etanol no organismo (Mezey, 1980; Leevy e Moroianu, 2005; Wagnerberger et al., 2012). A absorção ou digestão inadequada de nutrientes essenciais compromete suas biodisponibilidades. No caso de *déficit* de aminoácidos essenciais, a síntese protéica pode ficar comprometida e no caso de *déficit* de vitaminas, vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos podem ter alterações significativas (Lieber, 2003).

Utilizando a dieta estabelecida por Lieber-DeCarli (Lieber et al., 1982), Rodrigo e colaboradores (1971) mostraram que havia perda significativa de nitrogênio na urina, mas

não nas fezes, de ratos tratados com etanol. Esse dado indicou uma desregulação no metabolismo de proteínas via aumento na excreção de nitrogênio, fator importante a ser considerado no ganho e/ou perda de massa corpórea pelos animais. O consumo crônico de etanol pode levar a deficiências nutricionais, entretanto, mesmo em condições de dieta adequada, verifica-se que pacientes com doença hepática alcoólica não utilizam adequadamente os nutrientes disponíveis (Mitchell e Herlong, 1986, Lieber, 2003).

A dieta de Lieber-De Carli (Lieber et al., 1982) é a dieta mais amplamente utilizada para estudos de consumo de etanol. Ela consiste de uma dieta semi-sólida na qual o etanol (~5% v/v) está diluído na presença de carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais. Cabe considerar alguns pontos dessa dieta em comparação à utilizada nessa tese.

O primeiro ponto a ser considerado é que, enquanto o etanol está misturado a outros nutrientes na dieta de Lieber-DeCarli, a dieta utilizada nessa tese mantém os nutrientes essenciais presentes na ração separados da solução contendo etanol. Isso pode ter um efeito crucial na biodisponibilidade desses nutrientes para os animais, podendo interferir diretamente no estado nutricional deles. Além disso, para que haja a compensação da quantidade de calorias na dieta de Lieber-DeCarli, dobra-se o conteúdo total de lipídeos presente nessa dieta. Entretanto, a presença de determinado grupo de lipídeos, como ácidos graxos poliinsaturados, pode potencializar o efeito hepatotóxico do etanol devido ao aumento na peroxidação lipídica (Song et al., 2008). Adicionalmente, trabalho recente (Sharda et al., 2012) mostrou que a dieta de Lieber-DeCarli resultou em níveis elevados de álcool no sangue, com alterações severas no tecido hepático em linhagens de ratos F344 (semelhante ao *Wistar*). Em relação ao conteúdo calórico, o etanol representa 36% da quantidade de calorias dessa dieta, enquanto que na dieta que utilizamos, ele representa cerca de 40%.

Em associação a um provável *déficit* na absorção ou utilização de substratos para vias metabólicas, pode haver prejuízo às vias relacionadas ao metabolismo energético mitocondrial no consumo crônico de etanol. Nesse sentido, avaliamos a respiração mitocondrial na presença de substratos doadores de elétrons para os complexos I, II e IV (**Figura 4**). Verificamos que, em animais que consumiram etanol durante 6 semanas, houve redução na velocidade de consumo de oxigênio por mitocôndrias hepáticas isoladas quando

na presença de substratos para os complexos I e IV. Quando na presença de oligomicina (inibidor da ATP sintase) ou de desacoplador (FCCP) também houve menor consumo de oxigênio pelas mitocôndrias do grupo tratado com etanol. Esses dados indicam que há alguma alteração na cadeia de transporte de elétrons que limita o consumo de oxigênio em mitocôndrias de animais tratados com etanol. Também não podemos descartar a possibilidade de alterações estruturais à ATP sintase. Song e colaboradores (2008) mostraram que há oxidação de subunidade alfa e nitrosilação de subunidade beta da enzima ATP sintase em animais submetidos, durante 9 semanas, à uma dieta na qual o etanol representou 36% do conteúdo calórico. Como houve diferença no consumo de oxigênio com substratos para os complexos I e IV, medimos a atividade específica da citocromo c oxidase durante a oxidação de ferrocitocromo c a ferricitocromo c.

Mostramos que houve redução significativa (40-60%) na atividade enzimática específica da citocromo c oxidase (COX, complexo IV) (**Figura 5**), bem como no conteúdo protéico total de COX4 (**Figura 6**) nas mitocôndrias hepáticas de ratos tratados com etanol segundo os protocolos executados. Entretanto, embora tenha havido redução significativa na respiração mitocondrial quando na presença de substrato doador de elétrons para o complexo IV (TMPD/Ascorbato), não houve uma redução do consumo de O<sub>2</sub> na mesma amplitude da redução na atividade da citocromo c oxidase. Isso se deve ao fato de que, em mitocôndrias intactas, a enzima citocromo c oxidase funciona bem abaixo da sua capacidade enzimática máxima. Assim, somente inibições severas (acima de 80%) são capazes de causar grandes reduções no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas. Esse baixo *threshold* da COX permite que haja uma “margem de segurança”, que protege as mitocôndrias contra alterações severas que poderiam levar à lesões no DNA mitocondrial (Letellier et al., 1994; Gnaigner et al., 1998; Mazat et al., 2001).

Um das possíveis explicações para a redução observada na atividade enzimática da citocromo c oxidase são alterações na expressão de genes codificadores das subunidades dessa enzima. Nesse sentido, Kim e colaboradores (2001) mostraram redução na expressão de RNA mensageiro para citocromo c oxidase (COX) em regiões de hipocampo de ratos *Sprague-Dawley* submetidos a uma solução com 15% de etanol durante 10 dias. Thayer e colaboradores (1990) já haviam concluído que o consumo de etanol não altera as

propriedades dos sítios catalíticos da citocromo c oxidase, mas pode alterar a quantidade de moléculas ou subunidades envolvidas funcionamente na atividade desse complexo enzimático. Em 2010, Andringa e colaboradores mostraram, após análise proteômica de mitocôndrias de ratos *Sprague-Dawley* machos submetidos a uma dieta na qual o etanol representa 36 % do conteúdo calórico, que todas as subunidades de citocromo c oxidase tiveram redução no seu conteúdo proteico.

Além da redução na expressão de subunidades da COX, também devemos considerar modificações de estado redox ou interações com produtos de oxidação de biomoléculas. Um aumento na produção de malondialdeído, gerado através da peroxidação de lipídeos poliinsaturados (processo que pode ser induzido indiretamente pelo metabolismo oxidativo do etanol), pode inibir a atividade de algumas enzimas, tais como aldeído desidrogenase 2 (isoforma mitocondrial) (Song et al., 2008) e citocromo c oxidase (Chen et al., 2000).

Além disso, os compostos 4-hidróxi-nonenal e malondialdeído são capazes de formar aductos com subunidades da citocromo c oxidase tanto em animais adultos quanto em fetos de ratos *Sprague-Dawley* expostos ao etanol (Chen et al., 2000). A formação desses aductos de malondialdeído e 4-hidróxi-nonenal também reduziu significativamente a atividade da COX (Chen et al., 1998,1999). Essa redução na atividade da COX, após exposição ao etanol, também foi verificada por Kennedy (1998) em cultura de miócitos cardíacos, seguindo uma relação dose-dependente. Marcinkeviciute e colaboradores (2000), seguindo a dieta de Lieber-DeCarli, em ratos *Sprague-Dawley* machos, também mostraram que houve redução na atividade da citocromo c oxidase. Adicionalmente, a atividade de sirtuina-3, capaz de modular a atividade de ciclofilina D, também é inibida pelo 4-hidróxi-nonenal (4-HNE) via modificações em tióis com formação de aductos (Fritz et al., 2011).

Além da maior produção de aldeídos devido à metabolização do etanol, a presença desse xenobiótico induz aumento na quantidade de lesões ao DNA (Cahill et al., 1997; Sun et al., 2001) e aumento na quantidade de proteínas carboniladas em modelo de camundongos submetidos à ingestão de até 6% de etanol (Galligan et al., 2012).

Na **Figura 9** mostramos que, para o modelo e períodos de tratamento empregados, houve menor suscetibilidade à TPM nas mitocôndrias dos animais tratados aguda e

cronicamente com etanol, com aumento na capacidade de retenção de cálcio (**Figuras 7, 8 e 12**). Esses dados concordam entre si, entretanto discordam em relação a alguns dados presentes na literatura utilizando modelos similares de alcoolismo experimental em roedores ou em cultura de células. Shulga e Pastorino (2010) mostraram que, em células de linhagem de hepatócitos de rato (H4IIEC3), o etanol tornou as mitocôndrias mais suscetíveis à transição de permeabilidade mediada pela ciclofilina D (CyP D). A menor atividade de sirtuina-3 aumentou a acetilação e a atividade de ciclofilina D, intensificando a interação dessa proteína ao translocador de nucleotídeos de adenina-1 (ANT-1). King e colaboradores (2010) avaliaram a expressão de ciclofilina D e de seu RNA mensageiro em um modelo de consumo de etanol com maior suscetibilidade à transição de permeabilidade e mostraram que havia maior expressão de ambos no modelo animal utilizado, com menor capacidade retenção de cálcio por mitocôndrias de animais tratados com etanol.

Entretanto, em estudos com células de linhagem cardíaca, Zhou e colaboradores (2009) mostraram que, quando submetidas à concentrações crescentes de etanol (10 a 1000  $\mu\text{M}$ ), também houve proteção contra a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial com concentrações de até 500  $\mu\text{M}$ , envolvendo a inibição da sinalização via glicogênio sintase quinase  $3\beta$ .

Mostramos, utilizando nosso modelo experimental, que as mitocôndrias de animais tratados com etanol estão menos susceptíveis à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, com aumento na capacidade de retenção de cálcio. Além disso, mostramos também aumento no poder redutor mitocondrial com a quantificação de nucleotídeos de piridina. Houve aumento na quantidade de nucleotídeos na forma reduzida (NADH e NADPH) e aumento nas razões NADH/ NAD<sup>+</sup> e de NADPH/ NADP<sup>+</sup> (**Figura 13**). Na presença de agentes oxidantes de nucleotídeos de piridina (diamida, acetoacetato e tert butil-hidroperóxido, **Figuras 9 e 11**) ou em mitocôndrias desacopladas (**Figura 10**), houve a mesma suscetibilidade à transição de permeabilidade (**Figuras 9 e 10**). O poder redutor elevado aumenta a capacidade de retenção de Ca<sup>2+</sup> pelas mitocôndrias (Lehninger et al., 1978; Macedo et al., 1998; Zago et al., 2000). Entretanto, não observamos aumento no conteúdo protéico da enzima Nampt (Nicotinamida fosforibosil transferase) (**Figura 14**), enzima da via de biossíntese de NAD<sup>+</sup> (Pollak et al., 2007a; Garten et al., 2008). Devemos

considerar que a Nampt não é a única a enzima responsável pela síntese de nucleotídeos de piridina. Também temos a NADK (NAD quinase), responsável pela fosforilação de NAD<sup>+</sup> a NADP<sup>+</sup> (Pollak et al., 2007a, 2007b; Ying et al., 2008).

Embora dados da literatura indiquem que o etanol pode aumentar o estresse oxidativo, elevando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Fernández-Checa et al., 1997; Wu e Cederbaum, 2003; Cederbaum et al., 2009; Wu e Cederbaum, 2009), não observamos aumento na produção de EROs mitocondrial (**Figura 15**), em linfócitos esplênicos (**Figuras 22 e 23**) ou alterações no sistema antioxidante envolvendo glutathione (**Figuras 16 e 17**). Em todos os protocolos executados não verificamos diferença na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ânion superóxido ou na oxidação de H<sub>2</sub>DCFDA, tanto em mitocôndrias isoladas quanto em linfócitos esplênicos.

Também não verificamos diferença na atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase (**Figura 16**) em nenhum grupo tratado com etanol em relação ao seu respectivo grupo controle. Isso descarta a possibilidade de que os níveis de peróxido medidos estivessem idênticos devido a uma atividade aumentada da GPx em resposta a uma produção maior de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aykaç e colaboradores (1985), em protocolo no qual os ratos ingeriram água contendo 20% de etanol (próxima à concentração que utilizamos nesse trabalho), os autores não verificaram mudança na atividade de glutathione peroxidase após 3 semanas de tratamento com etanol, notando aumento após esse período e atribuindo isso a uma provável resposta adaptativa contra às injúrias celulares induzidas pelo álcool. Gonzalez e colaboradores (1988) também não verificaram alteração na atividade de glutathione peroxidase em ratos *Wistar* machos que receberam solução salina contendo etanol a 20% (m/v). Entretanto, Rouach (1997) e Bailey (2001) verificaram redução na atividade de glutathione peroxidase em ratos *Wistar* submetidos ao etanol, enquanto que Nadkarni (1988) observou redução na atividade hepática dessa enzima com quatro meses de tratamento e aumento aos dez meses de tratamento, com concentração crescente de 2,5% a 20% (v/v) de etanol. Nesse último trabalho, também foi observada modulação na atividade da enzima superóxido dismutase, com redução na sua atividade aos dez meses de tratamento.



Utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), quantificamos glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e não verificamos alteração no conteúdo total desses dois compostos, bem como na razão GSH/GSSG, exceto para animais de meia idade com 2 semanas de tratamento com etanol. Entretanto, para esse último grupo, devemos considerar a possibilidade de um efeito somatório de idade e tratamento com etanol na alteração dos níveis de GSSG total. Miñana e colaboradores (2002) relataram depleção de glutatona associada à maior produção de peróxido de hidrogênio em hepatócitos na presença de etanol e de acetaldeído. Fernandez-Checa e colaboradores (1989) mostraram que houve redução na quantidade de glutatona total em hepatócitos isolados e *in vivo* de ratos *Sprague-Dawley* que receberam, durante 6 a 8 semanas, dieta contendo etanol, na qual o etanol representa 36% do conteúdo calórico. Entretanto, Oh e colaboradores (1998), com modelo animal e dieta semelhantes, mostraram aumento nos níveis de glutatona total e de GSH, redução nos níveis de GSSG e aumento na razão GSH/GSSG. Bailey e colaboradores (2001) verificaram redução nos níveis de GSH citosólicos e aumento nos níveis mitocondriais. Já em ratos *Wistar* machos com ingestão intragástrica de solução contendo 20% de etanol (m/v), Gonzalez e colaboradores (1988) constataram redução nos níveis de glutatona total hepática. Conclui-se que os protocolos experimentais podem influenciar no conteúdo de GSH e de GSSG encontrados.

Outro ponto a ser considerado é o de que as células podem alterar a localização de GSSG, relocando essa molécula em compartimentos subcelulares como vacúolos, com a finalidade de manter o conteúdo de GSH alto nos locais nos quais a demanda por essa molécula for maior (Morgan et al., 2013; Winther e Jakob, 2013).

Além de não termos observado alterações na produção de espécies reativas de oxigênio e/ou comprometimento de sistemas antioxidantes envolvendo a participação de glutatona e de nucleotídeos de piridina, mostramos que houve redução na quantidade de DNA mitocondrial em tratamentos agudos (2 semanas), com aumento dessa quantidade em tratamento crônico (animais jovens tratados com etanol durante 36 semanas) (**Figura 19**). Quando normalizamos esses valores em relação à respectiva atividade de citrato sintase (**Figuras 20 e 21**), observamos que há uma menor quantidade de DNA mitocondrial em relação à quantidade total de mitocôndrias (**Figura 18**), sugerindo que mecanismos de

biogênese e de reparo de DNA mitocondrial tenham sido estimulados pelo consumo de etanol. Recentemente, Han e colaboradores (2012) mostraram que houve aumento na expressão de PGC1- $\alpha$ , regulador central da biogênese mitocondrial, no fígado de camundongos que consumiram etanol por até 4 semanas. Esses mesmos autores sugerem que haja uma resposta adaptativa às alterações mitocondriais induzidas pelo etanol, com estímulo à biogênese e remodelamento das estruturas mitocondrias, com alterações das funções hepáticas (Han et al., 2012).

Entretanto, embora mecanismos relacionados à biogênese possam ter sido estimulados, não devemos desconsiderar prováveis danos causados ao DNA e a alterações nas funções bioenergéticas e de reparo de DNA em mitocôndrias. Diversos trabalhos têm relacionado o consumo de etanol à redução na atividade de vias de reparo de DNA (Wilson et al., 1994; Navasumrit et al., 2001; Stuart e Brown, 2006; Fowler et al., 2012), acúmulo de lesões (Hirano, 2011; Fowler, et al., 2012; Kruman et al., 2012 ), quebra de fitas de DNA ( Lamarche et al., 2003; Kotova et al., 2013), alteração de metilação (Moghe et al., 2011; Fowler et al., 2012) e formação de aductos, principalmente com acetaldeído (Quertemont e Tambour, 2004; Quertemont et al., 2005; 2006; Brooks e Theruvathu, 2005; Seitz e Stickel, 2007; Karahanian et al., 2011), causando instabilidade genômica (Kotova et al., 2013), considerada a principal causa do desenvolvimento de processos carcinogênicos (Seitz e Stickel, 2007; Seitz e Becker, 2007).

Os estudos bioenergéticos e moleculares que realizamos podem contribuir para o esclarecimento de como o consumo de etanol pode modular vias celulares e mitocondriais, levando em consideração a quantidade de etanol, o tempo de exposição a esse xenobiótico e a forma de consumo (não diluído com nutrientes essenciais), como fatores determinantes para uma resposta adaptativa.

Em todos os protocolos executados nesse trabalho observamos proteção contra a transição mitocondrial induzida por  $Ca^{2+}$  e ausência de comprometimento dos sistemas antioxidantes envolvendo glutatona. Em trabalho prévio, Ravagnani (2007) mostrou que ocorreu degeneração lipídica (esteatose microvesicular) em fígado de animais que consumiram etanol por 75 e 90 dias segundo o protocolo utilizado nesse tese.

Todas essas evidências chamam a atenção para a importância da mitocôndria na manutenção do equilíbrio celular e da sua própria homeostasia em resposta à presença de um xenobiótico. Também podemos considerar que a quantidade de etanol que fornecemos para os animais pode ter modulado vias de sinalização dependentes de nucleotídeos de piridina (como a via das sirtuínas) e que esse seja justamente o ponto de equilíbrio entre a ação protetora ou deletéria do etanol, aproximando os tecidos ou órgãos por ele afetados do ponto de não-retorno patológico. Logo, os resultados que obtivemos podem estar relacionados a um momento que precede os processos de hepatite e cirrose alcoólicas, bem como os processos de carcinogênese envolvendo o metabolismo do etanol.



## *6. Conclusões*



Podemos concluir que o consumo de etanol, segundo o protocolo utilizado:

- Foi capaz de modular a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e que esse processo foi mediado pelo estado redox de nucleotídeos de piridina;
- Não induziu aumento na produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais ou em linfócitos esplênicos;
- Não induziu o comprometimento de sistemas oxidantes relacionados à glutatona;
- Induziu alterações na quantidade de DNA mitocondrial relacionado ao tempo de tratamento com etanol em animais jovens, sugerindo um mecanismo celular e/ou mitocondrial de adaptação.





## *7. Referências Bibliográficas*



Aagaard, N. K., T. Thogersen, *et al.* Alcohol acutely down-regulates urea synthesis in normal men. Alcohol Clin Exp Res, v.28, n.5, May, p.697-701. 2004.

Andringa, K. K., A. L. King, *et al.* Analysis of the liver mitochondrial proteome in response to ethanol and S-adenosylmethionine treatments: novel molecular targets of disease and hepatoprotection. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.298, n.5, May, p.G732-45. 2010.

Argiles, J. M., S. Busquets, *et al.* Metabolic interrelationships between liver and skeletal muscle in pathological states. Life Sci, v.69, n.12, Aug 10, p.1345-61. 2001.

Aykac, G., M. Uysal, *et al.* The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. Toxicology, v.36, n.1, Jul, p.71-6. 1985.

Bailey, S. M., V. B. Patel, *et al.* Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. Alcohol Clin Exp Res, v.25, n.5, May, p.726-33. 2001.

Balakirev, M. Y. e G. Zimmer. Gradual changes in permeability of inner mitochondrial membrane precede the mitochondrial permeability transition. Arch Biochem Biophys, v.356, n.1, Aug 1, p.46-54. 1998.

Beavis, A. D., R. D. Brannan, *et al.* Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. J Biol Chem, v.260, n.25, Nov 5, p.13424-33. 1985.

Bedard, K. e K. H. Krause. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev, v.87, n.1, Jan, p.245-313. 2007.

Belló-Klein, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: Marroni, N. P. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. CANOAS: Ed. ULBRA, p. 15-19, 2002.

Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? Front Physiol, v.4, p.95. 2013.

Bianchi, M. L. P.; antunes, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rer Nutr, v. 12 (2), Campinas, maio/agosto 1999.

Boffetta, P. Alcohol and cancer: benefits in addition to risks? Lancet Oncol, v.6, n.7, Jul, p.443-4. 2005.

Boffetta, P. e M. Hashibe. Alcohol and cancer. Lancet Oncol, v.7, n.2, Feb, p.149-56. 2006.

Bohr, V. A., T. Stevnsner, *et al.* Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. Gene, v.286, n.1, Mar 6, p.127-34. 2002.

- Boveris, A. e B. Chance. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J, v.134, n.3, Jul, p.707-16. 1973.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Brooks, P. J. e J. A. Theruvathu. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. Alcohol, v.35, n.3, Apr, p.187-93. 2005.
- Brown, L. M. Epidemiology of alcohol-associated cancers. Alcohol, v.35, n.3, Apr, p.161-8. 2005.
- Bunout, D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. Nutrition, v.15, n.7-8, Jul-Aug, p.583-9. 1999.
- Caballeria, J. Current concepts in alcohol metabolism. Ann Hepatol, v.2, n.2, Apr-Jun, p.60-8. 2003.
- Cahill, A., C. C. Cunningham, *et al.* Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. Alcohol Clin Exp Res, v.26, n.6, Jun, p.907-15. 2002.
- Cahill, A., G. J. Stablesy, *et al.* Chronic ethanol consumption causes alterations in the structural integrity of mitochondrial DNA in aged rats. Hepatology, v.30, n.4, Oct, p.881-8. 1999.
- Cahill, A., X. Wang, *et al.* Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption. Biochem Biophys Res Commun, v.235, n.2, Jun 18, p.286-90. 1997.
- Carafoli, E. Intracellular calcium homeostasis. Annu Rev Biochem, v.56, p.395-433. 1987.
- Castilho, R. F., A. J. Kowaltowski, *et al.* The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. J Bioenerg Biomembr, v.28, n.6, Dec, p.523-9. 1996.
- Cederbaum, A. I. Effects of alcohol on hepatic mitochondrial function and DNA. Gastroenterology, v.117, n.1, Jul, p.265-9. 1999.
- Cederbaum, A. I., Y. Lu, *et al.* Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. Arch Toxicol, v.83, n.6, Jun, p.519-48. 2009.
- Cha, B. S., C. W. Ahn, *et al.* Chronic alcohol intake differently influences glucose metabolism according to nutritional status. J Clin Endocrinol Metab, v.85, n.10, Oct, p.3646-52. 2000.

Chance, B., H. Sies, *et al.* Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev, v.59, n.3, Jul, p.527-605. 1979.

Chen, J., D. R. Petersen, *et al.* Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. Alcohol Clin Exp Res, v.24, n.4, Apr, p.544-52. 2000.

Chen, J., N. C. Robinson, *et al.* Formation of 4-hydroxynonenal adducts with cytochrome c oxidase in rats following short-term ethanol intake. Hepatology, v.29, n.6, Jun, p.1792-8. 1999.

Chen, J., S. Schenker, *et al.* Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits. Biochim Biophys Acta, v.1380, n.3, May 8, p.336-44. 1998.

Coelho, J. L. e A. E. Vercesi. Retention of Ca<sup>2+</sup> by rat liver and rat heart mitochondria: effect of phosphate, Mg<sup>2+</sup>, and NAD(P) redox state. Arch Biochem Biophys, v.204, n.1, Oct 1, p.141-7. 1980.

Collins, S. e T. Meyer. Cell biology: A sensor for calcium uptake. Nature, v.467, n.7313, Sep 16, p.283. 2010.

Costa, J. S D. da; silveira, M. F., gazalle, Fernando, K. et al. Consumo abusivo de álcool e fatores associados: estudo de base populacional. Rev. Saúde Pública, v. 38, n. 2, p. 284-291, Abril/2004.

Crompton, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. J Physiol, v.529 Pt 1, Nov 15, p.11-21. 2000.

Das, S. K. e D. M. Vasudevan. Alcohol-induced oxidative stress. Life Sci, v.81, n.3, Jun 27, p.177-87. 2007.

Dawson, V. L. e T. M. Dawson. Free radicals and neuronal cell death. Cell Death Differ, v.3, n.1, Jan, p.71-8. 1996.

De Souza-Pinto, N. C., L. Eide, *et al.* Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial dna depends on the oxoguanine dna glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial dna of OGG1-defective mice. Cancer Res, v.61, n.14, Jul 15, p.5378-81. 2001.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, v.82, n.1, Jan, p.47-95. 2002.

Fagian, M. M., L. Pereira-Da-Silva, *et al.* Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants. J Biol Chem, v.265, n.32, Nov 15, p.19955-60. 1990.

Fariss, M. W., C. B. Chan, *et al.* Role of mitochondria in toxic oxidative stress. Mol Interv, v.5, n.2, Apr, p.94-111. 2005.

Fernandez-Checa, J. C., M. Ookhtens, *et al.* Effects of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Relationship of cytosolic glutathione to efflux and mitochondrial sequestration. J Clin Invest, v.83, n.4, Apr, p.1247-52. 1989.

Fernandez-Checa, J. C., N. Kaplowitz, *et al.* Oxidative stress and alcoholic liver disease. Alcohol Health Res World, v.21, n.4, p.321-4. 1997.

Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Brasil, v. 43 (1), p. 61-68, 1997.

Figueira, T. R., M. H. Barros, *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. Antioxid Redox Signal, v.18, n.16, Jun 1, p.2029-74. 2013.

Flohe, L., W. A. Gunzler, *et al.* Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett, v.32, n.1, May 15, p.132-4. 1973.

Fowler, A. K., A. Hewetson, *et al.* Alcohol-induced one-carbon metabolism impairment promotes dysfunction of DNA base excision repair in adult brain. J Biol Chem, v.287, n.52, Dec 21, p.43533-42. 2012.

Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. Science, v.201, n.4359, Sep 8, p.875-80. 1978.

Fritz, K. S., J. J. Galligan, *et al.* 4-Hydroxynonenal inhibits SIRT3 via thiol-specific modification. Chem Res Toxicol, v.24, n.5, May 16, p.651-62. 2011.

Galduróz, F. C. F.; Caetano, R. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. Rev Bras Psiquiatr, v. 26, Supl I, p. 3-6, 2004

Galligan, J. J., R. L. Smathers, *et al.* Protein carbonylation in a murine model for early alcoholic liver disease. Chem Res Toxicol, v.25, n.5, May 21, p.1012-21. 2012.

Garten, A., S. Petzold, *et al.* Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. Trends Endocrinol Metab, v.20, n.3, Apr, p.130-8. 2009.

Giorgio, V., S. Von Stockum, *et al.* Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. Proc Natl Acad Sci U S A, v.110, n.15, Apr 9, p.5887-92. 2013.

Gnainiger, E., B. Lassnig, *et al.* Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. The Journal of Experimental Biology, v.201, p.1129-1139. 1998.

- Gonzalez, J., M. E. Munoz, *et al.* Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione metabolism in the rat. Alcohol, v.5, n.2, Mar-Apr, p.103-6. 1988.
- Gornall, A. G., C. J. Bardawill, *et al.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem, v.177, n.2, Feb, p.751-66. 1949.
- Green, R. C. e P. J. O'brien. The cellular localisation of glutathione peroxidase and its release from mitochondria during swelling. Biochim Biophys Acta, v.197, n.1, Jan 13, p.31-9. 1970.
- Griffith, C. M. e S. Schenker. The role of nutritional therapy in alcoholic liver disease. Alcohol Res Health, v.29, n.4, p.296-306. 2006.
- Gunter, K. K. e T. E. Gunter. Transport of calcium by mitochondria. J Bioenerg Biomembr, v.26, n.5, Oct, p.471-85. 1994.
- Guz, B. Metabolismo do álcool. In: Gayotto, L. C. da C.; Alves, V. A. F. Doenças do Fígado e Vias Biliares. São Paulo: Atheneu, 2001, v. 2, p. 673-679.
- Halliwell, B. e J. M. Gutteridge. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. J Neurochem, v.69, n.3, Sep, p.1330-1. 1997.
- Han, D., M. D. Ybanez, *et al.* Dynamic adaptation of liver mitochondria to chronic alcohol feeding in mice: biogenesis, remodeling, and functional alterations. J Biol Chem, v.287, n.50, Dec 7, p.42165-79. 2012.
- Harper, M. E., L. Bevilacqua, *et al.* Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. Acta Physiol Scand, v.182, n.4, Dec, p.321-31. 2004.
- He, L. e J. J. Lemasters. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? FEBS Lett, v.512, n.1-3, Feb 13, p.1-7. 2002.
- Hill, A. G. e G. L. Hill. Metabolic response to severe injury. Br J Surg, v.85, n.7, Jul, p.884-90. 1998.
- Hirano, T. Alcohol consumption and oxidative DNA damage. Int J Environ Res Public Health, v.8, n.7, Jul, p.2895-906. 2011.
- Hoek, J. B., A. Cahill, *et al.* Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. Gastroenterology, v.122, n.7, Jun, p.2049-63. 2002.
- Hu, J., N. C. De Souza-Pinto, *et al.* Repair of formamidopyrimidines in DNA involves different glycosylases: role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes. J Biol Chem, v.280, n.49, Dec 9, p.40544-51. 2005.

- Hunter, D. R. e R. A. Haworth. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. Arch Biochem Biophys, v.195, n.2, Jul, p.453-9. 1979.
- Hunter, D. R., R. A. Haworth, *et al.* Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. J Biol Chem, v.251, n.16, Aug 25, p.5069-77. 1976.
- Kang, D. e N. Hamasaki. Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. Curr Med Chem, v.12, n.4, p.429-41. 2005.
- Kaplan, R. S. e P. L. Pedersen. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. Biochem J, v.212, n.2, May 15, p.279-88. 1983.
- Karahanian, E., M. E. Quintanilla, *et al.* Ethanol as a prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. Alcohol Clin Exp Res, v.35, n.4, Apr, p.606-12. 2011.
- Karlsson, M., T. Kurz, *et al.* What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? Biochem J, v.428, n.2, Jun 1, p.183-90. 2010.
- Kennedy, J. M. Mitochondrial gene expression is impaired by ethanol exposure in cultured chick cardiac myocytes. Cardiovasc Res, v.37, n.1, Jan, p.141-50. 1998.
- Kim, J. H., J. E. Kim, *et al.* Ethanol decreases the expression of mitochondrial cytochrome c oxidase mRNA in the rat. Neurosci Lett, v.305, n.2, Jun 8, p.107-10. 2001.
- King, A. L., T. M. Swain, *et al.* Chronic ethanol consumption enhances sensitivity to Ca(2+)-mediated opening of the mitochondrial permeability transition pore and increases cyclophilin D in liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.299, n.4, Oct, p.G954-66. 2010.
- Klaidman, L. K., A. C. Leung, *et al.* High-performance liquid chromatography analysis of oxidized and reduced pyridine dinucleotides in specific brain regions. Anal Biochem, v.228, n.2, Jul 1, p.312-7. 1995.
- Koop, D. R. Alcohol Metabolism's Damaging Effects on the Cell - A Focus on Reactive Oxygen Generation by the Enzyme Cytochrome P450 2E1. Alcohol Research & Health, v. 29, n. 4, 2006.
- Kotova, N., D. Vare, *et al.* Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair. Carcinogenesis, v.34, n.2, Feb, p.325-30. 2013.
- Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, *et al.* Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett, v.495, n.1-2, Apr 20, p.12-5. 2001.



- Kruman, Ii, G. I. Henderson, *et al.* DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. Exp Biol Med (Maywood), v.237, n.7, Jul 1, p.740-7. 2012.
- Lamarche, F., B. Gonthier, *et al.* Acute exposure of cultured neurones to ethanol results in reversible DNA single-strand breaks; whereas chronic exposure causes loss of cell viability. Alcohol Alcohol, v.38, n.6, Nov-Dec, p.550-8. 2003.
- Lang, C. H., S. R. Kimball, *et al.* Alcohol myopathy: impairment of protein synthesis and translation initiation. Int J Biochem Cell Biol, v.33, n.5, May, p.457-73. 2001.
- Lawrence, R. A. e R. F. Burk. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Biophys Res Commun, v.71, n.4, Aug 23, p.952-8. 1976.
- Lebel, C. P., H. Ischiropoulos, *et al.* Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol, v.5, n.2, Mar-Apr, p.227-31. 1992.
- Leevy, C. M. e S. A. Moroianu. Nutritional aspects of alcoholic liver disease. Clin Liver Dis, v.9, n.1, Feb, p.67-81. 2005.
- Lefevre, A., H. Adler, *et al.* Effect of ethanol on ketone metabolism. J Clin Invest, v.49, n.10, Oct, p.1775-82. 1970.
- Lehninger, A. L., A. Vercesi, *et al.* Regulation of Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A, v.75, n.4, Apr, p.1690-4. 1978.
- Lemasters, J. J., T. Qian, *et al.* Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. Antioxid Redox Signal, v.4, n.5, Oct, p.769-81. 2002.
- Lemasters, J. J., T. P. Theruvath, *et al.* Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim Biophys Acta, v.1787, n.11, Nov, p.1395-401. 2009.
- Letellier, T., R. Heinrich, *et al.* The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. Biochem J, v.302 ( Pt 1), Aug 15, p.171-4. 1994.
- Lieber, C. S. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. Alcohol Res Health, v.27, n.3, p.220-31. 2003.
- Lieber, C. S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. Clin Chim Acta, v.257, n.1, Jan 3, p.59-84. 1997.
- Lieber, C. S. e L. M. Decarli. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. Alcohol Clin Exp Res, v.6, n.4, Fall, p.523-31. 1982.

Llesuy, S. F. Introducción y Espécies Activas de Oxígeno. In: Marroni, N. P. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. CANOAS: Ed. ULBRA, p. 21-32, 2002.

Macedo, D.V., Ferraz, V.L., Pereira Da Silva, L., Vercesi, A.E. Ca<sup>2+</sup>-dependent NAD(P)<sup>+</sup>-induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. Integration of Mitochondrial Function, Ed. J. Lemasters, Plenum, New York, pp 535-542, 1998.

Madamanchi, N. R. e M. S. Runge. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. Circ Res, v.100, n.4, Mar 2, p.460-73. 2007.

Mansouri, A., C. Demeilliers, *et al.* Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. J Pharmacol Exp Ther, v.298, n.2, Aug, p.737-43. 2001.

Marcinkeviciute, A., V. Mildaziene, *et al.* Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after chronic ethanol feeding. Biochem J, v.349, n.Pt 2, Jul 15, p.519-26. 2000.

Masters, S. B. Os álcoois. In: Katzung, B. G. Farmacologia Básica & Clínica. 8 ed. Guanabara-Koogan, 2003, cap. 23, p. 334-342.

Mazat, J. P., R. Rossignol, *et al.* What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions...that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects. Biochim Biophys Acta, v.1504, n.1, Mar 1, p.20-30. 2001.

Mezey, E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. Am J Clin Nutr, v.33, n.12, Dec, p.2709-18. 1980.

Miller, S. A., D. D. Dykes, *et al.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res, v.16, n.3, Feb 11, p.1215. 1988.

Minana, J. B., L. Gomez-Cambronero, *et al.* Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. Hepatology, v.35, n.5, May, p.1205-14. 2002.

Mincis, M. Fígado e Álcool. In: Gayotto, L. C. da C.; Alves, V. A. F. Doenças do Fígado e Vias Biliares. São Paulo: Atheneu, 2001. v. 2, p. 667-671.

Mitchell, M. C. e H. F. Herlong. Alcohol and nutrition: caloric value, bioenergetics, and relationship to liver damage. Annu Rev Nutr, v.6, p.457-74. 1986.

Moghe, A., S. Joshi-Barve, *et al.* Histone modifications and alcohol-induced liver disease: are altered nutrients the missing link? World J Gastroenterol, v.17, n.20, May 28, p.2465-72. 2011.

- Morgan, B., D. Ezerina, *et al.* Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. Nat Chem Biol, v.9, n.2, Feb, p.119-25. 2013.
- Mounolou, J. C. e F. Lacroute. Mitochondrial DNA: an advance in eukaryotic cell biology in the 1960s. Biol Cell, v.97, n.9, Sep, p.743-8. 2005.
- Nadkarni, G. D. e N. B. D'souza. Antioxidant and free radical-scavenging enzymes in chronically ethanol-consuming rats: controversy over hepatic lipid peroxidation. Drug Alcohol Depend, v.22, n.1-2, Oct, p.161-4. 1988.
- Navasumrit, P., G. P. Margison, *et al.* Ethanol modulates rat hepatic DNA repair functions. Alcohol Alcohol, v.36, n.5, Sep-Oct, p.369-76. 2001.
- Oh, S. I., C. I. Kim, *et al.* Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. J Nutr, v.128, n.4, Apr, p.758-63. 1998.
- Oliveira, H. C., R. G. Cosso, *et al.* Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. FASEB J, v.19, n.2, Feb, p.278-80. 2005.
- Oroboros Instruments. Laboratory Protocol Citrate Synthase Mitochondrial Marker Enzyme. Mitochondrial Physiology Network 08.14, p. 1-10, 2010.  
Disponível em:  
[http://www.orooboros.at/fileadmin/user\\_upload/Protocols/MiPNet08.14\\_CitrateSynthase.pdf](http://www.orooboros.at/fileadmin/user_upload/Protocols/MiPNet08.14_CitrateSynthase.pdf)
- O'Rourke, B., S. Cortassa, *et al.* Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. Physiology (Bethesda), v.20, Oct, p.303-15. 2005.
- Pastorino, J. G., A. Marcineviciute, *et al.* Potentiation by chronic ethanol treatment of the mitochondrial permeability transition. Biochem Biophys Res Commun, v.265, n.2, Nov 19, p.405-9. 1999.
- Perocchi, F., V. M. Gohil, *et al.* MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. Nature, v.467, n.7313, Sep 16, p.291-6. 2010.
- Petitpas, F., F. Sichel, *et al.* Effects of alcohol consumption on biomarkers of oxidative damage to DNA and lipids in ethanol-fed pigs. Exp Toxicol Pathol, v.65, n.3, Mar, p.263-9. 2013.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.
- Pollak, N., C. Dolle, *et al.*(a) The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. Biochem J, v.402, n.2, Mar 1, p.205-18. 2007.
- Pollak, N., M. Niere, *et al.*(b) NAD kinase levels control the NADPH concentration in human cells. J Biol Chem, v.282, n.46, Nov 16, p.33562-71. 2007.

Quertemont, E. e V. Didone. Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. Alcohol Res Health, v.29, n.4, p.258-65. 2006.

Quertemont, E., C. J. Eriksson, *et al.* Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects. Alcohol Clin Exp Res, v.29, n.8, Aug, p.1514-21. 2005.

Quertemont, E. e S. Tambour. Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. Trends Pharmacol Sci, v.25, n.3, Mar, p.130-4. 2004.

Radi, R., J. F. Turrens, *et al.* Detection of catalase in rat heart mitochondria. J Biol Chem, v.266, n.32, Nov 15, p.22028-34. 1991.

Rang, H. P; Dale, M. M.; Ritter, J. M. Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001, p. 523-528.

Ravagnani, F. G. Estudo do *turnover* hepático, muscular e sanguíneo em ratos *Wistar* tratados com alcoóis de origens vegetais C<sub>3</sub> (uva) e C<sub>4</sub> (cana-de- açúcar) – Análises morfológicas, bioquímicas e dos isótopos estáveis de Carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e de Nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ). Botucatu, 2007. 65 f. Monografia apresentada ao Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Rhee, S. G., K. H. Kim, *et al.* Antioxidant defense mechanisms: a new thiol-specific antioxidant enzyme. Ann N Y Acad Sci, v.738, Nov 17, p.86-92. 1994.

Robinson, J. e J. M. Cooper. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. Anal Biochem, v.33, n.2, Feb, p.390-9. 1970.

Rodrigo, C., C. Antezana, *et al.* Fat and nitrogen balances in rats with alcohol-induced fatty liver. J Nutr, v.101, n.10, Oct, p.1307-10. 1971.

Ronchi, J. A., A. E. Vercesi, *et al.* Reactive oxygen species and permeability transition pore in rat liver and kidney mitoplasts. J Bioenerg Biomembr, v.43, n.6, Dec, p.709-15. 2011.

Rouquayrol, M. Z; Filho, N. A. Epidemiologia & Saúde. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999, p. 386.

Rouach, H., V. Fataccioli, *et al.* Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. Hepatology, v.25, n.2, Feb, p.351-5. 1997.

Salvi, M., V. Battaglia, *et al.* Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. J Biol Chem, v.282, n.33, Aug 17, p.24407-15. 2007.

Schneider, W. C. e G. H. Hogeboom. Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review. Cancer Res, v.11, n.1, Jan, p.1-22. 1951.

Seitz, H. K. e P. Becker. Alcohol metabolism and cancer risk. Alcohol Res Health, v.30, n.1, p.38-41, 44-7. 2007.

Seitz, H. K. e F. Stickel. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. Nat Rev Cancer, v.7, n.8, Aug, p.599-612. 2007.

Simm, A.; Brömme, H-J. Reactive oxygen species (ROS) and aging: Do we need them - can we measure them – should we block them? Signal Transduction, v. 3, p. 115-125, 2005.

Sharda, D. R., J. L. Miller-Lee, *et al.* Comparison of the agar block and Lieber-DeCarli diets to study chronic alcohol consumption in an aging model of Fischer 344 female rats. J Pharmacol Toxicol Methods, v.66, n.3, Nov-Dec, p.257-63. 2012.

Shulga, N. e J. G. Pastorino. Ethanol sensitizes mitochondria to the permeability transition by inhibiting deacetylation of cyclophilin-D mediated by sirtuin-3. J Cell Sci, v.123, n.Pt 23, Dec 1, p.4117-27. 2010.

Song, B. J., K. H. Moon, *et al.* Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. J Hepatol, v.49, n.2, Aug, p.262-73. 2008.

Splettstoesser, W. D. e P. Schuff-Werner. Oxidative stress in phagocytes--"the enemy within". Microsc Res Tech, v.57, n.6, Jun 15, p.441-55. 2002.

Strbak, V., J. Benicky, *et al.* Four-week ethanol intake decreases food intake and body weight but does not affect plasma leptin, corticosterone, and insulin levels in pubertal rats. Metabolism, v.47, n.10, Oct, p.1269-73. 1998.

Stadtman, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. Free Radic Biol Med, v.9, n.4, p.315-25. 1990.

Stuart, J. A. e M. F. Brown. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. Biochim Biophys Acta, v.1757, n.2, Feb, p.79-89. 2006.

Sun, A. Y., M. Ingelman-Sundberg, *et al.* Ethanol and oxidative stress. Alcohol Clin Exp Res, v.25, n.5 Suppl ISBRA, May, p.237S-243S. 2001.

Teixeira, L. S. Despesas com tratamento de doenças causadas ou agravadas pelo álcool: análise de propostas para seu financiamento. Consultoria Legislativa. Câmara dos Deputados. Dezembro de 2004. Disponível em:

<[www2.camara.gov.br/internet/publicacoes/estnottec/tema10/2004\\_12204.pdf](http://www2.camara.gov.br/internet/publicacoes/estnottec/tema10/2004_12204.pdf)>.

- Thayer, W. S. e J. J. Cummings, Jr. Effects of chronic alcohol consumption on the steady-state kinetics properties of cytochrome oxidase in rat liver. Biochim Biophys Acta, v.1016, n.3, Apr 26, p.333-8. 1990.
- Thiele, T. E. e N. E. Badia-Elder. A role for neuropeptide Y in alcohol intake control: evidence from human and animal research. Physiol Behav, v.79, n.1, Jun, p.95-101. 2003.
- Tsujimoto, Y. e S. Shimizu. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. Apoptosis, v.12, n.5, May, p.835-40. 2007.
- Tyler, D. D.; Nathanailides, C. Assaying for maximal cytochrome c oxidase activity in fish muscle. BAM, v. 5, n. 1, p. 99-102, 1995.
- Vaseva, A. V., N. D. Marchenko, *et al.* p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. Cell, v.149, n.7, Jun 22, p.1536-48. 2012.
- Vercesi, A. E., A. J. Kowaltowski, *et al.* The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. Biosci Rep, v.17, n.1, Feb, p.43-52. 1997.
- Wagnerberger, S., G. Kanuri, *et al.* Alcohol drinking patterns and nutrition in alcoholic liver disease In: I. Shimizu (Ed.). Trends in Alcoholic Liver Disease Research - Clinical and Scientific Aspects: InTech, 2012.
- Wilson, D. M., 3rd, T. M. Sofinowski, *et al.* Repair mechanisms for oxidative DNA damage. Front Biosci, v.8, May 1, p.d963-81. 2003.
- Wilson, D. M., 3rd, J. J. Tentler, *et al.* Acute ethanol exposure suppresses the repair of O6-methylguanine DNA lesions in castrated adult male rats. Alcohol Clin Exp Res, v.18, n.5, Oct, p.1267-71. 1994.
- Winther, J. R. e U. Jakob. Redox control: A black hole for oxidized glutathione. Nat Chem Biol, v.9, n.2, Feb, p.69-70. 2013.
- Wu, D. e A. I. Cederbaum. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Res Health, v.27, n.4, p.277-84. 2003.
- Wu, D. e A. I. Cederbaum. Oxidative stress and alcoholic liver disease. Semin Liver Dis, v.29, n.2, May, p.141-54. 2009.
- Ying, W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. Antioxid Redox Signal, v.10, n.2, Feb, p.179-206. 2008.
- Yilmaz et al. A practical HPLC method to measure reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations in animal tissues. Journal of Animal and Veterinary Advances 8 (2): 343-347, 2009.

Zago, E. B., R. F. Castilho, *et al.* The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. FEBS Lett, v.478, n.1-2, Jul 28, p.29-33. 2000.

Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? Alcohol Res Health, n. 29, p. 245-254, 2006.

Zhou, K., L. Zhang, *et al.* Ethanol prevents oxidant-induced mitochondrial permeability transition pore opening in cardiac cells. Alcohol Alcohol, v.44, n.1, Jan-Feb, p.20-4. 2009.

Zhou, M., Z. Diwu, *et al.* A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. Anal Biochem, v.253, n.2, Nov 15, p.162-8. 1997.



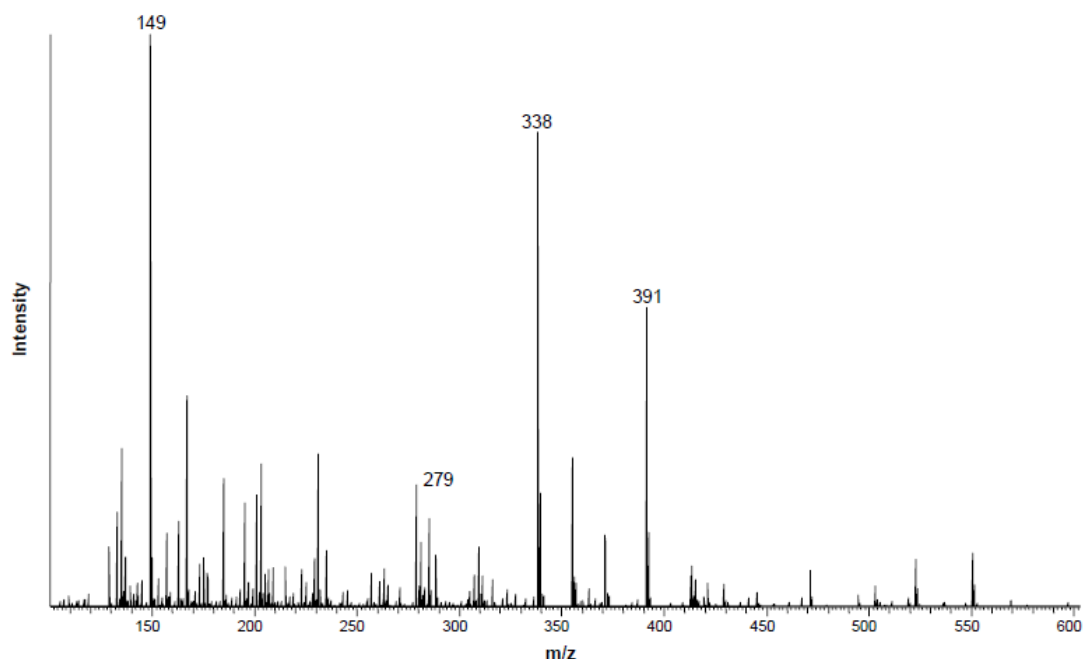


## *8. Apêndice*



O etanol utilizado neste trabalho foi caracterizado, qualitativamente, pela estratégia de *Metabolic fingerprint* com ferramenta analítica que exige o mínimo preparo de amostras. As amostras de álcool (100 uL) foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL e diluídas para 1 mL de uma solução de metanol e água 50:50 (v/v). Depois essa solução foi agitada, centrifugada e o sobrenadante foi analisado diretamente no espectrômetro de massas. A infusão direta foi de 10 µL/min. ESI-MS e ESI-MS/MS foram realizados no modo positivo e o espectro foi adquirido usando um LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) instrumento alta resolução com analisador Orbitrap. O sistema foi operado em 10 (arb) *sheath gas*, 3,5 kV de voltagem no *spray*, 43 V de voltagem e 275°C de temperatura no capilar e 112 V nos tubos de lentes magnéticas. A alta resolução é um importante parâmetro para a identificação e a exatidão das massas foi calculada baseada no erro, em ppm. Os experimentos de dissociação de íons são também importantes para a identificação do composto e foram realizados no *Ion-trap* (outro analisador que compõe o espectrômetro de massas). Os íons-produto obtidos foram analisados em alta resolução pelo Orbitrap, sendo que as energias de colisão foram 10 e 25 eV. O espectro de massas em ESI-MS foi adquirido entre as faixas de massas de 100 a 600. Os íons obtidos no *fingerprint* (**Figura 24**) foram analisados, sendo identificados os principais componentes que caracterizam a amostra (**Tabela 3**). Não foi verificada a presença de resveratrol na amostra de álcool analisada, comparando com um padrão desse polifenol.





**Figura 24.** Espectro de massas do álcool etílico utilizado na tese. Análise do *fingerprinting* em espectrômetro de massas de alta resolução (*Orbitrap*) em modo positivo. As razões *m/z* indicadas no gráfico correspondem às dos quatro compostos mais abundantes presentes no etanol utilizado.

**Tabela 3.** Compostos mais abundantes encontrados no álcool utilizado após análise em espectrometria de massas (MS/MS).

Composto	Massa [M + H] <sup>+</sup>	Fragmentos CID
Citramalic acid	149	121, 107, 93
6-O-(4-hydroxy-2-methylene-butanoyl)-β-D-glucopyranose	279	261, 181, 149
3-hydroxy-5-methoxy-6-prenylstilbene-2-carboxylic acid	338	320, 302
(-)-11-hydroxy-9,10-dihydrojasmonic acid 11-β-D-glucoside	391	333, 247, 149



## *9. Anexos*





## 9.1. Parecer de Aprovação do Comitê de Ética



UNICAMP



CEEA/Unicamp

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1539-1, sobre "Efeitos do consumo agúdo e crônico de etanol sobre as funções mitocondriais: estudo em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*)", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi / Felipe Gustavo Ravagnani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 19 de maio de 2008.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1539-1, entitled "Effects of short and long-term ethanol consumption on mitochondrial functions: study with Wistar rats (*Rattus norvegicus*)", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 19, 2008.

Campinas, 19 de maio de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



## 9.2. Currículo

**Nome:** Felipe Gustavo Ravagnani

**Data de Nascimento:** 04/08/1984

### Formação

Bacharelado em Física/Matemática Aplicada/ Matemática Computacional  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP  
2003-2003 – não concluído

Bacharelado em Ciências Biológicas – Modalidade Médica (Biomedicina)  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – *Campus* de Botucatu  
2004-2007

### Publicações

#### - Artigos completos

La Guardia, P. G. ; Alberici, L. C. ; **Ravagnani, F. G.** ; Catharino, R. R. ; Vercesi, A. E.  
Protection of rat skeletal muscle fibers by either L-carnitine or coenzyme Q10 against  
statins toxicity mediated by mitochondrial reactive oxygen generation.  
*Frontiers in Physiology*, v. 4, p. 1-9, 2013.

Ronchi, J. A. ; Figueira, T. R. ; **Ravagnani, F. G.** ; Oliveira, H.C.F. ; Vercesi, A.E. ;  
Castilho, Roger F. A Spontaneous Mutation in the Nicotinamide Nucleotide  
Transhydrogenase Gene of C57BL/6J Mice Results in Mitochondrial Redox Abnormalities.  
*Free Radical Biology & Medicine*, 2013.

#### - Capítulos de livro

**Ravagnani, F. G.** ; Catharino, R. R. . Papel da Metabolômica na Obesidade e Doenças  
Associadas. In: Márcio C. Mancini; Bruno Geloneze; João Eduardo N. Salles, Josivan  
Gomes de Lima; Mario K. Carra. (Org.). *Tratado de Obesidade*. 1ed. Itapevi, SP e Rio de  
Janeiro/RJ: AC Farmacêutica e Guanabara Koogan Ltda, 2010, p. 716-723.

**Ravagnani, F. G.**; Saidemberg, D. M.; Faria, A. L. C.; Sartor; S. B.; Oliveira, D. N.;  
Catharino, R. R. Quality Control of Biomarkers: From the Samples to Data Interpretation.  
Latest Research into Quality Control, ISBN 978-953-51-0868-9, doi: 10.5772/51555

