

# Impacto do Carvedilol sobre o Dano Mitochondrial Induzido por Hipoxantina/Xantina Oxidase – Que Papel na Isquemia e Reperfusão do Miocárdio? [103]

PAULO J. OLIVEIRA \*, ANABELA P. ROLO \*\*, PEDRO MONTEIRO \*\*\*, LINO GONÇALVES \*\*\*,  
CARLOS M. PALMEIRA \*\*, ANTÓNIO J. MORENO \*\*

\* Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Unidade de Investigação Básica em Cardiologia,  
Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

\*\* Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Departamento de Zoologia,  
Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

\*\*\* Unidade de Investigação Básica em Cardiologia, Serviço de Cardiologia,  
Hospitais da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Rev Port Cardiol 2002;21 (12): 1447-1455

## RESUMO

**Objectivo:** Os efeitos cardioprotectores do carvedilol (CV) poderão ser explicados, em parte, por interações ao nível da mitocôndria cardíaca. O objectivo deste trabalho visou o estudo do efeito protector do CV em mitocôndrias cardíacas durante danos oxidativos induzidos por hipoxantina e xantina oxidase (HX/XO), uma conhecida fonte de estresse oxidativo no sistema cardiovascular.

**Métodos:** As mitocôndrias foram isoladas a partir de corações de ratos Wistar (n=8) e incubadas com o par HX/XO, na presença e na ausência de cálcio. Vários métodos foram utilizados de modo a verificar a acção protectora do CV: avaliação das alterações de volume mitocondrial (variação da densidade óptica da suspensão mitocondrial), tomada e libertação de cálcio mitocondrial (com uma sonda fluorescente, Calcium Green-5N) e respiração mitocondrial (com um eléctrodo de oxigénio).

**Resultados:** O CV reduziu os danos mitocondriais associados à produção de espécies reactivas de oxigénio (ERO) pelos prooxidantes, como verificado pela redução no entumescimento mitocondrial e aumento da capacidade de retenção do cálcio pela mitocôndria. O CV melhorou ainda a capacidade respiratória mitocondrial

## ABSTRACT

### Impact of Carvedilol on the Mitochondrial Damage Induced by Hypoxanthine and Xanthine Oxidase – What Role in Myocardial Ischemia and Reperfusion?

**Objectives:** The cardioprotective effects of carvedilol (CV) may be explained in part by interactions with heart mitochondria. The objective of this work was to study the protection afforded by CV against oxidative stress induced in isolated heart mitochondria by hypoxanthine and xanthine oxidase (HX/XO), a well-known source of reactive oxygen species (ROS) in the cardiovascular system.

**Methods:** Mitochondria were isolated from Wistar rat hearts (n=8) and incubated with HX/XO in the presence and in the absence of calcium. Several methods were used to assess the protection afforded by CV: evaluation of mitochondrial volume changes (by measuring changes in the optical density of the mitochondrial suspension), calcium uptake and release (with a fluorescent probe, Calcium Green 5-N) and mitochondrial respiration (with a Clark-type oxygen electrode).

**Results:** CV decreased mitochondrial damage associated with ROS production by HX and XO, as verified by the reduction of

associada ao estado fosforilativo e aumentou o índice de controlo respiratório ( $p < 0.05$ ) e o quociente ADP/O ( $p < 0.001$ ) das mitocôndrias cardíacas sob estresse oxidativo induzido por HX/XO.

**Conclusões:** Os dados indicam que o CV protegeu parcialmente a mitocôndria cardíaca de danos oxidativos induzidos por HX/XO, o que poderá ser de grande utilidade em situações de isquemia-reperfusão do miocárdio.

Os resultados também sugerem que a mitocôndria poderá ser um alvo prioritário para a acção benéfica de alguns fármacos cardioprotectores.

#### Palavras-Chave

Mitocôndria; Coração; Carvedilol; Cálcio; Xantina oxidase; Transição de permeabilidade mitocondrial

mitochondrial swelling and increase in mitochondrial calcium uptake. In the presence of HX and XO, CV also ameliorated mitochondrial respiration in the active phosphorylation state and prevented decrease in the respiratory control ratio ( $p < 0.05$ ) and in mitochondrial phosphorylative efficiency ( $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** The data indicate that CV partly protected heart mitochondria from oxidative damage induced by HX and XO, which may be useful during myocardial ischemia and reperfusion. It is also suggested that mitochondria may be a priority target for the protective action of some compounds.

#### Key words

Mitochondria; Heart; Carvedilol; Calcium; Xantine oxidase; Mitochondrial permeability transition

## INTRODUÇÃO

A síntese de adenosina trifosfato (ATP) e a manutenção dos níveis citosólicos e mitocondriais de cálcio são dois dos processos que dependem do gradiente electroquímico de prótons gerado pela respiração mitocondrial. A elevada necessidade energética do músculo cardíaco é sustentada pela produção mitocondrial de ATP. Uma redução na disponibilidade de oxigénio, como acontece durante a isquémia do miocárdio, poderá ser danosa para a função do miocárdio. O papel da mitocôndria na doença isquémica cardíaca foi já exaustivamente descrito (para uma revisão, ver <sup>(1)</sup>). A isquémia/hipóxia e a reoxigenação do tecido cardíaco são processos que se sabe danificarem a mitocôndria cardíaca num fenómeno denominado paradoxo do oxigénio. Sabe-se que a súbita disponibilidade de oxigénio poderá causar uma elevada e prejudicial geração de espécies reactivas de oxigénio (ERO) <sup>(2)</sup>. Há muitas fontes potenciais de ERO no miocárdio <sup>(3)</sup>, incluindo a cadeia respiratória mitocondrial e a enzima xantina oxidase, localizada nas células endoteliais vasculares. Consequências da súbita geração de ERO incluem peroxidação lipídica, danos ao material genético nuclear e mitocondrial e oxidação de proteínas. Especificamente ao nível mitocondrial, o estresse oxidativo aliado à presença de cálcio no interior da mitocôndria leva à formação e abertura de poros na membrana interna da mitocôndria,

## INTRODUCTION

Synthesis of adenosine triphosphate (ATP) and maintenance of cytosolic and mitochondrial calcium levels are two of the processes dependent on the electrochemical proton gradient produced by mitochondrial respiration. The high energy requirements of cardiac muscle are met by ATP production in the mitochondria. A reduction in the availability of oxygen, such as occurs in myocardial ischemia, may impair mitochondrial function. The role of mitochondria in ischemic heart disease has been comprehensively investigated (see <sup>(1)</sup> for a review). Ischemia hypoxia and reoxygenation of cardiac tissue are known to damage cardiac mitochondria, in a phenomenon known as the oxygen paradox. It is known that the sudden availability of oxygen can lead to the generation of a massive and harmful amount of reactive oxygen species (ROS) <sup>(2)</sup>. There are many potential sources of ROS in the myocardium <sup>(3)</sup>, including the mitochondrial respiratory chain and the enzyme xanthine oxidase, which is found in vascular endothelial cells. The consequences of a rapid generation of ROS include lipid peroxidation, damage to nuclear and mitochondrial genetic material and oxidation of proteins. In mitochondria in particular, oxidative stress, together with the presence of calcium inside the mitochondria, leads to the formation and opening of pores in the internal mitochondrial membrane, a phenomenon

um fenómeno conhecido por transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (para uma revisão ver<sup>(4)</sup>). Dada a importância da manutenção da função mitocondrial cardíaca para a sobrevivência do cardiomiócito após um episódio de isquémia e reperfusão (I/R), é essencial estudar e desenhar compostos que possam proteger o funcionamento da mitocôndria.

O carvedilol é um antagonista beta-adrenérgico, utilizado no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão e enfarte do miocárdio. O carvedilol mostrou também possuir uma actividade antioxidante intrínseca bastante potente<sup>(5)</sup>.

O objectivo deste trabalho foi o de determinar o efeito do carvedilol em mitocôndrias cardíacas após estresse oxidativo gerado pela enzima xantina oxidase (XO) na presença de um substrato, a hipoxantina (HX). A função cardíaca mitocondrial foi testada após a geração de anião superóxido por aquele par pro-oxidante, na presença e ausência de cálcio, em protocolos experimentais que procuraram mimetizar o que se passa durante a I/R do miocárdio.

Observámos que o carvedilol protegeu parcialmente a mitocôndria cardíaca dos danos oxidativos induzidos por XO/HX. A presença de cálcio parece ser determinante para o tipo de disfunção sofrida pela mitocôndria.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Materiais:** O carvedilol foi obtido da Roche Farmacêutica (Portugal) e preparado em DMSO (dimetilsulfoxido). O volume final de solvente na câmara de reacção foi sempre inferior a 0,2 % do volume total e nunca mostrou ter qualquer efeito nos parâmetros medidos. Todos os outros compostos foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO), à excepção da sonda fluorescente Calcium Green-5N (Molecular Probes, Eugene, OR).

**Animais:** Ratos macho Wistar (n=8) foram usados durante as experiências. Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Requerimentos Europeus para a Pesquisa em Animais Vertebrados.

**Isolamento da fracção mitocondrial cardíaca:** Mitocôndrias cardíacas foram isoladas de acordo com um método previamente descrito<sup>(6)</sup>. A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pelo método do biureto, utilizando BSA como padrão.

known as the mitochondrial permeability transition (MPT) (see<sup>(4)</sup> for a review). Given the importance of maintaining cardiac mitochondrial function for the survival of cardiac myocytes after an episode of ischemia and reperfusion (I/R), it is essential to investigate and design compounds that can protect mitochondrial function.

Carvedilol is a beta-adrenergic antagonist used in the treatment of congestive heart failure, hypertension and myocardial infarction. It has also been shown to have a strong intrinsic antioxidant effect<sup>(5)</sup>.

The objective of this work was to determine the effect of carvedilol on cardiac mitochondria following oxidative stress induced by the enzyme xanthine oxidase (XO) in the presence of a substrate, hypoxanthine (HX). Cardiac mitochondrial function was tested after the generation of superoxide anions by this pair of pro-oxidants, in the presence and the absence of calcium, in experimental protocols designed to mimic what occurs during myocardial I/R.

We observed that carvedilol partially protected cardiac mitochondria from oxidative damage induced by XO/HX. The presence of calcium appears to be a determining factor in the type of mitochondrial dysfunction.

## METHODS

**Materials:** The carvedilol was obtained from Roche Farmacêutica (Portugal) and prepared in DMSO (dimethylsulfoxide). The final volume of solvent in the reaction chamber was kept below 0.2 % of total volume and showed no effect on the parameters measured. All other compounds were acquired from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO), except the fluorescent probe Calcium Green-5N (Molecular Probes, Eugene, OR).

**Animals:** Male Wistar rats (n=8) were used in the experiments. The experimental procedures were in accordance with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Scientific Purposes.

**Isolation of the cardiac mitochondrial fraction:** Cardiac mitochondria were isolated in accordance with a previously described method<sup>(6)</sup>. The concentration of mitochondrial protein was determined by the biuret reaction, using BSA as the standard.

**Monitoring of mitochondrial swelling:** The excessive accumulation of calcium in mito-

*Seguimento do entumescimento mitocondrial:* A acumulação excessiva de cálcio na mitocôndria, em condições pro-oxidantes, leva à TPM. Uma das consequências é o aumento de volume mitocondrial que pode ser seguido pelas variações da densidade óptica da suspensão mitocondrial medidas a 540 nm.

*Seguimento da tomada de cálcio pela mitocôndria:* Uma conhecida manifestação da TPM é a libertação de cálcio mitocondrial induzida por cálcio. A tomada e libertação de cálcio pelas mitocôndrias foram seguidas recorrendo a uma sonda fluorescente, denominada Calcium Green-5N (exc.: 506 nm/em.: 531 nm).

*Consumo de oxigénio da suspensão mitocondrial:* A respiração mitocondrial foi seguida com um eléctrodo de oxigénio do tipo Clark. Os parâmetros avaliados foram o estado respiratório 3 (consumo respiratório durante a fosforilação mitocondrial de ADP em ATP), estado respiratório 4 (após a cessação da fosforilação de ADP em ATP), o índice de controlo respiratório (ICR, a razão entre o estado 3 e o estado 4) e o quociente ADP/O (uma medida da eficiência fosforilativa mitocondrial que nos dá a quantidade de ADP fosforilado por unidade de átomo de oxigénio consumido).

*Análise estatística:* Os resultados são apresentados como médias $\pm$ SEM de 7-8 preparações diferentes. A análise estatística foi efectuada por ANOVA, seguido de um pós-teste Student-Newman-Keuls. Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

A adição de XO a uma suspensão mitocondrial previamente acumulada com cálcio e num meio de reacção suplementado com HX levou a um aumento do volume mitocondrial (traço A, *Fig. 1*), que foi inibido por ciclosporina-A, um inibidor específico da TPM (traço D, *Fig. 1*). O carvedilol, de uma forma dose-dependente, inibiu o entumescimento da suspensão mitocondrial (traços B e C, *Fig. 1*). Na ausência de cálcio, as concentrações utilizadas de XO e HX não mostraram qualquer efeito significativo (não mostrado).

A capacidade mitocondrial de retenção de cálcio na presença dos pro-oxidantes XO e HX foi também testada (*Fig. 2*). Adicionou-se XO a mitocôndrias cardíacas pré-acumuladas com cálcio e na presença de HX. O resultado foi uma descarga de cálcio para o meio de reacção

chondria in pro-oxidant conditions leads to the MPT. One of the consequences of this is an increase in mitochondrial volume, which can be monitored by variations in the optical density of the mitochondrial suspension measured at 540 nm.

*Monitoring of calcium uptake by mitochondria:* A known result of the MPT is calcium-induced mitochondrial calcium release. Calcium uptake and release were monitored using a fluorescent probe, Calcium Green-5N (excitation 506 nm/emission 531 nm).

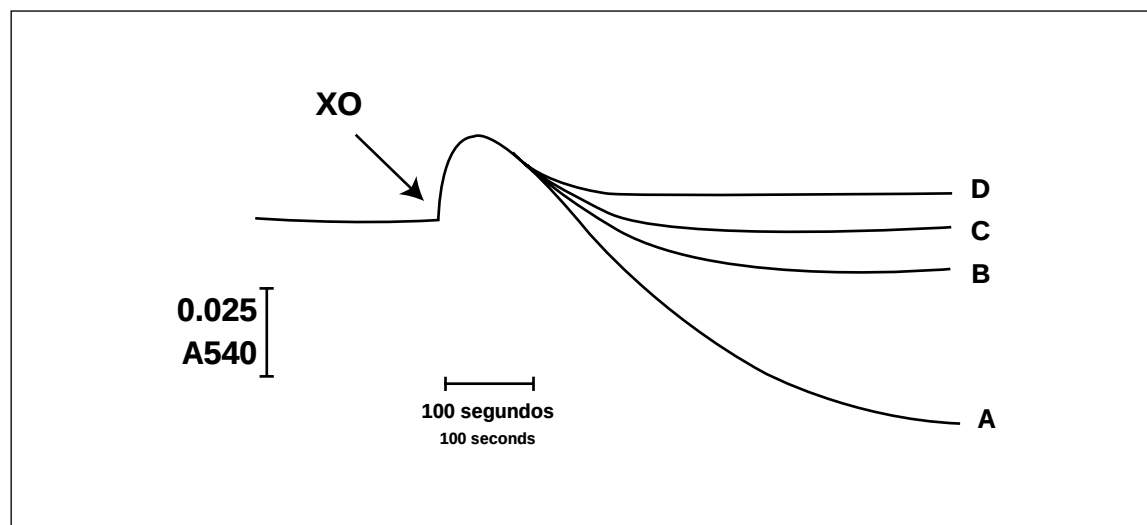
*Oxygen consumption in the mitochondrial suspension:* Mitochondrial respiration was measured using a Clark oxygen electrode. The parameters assessed were respiratory state 3 (respiratory consumption during mitochondrial phosphorylation of ADP to ATP), respiratory state 4 (after phosphorylation of ADP to ATP), the respiratory control ratio (RCR, the ratio between state 3 and state 4), and the ADP/O ratio (a measure of the efficiency of mitochondrial phosphorylation that gives the amount of ADP phosphorylated per oxygen atom consumed).

*Statistical analysis:* The results are presented as the means $\pm$ SEM of 7-8 different preparations. Statistical analysis was done by ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls post-test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

The addition of XO to a mitochondrial suspension pre-loaded with calcium and in a reaction medium supplemented with HX led to an increase in mitochondrial volume (line A, *Fig. 1*), which was inhibited by cyclosporin-A, a specific inhibitor of the MPT (line D, *Fig. 1*). Carvedilol inhibited the swelling of the mitochondrial suspension in a dose-dependent fashion (lines B and C, *Fig. 1*). In the absence of calcium, the concentrations of XO and HX used had no significant effect (not shown).

The ability of mitochondria to retain calcium in the presence of the pro-oxidants XO and HX was also tested (*Fig. 2*). XO was added to cardiac mitochondria that had been pre-loaded with calcium and in the presence of HX. The result was a discharge of calcium to the reaction medium (line A, *Fig. 2*), again inhibited by cyclosporin-A (line D, *Fig. 2*). Confirming the previous result, carvedilol was shown to slow down calcium loss in a dose-dependent fashion (lines B and C, *Fig. 2*).



*Fig. 1* Entumescimento mitocondrial medido como a variação da densidade óptica a 540 nm da suspensão mitocondrial. Um pequeno pulso de 50  $\mu$ M cálcio foi adicionado à suspensão mitocondrial (0,5 mg proteína mitocondrial/ml). O meio de reação era constituído por 200 mM sacarose, 10  $\mu$ M TRIS-MOPS, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\mu$ M EGTA, 4  $\mu$ M rotenona, 0,5  $\mu$ g oligomicina, 8 mM succinato e 25  $\mu$ M hipoxantina (pH 7,4, 25°C). Após estabilização da linha base, xantina oxidase (XO), 67 mU, foi adicionada à suspensão mitocondrial. O carvedilol foi pré-incubado com a suspensão mitocondrial durante 3 minutos. Curva A: Cálcio+XO, Curva B: Cálcio+XO+10  $\mu$ M carvedilol, Curva C: Cálcio+XO+20  $\mu$ M carvedilol, Curva D: Cálcio+XO+1  $\mu$ M ciclosporina-A. O registo é representativo de três preparações diferentes.

*Fig. 1* Mitochondrial swelling measured as the variation in optical density of the mitochondrial suspension at 540 nm. A small 50- $\mu$ M pulse of calcium was added to the suspension (0.5 mg mitochondrial protein/ml). The reaction medium consisted of 200 mM sucrose, 10  $\mu$ M TRIS-MOPS, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\mu$ M EGTA, 4  $\mu$ M rotenone, 0.5  $\mu$ g oligomycin, 8 mM succinate and 25  $\mu$ M hypoxanthine (pH 7.4, 25°C). After baseline stabilization, xanthine oxidase (XO), 67 mU, was added to the suspension. Carvedilol was pre-incubated with the mitochondrial suspension for 3 minutes. Curve A: Calcium+XO, Curve B: Calcium+XO+10  $\mu$ M carvedilol, Curve C: Calcium+XO+20  $\mu$ M carvedilol, Curve D: Calcium+XO+1  $\mu$ M cyclosporine-A. The record illustrates three different preparations.

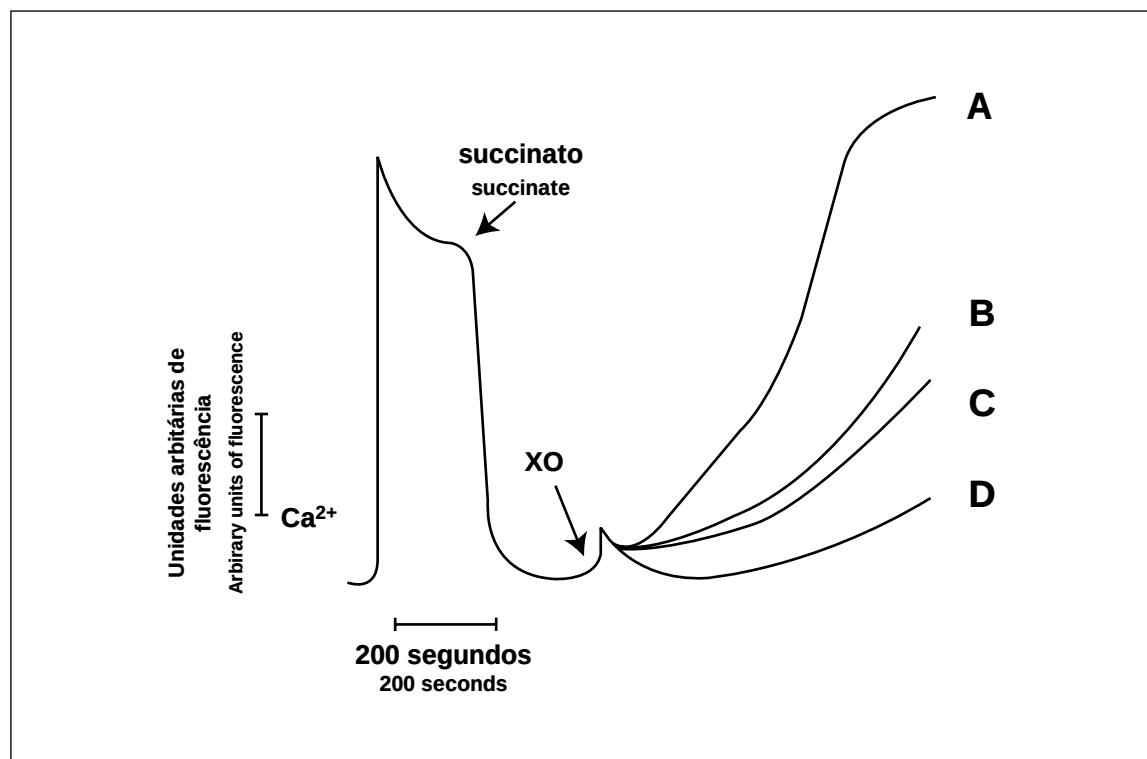
(traço A, *Fig. 2*), novamente inibida por ciclosporina-A (traço D, *Fig. 2*). Confirmando o resultado anterior, o carvedilol, de uma forma dose-dependente, mostrou ser capaz de atrasar a perda de cálcio (traços B e C, *Fig. 2*).

Finalmente, testámos o efeito dos pro-oxidantes na ausência de cálcio em parâmetros respiratórios de mitocôndrias cardíacas isoladas. A pré-incubação com os pro-oxidantes inibiu a respiração nos estados 4 e 3 (*Fig. 3*), sendo que o estado respiratório 3 foi o mais inibido. Tanto o índice ADP/O como o ICR foram também bastante afectados (*Fig. 4*) pela incubação com XO. O carvedilol, pré-incubado três minutos antes da adição de XO, promoveu uma protecção significativa ao nível do estado 3 ( $p < 0.05$  vs ausência de carvedilol, *Fig. 3*). No entanto, o estado 4 manteve-se inalterado. De realçar a protecção completa do carvedilol no índice ADP/O ( $p < 0.001$  vs ausência de carvedilol) e a protecção parcial ao nível do ICR ( $p < 0.01$  vs ausência de carvedilol) (*Fig. 4*). O composto ciclosporina-A, inibidor da TPM dependente de cálcio, não mostrou qualquer efeito protector em nenhum dos parâmetros.

Finally, we tested the effect of the pro-oxidants in the absence of calcium on the respiratory parameters of isolated cardiac mitochondria. Pre-incubation with the pro-oxidants inhibited respiration in states 4 and 3 (*Fig. 3*), with respiratory state 3 being the most inhibited. Both the ADP/O ratio and the RCR were also strongly affected (*Fig. 4*) by incubation with XO. Carvedilol, pre-incubated three minutes before the addition of XO, gave significant protection during state 3 ( $p < 0.05$  vs. absence of carvedilol, *Fig. 3*). However, state 4 remained unchanged. It should be noted that carvedilol 9f forced complete protection on the ADP/O index ( $p < 0.001$  vs. absence of carvedilol) and partial protection on the RCR ( $p < 0.01$  vs. absence of carvedilol) (*Fig. 4*). Cyclosporin-A, a compound that inhibits calcium-dependent MPT, had no protective effect on any of the parameters.

## DISCUSSION

Isolated cardiac mitochondria were used to study the protective effect of carvedilol in a model of mitochondrial damage through oxidat-



**Fig. 2** Tomada e liberação de cálcio pela mitocôndria. A sonda Calcium Green-5N foi utilizada para seguir a concentração de cálcio livre no exterior da mitocôndria (0,2 mg proteína/ml). O meio de reação era constituído por 200 nM sacarose, 10  $\mu$ M TRIS-MOPS, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\mu$ M EGTA, 2  $\mu$ M rotenona, 100 nM Calcium Green-5N, 0,1  $\mu$ g oligomicina e 5  $\mu$ M hipoxantina (pH 7,4, 25°C). Foi adicionado cálcio (10  $\mu$ M) à suspensão mitocondrial. Após estabilização da linha base, foi adicionado succinato para permitir a acumulação mitocondrial de cálcio. Após estabilização da nova linha base, foi adicionada xantina oxidase (XO), 13,4 mU, à suspensão mitocondrial. O carvedilol foi pré-incubado com a suspensão mitocondrial durante 3 minutos. Curva A: Cálcio+XO, Curva B: Cálcio+XO+10  $\mu$ M carvedilol, Curva C: Cálcio+XO+20  $\mu$ M carvedilol, Curva D: Cálcio+XO+1  $\mu$ M ciclosporina-A. O registo é representativo de cinco preparações diferentes.

**Fig. 2** Calcium uptake and release by the mitochondria. The Calcium Green-5N probe was used to monitor the concentration of free calcium outside the mitochondria (0.2 mg protein/ml). The reaction medium consisted of 200 nM sucrose, 10  $\mu$ M TRIS-MOPS, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\mu$ M EGTA, 2  $\mu$ M rotenone, 100 nM Calcium Green-5N, 0.1  $\mu$ g oligomycin, and 5  $\mu$ M hypoxanthine (pH 7.4, 25°C). Calcium (10  $\mu$ M) was added to the mitochondrial suspension. After baseline stabilization, succinate was added to allow mitochondrial calcium loading. After stabilization of the new baseline, xanthine oxidase (XO), 13.4 mU, was added to the suspension. Carvedilol was pre-incubated with the mitochondrial suspension for 3 minutes. Curve A: Calcium+XO, Curve B: Calcium+XO+10  $\mu$ M carvedilol, Curve C: Calcium+XO+20  $\mu$ M carvedilol, Curve D: Calcium+XO+1  $\mu$ M cyclosporine-A. The record represents five different preparations.

## DISCUSSÃO

Foram utilizadas mitocôndrias cardíacas isoladas para estudar o efeito protector do carvedilol num modelo de lesão mitocondrial por estresse oxidativo. A combinação de XO e do seu substrato HX gera o radical livre de oxigénio anião superóxido.

Como o carvedilol demonstrou ser um excelente antioxidante<sup>(5)</sup>, o nosso objectivo foi o de estudar o efeito daquele composto num modelo *in vitro* de estresse oxidativo na presença e ausência de cálcio.

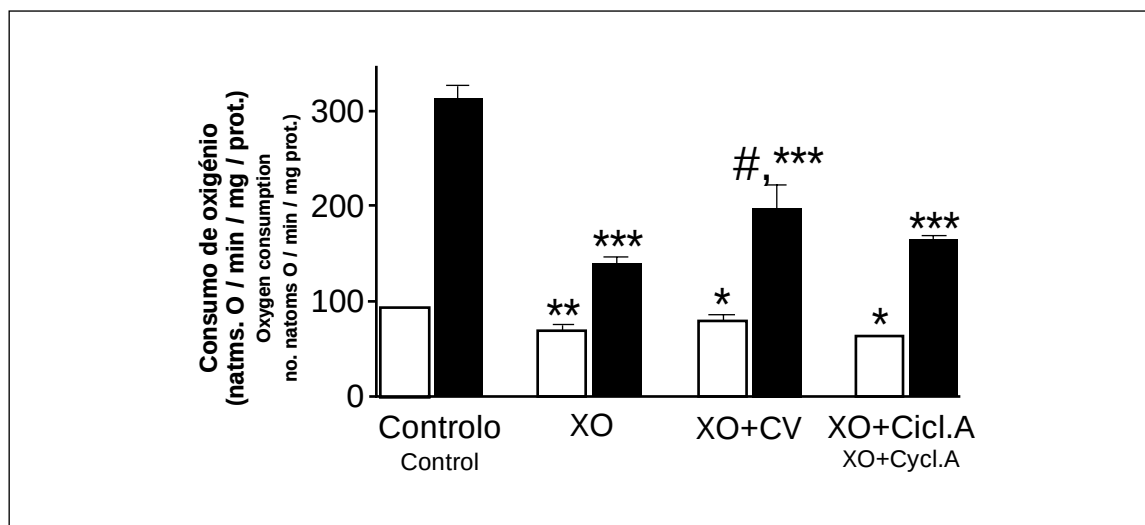
Na presença de cálcio e dos pro-oxidantes em estudo, notámos que as mitocôndrias cardíacas sofreram o fenómeno denominado por transição de permeabilidade mitocondrial

ive stress. The combination of XO and its substrate HX generates superoxide anion oxygen free radicals.

As carvedilol has been shown to be an excellent antioxidant<sup>(5)</sup>, our objective was to study the effects of this compound in an *in vitro* model of oxidative stress in the presence and the absence of calcium.

In the presence of calcium and the pro-oxidants studied, we found that cardiac mitochondria underwent the phenomenon known as the mitochondrial permeability transition (MPT), which is inhibited by cyclosporin-A. With regard both to mitochondrial swelling (*Fig. 1*) and to the level of calcium-induced calcium release (*Fig. 2*), it was clear that carvedilol showed a dose-dependent protective effect. It



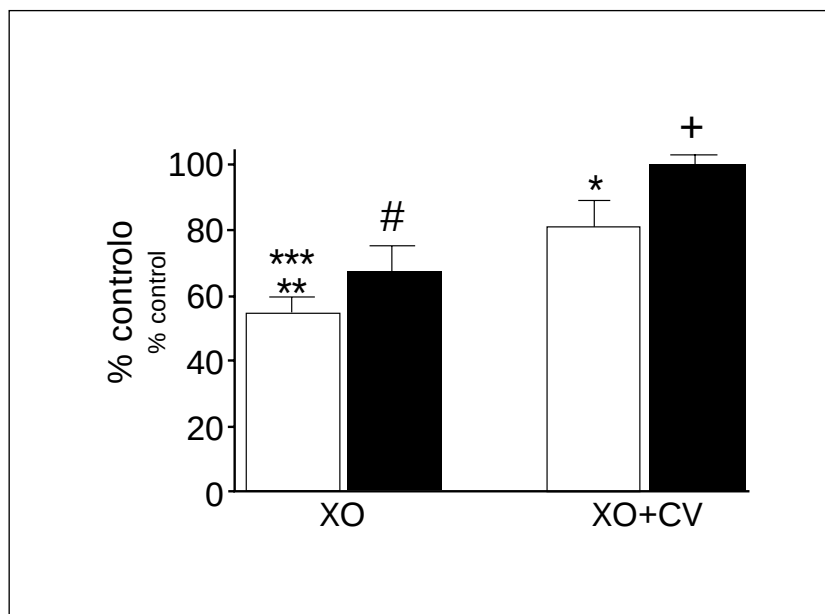


**Fig. 3** Efeito da xantina oxidase/hipoxantina no consumo respiratório mitocondrial durante o estado 3 (barras pretas) e durante o estado 4 (barras brancas). O estresse oxidativo foi conseguido com uma pré-incubação com 9 mU de xantina oxidase (XO) durante 3 minutos no meio de reacção (100 mM KCl, 50 mM sucrose, 10 mM TRIS-HCL, 30  $\mu$ M EGTA, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 5  $\mu$ M hipoxantina, pH 7.4, 25°C). Foi pré-incubado carvedilol (CV, 10  $\mu$ M) com a suspensão mitocondrial durante 3 minutos. O efeito da ciclosporina-A (Cicl.A, 1  $\mu$ M) também foi testado. Valores são médias $\pm$ SEM, n=8; \* - p<0,05 vs controlo, \*\* - p<0,01 vs controlo, \*\*\* - p<0,001 vs controlo, # - p<0,05 vs XO.

**Fig. 3** Effect of xanthine oxidase/hypoxanthine on mitochondrial respiratory consumption during state 3 (black bars) and state 4 (white bars). Oxidative stress was achieved with a pre-incubation with 9 mU of xanthine oxidase (XO) for 3 minutes in the reaction medium (100 mM KCl, 50 mM sucrose, 10 mM TRIS-HCL, 30  $\mu$ M EGTA, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 5  $\mu$ M hypoxanthine, pH 7.4, 25°C). Carvedilol (CV, 10  $\mu$ M) was pre-incubated with the mitochondrial suspension for 3 minutes. The effect of cyclosporine-A (Cycl.A, 1  $\mu$ M) was also tested. Values are means $\pm$ SEM, n=8; \* - p<0.05 vs. control, \*\* - p<0.01 vs. control, \*\*\* - p<0.001 vs. control, # - p<0.05 vs. XO.

(TPM), fenómeno esse inibido pelo composto ciclosporina-A. Quer ao nível do entumescimento mitocondrial (*Fig. 1*), quer ao nível da libertação de cálcio induzida por cálcio (*Fig. 2*), foi claro que o carvedilol mostrou um efeito protector dependente da dose. Sabe-se que a

is known that the MPT is closely linked to the generation of oxidative stress and that it is dependent on the presence of calcium. It has also been identified as a determinant for the survival of cardiac myocytes after I/R<sup>(7)</sup>. Furthermore, we confirmed the dependence of both



**Fig. 4** Efeito da xantina oxidase/hipoxantina no ICR (barras brancas) e na razão ADP/O (barras pretas). As condições foram as mesmas da *Fig. 3*. Valores são médias $\pm$ SEM, n=5; \* - p<0,05 vs controlo, \*\* - p<0,01 vs XO+CV, \*\*\* - p<0,001 vs controlo, # - p<0,01 vs controlo, + - p<0,001 vs XO.

**Fig. 4** Effect of xanthine oxidase/hypoxanthine on RCR (white bars) and on the ADP/O ratio (black bars). The conditions were the same as in *Fig. 3*. Values are means $\pm$ SEM, n=5; \* - p<0.05 vs. control, \*\* - p<0.01 vs. XO + CV, \*\*\* - p<0.001 vs. control, # - p<0.01 vs. control, + - p<0.001 vs. XO.

TPM está intimamente ligada à geração de estresse oxidativo e é dependente da presença de cálcio. Tem sido mesmo apontada como um determinante para a sobrevivência do cardiomiócito após a I/R<sup>(7)</sup>. Confirmámos também a dependência de cálcio para a observação dos dois fenómenos, uma característica típica da TPM. Sabe-se que a perda de impermeabilidade da membrana interna mitocondrial que caracteriza o desenrolar da TPM deve-se à formação de poros proteicos, que surgem após ligações cruzadas entre grupos tiólicos das proteínas participantes. Sendo o carvedilol um composto com características antioxidantes, seria de esperar que prevenisse as referidas ligações cruzadas entre grupos tiólicos proteicos. De facto, o carvedilol já mostrou ser um inibidor da TPM induzida pela presença de cálcio e fosfato<sup>(8)</sup>.

Na ausência de cálcio, um segundo tipo de resultados surgiu. A ausência de cálcio explica a não eficácia da ciclosporina-A na prevenção da disfunção mitocondrial após incubação com os agentes pro-oxidantes. A redução da velocidade respiratória em estado 3 e estado 4 poderá ser justificada por uma inibição da taxa de condução de electrões através da cadeia respiratória mitocondrial, provavelmente devido a inactivação de componentes proteicos da referida cadeia. É de realçar a protecção concedida pelo carvedilol ao nível dos índices ICR e ADP/O e na respiração mitocondrial em estado 3. A actividade antioxidante do carvedilol será mesmo a grande responsável pela protecção oferecida.

Não é de estranhar que o carvedilol forneça uma protecção significativa durante a hipoxia e reoxigenação do miocárdio, condições que se sabe estarem associadas a uma aumento de cálcio e de estresse oxidativo na célula. Mesmo na ausência de cálcio (sendo os danos mitocondriais independentes da TPM), o carvedilol mostrou uma protecção bastante acentuada, em concentrações (10-20 µM) que rondam as que se pensa poderem existir no músculo cardíaco durante a terapêutica com carvedilol, um fármaco bastante lipofílico<sup>(9,10)</sup>.

Os resultados descritos neste artigo permitem atribuir um papel importante à mitocôndria cardíaca durante processos patológicos do miocárdio. Permitem também sugerir que o efeito benéfico de certos fármacos, nomeadamente aqueles albergando propriedades antioxidantes, poderá passar por uma protecção da função mitocondrial cardíaca. A prevenção da

phenomena on calcium, a typical characteristic of the MPT. It is known that the loss of impermeability of the internal membrane of the mitochondrion that characterizes the triggering of the MPT is due to the formation of protein pores which appear after cross-links are between protein thiol groups. As carvedilol is a compound with antioxidant characteristics, it would be expected to prevent the formation of these crossbridges, and carvedilol has indeed been shown to inhibit the MPT induced by the presence of calcium and phosphate<sup>(8)</sup>.

In the absence of calcium, another type of result was found. This absence accounts for the failure of cyclosporin-A to prevent mitochondrial dysfunction after incubation with pro-oxidant agents. The reduction in respiratory velocity in state 3 and state 4 may be explained by inhibition of the rate of electron conduction through the mitochondrial respiratory chain, probably because of the inactivation of protein components of this chain. It is worth noting the protection afforded by carvedilol in terms of the RCR and ADP/O indices and in mitochondrial respiration in state 3. Carvedilol's antioxidant activity is presumably mainly responsible for this protection.

It is not surprising that carvedilol affords significant protection during hypoxia and reoxygenation of the myocardium, conditions that are known to be associated with increases in calcium and oxidative stress in the cell. Even in the absence of calcium (as mitochondrial damage is independent of the MPT), carvedilol showed a marked protective effect in concentrations (10-20 µM) that approximate to those thought to exist in cardiac muscle during therapy with carvedilol, a highly lipophilic drug<sup>(9,10)</sup>.

The results described in this paper enable an important role to be attributed to cardiac mitochondria during pathological processes in the myocardium. They also support the suggestion that the beneficial effect of certain drugs, particularly those with antioxidant properties, may work through protecting cardiac mitochondrial function. The prevention of calcium-dependent MPT by the use of carvedilol will also have important consequences in terms of inhibiting cell death and preventing mitochondrial dysfunction, since the induction of the MPT is closely associated with the release of pro-apoptotic factors from the inter-membrane space of mitochondria and with the loss of



TPM dependente de cálcio pelo carvedilol terá também importantes consequências ao nível da inibição de fenómenos de morte celular e prevenção da disfunção mitocondrial, uma vez que a indução daquele processo está intimamente ligado à libertação de factores pro-apoptóticos do espaço intermembranar mitocondrial e à perda da capacidade mitocondrial de síntese de ATP.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Roche Farmacêutica (Portugal), pela cedência de carvedilol.

Paulo J. Oliveira e Anabela P. Rolo são apoiados por Bolsas de Doutoramento da Fundação Para a Ciência e Tecnologia, Ministério da Ciência e do Ensino Superior (PRAXIS XXI/BD/21494/99 e PRAXIS XXI/BD/21454/

their ability to synthesise ATP.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Roche Farmacêutica (Portugal) for providing the carvedilol.

Paulo J. Oliveira and Anabela P. Rolo are funded by PhD scholarship grants from the Foundation for Science and Technology, Portuguese Ministry of Science and Higher Education (PRAXIS XXI/BD/21494/99 and PRAXIS XXI/BD/21454/99, respectively).

Pedido de separatas para:

Address for reprints:

PAULO J. OLIVEIRA

Centro de Neurociência e Biologia Celular de Coimbra

IBILI - Universidade de Coimbra

Azinhaga de Santa Comba, Celas

3000-354 COIMBRA

Portugal

## REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Ferrari R. The Role of Mitochondria in Ischemic Heart Disease *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:S1-S10.
2. Baker JE, Felix CC, Olinger GN, Kalyanaraman B. Myocardial Ischemia and Reperfusion: Direct Evidence for Free Radical Generation by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2786-9.
3. Ferrari R, Agnoletti L, Comini L et al. Oxidative Stress During Myocardial Ischaemia and Heart Failure. *Eur Heart J* 2001;19:B2-B11.
4. Crompton M, Costi A. A Heart Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent Pore of Possible Relevance to Reperfusion-Induced Injury. *Biochem J* 1990;266:33-9.
5. Yue TL, Cheng HY, Lysko PG, et al. Carvedilol, a New Vasodilator and Beta Adrenoceptor Antagonist, Is an Antioxidant and Free Radical Scavenger. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:92-8.

6. Oliveira PJ, Santos DL, Moreno AJM. Carvedilol Inhibits the Exogenous NADH Dehydrogenase in Rat Heart Mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2000;374:279-85.
7. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Causes Depletion of Mitochondrial and Cytosolic  $\text{NAD}^+$  and Is a Causative Event in the Death of Myocytes in Postischemic Reperfusion of the Heart. *J Biol Chem* 2001;276:2571-5.
8. Oliveira PJ, Coxito PM, Rolo AP, Santos DL, Palmeira CM, Moreno, AJM. Inhibitory Effect of Carvedilol in the High-Conductance State of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Eur J Pharmacol* 2001;412:231-7.
9. Pruett JK, Walle T, Walle U. Propranolol Effects on Membrane Repolarization Time in Isolated Canine Purkinje Fibers: Threshold Tissue Content and the Influence of Exposure Time. *J Pharmacol Exp Therap* 1980;215:539-43.
10. Neugebauer G, Akpan W, Mollendorff EV, Neupert P, Reif K. Pharmacokinetics and Disposition of Carvedilol in Humans. *J Cardiovasc Therap* 1987;10 (Suppl. 11):S85-S88.