

O Carvedilol Protege Mitocôndrias Cardíacas Isquémicas de Lesões Induzidas por *Stress Oxidativo* [95]

RAQUEL CARREIRA, ANA DUARTE, PEDRO MONTEIRO, MARIA SANCHA SANTOS,
ANA CRISTINA REGO, CATARINA R. OLIVEIRA, LINO M. GONÇALVES, LUÍS A. PROVIDÊNCIA

Unidade de Investigação Básica em Cardiologia – Serviço de Cardiologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal
Clínica de Cardiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal
Centro de Neurociência e Biologia Celular de Coimbra, Portugal

Rev Port Cardiol 2004; 23 (11): 1447-1455

RESUMO

A isquémia afecta negativamente a função mitocondrial através da indução da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM é causada por *stress* oxidativo, o qual ocorre na mitocôndria durante a isquémia como resultado de uma diminuição nas defesas antioxidantes e um aumento das espécies oxidantes. A TPM causa disfunção mitocondrial e pode mesmo provocar morte celular. Daqui se infere que fármacos capazes de minimizar os danos mitocondriais induzidos pela isquémia, se possam revelar clinicamente muito eficientes. Analisou-se o impacto do carvedilol, um bloqueador β -adrenérgico com propriedades antioxidantes, na disfunção mitocondrial. O carvedilol diminuiu os níveis de TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*), um indicador de *stress* oxidativo, o que é consistente com as suas propriedades antioxidantes. No que diz respeito à morte celular por apoptose, apesar da isquémia ter aumentado a actividade típica da caspase 8, como não houve alterações da actividade da caspase 3, a qual é activada distalmente à caspase 8, verificou-se que 60 minutos de isquémia poderão não ser suficientes para induzir apoptose. Conclui-se que o carvedilol protege mitocôndrias isquémicas, através da prevenção do dano oxidativo mitocondrial, e, ao fazê-lo, pode inibir a formação do poro de TPM.

Palavras-Chave

Bloqueadores Beta; Mitocôndria; Isquemia miocárdica; Apoptose; *Stress* oxidativo

SUMMARY

Carvedilol protects ischemic cardiac mitochondria by preventing oxidative stress

Ischemia negatively affects mitochondrial function by inducing the mitochondrial permeability transition (MPT). The MPT is triggered by oxidative stress, which occurs in mitochondria during ischemia as a result of diminished antioxidant defenses and increased reactive oxygen species production. It causes mitochondrial dysfunction and can ultimately lead to cell death. Therefore, drugs able to minimize mitochondrial damage induced by ischemia may prove to be clinically effective. We analyzed the effect of carvedilol, a β -blocker with antioxidant properties, on mitochondrial dysfunction. Carvedilol decreased levels of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), an indicator of oxidative stress, which is consistent with its antioxidant properties. Regarding cell death by apoptosis, although ischemia did increase caspase-8-like activity, there were no changes in caspase-3-like activity, which is activated downstream of caspase-8; this may indicate that the apoptotic cascade is not activated by 60 minutes of ischemia. We conclude that carvedilol protects ischemic mitochondria by preventing oxidative mitochondrial damage, and, by so doing, it may also inhibit the formation of the MPT pore.

Key words

Beta-blockers; Mitochondria; Myocardial ischemia; Apoptosis; Oxidative stress

INTRODUÇÃO

As alterações celulares subjacentes à cardiopatia isquémica estão frequentemente associadas a um fornecimento deficitário de oxigénio e nutrientes às células cardíacas devido a uma insuficiente perfusão coronária (isquémia), o que pode provocar disfunção ou morte dos cardiomiócitos. A isquémia afecta negativamente a função mitocondrial através da indução da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), que consiste na formação de poros proteicos na membrana mitocondrial interna, os poros transitórios de permeabilidade mitocondrial (PTPM). Durante a isquémia, as defesas antioxidantes estão diminuídas e os componentes da cadeia respiratória encontram-se na forma reduzida devido à deficiência em oxigénio, o que favorece a fuga de electrões e, conseqüentemente, a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) que conduzem ao *stress* oxidativo, o qual por sua vez induz a TPM⁽¹⁾. A TPM causa disfunção mitocondrial e pode mesmo levar à morte celular.

A TPM é um factor decisivo na irreversibilidade das lesões induzidas durante a isquémia/reperfusão cardíaca, parecendo estar envolvida na modulação do mecanismo de morte celular: por necrose ou apoptose. Existem duas vias principais pelas quais a apoptose pode ocorrer: uma é a via que implica receptores de morte e a outra é a via mitocondrial. A primeira envolve o *Fas*, o factor de necrose tumoral (TNF) e os respectivos receptores. A estimulação destes receptores resulta na activação da caspase 8, a qual, por sua vez, activa as caspases 3, 6 e 7, desencadeando-se assim a cascata apoptótica. A via mitocondrial envolve a libertação de factores pro-apoptóticos para o citosol, entre os quais citocromo *c*, o qual forma um complexo com Apaf-1 activa a caspase 9 que, por sua vez, activa as caspases 3, 6 e 7 e outras caspases que se encontram distalmente⁽²⁾. Os estudos que têm vindo a ser realizados sugerem que a apoptose que ocorre ao nível dos cardiomiócitos poderá ser uma das principais causas dos danos provocados pela isquémia/reperfusão ao nível do miocárdio, podendo também estar envolvida na génese da insuficiência cardíaca.

O carvedilol ou {1-[carbazolil-(4)-oxi]-3-[2-metoxifenoxietil]amino]-propanol-(2)} é utilizado clinicamente no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca, hipertensão e doença coronária.

INTRODUCTION

The cell changes underlying ischemic heart disease are often associated with deficiencies in oxygen and nutrient supply to cardiac cells due to impaired coronary perfusion (ischemia), which can cause dysfunction or death of cardiac myocytes. Ischemia negatively affects mitochondrial function by inducing the mitochondrial permeability transition (MPT), which consists of the formation of protein pores in the internal mitochondrial membrane, called mitochondrial permeability transition pores (MPTP). During ischemia, antioxidant defenses are diminished and the components of the respiratory chain are in the reduced state due to oxygen deficiency, which favors electron leakage and consequently the formation of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress, which in turn induces the MPT⁽¹⁾. The MPT causes mitochondrial dysfunction and can ultimately lead to cell death.

The MPT is a major factor in the irreversibility of damage caused during cardiac ischemia/reperfusion, and appears to affect whether the mechanism of cell death is necrosis or apoptosis. There are two main pathways by which apoptosis can occur: one involves death receptors and the other the mitochondria. The former involves the Fas ligand, tumor necrosis factor (TNF) and their respective receptors. Stimulation of these receptors activates caspase 8, which in turn activates caspase 3, 6 and 7, triggering the apoptotic cascade. The mitochondrial pathway involves the release of pro-apoptotic factors into the cytosol, including cytochrome *c*; when this forms a complex with APAF1 it activates caspase 9, which in turn activates caspase 3, 6 and 7 and other downstream caspases⁽²⁾. Studies have suggested that apoptosis of cardiomyocytes may be one of the principal causes of myocardial damage following ischemia/reperfusion, and may also be implicated in the genesis of heart failure.

Carvedilol, or [1-[carbazolyl-(4)-oxy]-3-[(2-methoxyphenoxyethyl)amino]-propanol-(2)], is used clinically in the treatment of patients with heart failure, hypertension and coronary heart disease. It is an antihypertensive agent and a non-selective beta-blocker, with vasodilatory (through blockade of α 1-adrenergic receptors) and antioxidant properties. Its antioxidant activity is attributed to its ability to chelate ions, break the chain of propagation reactions in-

Trata-se de um agente antihipertensivo e um bloqueador não selectivo de receptores β -adrenérgicos, que apresenta propriedades vasodilatadoras (devido a bloquear também os receptores α -adrenérgicos) e antioxidantes. A sua actividade antioxidante é atribuída à capacidade de quelar iões, de quebrar a cadeia (*chain-breaking*) de reacções de propagação envolvidas na peroxidação lipídica membranar e à capacidade de captar radicais superóxido e hidroxilo⁽³⁾.

Os mecanismos responsáveis pelo efeito cardioprotector ainda não estão completamente elucidados. No entanto, pensa-se que o efeito protector seja devido também às propriedades antioxidantes e não apenas ao antagonismo β -adrenérgico. Com o objectivo de elucidar o mecanismo de acção do carvedilol, estudámos o seu impacto ao nível da cascata apoptótica e do stress oxidativo que ocorre na mitocôndria durante a isquémica miocárdica global.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes: Os reagentes foram adquiridos à Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo) ou à Merck (Darmstadt, Germany), com a excepção do carvedilol que foi cedido pela Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) e preparado em dimetilsulfóxido.

Perfusão dos corações: Corações de ratos da estirpe Wistar foram rapidamente removidos da cavidade torácica e perfundidos com meio de

envolvido em membrana lipid peroxidation and capture superoxide and hydroxyl radicals⁽³⁾.

The mechanisms behind this cardioprotective effect are not fully understood. However, it is thought that the effect is due not only to β -adrenergic blockade but also to carvedilol's antioxidant properties. With the aim of clarifying the mechanism responsible for its action, we studied its impact on the apoptotic cascade and on the oxidative stress that occurs in mitochondria following global myocardial ischemia.

METHODS

Reagents: The reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo) or from Merck (Darmstadt, Germany), with the exception of carvedilol, which was supplied by Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) and prepared in DMSO (dimethylsulphoxide).

Perfusion of hearts: Wistar rat hearts were rapidly removed from the chest cavity and perfused in Krebs-Henseleit solution containing 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.25 mM CaCl₂, 10 mM glucose and 10 mM HEPES (pH=7.4, temperature 37 °C) at a pressure of 80-100 mmHg in a Langendorff perfusion system. The ischemia-inducing solution did not contain glucose or oxygen. The hearts were divided into the following groups: i) control – 75 minutes perfusion; ii) ischemia – 15 minutes perfusion followed by 60 minutes ischemia; iii)

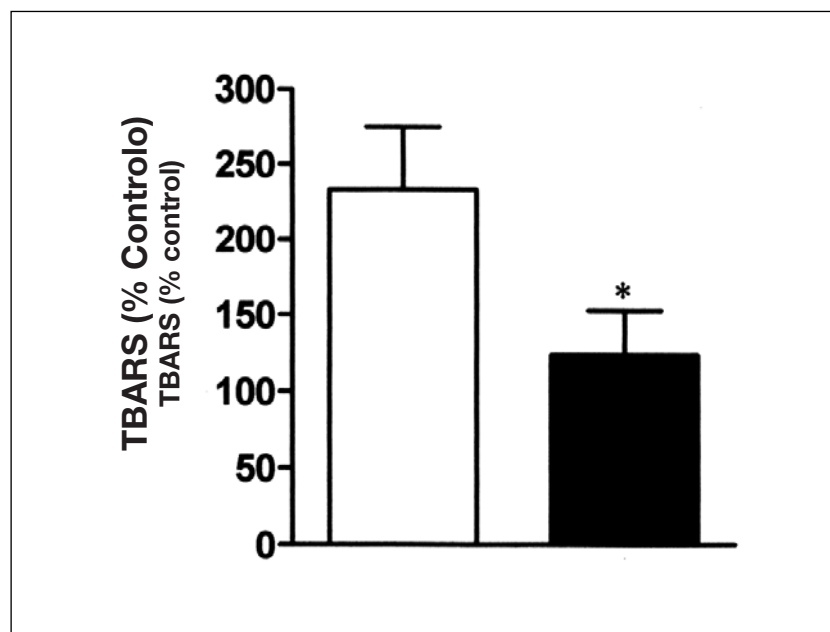


Fig. 1 Efeito da isquémia e do carvedilol no desenvolvimento de stress oxidativo. Comparação dos níveis de TBARS de mitocôndrias cardíacas de rato do grupo isquémico (barras vazias) e do grupo em que a isquémia foi induzida na presença de carvedilol (barras cheias) para sete experiências distintas. Os valores são apresentados em percentagem do controlo. * $p < 0,05$ vs. Isquémia.

Fig. 1 Effect of ischemia and of carvedilol in development of oxidative stress. Comparison of TBARS levels in rat heart mitochondria in the ischemic group (white bar) and in the group in which ischemia was induced in the presence of carvedilol (black bar), for seven separate experiments. Values are presented as percentages of the control. * $p < 0.05$ vs. ischemia.

Krebs-Hanseleit contendo 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,25 mM CaCl₂, 10 mM glicose e 10mM HEPES (pH=7,4 e à temperatura de 37°C) a uma pressão de 80-100 mmHg num sistema de perfusão do tipo Lagendorff. A solução para indução de isquémia não continha glicose nem oxigénio. Os corações foram distribuídos pelos seguintes grupos: i) controlo – 75 minutos de perfusão; ii) isquémia – 15 minutos de perfusão seguidos de 60 minutos de isquémia; iii) isquémia + Carvedilol – 15 minutos de perfusão seguidos de 60 minutos de isquémia, ambas na presença de 40 µM Carvedilol.

Isolamento da fracção mitocondrial: A fracção mitocondrial foi isolada de acordo com o método descrito por Phaneuf e Leeuwenburgh⁽⁴⁾. Resumidamente, após homogeneização dos corações em 300 mM sacarose, 0,2% BSA deslipidada, 10 µM BHT, 100 µM DTPA, pH 7,4 procedeu-se a uma série de centrifugações até se obter a fracção mitocondrial.

Avaliação do stress oxidativo: O stress oxidativo foi avaliado usando o teste do ácido tiobarbitúrico de acordo com o método descrito por Ernster e Nordenbrand⁽⁵⁾, com algumas modificações. Corações homogeneizados em 150 mM KCl, 25 mM Tris-KCl, pH 7,4 foram ressuspensos a uma concentração de 1mg/mL (concentração de proteína avaliada pelo método do biureto) em 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 10mM HEPES, pH 7,4 e fizeram-se reagir com TCA a 40% e reagente de TBA (ácido tiobarbitúrico a 0,375% (m/v), ácido tricloroacético a 15% (m/v) e dibutilhidroxitolueno a 0,68 mM) durante 10 minutos a 100°C, após o que as amostras foram colocadas em gelo, transferidas para tubos cónicos e centrifugadas a 350 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi decantado e a sua densidade óptica determinada a 530 nm, num espectrofotómetro *Spectronic 21*.

Avaliação da actividade típica das caspases 1, 3, 8 e 9: A actividade típica das caspases 1 e 3 foi avaliada de acordo com o método descrito por Gurtu e colaboradores⁽⁶⁾ e a das caspases 8 e 9 de acordo com o protocolo descrito nos respectivos kits da *R&D Systems*. Cada ensaio consistiu em adicionar a cada *well* amostra, meio de reacção (25 mM HEPES, 10% sacarose, 0,1% CHAPS, pH 7,5 e 10 mM DTT) e substrato colorimétrico (substrato IV para a caspase 1, substrato I para a caspase 3, ambos

ischemia + carvedilol – 15 minutes perfusion followed by 60 minutes ischemia, both with 40 µM carvedilol.

Isolation of the mitochondrial fraction: The mitochondrial fraction was isolated following the method described by Phaneuf and Leeuwenburgh⁽⁴⁾. Briefly, following homogenization of the hearts in 300 mM sucrose, 0.2% fat-free BSA, 10 µM BHT, 100 mM DTPA, pH 7.4, a series of centrifugations were performed until the mitochondrial fraction was obtained.

Assessment of oxidative stress: Oxidative stress was assessed using the thiobarbituric acid test using the method described by Ernster and Nordenbrand⁽⁵⁾, with certain modifications. Hearts homogenized in 150 mM KCl, 25 mM Tris-KCl, pH 7.4, were resuspended at a concentration of 1 mg/mL (protein concentration determined by the biuret method) in 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, pH 7.4, and reacted with 40% TCA and TBA reagent (thiobarbituric acid at 0.375% (m/v), trichloroacetic acid at 15% (m/v) and dibutylhydroxytoluene at 0.68 mM) for 10 minutes in a water bath at 100 °C. The samples were then placed in ice, transferred to conical tubes and centrifuged at 350 x g for 10 minutes. The supernatant fluid was decanted and its optical density measured at 530 nm in a *Spectronic 21* spectrophotometer.

Assessment of caspase 1, 3, 8 and 9-like activity: Caspase 1 and 3 activity was assessed following the method described by Gurtu et al.⁽⁶⁾, and caspase 8 and 9 using the protocols included in the respective R&D Systems kits. In each experiment, the reaction medium (25 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, pH 7.5 and 10 mM DTT) and the colorimetric substrate (substrate IV for caspase 1, substrate I for caspase 3, both from Calbiochem, IETD-pNA for caspase 8 and LEHD-pNA for caspase 9) were added to each sample well. Following incubation at 37 °C for 2 hours in the absence of light, the optical density of each well was determined at 405 nm using a Mediators PhL reader.

Analysis of results and statistical treatment: The results of the study are presented as means ± standard error or as percentages of the control ± standard error, for the number of experiments indicated. Statistical analysis of the results was performed using the one-way ANOVA test (GraphPad Prism version 4.00, GraphPad Soft-

da Calbiochem, IETD-*p*NA para a caspase 8 e LEHD-*p*NA para a caspase 9). Após incubação a 37 °C, durante 2 horas e na ausência de luz, determinou-se a densidade óptica de cada *well* a 405 nm no leitor *Mediators PhL*.

Análise dos resultados e tratamento estatístico: Os resultados deste trabalho são apresentados como média±erro padrão ou como percentagem do controlo±erro padrão, para o número de experiências indicadas. O tratamento estatístico dos resultados foi realizado utilizando o teste One-way ANOVA (GraphPad Prism, Versão 4.00, GraphPad Software). O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$ obtido pelo pós-teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (GraphPad Prism, Versão 4.00, GraphPad Software).

RESULTADOS

Neste trabalho, a análise quantitativa da peroxidação lipídica, tradutora do *stress* oxidativo associado à situação de isquémia, foi realizada mediante um ensaio colorimétrico, o teste do ácido tiobarbitúrico, o qual detecta um complexo rosado, resultante da reacção do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malonildialdeído (MDA), produto secundário da peroxidação lipídica, daí o termo TBARS («thiobarbituric acid reactive substances»). Os níveis de TBARS no grupo isquémico foram elevados em comparação com os níveis verificados para o grupo controlo ($233,2 \pm 41,97\%$ no grupo isquémico vs. 100% no grupo controlo; $p < 0,05$) (*Fig. 1*).

Os níveis de TBARS foram significativamente inferiores no grupo em que a isquémia foi induzida na presença de carvedilol ($233,2 \pm 41,97\%$ no grupo isquémico vs. $123,7 \pm 28,82\%$ no grupo isquémia+carvedilol; $p < 0,05$) (*Fig. 1*).

Em relação à actividade típica de caspases, esta foi determinada utilizando um substrato sintético ligado ao cromóforo *p*-nitroanilide (*p*NA). A actividade das caspases é avaliada a partir da detecção de cromóforo de livre, visto que as caspases ao clivarem o substrato, libertam *p*NA que absorve radiação a 405 nm sendo, por isso, facilmente detectado. A actividade típica das caspases na isquémia só apresentou um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo no caso da caspase 8 (*Fig. 2*). Como a actividade das restantes caspases não aumentou significativamente, (nomeadamente a actividade da caspase 3, activada distalmente à caspase 8), estes resultados sugerem

ware). The level of significance was $p < 0.05$ as obtained by the Student-Newman-Keuls multiple comparison post-test (GraphPad Prism version 4.00, GraphPad Software).

RESULTS

Quantitative analysis of lipid peroxidation, which reflects the oxidative stress associated with ischemia, was performed by colorimetry, the thiobarbituric acid test, which detects the pink chromogen resulting from the reaction of thiobarbituric acid with malonyldialdehyde, a secondary product of lipid peroxidation, hence the term thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). TBARS levels in the ischemic group were higher than those found in the control group ($233.2 \pm 41.97\%$ in the ischemic group vs. 100% in the control group; $p < 0.05$) (*Fig. 1*).

These levels were significantly lower in the group in which ischemia was induced in the presence of carvedilol ($233.2 \pm 41.97\%$ in the ischemic group without carvedilol vs. $123.7 \pm 28.82\%$ in the ischemia+carvedilol group; $p < 0.05$) (*Fig. 1*).

Caspase-like activity was determined using a synthetic substrate bound to the chromophore *p*-nitroanilide (*p*NA). It was measured by detection of free chromophores, since as they cleave the substrate, caspases release *p*NA, which absorbs radiation at 405 nm and is therefore easily detected. Under ischemic conditions only caspase 8 showed a statistically significant increase in activity compared to the control (*Fig. 2*). Since the activity of the other caspases did not increase significantly (particularly caspase 3, which is activated downstream of caspase 8), these results suggest that this ischemic protocol did not trigger the apoptotic cascade.

DISCUSSION

The main trigger for the MPT is the oxidative stress that occurs in mitochondria during ischemia. TBARS levels, indicators of oxidative stress, were higher in the ischemic group than in the control group (*Fig. 1*), due to the fact that during ischemia respiratory chain components are in the reduced state (as a result of high levels of NADH and FADH₂ and decreased levels of the electron-transport stimulators ADP and O₂), which favors electron leakage and ROS production⁽¹⁾. If antioxidant defenses are effective, ROS production does not cause ox-

que este protocolo de isquemia não provocou indução da cascata apoptótica.

DISCUSSÃO

O principal indutor de TPM é o *stress* oxidativo que ocorre na mitocôndria durante a isquemia. Os níveis de TBARS, tradutores de *stress* oxidativo, são superiores no grupo isquémico em comparação com o grupo controlo (*Fig. 1*) devido a durante a situação de isquemia os componentes da cadeia respiratória se encontrarem na forma reduzida (como consequência de elevados níveis de NADH e FADH₂ e aos estimuladores do transporte de electrões, ADP e O₂, estarem diminuídos) o que favorece a fuga de electrões e a produção de ROS⁽¹⁾. Se as defesas antioxidantes fossem suficientemente eficientes, a produção de ROS não provocaria dano oxidativo. Contudo, a isquemia, além de aumentar a produção de ROS, também diminui as defesas antioxidantes (diminui, por exemplo, a actividade da MnSOD e da glutathione peroxidase), aumentando a probabilidade de ocorrência de dano oxidativo⁽⁷⁾. O dano oxidativo pode manifestar-se por indução da TPM ou por dano directo das membranas mitocondriais, com a consequente perda de integridade membranar.

A diminuição dos níveis de TBARS no grupo em que a isquemia foi induzida na presença de carvedilol (*Fig. 1*) está de acordo com o facto de este apresentar propriedades antioxi-

idative damage, but ischemia, besides increasing ROS production, also weakens antioxidant defenses (for example, by decreasing the activity of MnSOD and glutathione peroxidase), thus increasing the likelihood of oxidative damage⁽⁷⁾. This can manifest itself by induction of the MPT or by direct damage to mitochondrial membranes, with consequent loss of membrane integrity.

The lower levels of TBARS found in the group in which ischemia was induced in the presence of carvedilol (*Fig. 1*) are in accordance with its antioxidant properties. Carvedilol functions as an ROS scavenger and breaks the chain of propagation reactions involved in membrane lipid peroxidation, thereby protecting mitochondria from oxidative damage⁽³⁾.

Some authors do not believe that carvedilol functions as an ROS scavenger, suggesting its antioxidant properties stem from its ability to sequester Fe²⁺, preventing it from participating in the Fenton reaction that gives rise to the hydroxyl radical, one of the most damaging ROS⁽⁸⁾.

An additional mechanism that would enable carvedilol to preserve the functional and structural integrity of mitochondria under conditions of oxidative stress, such as those caused by ischemia, is the fact that it functions as a protonophore, an ability conferred by the amine group of the ethylamine group, which has a pKa value of 7.9⁽⁹⁾. Carvedilol may bind to a proton

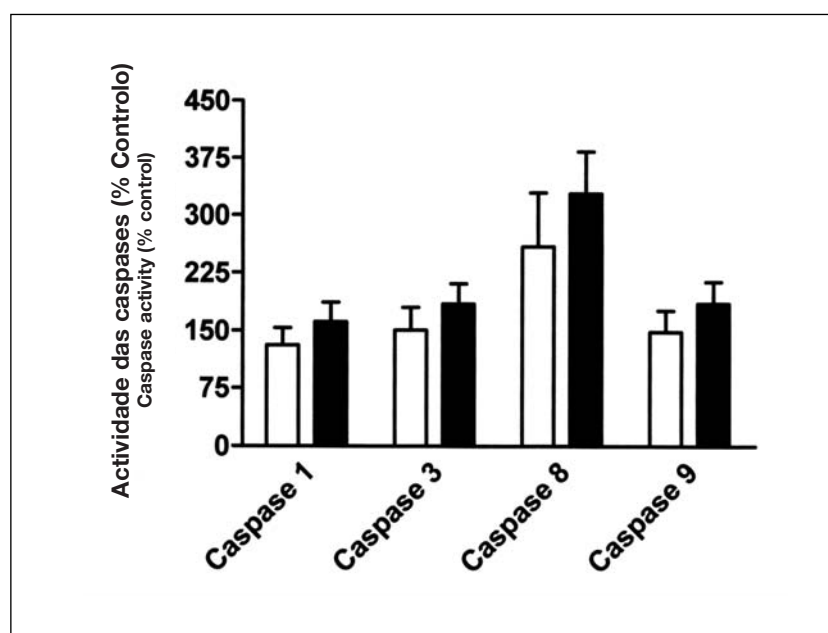


Fig. 2 Efeito da isquemia e do carvedilol na actividade típica de caspases. Comparação da actividade típica de caspases (1, 3, 8 e 9) de mitocôndrias cardíacas de ratos do grupo isquémico (barras vazias) e do grupo em que a isquemia foi induzida na presença de carvedilol (barras cheias) para cinco experiências distintas. Os valores são apresentados em percentagem do controlo.

Fig. 2 Effect of ischemia and of carvedilol in caspase-like activity. Comparison of caspase (1, 3, 8 and 9) activity in rat heart mitochondria in the ischemic group (white bars) and in the group in which ischemia was induced in the presence of carvedilol (black bars), for five separate experiments. Values are presented as percentages of the control.

dantes. O carvedilol funciona como um *scavenger* de ROS e quebra a cadeia de reacções de propagação envolvidas na peroxidação lipídica membranar, protegendo as mitocôndrias do dano oxidativo⁽³⁾.

Existem outros autores que defendem que o carvedilol não funciona como um *scavenger* de ROS e que as suas propriedades antioxidantes são devidas à sua capacidade de sequestrar Fe²⁺, impedindo-o de participar na reacção de Fenton que daria origem ao radical hidroxilo, uma das ROS que mais danos provoca⁽⁸⁾.

Um mecanismo adicional que permitirá ao carvedilol preservar a integridade funcional e estrutural de mitocôndrias sob condições de *stress* oxidativo, como as provocadas por uma situação de isquémia, poderá ser o facto deste funcionar como um protonóforo, capacidade que lhe é conferida pelo grupo amínico do grupo etilamina que apresenta um valor de pKa de 7,9⁽⁹⁾. O carvedilol poderá ligar um protão do lado citosólico da membrana mitocondrial interna, atravessar a membrana na forma carregada a favor do gradiente eléctrico (negativo na matriz em relação ao citosol), libertar o protão na matriz (pH mais elevado) e retornar ao lado citosólico da membrana mitocondrial interna na forma neutra. O resultado deste processo é uma diminuição do potencial eléctrico transmembranar. Está demonstrado que uma ligeira redução do potencial eléctrico transmembranar, provocada por baixas concentrações de protonóforos, é um mecanismo eficaz para reduzir a produção de ROS sem comprometer a energética celular.

A isquémia provoca dano oxidativo dos lípidos e proteínas da membrana. O dano oxidativo das proteínas, que se manifesta por uma diminuição do conteúdo em grupos sulfidrílo (SH) e por um aumento do conteúdo em proteínas modificadas por oxidação⁽¹⁾, é particularmente importante, pois está envolvido na indução da TPM: para haver formação do PTPM é necessário ocorrer oxidação dos grupos tiólicos das proteínas que constituem o PTPM⁽²⁾. Sendo que a TPM parece representar um papel decisivo na irreversibilidade das lesões induzidas durante a isquémia cardíaca e que a sua extensão parece estar ainda envolvida na modulação do mecanismo de morte celular, o facto do carvedilol impedir a oxidação dos grupos tiólicos e a formação do PTPM na conformação de alta condutância reveste-se de grande importância. Esta sua acção ao nível da TPM poderá ser a base

on the cytosolic side of the internal mitochondrial membrane, cross the membrane in a charged state in the direction of the electrical gradient (negative in the matrix in relation to the cytosol), release the proton in the matrix (higher pH), and return to the cytosol in a neutral state. This process results in a decrease in transmembrane electrical potential. It has been demonstrated that a slight reduction in this potential, caused by low concentrations of protonophores, is effective in reducing ROS production without compromising cell energetics.

Ischemia causes oxidative damage to membrane lipids and proteins. Oxidative damage to proteins, manifested by reduced content of sulfhydryl groups and by increased content of proteins altered by oxidation⁽¹⁾, is particularly important since it is involved in induction of the MPT. For the MPTP to form the protein thiol groups that constitute it must be oxidized⁽²⁾. Since the MPT appears to determine the irreversibility of damage caused by cardiac ischemia and may also be involved in modulating cell death, the fact that carvedilol prevents oxidation of thiol groups and MPTP formation in high-conductance conformation takes on even greater importance. Carvedilol's action on the MPT may be the basis for its protective effect in cardiac mitochondria subjected to ischemia.

However, the protection that carvedilol affords against the oxidative damage to lipids (lipid peroxidation) that occurs during ischemia should not be ignored, since this can seriously compromise membrane integrity and hence the mitochondrial permeability barrier, which can also lead to serious consequences for the cell.

Since oxidative stress can induce apoptosis, we also studied whether the ischemia produced in this experimental protocol led to apoptosis and whether carvedilol would protect ischemic mitochondria from apoptotic cell death. It was found that in ischemia only caspase-8-like activity presented a statistically significant increase compared to the control (*Fig. 2*). Since the activity of the other caspases, particularly caspase 3 which is activated downstream of caspase 8, did not increase significantly, these results suggest that the ischemia induced in this experimental protocol did not trigger the apoptotic cascade. Indeed, some authors argue that ischemia itself is not sufficient to trigger apoptosis, which only occurs to any significant extent during reperfusion; others believe that

dos seus efeitos protectores em mitocôndrias cardíacas sujeitas a isquémia.

Não é, no entanto, de desprezar a protecção do carvedilol em relação ao dano oxidativo dos lípidos (peroxidação lipídica) que ocorre durante a situação de isquémia, uma vez que este pode comprometer seriamente a integridade membranar e, conseqüentemente, a barreira de permeabilidade mitocondrial, o que também acarreta graves conseqüências para a célula.

Sendo que o *stress* oxidativo pode induzir apoptose, analisou-se também se a isquémia induzida neste protocolo experimental provocava apoptose e se o carvedilol protegeria ou não as mitocôndrias isquémicas de morte celular por apoptose. Verificámos que a actividade típica das caspases na situação de isquémia só apresenta um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo no caso da caspase 8 (Fig. 2). Como a actividade das restantes caspases não é aumentada significativamente, nomeadamente, a actividade da caspase 3 que seria activada distalmente à caspase 8, estes resultados sugerem que a isquémia utilizada neste protocolo experimental não provocou indução da cascata apoptótica. De facto, existem autores que referem que a isquémia não é suficiente para provocar apoptose e que esta só ocorre de forma significativa durante a fase de reperfusão, ou que a apoptose pode ser iniciada durante a isquémia, mas que não pode ocorrer sem a subsequente reperfusão, visto que é necessário ATP para a conclusão da apoptose, o qual não se encontra disponível em quantidades suficientes durante a isquémia prolongada, mas sim apenas na fase de reperfusão, quando ocorre reoxigenação dos tecidos e reabastecimento das reservas de glucose⁽¹⁰⁾.

A TPM é apontada como podendo ser o evento inicial no processo de morte celular, designadamente na apoptose, que ocorre numa variedade de estados patológicos, como, por exemplo, a isquémia/reperfusão. Apesar do carvedilol ser um inibidor do PTPM, como não se verificou a ocorrência de apoptose durante a isquémia, não seria de esperar que se verificasse uma acção significativa por parte do carvedilol em relação à actividade das caspases. De facto, a actividade das caspases na situação de isquémia e isquémia induzida na presença de carvedilol não apresentou diferenças significativas.

apoptosis may be initiated during ischemia, but cannot occur without subsequent reperfusion, since ATP, which is necessary to complete the process, is not available in sufficient quantities during prolonged ischemia but only at the reperfusion stage, when there is re-oxygenation of tissues and replenishment of glucose reserves⁽¹⁰⁾.

The MPT has been proposed as the possible initial event in cell death, particularly in apoptosis, which occurs in a variety of pathological states, for example ischemia/reperfusion. Even though carvedilol is an MPTP inhibitor, the fact that no apoptosis was found during ischemia means that carvedilol would not be expected to have a significant effect on caspase activity, and in fact there were no significant differences in caspase activity between ischemia induced in the absence and in the presence of carvedilol.

CONCLUSIONS

This study proved that prolonged ischemia has a negative impact on cardiac mitochondrial function. Carvedilol was shown to have a protective effect against mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress during ischemia. The results suggest that carvedilol inhibits the MPT by preventing the oxidative stress that would trigger the opening of the MPTP.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly funded by Procardio. The carvedilol was kindly donated by Roche Diagnostics.

CONCLUSÕES

O estudo realizado comprovou que a isquémia prolongada tem um impacto negativo na função da mitocondrial cardíaca. O carvedilol demonstrou ter um efeito protector em relação à disfunção mitocondrial induzida pelo *stress* oxidativo desenvolvido durante a isquémia. Os resultados obtidos sugerem que o carvedilol inibe a TPM ao impedir a ocorrência de *stress* oxidativo que promoveria a abertura do PTPM.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Procardio. O carvedilol foi gentilmente cedido pelos Laboratórios Roche.

Pedido de separatas para:

Address for reprints:

LINO GONÇALVES

Serviço de Cardiologia

Hospitais da Universidade de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000 COIMBRA, PORTUGAL

e-mail: lgoncalv@ci.uc.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Lesnfsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1065-89.
2. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 1999;341:233-49.
3. Davis LL, and Feuerstein G. Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992;263:92-8.
4. Phaneuf S, and Leeuwenburgh C. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002;282:R423-R430.
5. Ernster L, and Nordenbrand K. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 1967;10:574-80.
6. Gurtu V, Kain SR, and Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal. Biochem.* 1997;251(1):98-102.
7. Shlafer M, Myers CL, and Adkins S. Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19:1195-206.
8. Noguchi N, Nishino K, and Niki E. Antioxidant action of the antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 2000;59:1069-76.
9. Oliveira PJ, Rolo AP, Sardão VA, Coxito PM, Palmeira CM, and Moreno AJM. Carvedilol in heart mitochondria: Protonophore or opener of the mitochondrial KATP channels? *Life Sciences.* 2001b;69:123-32.
10. Maulik N, Yoshida T, and Das DK. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free radical Biology & Medicine.* 1998;24(5):869-75.