



AUDREY DE MORAES

**ÓXIDO NÍTRICO E TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE
MITOCONDRIAL EM CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS: POSSÍVEL PAPEL DA
NADP-TRANSIDROGENASE**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

AUDREY DE MORAES

**ÓXIDO NÍTRICO E TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE
MITOCONDRIAL EM CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS: POSSÍVEL PAPEL DA
NADP-TRANSIDROGENASE**

Orientador: Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi

Co-orientador: Prof. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Dissertação de Mestrado 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 Mestra em Ciências.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Audrey de Moraes e orientada pelo Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

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

M791o Moraes, Audrey de, 1988-
Óxido nítrico e transição de permeabilidade
mitocondrial em camundongos hipercolesterolêmicos :
possível papel da NADP-transidrogenase / Audrey de
Moraes. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Anibal Eugenio Vercesi.
Coorientador : Helena Coutinho Franco de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipercolesterolemia. 2. Óxido nítrico. 3. NADP
transidrogenases. 4. Mitocôndria. 5. Transição de
permeabilidade mitocondrial. I. Vercesi, Anibal Eugenio,
1946-. II. Oliveira, Helena Coutinho Franco de, 1958-.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Nitric oxide and mitochondrial permeability transition in
hypercholesterolemic mice : putative role of NADP-transhydrogenase

Palavras-chave em inglês:

Hypercholesterolemia

Nitric oxide

NADP transhydrogenases

Mitochondria

Mitochondrial permeability transition

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Anibal Eugenio Vercesi [Orientador]

Nelci Fenalti Hoehr

Gerson Jhonatan Rodrigues

Data de defesa: 24-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

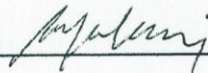
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

AUDREY DE MORAES

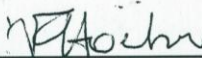
Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANIBAL EUGENIO VERCESI

MEMBROS:

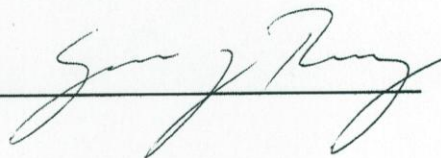
1. PROF(A). DR(A). ANIBAL EUGENIO VERCESI



2. PROF(A). DR(A). NELCI FENALTI HOEHR



3. PROF(A). DR(A). GERSON JHONATAN RODRIGUES



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

Data: 24 de fevereiro de 2014

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob orientação do Professor Anibal Eugenio Vercesi e co-orientação da Professora Helena Coutinho Franco Oliveira, na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP temático nº 11/50400-0, bolsa Processo nº 2011/15101-1), do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 302764/2009-7), INCT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Diabetes e Obesidade (Fapesp/CNPq) e Fundo de Apoio ao Ensino à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX, UNICAMP)

Agradecimentos

Agradeço á Deus que ilumina meus passos e me guia no melhor caminho.

Ao professor Dr. Anibal E. Vercesi, pela oportunidade de fazer parte de seu laboratório e por sua orientação;

À professora Dra. Helena C. F. Oliveira, pela co-orientação e grande ajuda nas correções de relatório, resumos e dissertação;

Ao professor Dr. Roger Castilho, pelas sugestões dadas e por auxiliar nas discussões científicas;

Aos meus pais, Adilson e Cidinha, que sempre estiveram ao meu lado me dando forças para continuar, sempre com muito incentivo, carinho e amor;

Ao meu namorado Aleandro, pelo seu carinho e compreensão e por sempre me ouvir e me ajudar;

À minha amiga Laís que muito soube me ouvir;

Aos meus queridos amigos do laboratório pelas conversas, auxílio e risadas: Ana Carolina, Arthur, Carina, Carlos, Cláudia, Erika, Evelyne, Franco, Hanan, Ivan, Juliana Ruas, Kézia, Luiz Guilherme, Paolo, Raffaella, Rute, Silvia Sonia e Vinícius;

Ao Tiago, Felipe e Juliana Ronchi pelos ensinamentos ao longo destes dois anos, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar;

À Dra. Márcia e ao Roberto, pela atenção e ajuda despendida.

À minha querida Edilene, pela incrível amizade, pelos conselhos e por tudo que me ajudou durante o mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa para o desenvolvimento dessa dissertação (processo nº 2011/15101-1).

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

“Não deixe de fazer algo que gosta, devido à falta de tempo, pois a única falta que terá, será desse tempo que infelizmente não voltará mais.”

Mário Quintana

RESUMO	xxv
---------------------	------------

ABSTRACT.....	xxix
----------------------	-------------

1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1. Bioenergética mitocondrial.....	35
1.2. Transporte de Ca^{2+} , estresse oxidativo e transição de permeabilidade mitocondrial.....	38
1.3. Hipercolesterolemia e deficiência de NADP-transidrogenase	44
1.4. Óxido nítrico e mitocôndrias.....	46
2. OBJETIVOS	51
2.1. Objetivos gerais	53
2.2. Objetivos específicos	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1. Animais de experimentação	57
3.2. Dosagem de colesterol e triglicérides plasmáticos	57
3.3. Isolamento de mitocôndrias de fígado.....	57
3.4. Determinação de proteína mitocondrial.....	58
3.5. Condições experimentais.....	58
3.6. Consumo de oxigênio mitocondrial	59
3.7. Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) pelo método da safranina	59
3.8. Captação de cálcio por mitocôndrias	61
3.9. Medida de inchamento mitocondrial	62
3.10. Determinação do estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....	63
3.11. Análise estatística	65

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1. Níveis de colesterol e de triglicérides plasmáticos nos camundongos estudados	69
4.2. Efeito de L-NAME e cPTIO sobre a respiração mitocondrial	71
4.3. Efeito de cPTIO e L-NAME sobre a transição de permeabilidade mitocondrial.....	73
4.4. O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais nos animais estudados não foi alterado na presença de cPTIO ou L-NAME: estudos com mitocôndrias isoladas de fígado oxidando diferentes substratos.....	77
4.5. Efeito de spermine NONOate, spermine e cPTIO sobre a respiração mitocondrial.....	83
4.6. Efeito de spermine NONOate e spermine sobre a transição de permeabilidade mitocondrial: captação e retenção de Ca^{2+}	89
4.7. Efeito de spermine NONOate, spermine e cPTIO sobre a transição de permeabilidade mitocondrial: inchamento mitocondrial.....	93
 5. CONCLUSÕES.....	 98
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 102
 7. ANEXO	 113

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
ADP	Adenosina difosfato
ANT	Translocador de nucleodídeo de adenina
ATP	Adenosina trifosfato
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina soro bovina
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
CR	Controle
CsA	Ciclosporina A
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETF	Flavoproteína transferidora de elétrons
FAD⁺	Flavina adenina dinucleotídeo oxidada
FADH	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FCCP	Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone
FMN	Flavina Mononucleotídeo

GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione, reduced
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	N-[2hydroxyethyl]piperazine-N'-[2ethanesulfonic acid])
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr-/-	<i>Knockout</i> do receptor de LDL
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester
L-NMMA	NG-monomethyl-L-arginine
L-NNA	NG-nitro-L-arginine
Mit.	Mitochondria
MnSOD	Superoxide dismutase dependent of manganese
NAD⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced
NADP⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide monophosphate oxidized
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide monophosphate reduced
NNT	NAD(P)-Transhydrogenase
NO[•]	Nitric Oxide
NO₂	Nitrite

NO₃	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Radical ânion superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
Prx	Peroxirredoxina
PTP	Poros de transição de permeabilidade
RNAi	Ácido ribonucleico de interferência
-SH	Grupamentos tiólicos
SOD	Superóxido dismutase
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
TPx	Tioredoxina peroxidase
TR	Tioredoxina
UQ	Ubiquinona (forma oxidada)
UQH[•]	radical Semiquinona
VDAC	Canal aniônico voltagem dependente

LISTA DE TABELAS

PÁG.

TABELA I - Efeito de L-NAME e cPTIO sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol.....70

TABELA II - Efeito de spermine NONOate 50 μ M, spermine 50 μ M e cPTIO 100 μ M sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Unib.....84

TABELA III - Efeito de spermine NONOate 50 μ M, spermine 50 μ M e cPTIO 100 μ M sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Jackson.....85

TABELA IV - Efeito de spermine NONOate 50 μ M, spermine 50 μ M e cPTIO 100 μ M sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Hipercol.....86

Lista de Figuras

FIGURA 1 - Versão simplificada da teoria quimiosmótica mitocondrial (Lehninger, Nelson e Cox, 2004 modificado).	37
FIGURA 2 - Imagem 3D obtida por tomografia eletrônica de mitocôndria isolada de fígado de rato.....	38
FIGURA 3 - Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca^{2+} e EROs.....	43
FIGURA 4 - Diagrama do modelo proposto para explicar o estresse oxidativo mitocondrial em células deficientes do receptor da LDL.....	45
FIGURA 5 - reação de formação de $\text{NO}^{\bullet}$ realizada pela NOS.....	47
FIGURA 6 – reação entre cPTIO e $\text{NO}^{\bullet}$	49
FIGURA 7 - estrutura química spermine NONOate	50
FIGURA 8 - estrutura química spermine	50
FIGURA 9 - Esquema ilustrativo para obtenção dos parâmetros respiratórios.....	59
FIGURA 10 - Estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial.....	60
FIGURA 11 - Efeitos de Ca^{2+} e EGTA sobre a fluorescência de Calcium Green.....	61
FIGURA 12 – Calibração de NADH.....	63
FIGURA 13 - Determinação de colesterol e de triglicérides plasmáticos em camundongos Unib, Jackson e Hipercol.	68

FIGURA 14 - O sequestrador de NO [*] cPTIO não tem efeito sobre a dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) induzida por íons de Ca ²⁺ em fígado de camundongos Unib, Hipercol e Jackson.	73
FIGURA 15 - O inibidor da NOS L-NAME não tem efeito sobre a dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) induzida por íons de Ca ²⁺ em fígado de camundongos Unib, Hipercol e Jackson.....	74
FIGURA 16 - O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais não foi alterado na presença de cPTIO e L-NAME em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol incubadas com succinato e rotenona.	77
FIGURA 17- O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais não foi alterado na presença de cPTIO e L-NAME em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol incubadas com substratos para complexo I	78
FIGURA 18 - O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais não foi alterado na presença de cPTIO e L-NAME em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol incubadas somente na presença de substrato endógeno. ...	79
FIGURA 19- O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais não foi alterado na presença de cPTIO e L-NAME em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol incubadas com malato e piruvato.....	80
FIGURA 20- Efeito de spermine NONOate, cPTIO e spermine sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Unib.	83
FIGURA 21 – O doador de NO [*] spermine NONOate e a poliamina spermine aumentam a capacidade de retenção mitocondrial de Ca ²⁺ em camundongos Unib.	88

FIGURA 22 - O doador de NO* spermine NONOate e a poliamina spermine aumentam a capacidade de retenção mitocondrial de Ca ²⁺ em camundongos Jackson.....	89
FIGURA 23 - O doador de NO* spermine NONOate e a poliamina spermine aumentam a capacidade de retenção mitocondrial de Ca ²⁺ em camundongos Hipercol.....	90
FIGURA 24 - O doador de NO* spermine NONOate e a poliamina spermine diminuem a susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca ²⁺ em camundongos Unib.....	92
FIGURA 25 - O doador de NO* spermine NONOate e a poliamina spermine diminuem a susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca ²⁺ em camundongos Jackson.	93
FIGURA 26 - O doador de NO* spermine NONOate e a poliamina spermine diminuem a susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca ²⁺ em camundongos Hipercol.....	94

RESUMO

RESUMO

O óxido nítrico (NO[•]), dependendo de sua concentração, pode tanto proteger quanto estimular a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), uma condição que pode resultar em morte celular. O NO[•] modifica reversivelmente os grupamentos SH-, formando S-nitrosotiol, em proteínas envolvidas na formação do poro de transição de permeabilidade (PTP). Foi recentemente mostrado que as mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos por knockout do receptor de LDL (LDLr -/-) apresentam menor capacidade de manter NADPH reduzido, principal poder redutor mitocondrial, do que as mitocôndrias de camundongos selvagens. Essa condição pode favorecer a formação de peroxinitrito a partir de superóxido e NO[•] em mitocôndrias dos animais hipercolesterolêmicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o efeito do NO[•] sobre a TPM em mitocôndrias de fígado é dependente da hipercolesterolemia e/ou da atividade da NADP-transidrogenase (NNT). Para tanto, mitocôndrias de fígado foram isoladas de 3 linhagens de camundongos: C57BL/6/JUnib (camundongo controle *wild type*), C57BL/6/J/LDLr-/- (deficiente do receptor de LDL e da NNT) e C57BL/6J (deficiente somente de NNT). A TPM (determinada por inchamento e capacidade de retenção de cálcio da organela), o estado redox de NAD(P) (fluorimetria) e a respiração (consumo de oxigênio) foram analisados na presença e ausência de L-NAME (inibidor da NOS), cPTIO (sequestrador de NO[•]), spermine NONOate (doador de NO[•]) e spermine (poliamina). Os valores de respiração no estado de fosforilação (V3) foram significativamente diminuídos (p<0,05), tanto por cPTIO (10-20%) quanto por L-NAME (5-15%) em todos os grupos de mitocôndrias. A susceptibilidade à TPM e o estado redox de NAD(P) não foram alterados por cPTIO ou L-NAME em todos os grupos. O doador de NO[•] spermine NONOate promoveu efeito inibitório da respiração de maneira dose-dependente. O composto spermine resultou em maior proteção (30-60%) contra TPM do que o spermine NONOate (15-25%), indicando que o NO[•] colabora para abertura do PTP. Portanto, conclui-se que: 1) NO[•] diminui respiração mitocondrial e aumenta a suscetibilidade à TPM e, 2) nem a hipercolesterolemia por deficiência do receptor

de LDL, nem a deficiência de NNT alteraram as respostas mitocondriais ao NO[•], incluindo a suscetibilidade à TPM.

ABSTRACT

Abstract

Nitric oxide ($\text{NO}^\bullet$) can either protect or stimulate mitochondrial permeability transition (MPT), a condition related to cell oxidative stress and death, via reversible formation of S-nitrosothiols and the permeability transition pore (PTP). It was previously shown that hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice ($\text{LDLr}^{-/-}$) mitochondria present lower capacity to sustain reduced NADPH than the wild type mice. This condition may favor peroxynitrite generation from $\text{NO}^\bullet$ plus superoxide in $\text{LDLr}^{-/-}$ mitochondria. The aim of the present study was to clarify whether $\text{NO}^\bullet$ effect on the MPT in mice liver mitochondria is dependent of hypercholesterolemia and/or NADP-transhydrogenase (NNT) activity. Liver mitochondria were isolated from C57BL6/Uni (wild type control mice), C57BL6/J/ $\text{LDLr}^{-/-}$ (deficient in both LDL receptor and NNT) and C57BL/6J (deficient in NNT only). MPT (measured as mitochondria swelling and calcium retention capacity), NAD(P) redox status (fluorimetry) and respiration (oxygen consumption) were analyzed in the presence or absence of L-NAME ($\text{NO}^\bullet$ synthase inhibitor), cPTIO ($\text{NO}^\bullet$ scavenger), spermine NONOate ($\text{NO}^\bullet$ donor) and spermine (polyamine). Mitochondrial phosphorylating respiration rates were slightly but significantly ($p < 0.05$) decreased by either cPTIO (10-20%) or L-NAME (5-15%) in all groups. Neither cPTIO nor L-NAME changed the susceptibility to MPT and the redox status of mitochondrial NAD(P). The $\text{NO}^\bullet$ donor spermine NONOate induced a dose-dependent inhibition of mitochondria respiration in all groups. Spermine alone caused a stronger protection (30-60%) against MPT than spermine NONOate (15-25%), indicating that $\text{NO}^\bullet$ contributes to the PTP opening. In conclusion: 1) $\text{NO}^\bullet$ decreases mitochondrial respiration and increases susceptibility to MPT; 2) neither hypercholesterolemia (LDL receptor deficiency) nor NNT deficiency change mitochondrial responses to $\text{NO}^\bullet$ levels, including susceptibility to permeability transition.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bioenergética mitocondrial

Mitocôndrias são organelas celulares responsáveis pela conversão de energia de reações de óxido-redução para energia química (ATP) utilizável em todos os processos vitais de células aeróbicas. Este processo é denominado de fosforilação oxidativa e envolve uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintase localizados na membrana mitocondrial interna (Nicholls e Ferguson, 2002).

Somente em 1948, Hogeboom, Schneider e Palade conseguiram isolar mitocôndrias intactas de fígado de rato através de centrifugação diferencial (Lehninger, 1964). Vários estudos foram feitos no sentido de entender o mecanismo responsável pelo acoplamento entre a respiração e a síntese do ATP e apenas em 1961, o bioquímico inglês Peter Mitchell propôs a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa, com base na constatação de que a redução do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O) pela cadeia respiratória gera um gradiente de prótons (H^+) entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas (Mitchell, 1961).

A energia necessária para a fosforilação oxidativa provém deste potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o O_2 à H_2O . A cadeia respiratória gera o potencial eletroquímico de prótons a partir da energia armazenada nas coenzimas reduzidas pelo catabolismo de nutrientes. Por sua vez este potencial constitui-se na força motriz que é usada pela ATP sintase, funcionando como uma bomba de prótons invertida, que promove a reação de fosforilação do ADP (Nicholls e Ferguson, 2002).

Elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à NADH desidrogenase (componente do complexo I). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Outros substratos passam elétrons para a cadeia respiratória diretamente no nível da ubiquinona. O primeiro passo na oxidação do acil-CoA graxo é catalisado pela flavoproteína acil-

CoA desidrogenase, e envolve a transferência de elétrons do substrato para a FAD desidrogenase, e em seguida para a flavoproteína transferidora de elétrons (ETF), e finalmente para ETF ubiquinona oxidoredutase. Essa enzima transfere elétrons para dentro da cadeia respiratória pela ubiquinona reduzida. No músculo esquelético e no cérebro, o glicerol 3-fosfato formado a partir do glicerol liberado de triacilglicerol ou da diidroxicetona fosfato, é oxidado pela glicerol fosfato desidrogenase. Essa enzima é localizada na face externa da membrana mitocondrial interna, sendo mais um canal de elétrons para a cadeia respiratória por reduzir a ubiquinona. A UQH é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona ($UQH^\bullet$), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos de $UQH^\bullet$, um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, que quando oxidadas regeneram UQ e doam elétrons para o citocromo c. Esse transfere elétrons à citocromo c oxidase (complexo IV), responsável pela transferência final de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água (Nicholls e Ferguson, 2002).

Segundo Mitchell (1961), a passagem de elétrons através da seqüência de intermediários redox da cadeia respiratória gera um fluxo de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, contra um gradiente eletroquímico. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico ($\Delta\Psi$) é o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a geração de energia química. O componente elétrico deste potencial atinge valores de aproximadamente -180 mV no estado de repouso, enquanto o componente químico oscila em até 1 unidade de pH. A ATP sintase é constituída de duas regiões distintas denominadas F_1 , solúvel e localizada na matriz mitocondrial e região F_0 , hidrofóbica e inserida na membrana mitocondrial interna. O fluxo de H^+ do espaço intermembranas de volta à matriz através das subunidades F_0 da ATP sintetase, desta vez a favor do gradiente, permite a reação de fosforilação do ADP (**Figura 1**).

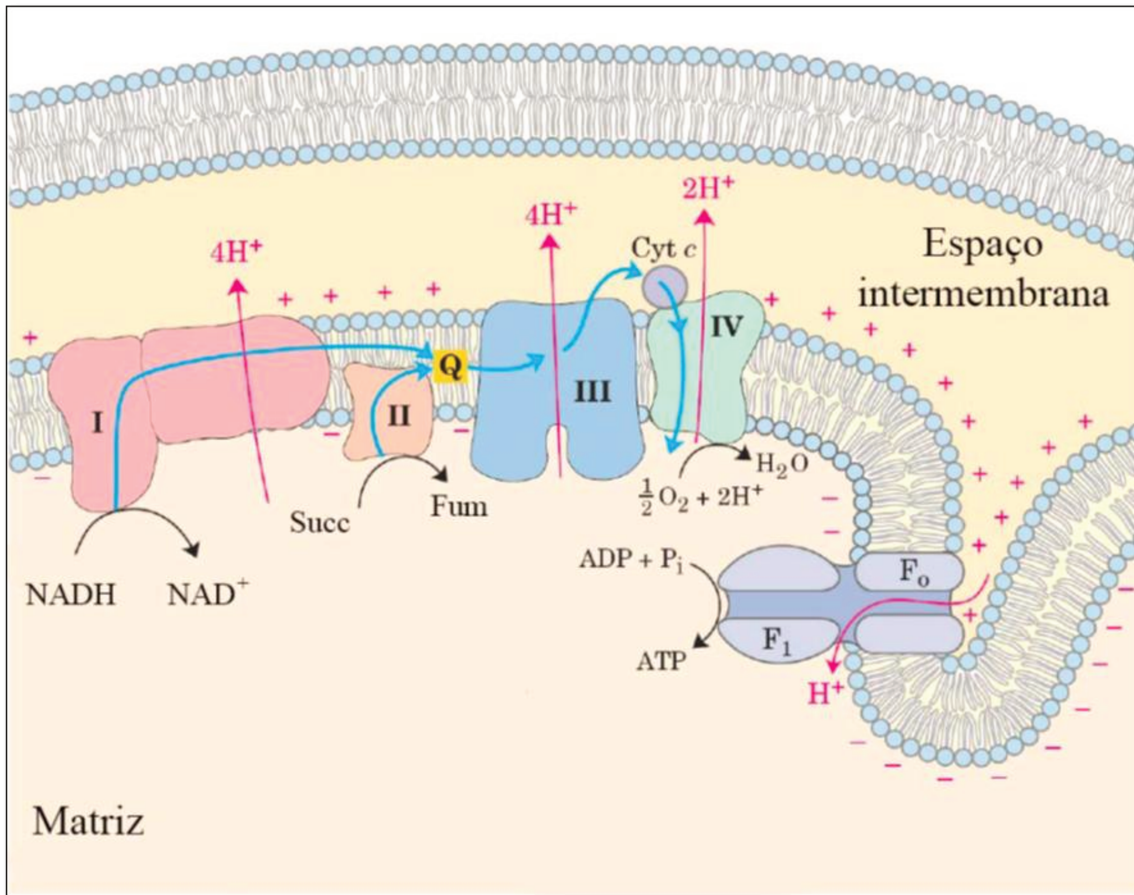


Figura 1: Versão simplificada da teoria quimiosmótica mitocondrial (Lehninger, Nelson e Cox, 2004 modificado). Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo um gradiente químico (ΔpH) e elétrico ($\Delta \Psi$). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem reentrar na matriz através de canais específicos de prótons (F_o). A força próton-motora que impulsiona os prótons de volta para a matriz fornece a energia para a síntese do ATP, catalisada pelo complexo F_1 associado com F_o .

O trabalho de Mannella et al, 2001 levou à correta localização dos complexos da cadeia respiratória e ATP sintase na membrana interna e demonstrou que as invaginações da crista da membrana interna mitocondrial são pleomórficas, ligadas através de estreitos segmentos tubulares de comprimento variável de uma superfície da membrana interna para outra (**Figura 2**).

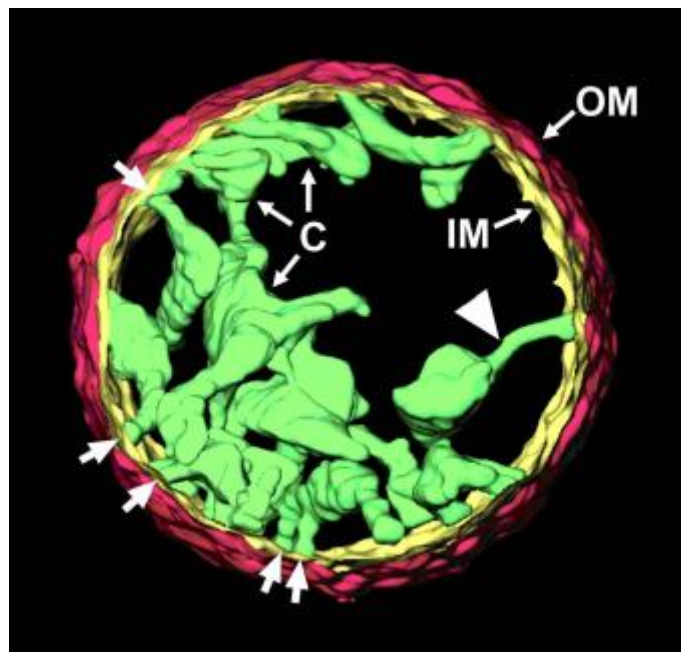


Figura 2: Imagem 3D obtida por tomografia eletrônica de mitocôndria isolada de fígado de rato. Membrana externa (OM), membrana interna (IM) e cristas (C). Os locais onde as setas não foram nomeadas apontam para regiões de ligações tubulares estreitas da crista à periferia. (Mannella, 2001)

1.2. Transporte de Ca^{2+} , estresse oxidativo e transição de permeabilidade mitocondrial

O íon cálcio (Ca^{2+}) parece ser o principal agente estimulador da geração de radicais livres de oxigênio em mitocôndrias (Cadenas e Boveris, 1980; Castilho et al., 1995; Castilho et al., 1996; Kowaltowski et al., 1996 e 2001). Este cátion é transportado para o interior das mitocôndrias por um processo eletroforético: o íon positivo é atraído pelo potencial eletroquímico de prótons que deixa o lado interno da membrana interna negativo, e é transferido através de uma proteína integral da membrana interna com alta afinidade pelo cátion (De Stefani, 2011).

A natureza molecular do canal transportador de Ca^{2+} foi recentemente descoberta (Baughman et al, 2011, De Stefani et al, 2011). Através de comparação de diversos genomas por bioinformática e de técnicas de RNA de interferência (RNAi), os autores identificaram as proteínas *MCU* (*mitochondrial calcium uniporter*) e *MICU1* (*mitochondrial calcium uptake 1*) (Mallilankaraman et al, 2012).

É bem estabelecido que o Ca^{2+} é um agente sinalizador em sistemas biológicos e que existem sistemas complexos transportadores de Ca^{2+} que coordenam seu fluxo através de membranas intracelulares em resposta à sinais celulares e extra-celulares (Berridge et al, 2003). Esta movimentação do Ca^{2+} é direta ou indiretamente direcionada pela hidrólise de ATP, indicando que é um processo altamente dependente do estado energético da célula (Glancy et al, 2012). Exemplo disto é que a deficiência nos mecanismos responsáveis pelo suprimento de ATP leva à desregulação da sinalização do Ca^{2+} que compromete a função celular (Hidalgo et al, 2008).

Em alta concentração, o Ca^{2+} liga-se ao fosfolípídeo cardiolipina na face interna da membrana mitocondrial interna (Grijalba et al., 1999). A cardiolipina é responsável pela fixação de várias proteínas da cadeia respiratória nessa membrana e sua ligação com o íon Ca^{2+} causa alterações da cadeia respiratória que facilitam a produção de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet}$), o qual é dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD) (Halliwell 1999). Ao mesmo tempo, o Ca^{2+} desloca íons Fe^{2+} de seus sítios de ligação aumentando sua concentração livre na matriz mitocondrial (Castilho et al., 1995). Este estimula a reação de Fenton com produção do radical hidroxil ($\text{HO}^{\bullet}$), capaz de causar danos em proteínas, lipídeos e DNA mitocondrial (Halliwell 1999). O fosfato inorgânico, quando em altas concentrações, realimenta o processo, pois estimula a formação de espécies reativas a partir de aldeídos resultantes da peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, e essas espécies multiplicam os danos à membrana (Kowaltowski et al., 1996). Assim, a mitocôndria constitui-se em um dos principais sítios de produção de oxigênio reativo e, em condições de estresse oxidativo, pode ser também o principal alvo dos danos causados por esses radicais.

O funcionamento da cadeia de transporte de elétrons que reduz continuamente oxigênio para formar o potencial eletroquímico transmembrana de prótons possui um importante efeito colateral para as células: a constante geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando ocorre um aumento da velocidade de produção de EROs ou uma deficiência nos sistemas enzimáticos responsáveis por sua detoxificação, tem-se uma condição caracterizada como

estresse oxidativo (Sies, 1985). Nesta condição, ocorre o ataque e dano de várias estruturas celulares por EROs (Sies e Cadenas, 1985). Normalmente, o oxigênio é reduzido à água na cadeia respiratória mitocondrial em quatro passos consecutivos de um elétron, pois o oxigênio molecular apresenta uma configuração triplete (Halliwell e Cross, 1994; Kowaltowski e Vercesi, 1999). A citocromo c oxidase é altamente especializada neste processo, sendo capaz de se ligar fortemente ao oxigênio parcialmente reduzido, impedindo sua liberação antes da obtenção de sua redução total (Turrens, 1997). Desse modo, a produção de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) através da redução monoeletrônica do O_2 pela citocromo c oxidase é praticamente inexistente. No entanto, 1-2% do O_2 consumido pela mitocôndria é convertido a $O_2^{\bullet-}$ e conseqüentemente a H_2O_2 em passos intermediários da cadeia respiratória mitocondrial (Boveris e Chance, 1973; Liu, 1997; Turrens, 1997). Esta produção pode ocorrer principalmente no complexo I (Turrens e Boveris, 1980) ou complexo III (Cadenas et al., 1977).

Como a geração mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ é um processo contínuo e fisiológico, a mitocôndria possui um eficiente sistema antioxidante, composto por enzimas tiólicas, superóxido dismutase, glutathione, NADPH, vitaminas E e C (Sutton e Winterbourn, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1989; Watabe et al., 1997; Netto et al., 2002). Além do sistema antioxidante, a mitocôndria possui mecanismos que promovem um leve desacoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa e podem diminuir a geração de EROs (Skulachev, 1991). Entre eles estão as proteínas desacopladoras (UCPs - Klingenberg et al., 2001), o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT - Samartsev et al., 1997) e os canais de K^+ sensíveis a ATP (MitoK_{ATP} - Ferranti et al., 2003). Eles promovem uma leve diminuição do potencial eletroquímico suficiente para aumentar o consumo de O_2 e mudar o estado redox dos transportadores de elétrons da cadeia respiratória diminuindo a redução monoeletrônica de oxigênio em estágios intermediários da cadeia de transporte de elétrons, principalmente nos complexos I e III (Turrens, 1997).

Como a membrana mitocondrial interna é rica em proteínas, estas se tornam um dos principais alvos das espécies reativas de oxigênio. O radical

hidroxil, principalmente, oxida resíduos -SH do aminoácido cisteína de proteínas vizinhas, formando ligações dissulfeto (S-S) entre essas proteínas (Fagian et al. 1990), isso leva à transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) que define um aumento da permeabilidade da membrana interna para íons e solutos com massa molecular até 1500 Daltons causando o inchamento da matriz. A ocorrência de inchamento em mitocôndrias isoladas é estritamente dependente do Ca^{2+} da matriz, da estimulação pelo Pi e ácidos graxos, inibição por Mg^{2+} e por nucleotídeos de adenina (Vercesi, 2006).

O envolvimento da TPM na morte celular foi postulado 25 anos atrás (Crompton e Ellinger, 1988). A TPM é um dos processos que permite a liberação de moléculas sinalizadoras de apoptose da mitocôndria para o citosol, sendo assim um mecanismo pelo qual as mitocôndrias podem controlar a morte celular (Skulachev, 1998).

O termo “transição de permeabilidade” foi introduzido por Hunter, Haworth, e Southard, 1976, que descreveram este fenômeno em mitocôndria de coração. Estes autores são responsáveis pela compreensão fundamental de que a transição de permeabilidade deve-se à abertura reversível de um poro proteico na membrana mitocondrial interna, o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP), cujo papel fisiológico permaneceu indefinido por muito tempo (Hunter, Haworth e Southard, 1976; Hunter e Haworth, 1979), (**Figura 3**).

A estrutura deste poro ainda é controversa. Dados da literatura sugerem que pode ser formado por proteínas como o translocador de nucleotídeos de adenina, o canal voltagem dependente (VDAC), a ciclofilina D, os carreadores aspartato-glutamato e de fosfato, hexoquinases entre outras proteínas (Lemasters et al 2009).

A permeabilização gerada é inibida pelo imunossupressor ciclosporina A (CsA) (Broekemeier et al., 1989 Crompton e Costi, 1988), que se liga à proteína ciclofilina D, componente essencial do agregado proteico que forma o PTP, e previne sua abertura. A permeabilização pode ser parcialmente revertida, logo após o início do processo, pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou de redutores que evitam a oxidação de grupos protéicos tiólicos (-SH) (Kowaltowski e Vercesi,

1999). A formação do PTP pode ser estimulada por compostos capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial: fosfato inorgânico (Rossi e Lehninger, 1967), oxidantes de nucleotídeos de piridina (Lehninger e col., 1978); e de grupamentos tiólicos (Fagian et al 1990).

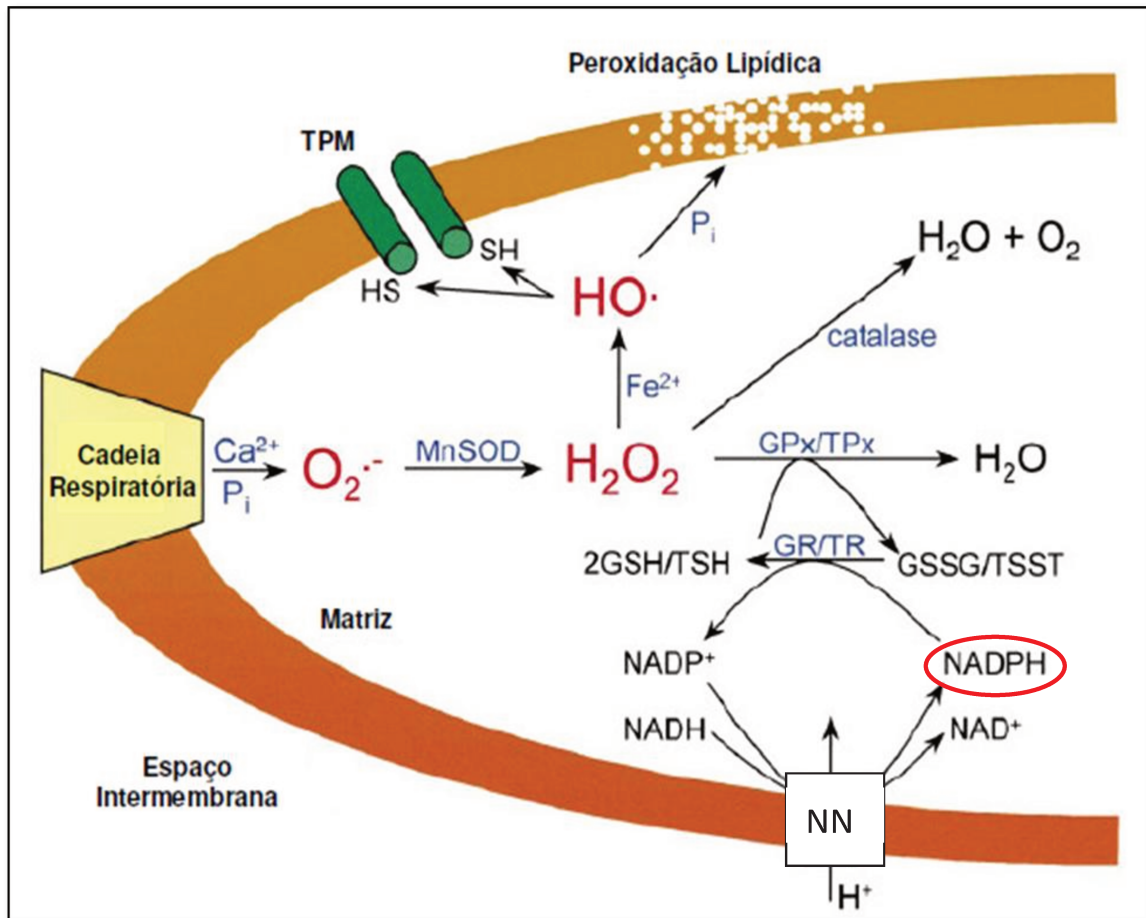


Figura 3: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca^{2+} e EROs. Acúmulo de EROs mitocondrial causa TPM. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radical $O_2^{\cdot-}$. Estes radicais são normalmente removidos por uma SOD dependente de Manganês (MnSOD), que promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é então reduzido à H_2O pela glutatona peroxidase (GP_x), peroxirredoxina (Prx) ou catalase (em mitocôndria de coração). Glutathiona (GSH), oxidado pela GP_x , e TSH, oxidado pela TP_x , são recuperados pelo sistema enzimático glutathiona e tioredoxina redutase (GR e TR), que utilizam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então $NADP^+$ usando NAD(P)-transidrogenase (NNT). Quando a geração de $O_2^{\cdot-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão inativados, o H_2O_2 acumula-se na presença de Fe^{2+} , gerando radical $OH^{\cdot}$ que é altamente reativo. $OH^{\cdot}$ oxida grupos tiólicos (-SH) da membrana mitocondrial interna, levando à formação e abertura do PTP. Alternativamente, $OH^{\cdot}$ pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i (modificado de Kowaltowski et al., 2001).

1.3. Hipercolesterolemia e deficiência de NADP-transidrogenase

Doenças metabólicas, inflamatórias e degenerativas têm sido associadas com disfunção mitocondrial, uma vez que essa organela além de ser responsável por diversas vias metabólicas, é um importante sítio intracelular de produção de EROs (Boveris e Chance, 1973) e também um alvo de dano oxidativo (Kowaltowski, et al., 2001).

Uma implicação direta da disfunção mitocondrial na aterogênese foi sugerida em trabalhos que descreveram acúmulo de mutações do DNA mitocondrial em artérias lesadas de camundongos hipercolesterolêmicos e artérias e corações de pacientes com aterosclerose (Ballinger, Patterson et al., 2002, Corral-Debrinski, Shoffner et al., 1992).

Trabalhos deste laboratório têm mostrado a relevância da participação mitocondrial no desequilíbrio redox observado em animais hipercolesterolêmicos por knockout do gene do receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) (Oliveira, et al 2005, Paim, et al, 2008). Mitocôndrias isoladas de fígado, coração e cérebro, e também células mononucleares isoladas do baço desses animais apresentam uma produção aumentada de EROs em comparação aos camundongos controle. O acúmulo de EROs na mitocôndria deveu-se à diminuição do poder redutor do NADPH, responsável por re-reduzir o sistema enzimático antioxidante dessa organela. Isso também explica a maior susceptibilidade à TPM verificada nestes animais. A hipótese proposta foi de que a diminuição do conteúdo de nucleotídeos reduzidos nas mitocôndrias dos animais $LDLr^{-/-}$ era resultante do aumento de seu consumo pela elevada taxa de lipogênese nos hepatócitos, uma vez que essas células não captam adequadamente colesterol exógeno (Gaylor, 2002), **Figura 4**. Porém estes animais hipercolesterolêmicos, além desta deficiência do receptor de LDL também possuem uma mutação espontânea no gene da NADP-transidrogenase (*Nnt*). A NNT é uma proteína integral da membrana interna mitocondrial com atividade enzimática envolvida na homeostase redox mitocondrial, reduzindo $NADP^+$ às custas de oxidação de NADH e da entrada de prótons na matriz mitocondrial (Rydström, 2006).

Os camundongos hipercolesterolêmicos apresentam a mutação da NNT porque a manipulação genética para nocautear o gene do receptor da LDL foi feita no background C57BL6/J proveniente do Jackson Laboratory em princípios da década de 90. (<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>; acessado em 10 de Dezembro de 2013). Em 2005, Toye et al. descreveram a mutação da NNT nos C57BL6/J, cuja ocorrência estima-se ter ocorrido entre o final da década de 70 e início dos anos 80. Esta mutação acarreta perda de função da NNT e consequente perda da capacidade de regulação do estado redox de NADP e glutatona, e da degradação de H_2O_2 (Ronchi et al 2013).

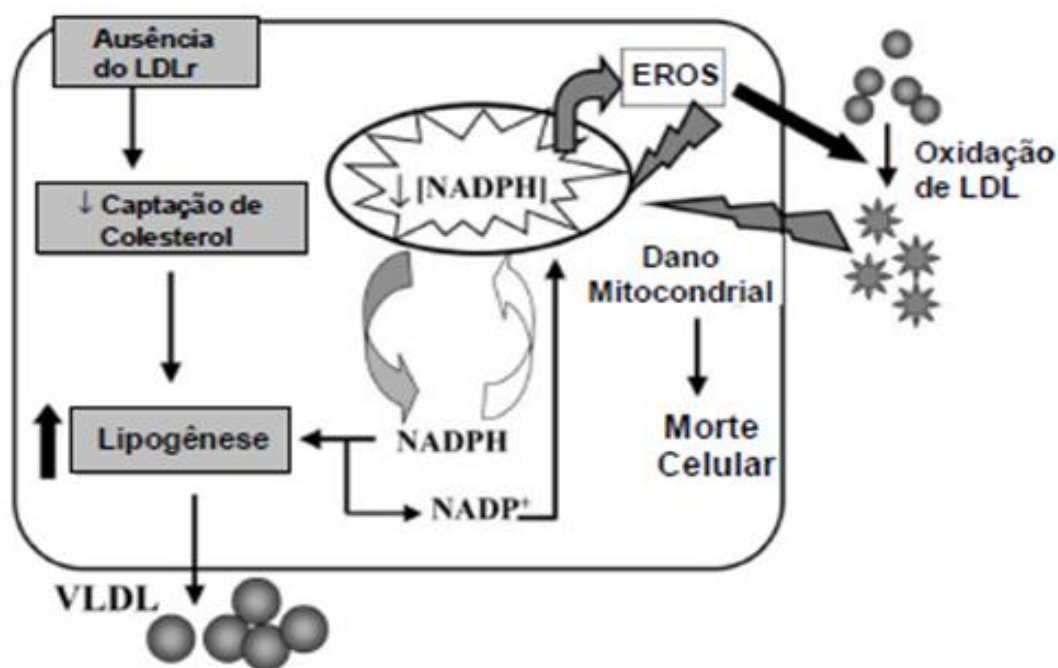


Figura 4: Diagrama do modelo proposto para explicar o estresse oxidativo mitocondrial em células deficientes do receptor da LDL. LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa; EROS: espécies reativas de oxigênio (modificado de Oliveira, Cosso *et al.*, 2005).

1.4. Óxido Nítrico e Mitocôndrias

O óxido nítrico (NO•) é um radical livre gasoso, produto da enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir da oxidação do nitrogênio da guanidina terminal da L-arginina formando NO• e L-citrulina. O NO• é considerado um mensageiro intra e intercelular envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos tais como neurotransmissão, resposta imune, ciclo celular, etc. (Ignarro, 1999; Moncada e Bolanos, 2006).

Este radical tem ação sobre a homeostase vascular, como por exemplo: controle do tônus vascular e pressão sanguínea, repressão de resposta inflamatória (inibição de adesão de leucócitos), inibição de coagulação (inibição da agregação plaquetária), inibição de proliferação de células musculares lisas, etc.. (Schulman, Zhou, *et al.* 2005; Duvall 2005).

Existem três isoformas documentadas da enzima NOS em humanos e outros organismos (Ignarro, 1999). Duas dessas isoformas são constitutivamente expressas: NOS neuronal (nNOS, também conhecida como NOS-1), e a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3). Ambas são reguladas pelo Ca^{2+} , calmodulina e por modificações pós-traducionais. A terceira isoforma é a NOS induzível (iNOS ou NOS-2), sua expressão é regulada principalmente por estímulos provenientes de citocinas e resulta em produção de grandes quantidades de NO•, muito maiores que aquelas produzidas pelas duas isoformas anteriores (Alderton, Cooper *et al.*, 2001). Todas essas isoformas são dependentes de Ca^{2+} (exceto a iNOS) e requerem vários co-fatores para seu funcionamento, como a tetrahydrobiopterina (BH4), NADPH, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) flavina mononucleotídeo (FMN) e calmodulina (Alderton, Cooper *et al.*, 2001) (**Figura 5**).

Na última década têm sido apresentadas evidências da existência de uma NOS própria da mitocôndria (mtNOS) (Giulivi, 2007; Navarro e Boveris, 2008) e de que a mitocôndria é uma fonte geradora de NO• (Bates, Loesch *et al.*, 1995; Frandsen, Lopez-Figueroa *et al.*, 1996; Kobzik, Stringer *et al.*, 1995).

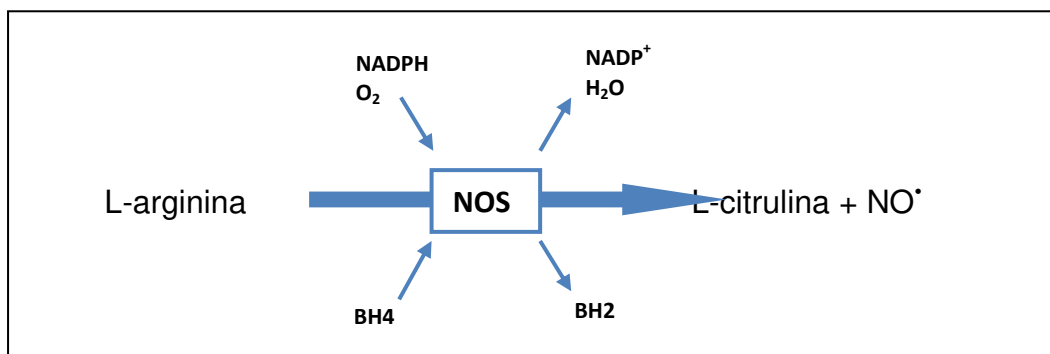


Figura 5: reação de formação de $\text{NO}^\bullet$ realizada pela NOS.

O debate e as controvérsias sobre a existência de mtNOS deve-se ao fato de que as técnicas de isolamento mitocondriais geralmente resultam em uma fração que contém também outros constituintes celulares, que podem permanecer como contaminantes, mesmo quando são realizados passos adicionais de purificação (Reinhart et al, 1982). Muitos aspectos relacionados com a identificação, sublocalização celular, regulação e fisiopatologia desta possível mtNOS foram abordados em vários artigos de revisão (Brookes et al 2004, Ghafourifar et al, 2005, Haynes, 2004, Villanueva e Giulivi, 2010).

A NOS pode produzir também o ânion $\text{O}_2^\bullet$ (Wever, Luscher *et al.*, 1998; Tiefenbacher, 2001), como por exemplo na presença de concentrações baixas de substrato ou de co-fatores. Na deficiência de L-arginina e/ou BH_4 , a atividade da NOS passa a ser chamada de “desacoplada” ou “disfuncional” e ocorre produção de $\text{O}_2^\bullet$ (Pou, Pou *et al.*, 1992; Stroes, Hijmering *et al.*, 1998; Vasquez-Vivar, Kalyanaraman *et al.*, 1998; Xia, Tsai *et al.*, 1998). A capacidade da NOS de produzir $\text{O}_2^\bullet$ foi primeiramente demonstrada com a nNOS e depois estendida para a eNOS (Schmidt, Werner *et al.*, 1992; Mayer e Werner, 1995).

Além de ser gerado pelas isoformas da NOS, o $\text{NO}^\bullet$ pode ser gerado a partir de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) inorgânicos da dieta (Lundberg et al, 2009) **(Esquema 1)**.

O NO[•] em quantidades elevadas, pode inibir a respiração mitocondrial e a síntese de ATP em uma variedade de sistemas biológicos, por inibição competitiva com a citocromo oxidase pelo oxigênio (GMPc-independente) (Moncada e Bolanos, 2006).

Estudos mostraram que o NO[•] gerado pela eNOS têm um papel na biogênese mitocondrial dependente de GMPc. Animais com deficiência de eNOS exibiram número reduzido de mitocôndrias (Nisoli, 2003).

Além disso, a crônica exposição a altos níveis de NO[•] diminui a atividade dos complexos respiratórios I, II e IV, e aumenta os níveis celulares de S-nitrosotióis (Ramachandran, Ceaser et al., 2004). Utilizando S-nitrosotióis exógenos, Prime et al (2009) demonstraram que S-nitrosilação do complexo I está associada com baixa respiração mitocondrial.

NO[•], nitrosotióis e peroxinitrito (ONOO⁻) podem, variavelmente, inibir ou promover a abertura do PTP, e conseqüentemente interferir no processo de morte celular. Quando em baixas concentrações (~10 nM) o NO[•] inibe a abertura do PTP induzida por cálcio em mitocôndrias de fígado de ratos (Leite et al, 2010), enquanto que em concentrações supra-fisiológicas (> 2 µM) este processo é acelerado (Brooks, Salinas et al, 2000). Neste caso, o excesso de NO[•] pode ter gerado ONOO⁻, o que já foi demonstrado anteriormente induzir TPM e peroxidação lipídica, independente de acúmulo de cálcio mitocondrial (Gadelha et al., 1997).

A interação de proteínas mitocondriais e lipídios com ONOO⁻ em níveis elevados causa dano oxidativo (Radi et al. 2002; Valez et al. 2013). Em particular, a interação de ONOO⁻ com compostos no interior da membrana mitocondrial, produz forte inibição do consumo de oxigênio dependente dos complexos I e II (Cassina e Radi. 1996; Radi et al. 1994).

Devido a dificuldades técnicas de se quantificar o NO[•] em sistemas biológicos, muitos estudos sobre o NO[•] são baseados no uso de inibidores da NOS (Griffith e Kilbourn, 1996) ou doadores e sequestradores de NO[•] (Brookes, 2004). Como exemplo, o sequestror de NO[•] cPTIO promove inibição do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) em ensaios *in vitro* (Akaike et al.,

1993), alterações no ciclo celular, estresse oxidativo e apoptose em células pulmonares (Janssen et al., 1998). Este composto reage com $\text{NO}^\bullet$ formando NO_2 e carboxy-PTI (**Figura 6**).

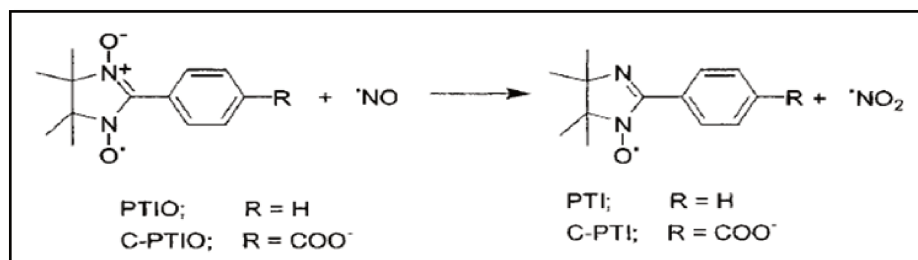


Figura 6: reação entre cPTIO e $\text{NO}^\bullet$.

Há uma grande disponibilidade de inibidores das NOS descritos na literatura e em uso principalmente como ferramenta farmacológica. Dentre esses, os mais comumente usados são o *NG*-nitro-*L*-arginina metil éster (L-NAME), o *NG*-monometil-*L*-arginina (L-NMMA), e o *NG*-nitro-*L*-arginina (L-NNA). Estes inibidores competem pelo mesmo sítio de ligação com o substrato *L*-arginina, embora eles variem em sua interação com as NOS em diversos aspectos: diferentes sítios de ligação, diferentes constantes de afinidade, dependência de substrato e mecanismo de inibição (Alderton, Cooper *et al.*, 2001).

Observações recentes deste laboratório indicam que os inibidores da síntese de $\text{NO}^\bullet$ aumentam a predisposição a abertura do PTP *in vivo* e *in vitro* em animais controles (Leite et al., 2010) enquanto promovem proteção contra a abertura deste poro em animais *LDLr*^{-/-}. A interpretação dada é que em concentrações fisiológicas o $\text{NO}^\bullet$ protege grupamentos -SH de proteínas da membrana mitocondrial interna contra oxidação (por gerar grupos S-nitrosotióis) e assim contra a abertura do PTP. Nos animais hipercolesterolêmicos, onde existe uma condição de estresse nitrosativo associado a uma maior predisposição à abertura do PTP, provavelmente mediada pelo excesso de ONOO^- , a inibição da síntese de $\text{NO}^\bullet$ protege contra a TPM.

Vários compostos doadores de NO podem ser utilizados em caso de redução da biodisponibilidade deste radical. Diazeniodiolatos, comumente conhecidos como NONOatos, têm sido largamente utilizado na pesquisa

biomédica devido a sua habilidade de liberar NO^{*} espontaneamente sob condições fisiológicas. Como mostrado por West et al (2008), o composto spermine NONOate (**Figura 7**) preveniu a TPM em mitocôndrias de coração de camundongos C57BL/6 (2,2 mM)). Brookes et al (2000) também utilizou o spermine NONOate que inibiu o inchamento de mitocôndrias de fígado de rato (2,2 mM)

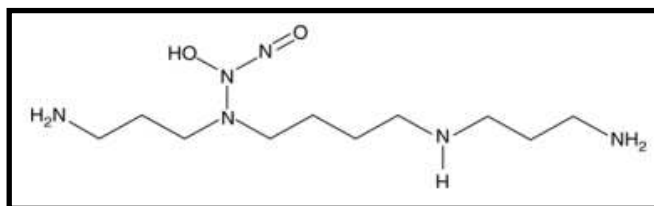


Figura 7: estrutura química spermine NONOate.

A poliamina spermine (**Figura 8**), controle do spermine NONOate, também pode ter efeito na TPM (Battaglia et al, 2012).

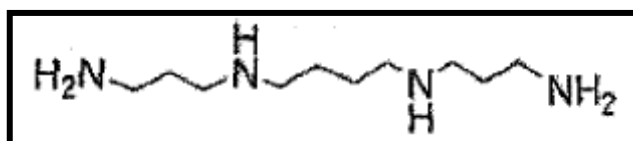


Figura 8: estrutura química spermine

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar se o efeito do NO[•] sobre a TPM em mitocôndrias de fígado de camundongo está associado à hipercolesterolemia e/ou a atividade de NNT.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME), do sequestrador (cPTIO) e do doador de NO[•] (spermine NONOate) sobre funções de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos C57BL6/J/LDLr^{-/-} (deficientes do receptor da LDL e da NNT), C57BL/6J (deficientes de NNT) e C57BL/6/JUnib (controle *wild type*), especificamente:

- 1- respiração mitocondrial;
- 2- estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H);
- 3- susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por cálcio:
 - variação do potencial de membrana;
 - captação e retenção de Ca²⁺;
 - inchamento mitocondrial;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais de experimentação – Foram utilizados camundongos hipercolesterolêmicos por inativação do gene do receptor de LDL (C57BL6/J/LDLr^{-/-}) que também possuem deleção de NADP-transidrogenase (NNT), C57BL6/J (NNT mutada), C57BL6/JUnib (*wild type*, NNT intacta), sendo os 2 primeiros provenientes do laboratório Jackson (Bar Harbor, ME) e mantidos no biotério central da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), em salas climatizadas em 22±1 °C com ciclo claro-escuro de 12 horas, com acesso a dieta padrão (Nuvital CR1, PR, Brasil) e água a vontade.

Camundongos machos de 2 a 4 meses de idade foram utilizados para o isolamento de mitocôndrias deste estudo. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/IB/UNICAMP Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), IB, UNICAMP (protocolo nº 2556-1 de 2011).

Para facilitar a nomenclatura, denominamos os grupos de camundongos de Hipercol (C57BL6/J/LDLr^{-/-}), Jackson (C57BL/6J) e Unib (C57BL/6/JUnib).

3.2. Dosagem de colesterol e triglicérides plasmáticos - O colesterol total e triglicérides plasmáticos foram determinados utilizando método enzimático-colorimétrico (kits enzimáticos Roche – Alemanha), conforme instruções do fabricante.

3.3. Isolamento de mitocôndrias de fígado - As mitocôndrias de fígado foram isoladas utilizando-se técnicas de centrifugação diferencial, segundo Schneider e Hogeboom (1950), com algumas modificações: o animal foi sacrificado por deslocamento cervical, o fígado foi retirado, picotado e lavado em Meio de isolamento I que contém sacarose 250 mM, EGTA 1 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2). O tecido picotado foi colocado em homogenizador do tipo Potter com Meio I, a suspensão foi centrifugada por 10 min a 800 x g com aceleração e desaceleração máxima. O sobrenadante foi separado e reservado em outro tubo e o pellet foi ressuspenso novamente e centrifugado por 10 min a 800 x g, obtendo

com isso uma quantidade maior de mitocôndria para realizar os experimentos. Este segundo sobrenadante foi separado em outro tubo e juntamente com o tubo já reservado foram centrifugados a $7.750 \times g$ por 10 min. Depois de desprezar os sobrenadantes e soltar os pellets com um pincel fino, foi ressuspensão em 500 μL de Meio II (sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2) e novamente centrifugado por 10 min a $7.750 \times g$. O sobrenadante foi novamente desprezado e o pellet foi lavado 3 vezes com 100 μL de Meio III (mesma condição dos anteriores sendo este isento de EGTA) para lavar mitocôndrias inviáveis e foi resuspensão com 100 μL do Meio III. Os procedimentos do isolamento foram realizados a 4°C ou em gelo.

3.4. Determinação de proteína mitocondrial – A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (Gornall et al., 1949), modificado pela adição de colato 1% (Kaplan e Pedersen, 1983). 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. Inicialmente uma solução contendo os reagentes foram colocados em um tubo de vidro com 1 cm de caminho óptico e lida à 540 nm em um espectrofotômetro.

A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% foi utilizada como padrão.

3.5. Condições experimentais – Todos os experimentos foram realizados em meio de reação padrão contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM, KCL 65 mM, KH_2PO_4 2 mM e MgCl_2 1 mM. Em todos os experimentos, o pH do meio de reação foi ajustado em 7,2 e a temperatura mantida em 28°C com agitação constante. Como substratos respiratórios foram utilizados substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM. Outros reagentes e substratos adicionados estão indicados nas figuras.

3.6. Consumo de oxigênio mitocondrial – O consumo de O_2 por suspensões mitocondriais isoladas de fígado (0,5 mg/mL) em meio de reação contendo EGTA 200 μ M foi monitorado utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado à uma câmara de vidro de 1,4 mL equipada com agitador magnético. A concentração inicial de oxigênio molecular no meio de reação foi de 225 nmol/ml, a 28 °C (Robinson e Cooper, 1970).

A respiração de fosforilação (V3) foi obtida pela adição de 150 n moles/mL de ADP. A respiração de repouso (V4) é aquela observada após o término da respiração de fosforilação. O controle respiratório (CR) foi calculado como a razão entre as velocidades de respiração nos estados 3 e 4. A razão ADP/O indica o número de moléculas de ADP fosforiladas por átomo de oxigênio consumido, como mostrado no esquema da **Figura 9**.

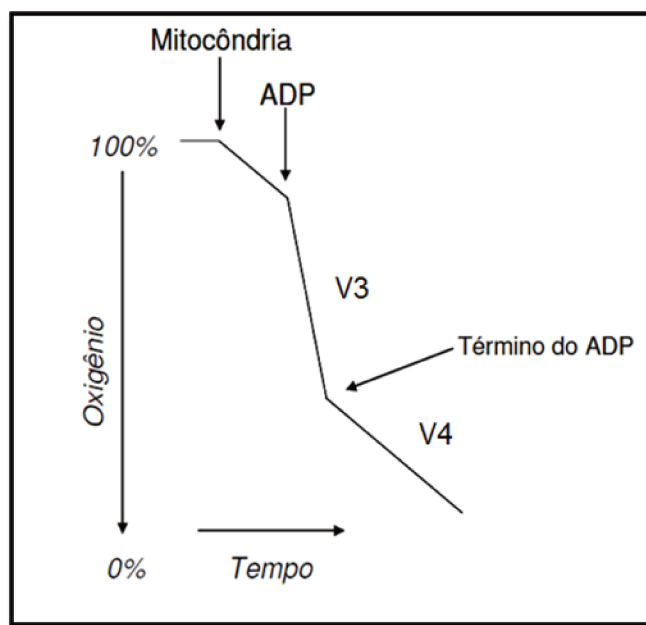


Figura 9: Esquema ilustrativo para obtenção dos parâmetros respiratórios.

3.7. Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) pelo método da safranina - A medida do potencial de membrana mitocondrial foi determinada usando-se o indicador fluorescente safranina O, 5 μ M (Figueira et al., 2012). A fluorescência da safranina decresce progressivamente com sua adsorção

à membrana mitocondrial interna à medida que aumenta o potencial elétrico até aproximadamente 170 mV. Usou-se espectrofluorímetro Hitachi F4500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japão) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 586 nm, respectivamente, e fenda de 5 nm. A calibração foi feita pela titulação do potencial com a captação de potássio (K^+) na presença de valinomicina, em meio de reação isento de potássio e contendo sacarose 200 mM, HEPES 20 mM pH 7,2, $MgCl_2$ 1,0 mM, EGTA 0,3 mM. KCl foi consecutivamente adicionado para determinações dos valores de potencial elétrico de membrana usando-se a equação de Nerst para as concentrações finais de KCl (0,375 mM, 0,75 mM, 1,125 mM, 1,625 mM, 2,125 mM, 2,625 mM, 3,375 mM, 4,125 mM, 4,875 mM e 5,625 mM) seguidas de uma adição de FCCP 0,35 μ M para dissipar totalmente o potencial (**Figura 10**).

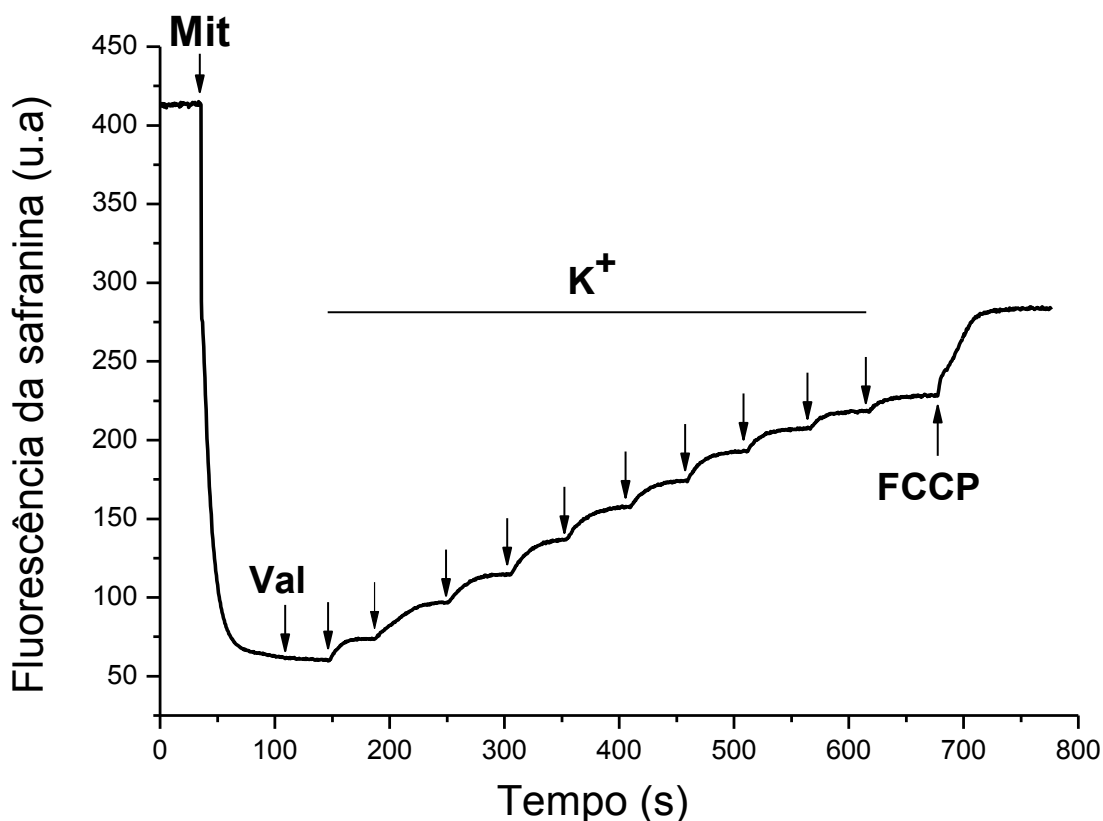


Figura 10. Estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial. Traçado representativo das alterações na fluorescência de safranina em resposta a titulação do potencial elétrico, com adições de KCl, na presença de valinomicina (Val) 40 ng/mL. KCl foi consecutivamente adicionado para determinar o valor de potencial elétrico de membrana usando-se a equação de Nerst para as concentrações finais de KCl (0,375 mM, 0,75 mM, 1,125 mM, 1,625 mM, 2,125 mM, 2,625 mM, 3,375 mM, 4,125 mM, 4,875 mM e 5,625 mM). Após as adições de KCl, foi adicionado o protonóforo FCCP 0,35 μ M para dissipar todo o potencial.

3.8. Captação de cálcio por mitocôndrias - A captação de cálcio por mitocôndrias isoladas foi monitorada segundo as variações de fluorescência de Calcium GreenTM- 5N 0,1 μ M (Molecular Probes) em um espectrofluorímetro Hitachi F4500 (Hitachi, Ltd., Tóquio, Japão), operando com excitação e emissão nos comprimentos de onda de 506 e 531 nm, respectivamente (Murphy et al., 1996). As medidas comentadas nos Resultados foram realizadas utilizando-se o tempo correspondente à metade da liberação do cálcio.

A calibração foi feita observando as alterações de calcium Green em resposta à titulação de Ca^{2+} e sua reversão com adição de EGTA (**Figura 11**).

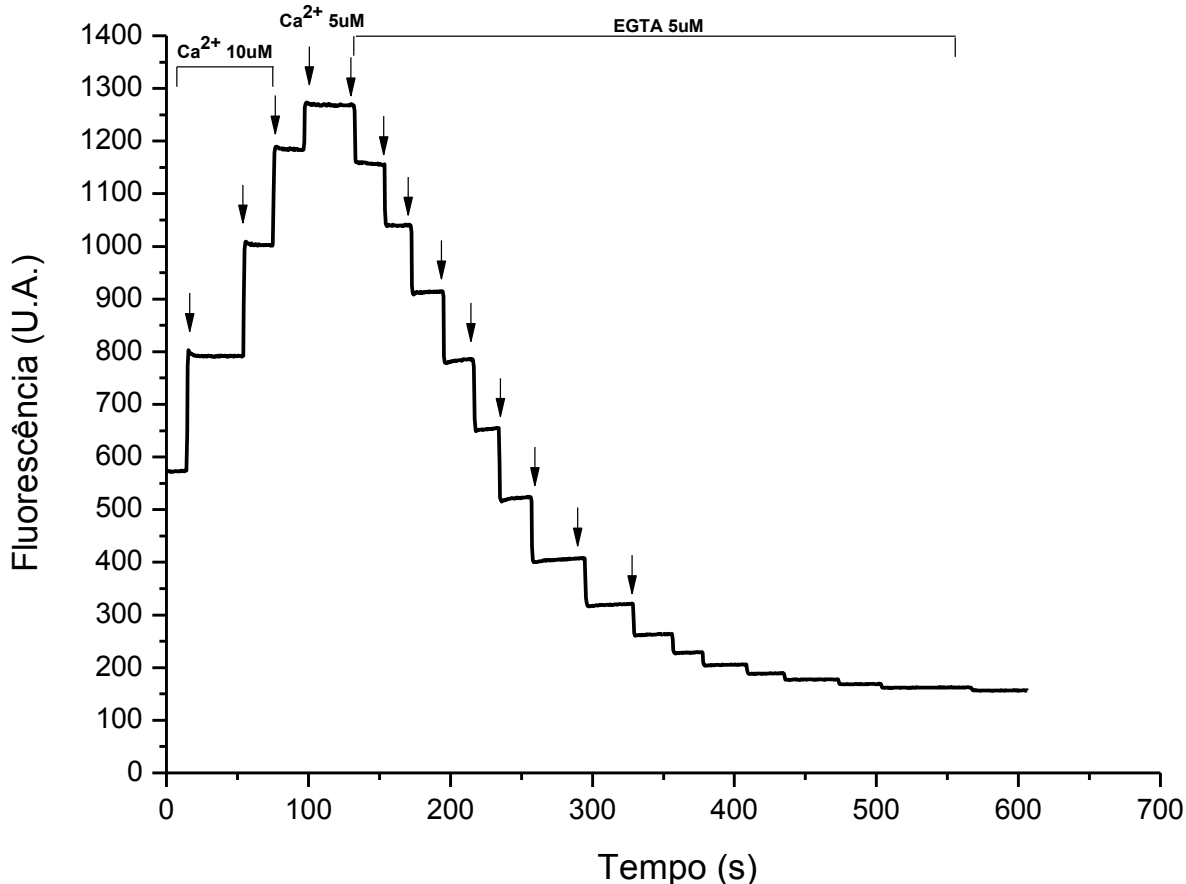


Figura 11: Efeitos de Ca^{2+} e EGTA sobre a fluorescência de Calcium Green. Traçado representativo das alterações de calcium Green em resposta a titulação com íon de Ca^{2+} e sua reversão com adições de EGTA. A fluorescência inicial aproximadamente 600 u.a. foi obtida com meio de reação padrão contendo Ca^{2+} na concentração aproximada de 15uM.

3.9. Medida de inchamento mitocondrial - As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz mitocondrial e do meio, e qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (Nicholls e Akerman, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a consequente diminuição da luz espalhada. O acompanhamento

espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (Vercesi et al., 1988) foi feito em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 (Hitachi, Ltd., Tóquio, Japão). As medidas comentadas nos Resultados foram feitas determinando-se um tempo para a medição das porcentagens de inibição.

3.10. Determinação do estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H). - A oxidação ou redução de nucleotídeos de piridina nas suspensões mitocondriais foram acompanhadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (Hitachi, Ltd., Tóquio, Japão) operando nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente (Vercesi, 1987). Calibrações foram realizadas por meio de adições de concentrações conhecidas de NADH (**Figura 12**) ao meio de reação na ausência de mitocôndria e na presença ou não de cPTIO.

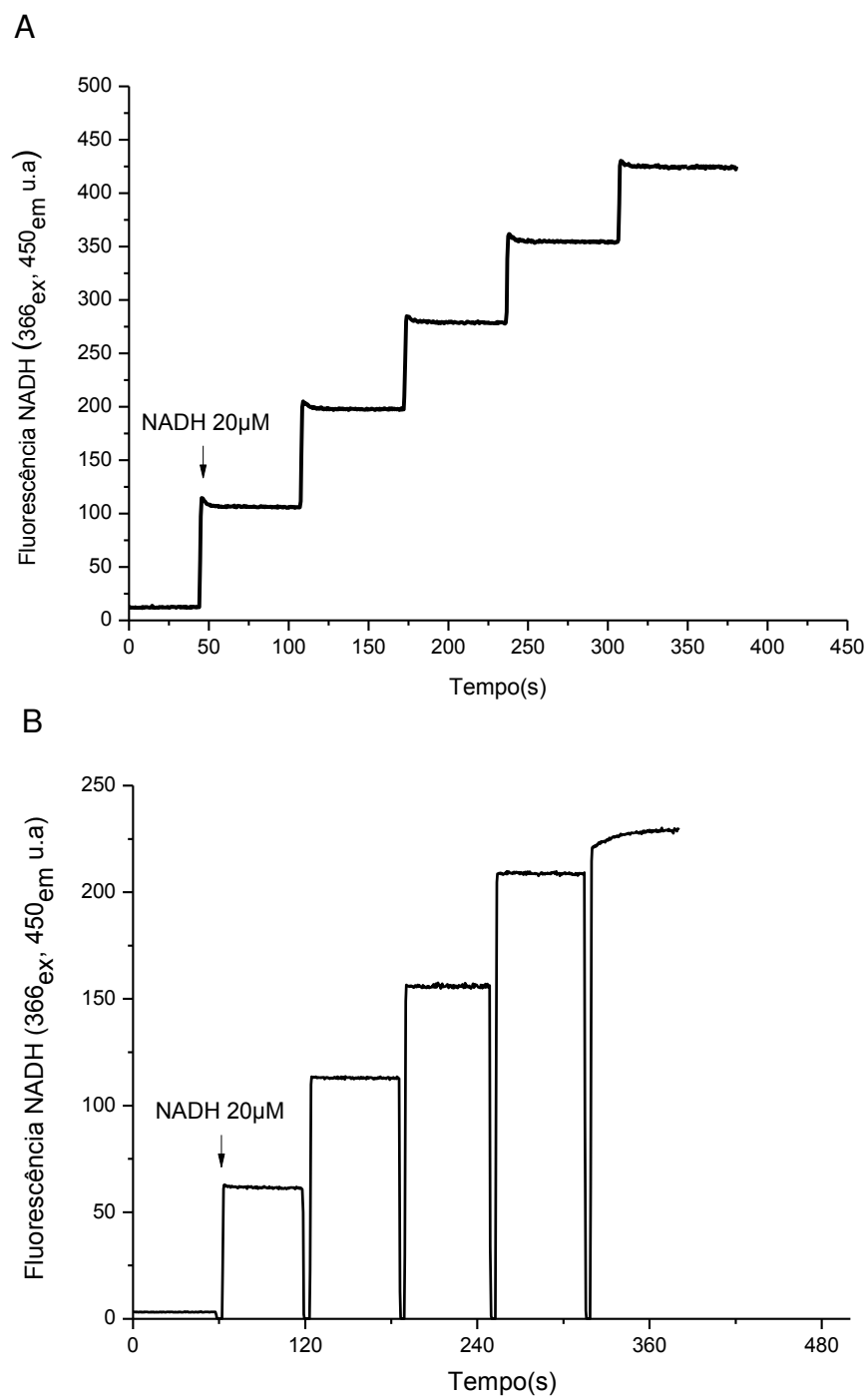


Figura 12: Calibração de NADH. Traçado representativo das alterações de fluorescência em resposta a adições de NADH 20 μ M. Painei A: adições de NADH em 2 mL de meio de reação padrão sem adição de mitocôndria. Painei B: adições de NADH em 2 mL de meio de reação padrão sem adição de mitocôndria na presença de cPTIO 100 μ M.

3.11. Análise estatística – Os dados experimentais foram analisados utilizando-se os softwares *GraphPad Prism* versão 5.0 e SigmaStat 3.5. Os dados foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Os dados estão representados como a média $\pm$ erro padrão ($\pm$ SEM) de pelo menos quatro experimentos independentes. Consideramos significativo o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Níveis de colesterol e de triglicérides plasmáticos nos camundongos estudados

A **Figura 13** mostra os valores de colesterol e triglicérides plasmáticos nos animais Hipercol (C57BL6/J/LDLr-/-), Jackson (C57BL6/J) e Unib (C57BL6/JUnib). Os resultados obtidos mostram que os camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram colesterol plasmático significativamente aumentado, por volta de 270 mg/dl, em relação aos grupos Jackson e Unib,

Estes valores estão de acordo com o que foi mostrado pelo Laboratório Jackson (<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>; acessado em 10 de Dezembro de 2013), onde os níveis de colesterol dos animais Hipercol, recebendo uma dieta normal (padrão do biotério), estão entre 200 e 400 mg/dl, sendo que os valores normais dos animais Jackson e Unib estão entre 80 e 100 mg/dl .

Os valores de triglicérides plasmáticos não foram significativamente diferentes e encontram-se dentro da faixa normal (entre 100 e 150 mg/dl).

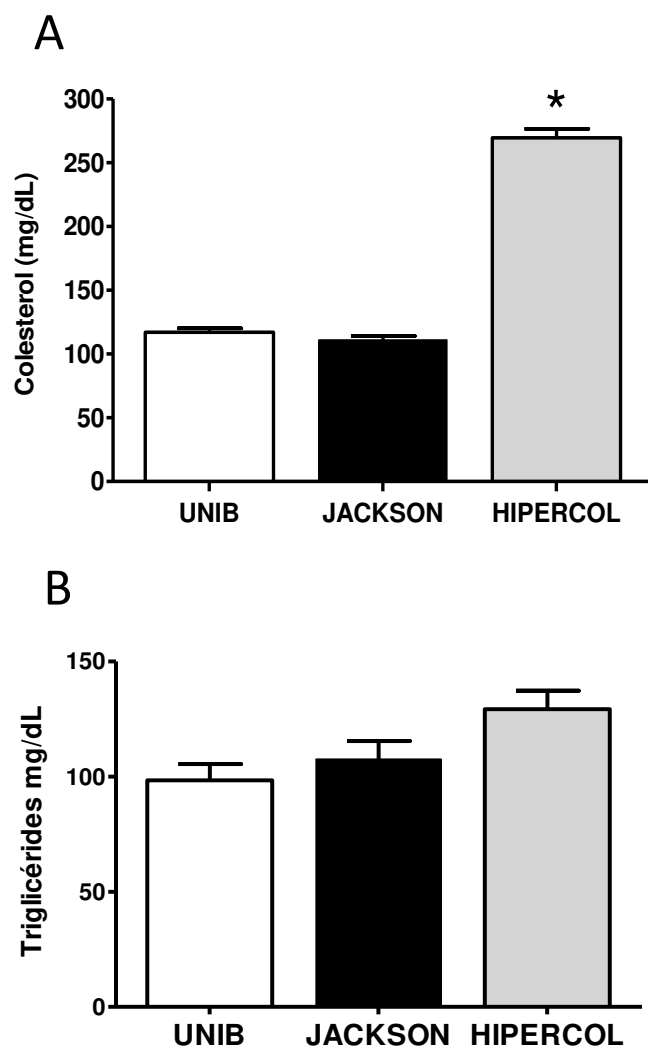


Figura 13. Determinação de colesterol e de triglicérides plasmáticos em camundongos Unib, Jackson e Hipercol. Painel A: colesterol plasmático, Painel B: triglicérides plasmático. N=30.
* $p < 0,05$

4.2. Efeito de L-NAME e cPTIO sobre a respiração mitocondrial

A **Tabela I** apresenta os dados sobre o consumo de O_2 na presença de 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) 100 μM , um sequestrador de $NO^\bullet$ e do composto N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 200 μM , um inibidor da NOS. Os valores de respiração no estado de fosforilação, V3, estavam diminuídos ($p < 0,05$) tanto por cPTIO (10-20%) quanto por L-NAME (5-15%) em relação a condição controle, nas mitocôndrias de todos os modelos de camundongos (Hipercol, Jackson e Unib). Os demais parâmetros não foram significativamente alterados por estes compostos.

Tabela I: Efeito de L-NAME e cPTIO sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol.

	Unib (wild type)			Jackson (deleção de NNT)			Hipercol (deleção de LDLr e NNT)		
	Controle	L-NAME	cPTIO	Controle	L-NAME	cPTIO	Controle	L-NAME	cPTIO
V3 (nmol O ₂ /mg/min)	43,35±0,77	36,06±1,05*	38,56±0,66*	37,74±0,24	35,2±0,38*	34,66±0,31*	39,56±2,77	33,54±0,47*	31,16±0,35*
V4 (nmol O ₂ /mg/min)	7,92±0,14	6,80±0,29	8,67±0,12	8,71±0,12	8,80±0,24	8,86±0,16	8,36±0,54	7,73±0,24	7,72±0,10
ADP/O	2,25±0,00	2,27±0,04	2,32±0,04	2,19±0,01	2,26±0,02	2,19±0,02	2,22±0,02	2,14±0,04	2,17±0,03
CR (V3/V4)	5,26±0,16	5,29±0,11	4,57±0,1	4,27±0,09	4,44±0,19	3,99±0,08	4,64±0,09	4,36±0,14	4,41±0,14

Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 µM e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM, e também na presença de L-NAME 200 µM e cPTIO 100 µM, com adição de ADP 150 µM nas três condições. Os dados representam a média ± SEM de n=4: *p<0,0001 (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

4.3. Efeito de cPTIO e L-NAME sobre a transição de permeabilidade mitocondrial

Dados da literatura mostram que o $\text{NO}^\bullet$ pode ter duplo efeito sobre a abertura do PTP (Whiteman et al., 2006; Dedkova e Blatter, 2009). Altas concentrações de $\text{NO}^\bullet$ podem gerar ONOO^- que oxida grupamentos tiólicos de proteínas mitocondriais envolvidas na formação do PTP (Dahm et al., 2006; Quijano et al., 2006). Em concentrações consideradas fisiológicas, o $\text{NO}^\bullet$ tem ação protetora contra abertura do PTP possivelmente por gerar nitrosotióis com grupamentos -SH de proteínas da membrana mitocondrial interna e proteger contra o ataque destes grupamentos por oxidantes como H_2O_2 , $\text{OH}^\bullet$ ou ONOO^- (Brookes et al., 2000; Leite et al., 2010). Em concentrações muito baixas ou na ausência de $\text{NO}^\bullet$ há maior susceptibilidade à abertura do PTP, possivelmente devido à diminuição de nitrosotióis na membrana mitocondrial (Leite et al., 2010).

Considerando-se estes efeitos do $\text{NO}^\bullet$ sobre o PTP, propusemos avaliar se os compostos cPTIO ou L-NAME têm efeito sobre a TPM, para isso realizamos a medida do potencial de membrana mitocondrial após desafio com cálcio, que foi determinado usando-se o indicador fluorescente safranina O, 5 μM (Figueira et al., 2012).

Os experimentos das **Figuras 14 e 15** foram iniciados com as adições de mitocôndria. Inicialmente ocorreu uma rápida deflexão do traçado, compatível com a captação da safranina devido à formação do potencial de membrana. Quando há a dissipação do potencial (abertura do PTP), a safranina é liberada da membrana mitocondrial e volta para o meio aumentando assim o valor da fluorescência.

As **Figuras 14A, B e C** mostram que nos camundongos Unib, Hipercol e Jackson não houve diferença no tempo de dissipação do potencial de membrana induzido por cálcio na presença ou ausência de cPTIO. Isto sugere que nestas mitocôndrias os níveis de $\text{NO}^\bullet$ endógenos não são suficientes para gerar ONOO^- que promove oxidação de grupamentos tióis seguido de abertura do PTP (Gadelha et al. 1997).

Quando os experimentos de potencial de membrana foram realizados na presença de L-NAME, como mostrado nas **Figuras 15A, B e C**, também não houve alterações nos tempos de dissipação do potencial de membrana induzido por cálcio em nenhuma das linhagens de camundongos estudadas (Hipercol, Jackson e Unib). A sensibilidade à CsA, em todos os experimentos realizados, confirma que a dissipação de $\Delta\Psi$ era devido a abertura do PTP.

Rodrigues e colaboradores (2012) demonstraram que o cPTIO protegeu contra a abertura do PTP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato incubadas na presença do doador de NO[•] nitrosyl ruthenium complex [Ru(NO₂)(b-py)₂(4-pic)]⁺. Neste caso, a abertura do poro era mediada pela formação de ONOO⁻ a partir de NO[•], fornecido pelo referido doador, e o O₂^{•-} gerado pela cadeia respiratória. Portanto, nos nossos experimentos, propomos que a quantidade de NO[•] endógeno não é suficiente para gerar ONOO⁻ e abertura do poro, não sendo assim sensível a cPTIO e L-NAME.

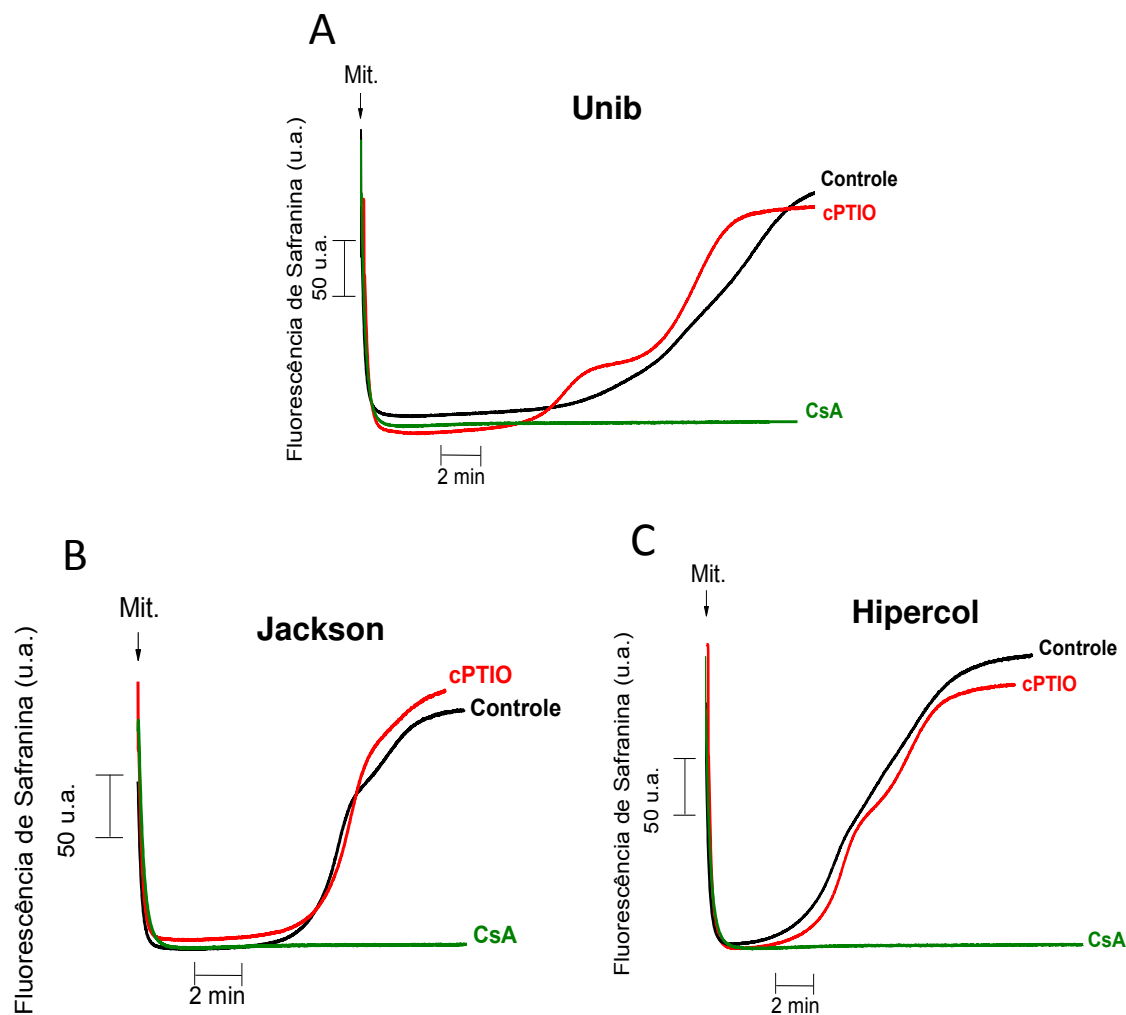


Figura 14. O sequestrador de $\text{NO}^\bullet$ cPTIO não tem efeito sobre a dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) induzida por íons de Ca^{2+} em fígado de camundongos Unib, Hipercol e Jackson. Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM, safranina 5 μM e Ca^{2+} 35 μM , na presença de cPTIO 100 μM . Foram realizados também experimentos na presença do inibidor de TPM: ciclosporina A (CsA 1 μM). **Painel A:** camundongos Unib, **Painel B:** camundongos Jackson e **Painel C:** camundongos Hipercol. Figura representativa (n=4). Mit.= Mitocôndria.

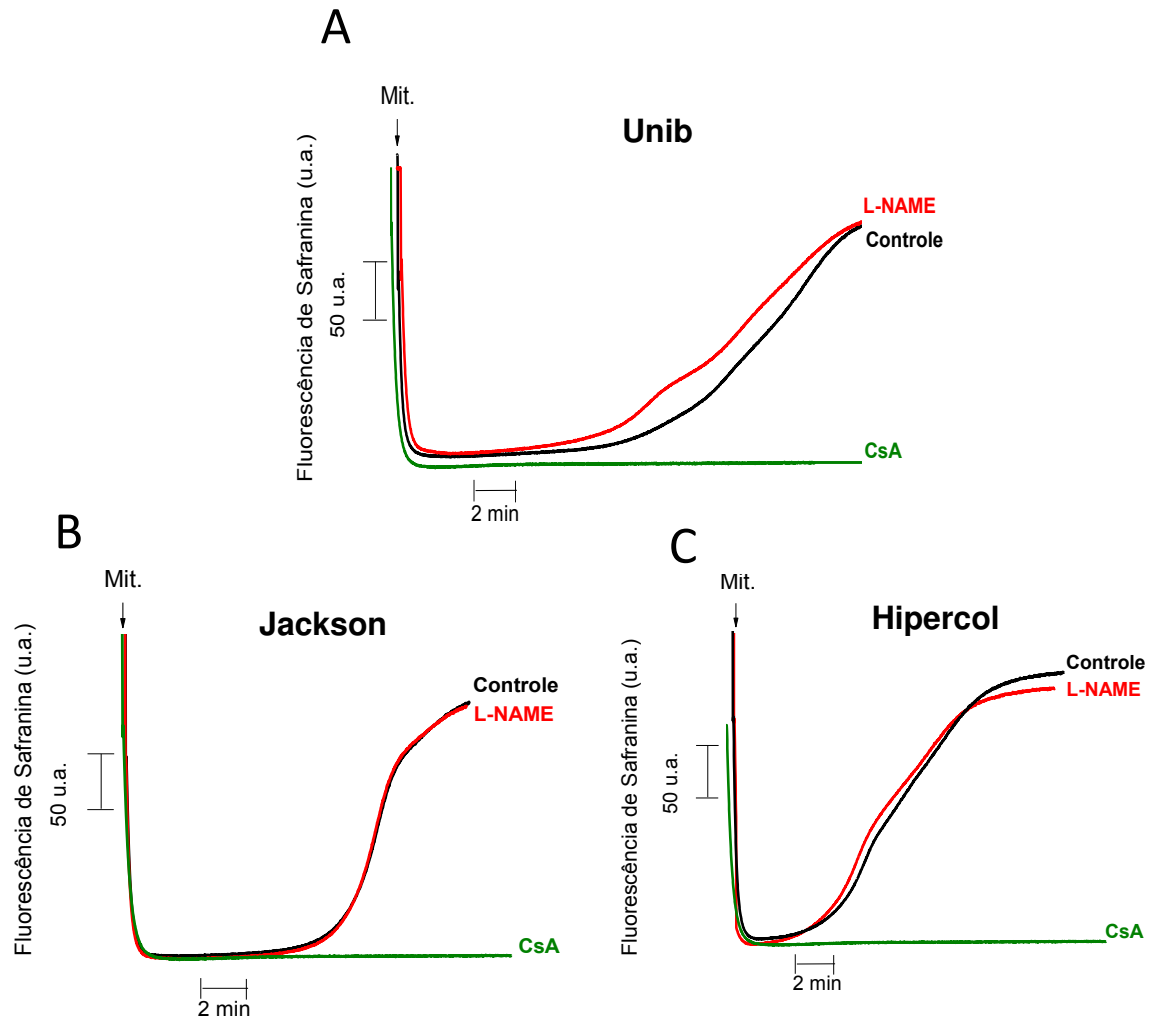


Figura 15. O inibidor da NOS L-NAME não tem efeito sobre a dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) induzida por íons de Ca^{2+} em fígado de camundongos Unib, Hipercol e Jackson. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetogluturato) 5 mM, safranina 5 μM e Ca^{2+} 35 μM , na presença de L-NAME 200 μM ou CsA 1 μM . **Painel A:** camundongos Unib, **Painel B:** camundongos Jackson, **Painel C:** camundongos Hipercol. Figura representativa (n=4). Mit.= Mitocôndria.

4.4. O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais nos animais estudados não foi alterado na presença de cPTIO ou L-NAME: estudos com mitocôndrias isoladas de fígado oxidando diferentes substratos

Considerando-se a deficiência de atividade da enzima NAD(P)-transidrogenase (NNT) nos camundongos Hipercol e Jackson, avaliamos o estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) em mitocôndrias isoladas destes animais comparados aos wild type Unib. Estes experimentos foram realizados através do monitoramento das alterações na fluorescência de NADPH endógeno. O estado reduzido máximo foi obtido pela adição de isocitrato 1 mM.

Utilizando-se mitocôndrias energizadas com succinato na presença de rotenona (para impedir a oxidação de NADH pelo complexo I), observou-se que as mitocôndrias dos camundongos Jackson e Hipercol exibiram uma queda espontânea mais acentuada da fluorescência do que as de camundongos Unib (**Figuras 16 A, B e C, linhas pretas**). A adição posterior de isocitrato levou ao aumento na fluorescência (indicando re-redução de NADP^+) nas mitocôndrias dos grupos Jackson e Hipercol. Os mesmos resultados foram obtidos quando utilizados substratos de complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) (**Figura 17 A, B e C, linhas pretas**).

Usando apenas substratos endógenos (**Figura 18**), as mitocôndrias dos camundongos estudados apresentaram comportamento similar ao ocorrido nos experimentos acima, com a diferença de que a adição de isocitrato reduziu NADP^+ mais lentamente que nos experimentos anteriores.

Em experimentos realizados na presença de altas concentrações de piruvato e malato (**Figura 19**), nenhuma das mitocôndrias dos três modelos de camundongos exibiram oxidação espontânea de NAD(P)H. De acordo com isso, não se observou efeito da adição de isocitrato. Na nossa interpretação, nestas concentrações altas de substratos ligados a NAD(P)H, o ciclo de Krebs gerou isocitrato em níveis suficientes para manter NADP no estado reduzido por via independente da NNT (**Figura 19**).

Quando utilizados os compostos L-NAME (linhas vermelhas) e cPTIO (linhas azuis), nas condições descritas acima, em nenhuma delas houve alterações no estado redox dos nucleotídeos de piridina destes animais. Os experimentos e suas calibrações com NADH mostram que a presença de cPTIO gera redução da intensidade de fluorescência deste nucleotídeo (**Figuras 16, 17, 18 e 19**).

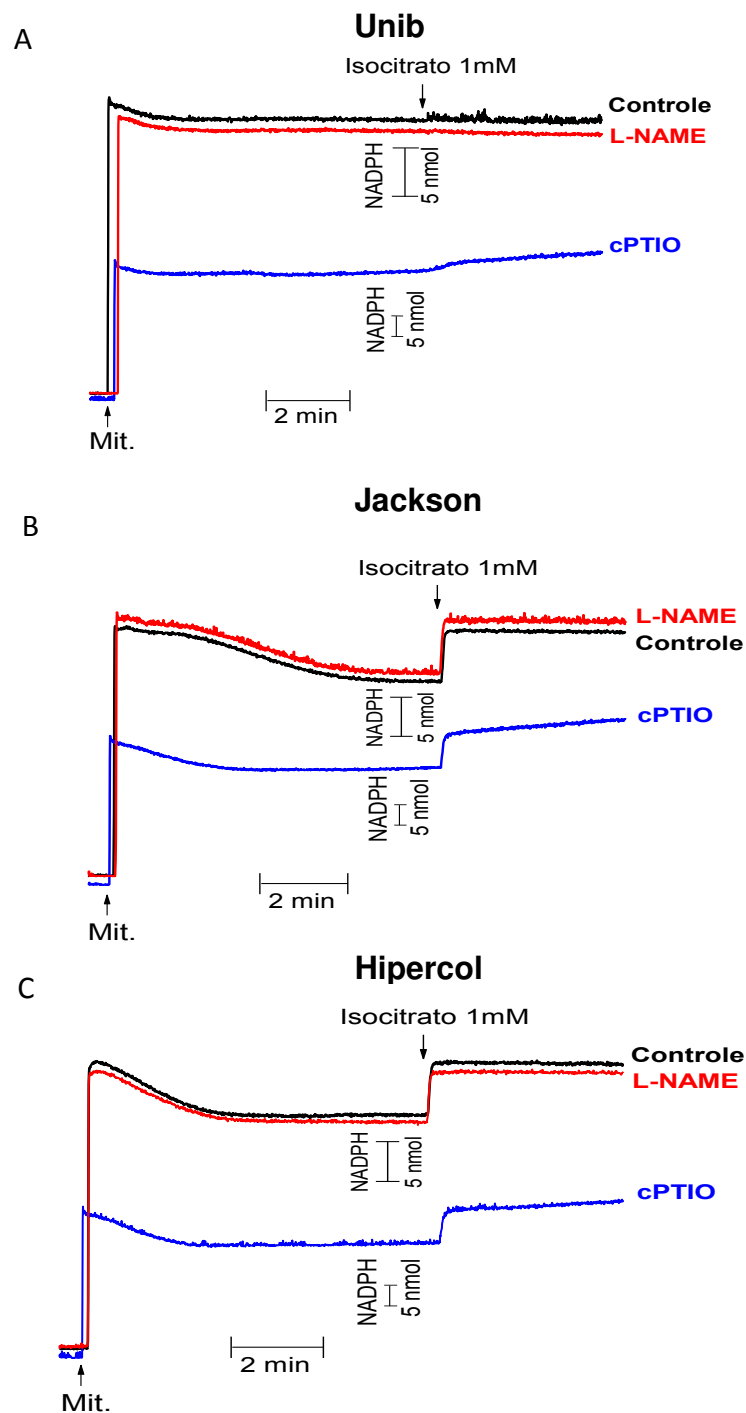


FIGURA 16. O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais não foi alterado na presença de cPTIO e L-NAME em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol incubadas com succinato e rotenona. Mitocôndrias isoladas (1 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo succinato 5 mM, rotenona 5 µM e EGTA 200 µM, na presença de cPTIO 100 µM ou L-NAME 200 µM. Isocitrato 1 mM foi adicionado onde indicado na figura. **Painel A:** camundongos Unib. **Painel B:** camundongos Jackson. **Painel C:** camundongos Hipercol. Figura representativa (n=4). Mit.= Mitocôndria.

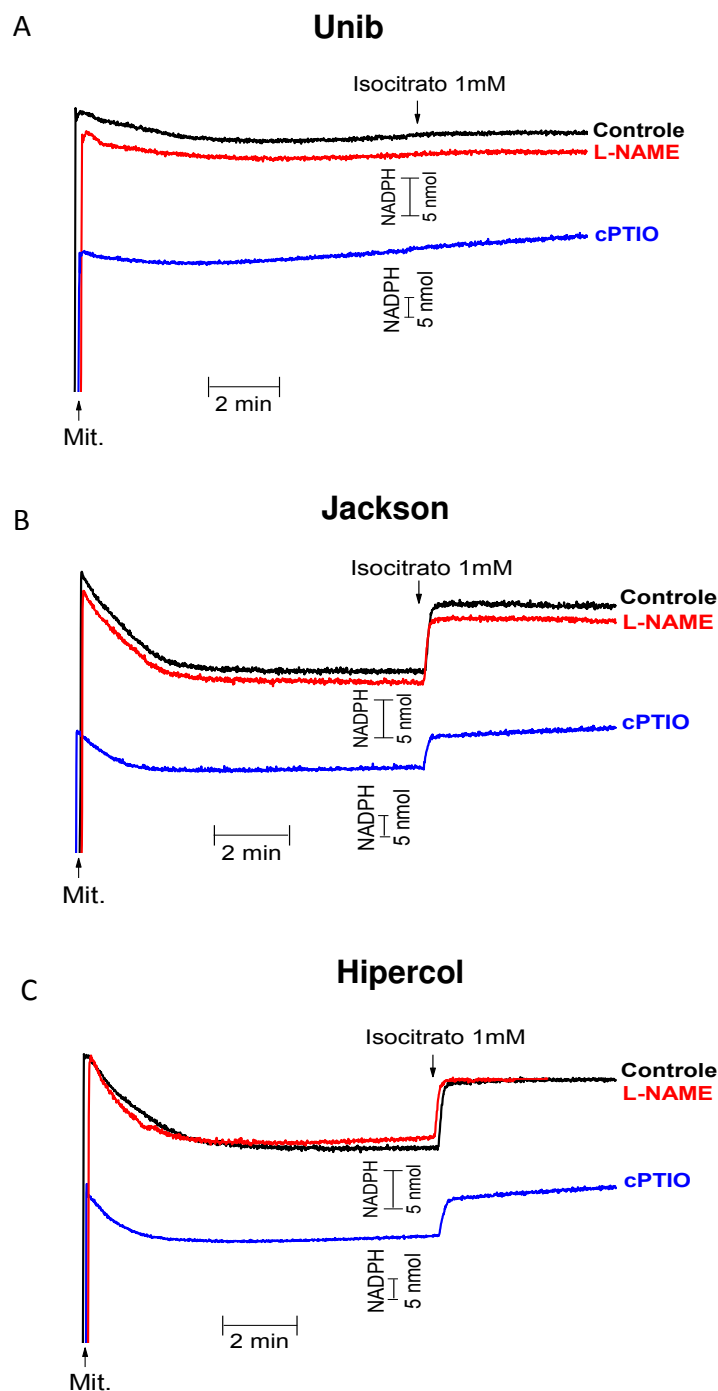


FIGURA 17. O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais não foi alterado na presença de cPTIO e L-NAME em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol incubadas com substratos para complexo I. Mitocôndrias isoladas (1 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM, EGTA 200 μ M, na presença de cPTIO 100 μ M ou L-NAME 200 μ M. Isocitrato 1 mM foi adicionado onde indicado na figura. **Painel A:** camundongos Unib. **Painel B:** camundongos Jackson. **Painel C:** camundongos Hipercol. Figura representativa (n=4). Mit.= Mitocôndria.

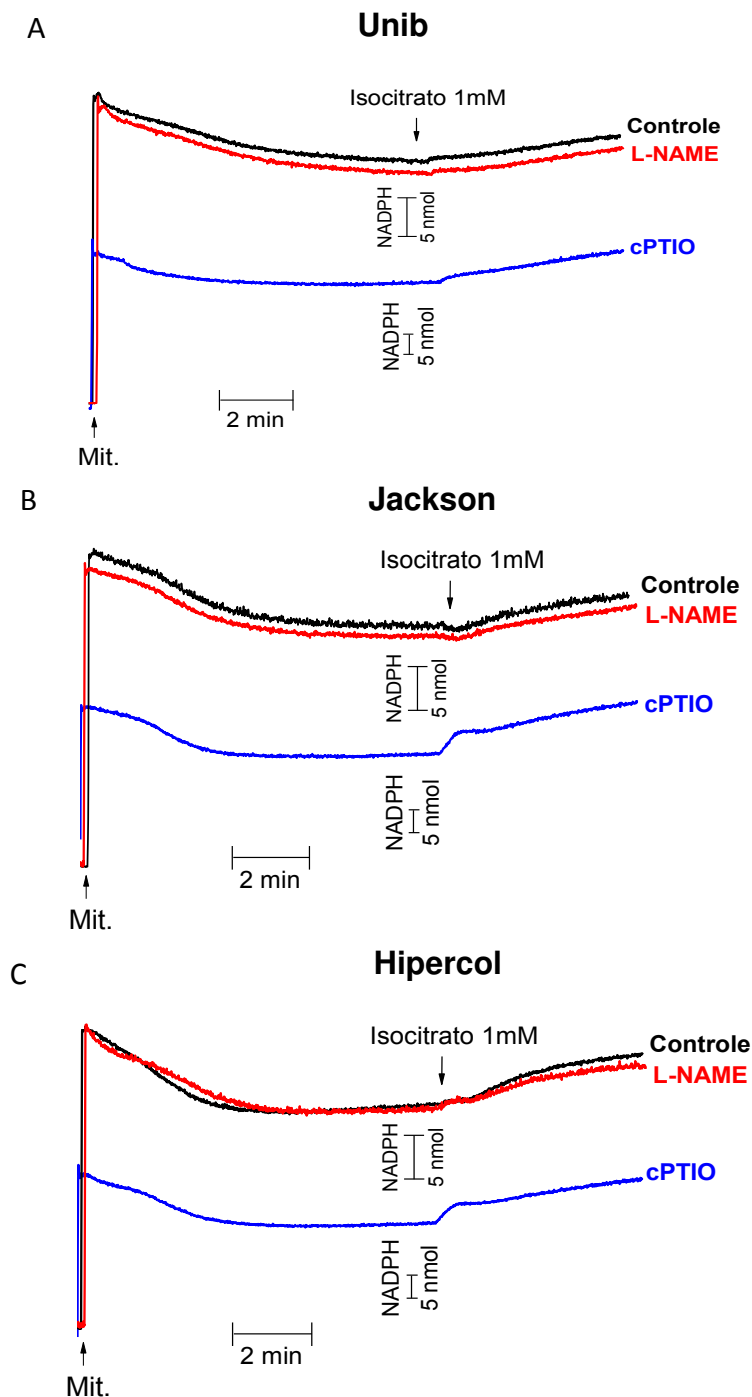


FIGURA 18. O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais não foi alterado na presença de cPTIO e L-NAME em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hieprcol incubadas somente na presença de substrato endógeno. Mitocôndrias isoladas (1 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 μ M, na presença de cPTIO 100 μ M ou L-NAME 200 μ M. Isocitrato 1 mM foi adicionado onde indicado na figura. **Painel A:** camundongos Unib. **Painel B:** camundongos Jackson. **Painel C:** camundongos Hipercol. Figura representativa (n=4). Mit.= Mitocôndria.

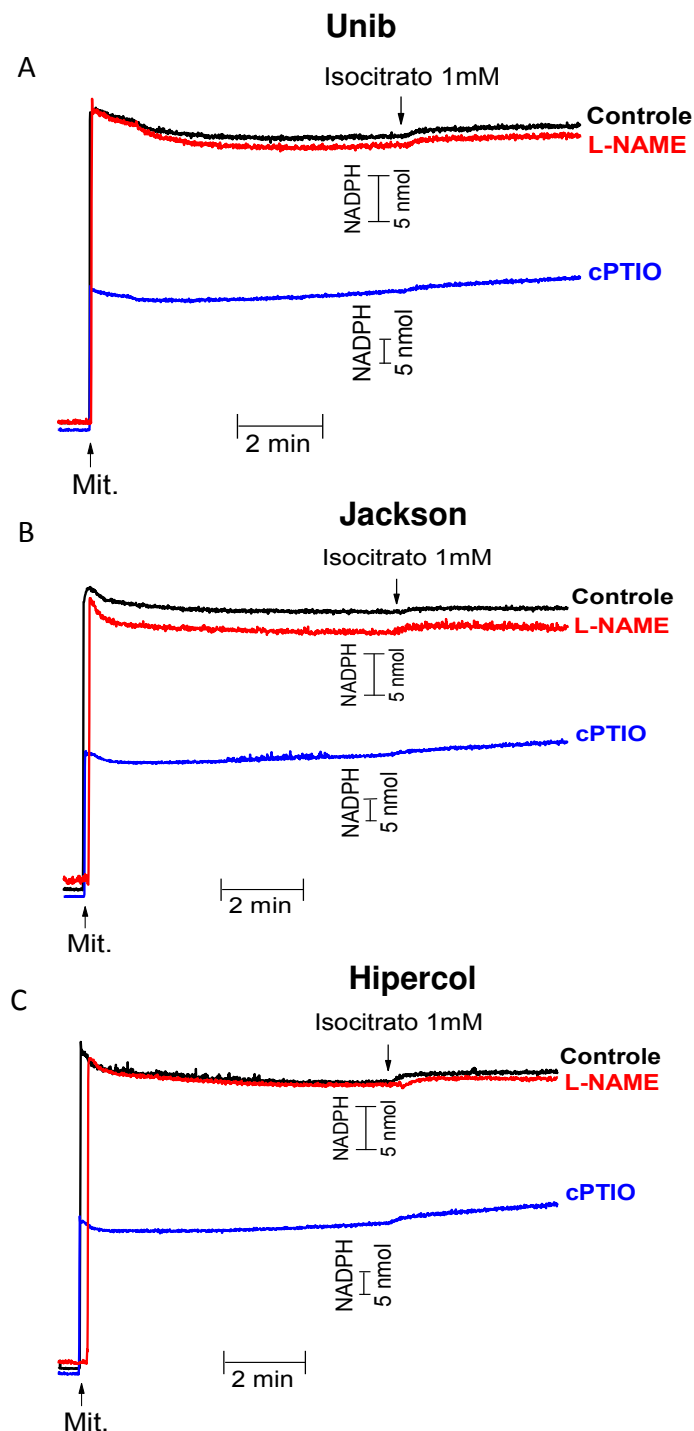


FIGURA 19. O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais não foi alterado na presença de cPTIO e L-NAME em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol incubadas com malato e piruvato. Mitocôndrias isoladas (1 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo malato 5 mM, piruvato 5 mM, EGTA 200 µM, na presença de cPTIO 100 µM ou L-NAME 200 µM. Isocitrato 1 mM foi adicionado onde indicado na figura. **Painel A:** camundongos Unib. **Painel B:** camundongos Jackson. **Painel C:** camundongos Hipercol. Figura representativa (n=4). Mit.= Mitocôndria.

4.5. Efeito de spermine NONOate, spermine e cPTIO sobre a respiração mitocondrial

Os experimentos sobre transição de permeabilidade mitocondrial (**Figuras 14 e 15**) indicaram que as preparações mitocondriais dos modelos de camundongos usados neste trabalho não possuem NO• endógeno em níveis suficientes para gerar os resultados esperados, como em mitocôndrias de fígado de rato (Leite et al. 2010). Assim, nos experimentos mostrados na **Figura 20 e Tabelas II, III e IV** estudamos os efeitos do doador de NO• spermine NONOate, do sequestrador de NO• (cPTIO) e da poliamina spermine, sobre a respiração de mitocôndrias isoladas dos animais Hipercol, Jackson e Unib. Usou-se a poliamina spermine como um controle uma vez que resultados prévios da literatura indicam que este composto tem ação direta sobre a TPM (Philips and Chaffee 1982; Lapidus and Sokolove 1992, 1993, 1994; Tassani et al. 1995a, 1996; Sava et al. 2006)

A **Figura 20** representa um experimento de respiração (consumo de oxigênio) com mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, exemplificando como os dados das **Tabelas II, III e IV** foram obtidos.

Observa-se que concentrações maiores que 20 µM (50 e 100 µM, **Fig 20 C e D**), de spermine NONOate promovem inibição da respiração de fosforilação (V3). Esta inibição foi revertida na presença de cPTIO (**Fig 20 E**), comprovando a ação do spermine NONOate como gerador de NO• (Brown e Cooper, 1994; Cleeter et al., 1994; Sarti et al., 2000; Giulivi et al., 1998; Rivera-Tirado et al., 2011). Em contraste, a adição de spermine não alterou a respiração de fosforilação (**Fig 20 F**), comprovando o efeito inibitório do NO• sobre as respirações na presença do doador de NO•, spermine NONOate, pois como mostrado por Moncada e Bolanos (2006), o NO• compete com o O₂ pela citocromo oxidase (complexo IV), que catalisa a transferência de elétrons do citocromo c reduzido para oxigênio molecular, inibindo assim a respiração.

As **Tabelas II, III e IV** mostram as médias e os desvios padrões dos resultados obtidos a partir da **Figura 20**. Nas mitocôndrias de todos os

camundongos estudados, os valores da respiração foram significativamente diminuídos por spermine NONOate 50 μ M e completamente revertidos pela presença de cPTIO nos camundongos Unib, enquanto nos animais Jackson e Hipercol as reversões foram parciais.

Estes dados levaram a escolha da concentração de spermine NONOate 50 μ M, uma vez que foi obtido declínio da respiração sem prejudicar o transporte de Ca^{2+} (**Figura 21, 22 e 23**)

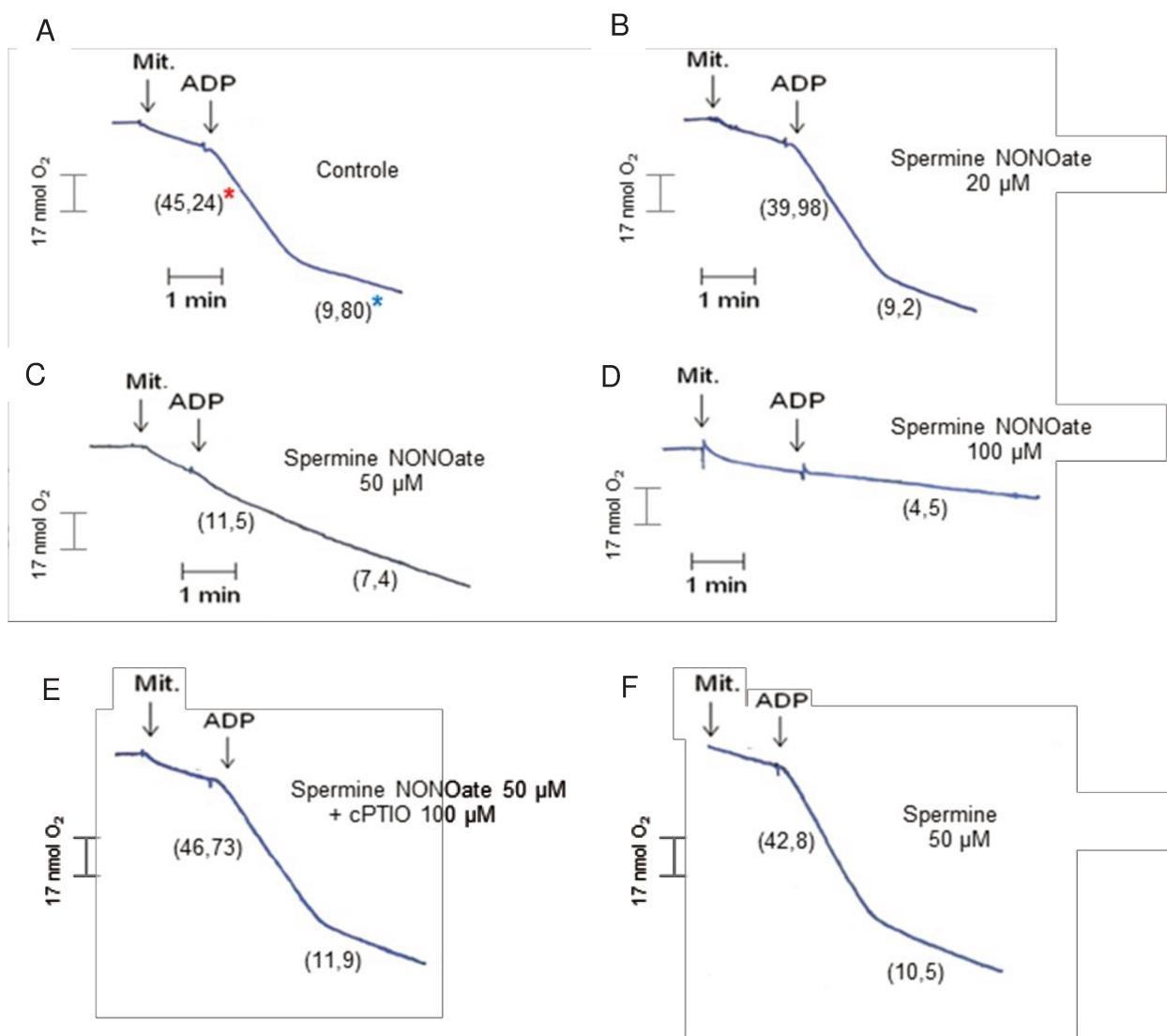


Figura 20. Efeito de spermine NONOate, cPTIO e spermine sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Unib. Mitocôndrias de camundongos (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 μM e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM na presença de cPTIO, spermine NONOate e spermine. ADP 150 μM, foi adicionado onde indicado. Os valores apresentados indicam (*): V3 em nmolO₂/mg/min e (*): V4 em nmolO₂/mg/min. **Painel A:** controle; **Painel B:** spermine NONOate 20 μM; **Painel C:** spermine NONOate 50 μM; **Painel D:** spermine NONOate 100 μM; **Painel E:** spermine NONOate 50 μM e cPTIO 100 μM; **Painel F:** spermine 50 μM. Figura representativa (n=1). Mit. = Mitocôndria.

Tabela II: Efeito de spermine NONOate 50 μ M, spermine 50 μ M e cPTIO 100 μ M sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Unib.

	UNIB				
	Controle	cPTIO	Spermine NONOate	Spermine NONOate + cPTIO	Spermine
V3 (nmol O ₂ / mg/min)	45,46 $\pm$ 2,47	41,42 $\pm$ 1,39	9,96 $\pm$ 1,57*	45,20 $\pm$ 2,74	45,25 $\pm$ 3,77
V4 (nmol O ₂ / mg/ min)	8,89 $\pm$ 0,42	8,99 $\pm$ 0,27	7 $\pm$ 0,48*	10,82 $\pm$ 0,49*	10,84 $\pm$ 0,27*
ADP/O	2,43 $\pm$ 0,06	2,24 $\pm$ 0,06	-	2,32 $\pm$ 0,07	2,18 $\pm$ 0,04*
CR (V3 / V4)	4,94 $\pm$ 0,13	4,60 $\pm$ 0,06	1,84 $\pm$ 0,13*	4,26 $\pm$ 0,16*	4,23 $\pm$ 0,21*

Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 μ M e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM e também na presença de cPTIO 100 μ M, spermine NONOate 50 μ M e spermine 50 μ M, com adição de ADP 150 μ M em todas as condições. Os dados representam a média $\pm$ SEM de n=8:*p<0,05 (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

Tabela III: Efeito de spermine NONOate 50 μ M, spermine 50 μ M e cPTIO 100 μ M sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Jackson

JACKSON					
	Controle	cPTIO	Spermine NONOate	Spermine NONOate + cPTIO	Spermine
V3 (nmol O ₂ / mg/min)	43,73 $\pm$ 0,97	37,71 $\pm$ 0,87*	10,38 $\pm$ 0,92*	38,12 $\pm$ 0,30*	39,84 $\pm$ 0,79*
V4 (nmol O ₂ / mg/ min)	9,17 $\pm$ 0,35	9,09 $\pm$ 0,21	7,35 $\pm$ 0,6*	8,05 $\pm$ 0,27	9,57 $\pm$ 0,40
ADP/O	2,54 $\pm$ 0,08	2,20 $\pm$ 0,02*	-	2,63 $\pm$ 0,02	2,26 $\pm$ 0,05*
CR (V3 / V4)	4,87 $\pm$ 0,12	4,00 $\pm$ 0,03*	2,11 $\pm$ 0,16*	4,56 $\pm$ 0,09	4,70 $\pm$ 0,15

Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 μ M e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM e também na presença de cPTIO 100 μ M, spermine NONOate 50 μ M e spermine 50 μ M, com adição de ADP 150 μ M em todas as condições. Os dados representam a média $\pm$ SEM de n=8:*p<0,05 (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

Tabela IV: Efeito de spermine NONOate 50 μ M, spermine 50 μ M e cPTIO 100 μ M sobre a respiração mitocondrial de fígado de camundongos Hipercol.

HIPERCOL					
	Controle	cPTIO	Spermine NONOate	Spermine NONOate + cPTIO	Spermine
V3 (nmol O ₂ / mg/min)	42,55 $\pm$ 1,81	31,63 $\pm$ 0,21*	8,13 $\pm$ 0,73*	37,85 $\pm$ 0,18	37,41 $\pm$ 1,91*
V4 (nmol O ₂ / mg/ min)	8,9 $\pm$ 0,90	7,60 $\pm$ 0,02	6,49 $\pm$ 0,35*	8,56 $\pm$ 0,13	9,25 $\pm$ 0,77
ADP/O	2,23 $\pm$ 0,08	2,17 $\pm$ 0,03	-	2,17 $\pm$ 0,03	2,40 $\pm$ 0,06
CR (V3 / V4)	4,65 $\pm$ 0,19	4,18 $\pm$ 0,02*	1,71 $\pm$ 0,08*	4,31 $\pm$ 0,03	4,32 $\pm$ 0,14

Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 μ M e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM e também na presença de cPTIO 100 μ M, spermine NONOate 50 μ M e spermine 50 μ M, com adição de ADP 150 μ M em todas as condições. Os dados representam a média $\pm$ SEM de n=8: *p<0,05 (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

4.6. Efeito de spermine NONOate e spermine sobre a transição de permeabilidade mitocondrial: captação e retenção de Ca^{2+}

As **Figuras 21, 22 e 23** mostram que a adição de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e Hipercol, respectivamente, (0,5 mg/mL; adição indicada por seta), causam decréscimo da fluorescência, devido a captação do Ca^{2+} presente no meio de reação. Estas figuras mostram que o doador de $\text{NO}^{\bullet}$ spermine NONOate na concentração de 50 μM e a spermine 50 μM aumentam a capacidade de retenção mitocondrial de Ca^{2+} nas mitocôndrias dos três camundongos em aproximadamente 25 e 60%, respectivamente.

Os efeitos observados de inibição da respiração mitocondrial (Tabela II, III e IV) e não alteração da capacidade de retenção de Ca^{2+} (Fig 21, 22, 23) estão de acordo com os resultados obtidos por David Nicholls (1978) que mostram que apenas em condições em que os potenciais estão abaixo de 130 mV ocorrem alterações das propriedades de transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias. De acordo com estes dados, nossos resultados demonstram que de fato as velocidades de captação do cátion são semelhantes em todas as condições: controle e na presença de spermine NONOate, spermine e CsA. No entanto, o período de início de liberação de Ca^{2+} foi postergado em cerca de aproximadamente 2 minutos por spermine NONOate e 4 minutos por spermine. Como esperado, a CsA causou proteção total em todas as condições experimentais. Como a spermine é um conhecido protetor da retenção de Ca^{2+} em mitocôndrias (Philips e Chaffee 1982; Lapidus e Sokolove 1992, 1993, 1994; Tassani et al. 1996; Sava et al. 2006), acreditamos que a menor proteção causada por spermine NONOate seja devido ao efeito estimulador do $\text{NO}^{\bullet}$ liberado sobre a abertura do PTP.

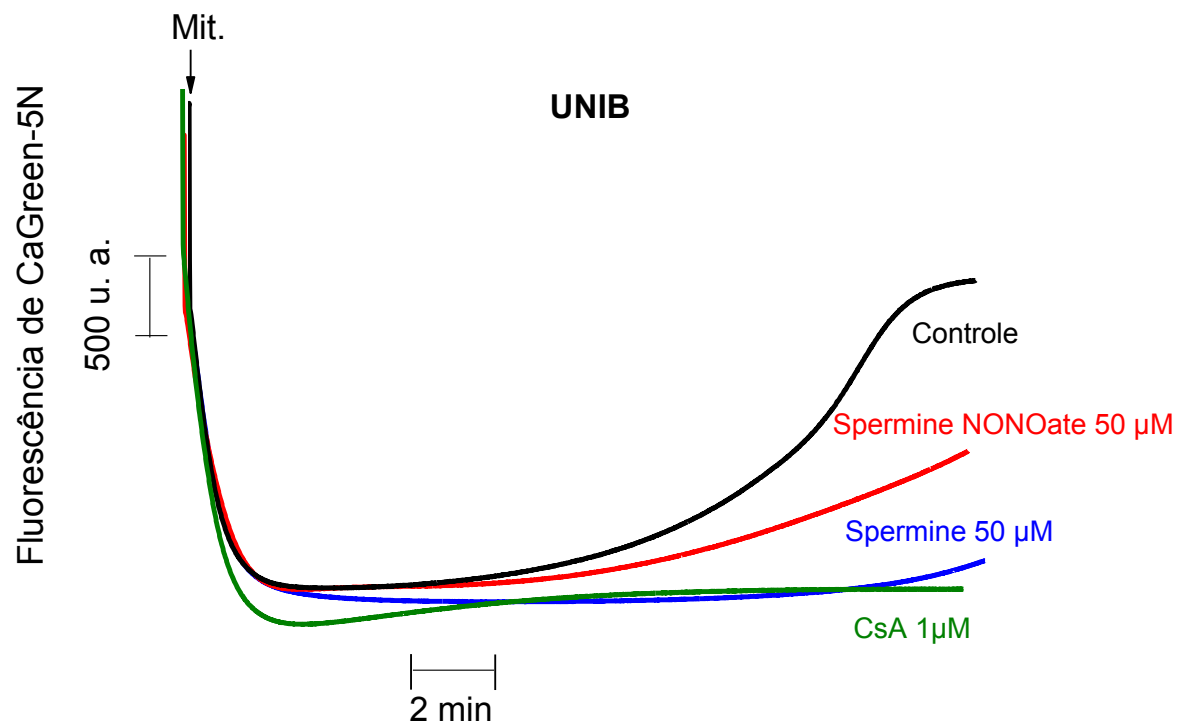


Figura 21. O doador de NO[•] spermine NONOate e a poliamina spermine aumentam a capacidade de retenção mitocondrial de Ca²⁺ em camundongos Unib. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM, Ca²⁺ 35 µM, Calcium Green™- 5N 0,1 µM, na presença ou não de spermine NONOate 50 µM ou spermine 50 µM. Figura representativa (n=6). Mit = Mitocôndria.

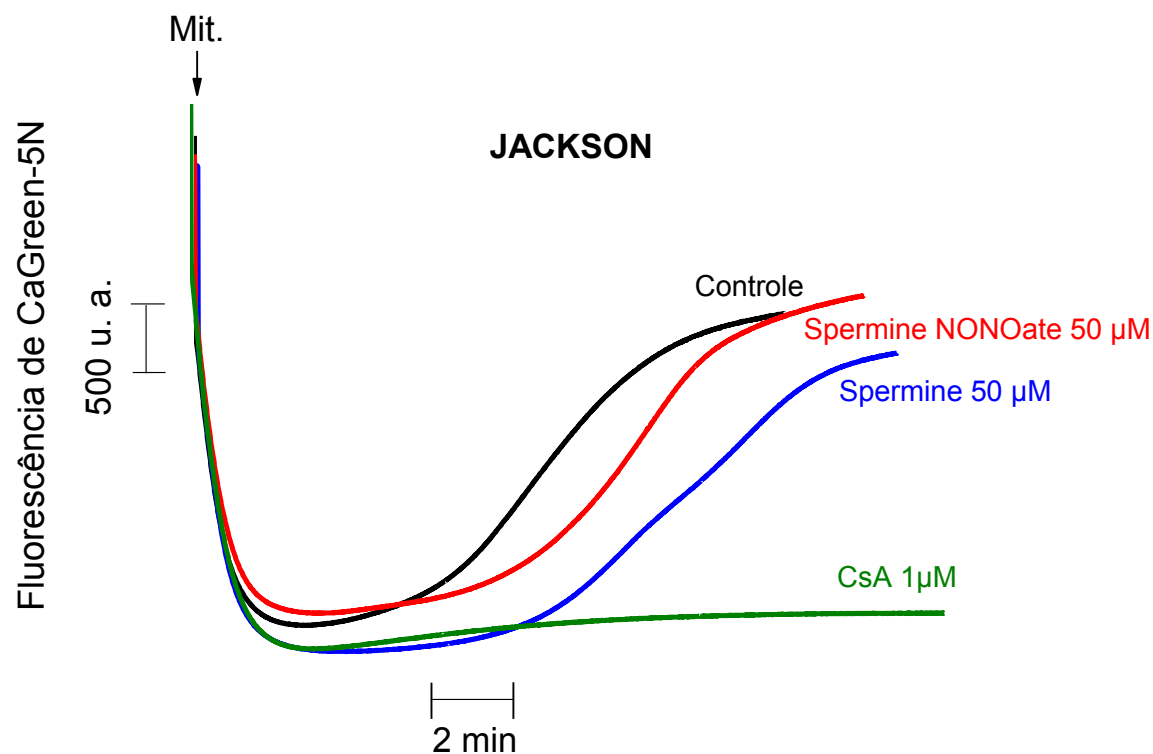


Figura 22. O doador de NO[•] spermine NONOate e a poliamina spermine aumentam a capacidade de retenção mitocondrial de Ca²⁺ em camundongos Jackson. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM, Ca²⁺ 35 µM, Calcium Green™- 5N 0,1 µM, na presença ou não de spermine NONOate 50 µM ou spermine 50 µM. Figura representativa (n=6). Mit = Mitocôndria.

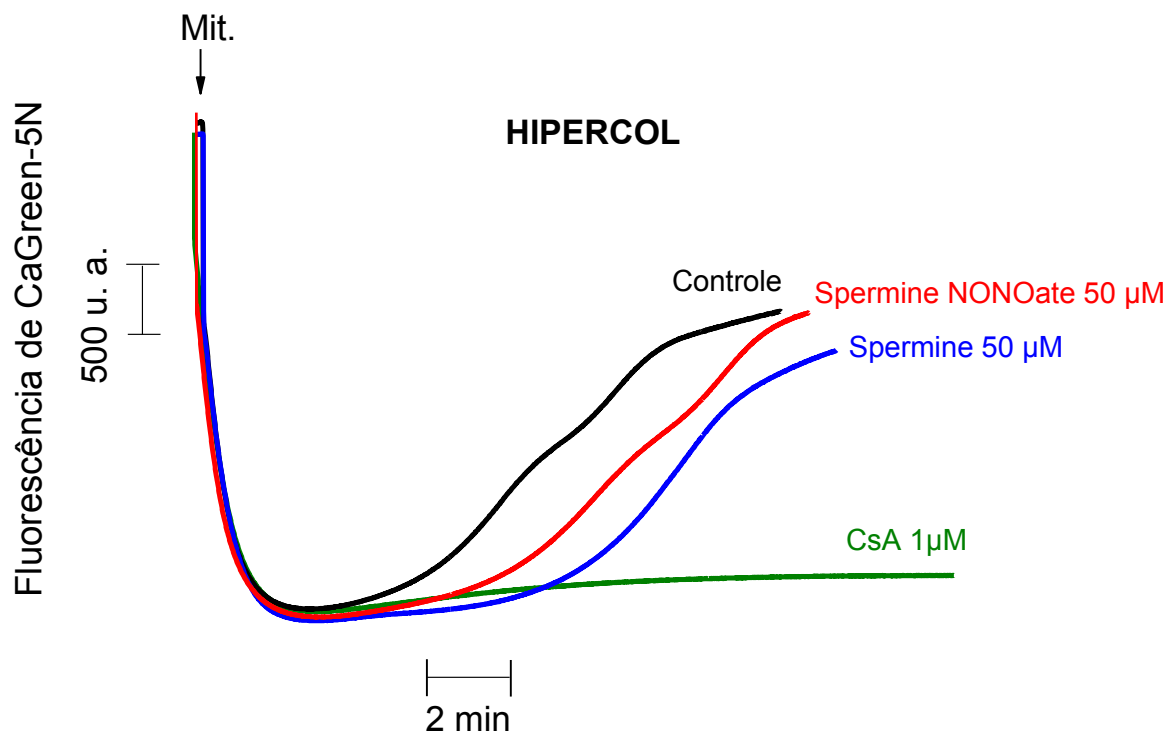


Figura 23. O doador de NO[•] spermine NONOate e a poliamina spermine aumentam a capacidade de retenção mitocondrial de Ca²⁺ em camundongos Hipercol. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM, Ca²⁺ 35 µM, Calcium GreenTM- 5N 0,1 µM, na presença ou não de spermine NONOate 50 µM ou spermine 50 µM. Figura representativa (n=6). Mit = Mitocôndria.

4.7. Efeito de spermine NONOate, spermine e cPTIO sobre a transição de permeabilidade mitocondrial: inchamento mitocondrial

Nestes experimentos observamos a diminuição da absorbância em decorrência do inchamento mitocondrial, e podemos certificar que este processo é devido à abertura do PTP por ser sensível a CsA.

A **Figura 24** mostra que em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, a spermine 50 μ M protege contra o inchamento mitocondrial reduzindo em cerca de 30% a susceptibilidade à TPM quando comparado ao controle, enquanto o spermine NONOate 50 μ M confere uma proteção de apenas 16%, utilizando o tempo de 16 minutos para esta medição.

Utilizando mitocôndrias dos camundongos Jackson, observamos na **Figura 25** resultados similares aos Unib, i.e., uma proteção de 36% com spermine e de 17% com o spermine NONOate no tempo de 10 minutos de experimento.

Em mitocôndrias de camundongos Hipercol, **Figura 26**, estes compostos tiveram efeitos de menor intensidade. Realizando a medição no tempo de 10 minutos, obtivemos 16% de proteção com a spermine e 9% com spermine NONOate.

Os experimentos de inchamento mitocondrial das **Figuras 24, 25 e 26**, indicam de forma complementar aos experimentos de captação/retenção de cálcio que o composto spermine na concentração de 50 μ M provoca maior proteção contra a TPM quando comparado com o spermine NONOate 50 μ M em todas as mitocôndrias dos camundongos estudados, o que indica a participação do NO[•] na abertura do PTP.

Alguns trabalhos como Brookes et AL. (2000) já utilizavam o spermine NONOate em mitocôndrias de fígado de rato e observaram que este composto gerava proteção contra o inchamento mitocondrial. No entanto, neste trabalho não foi usado a spermine como controle.

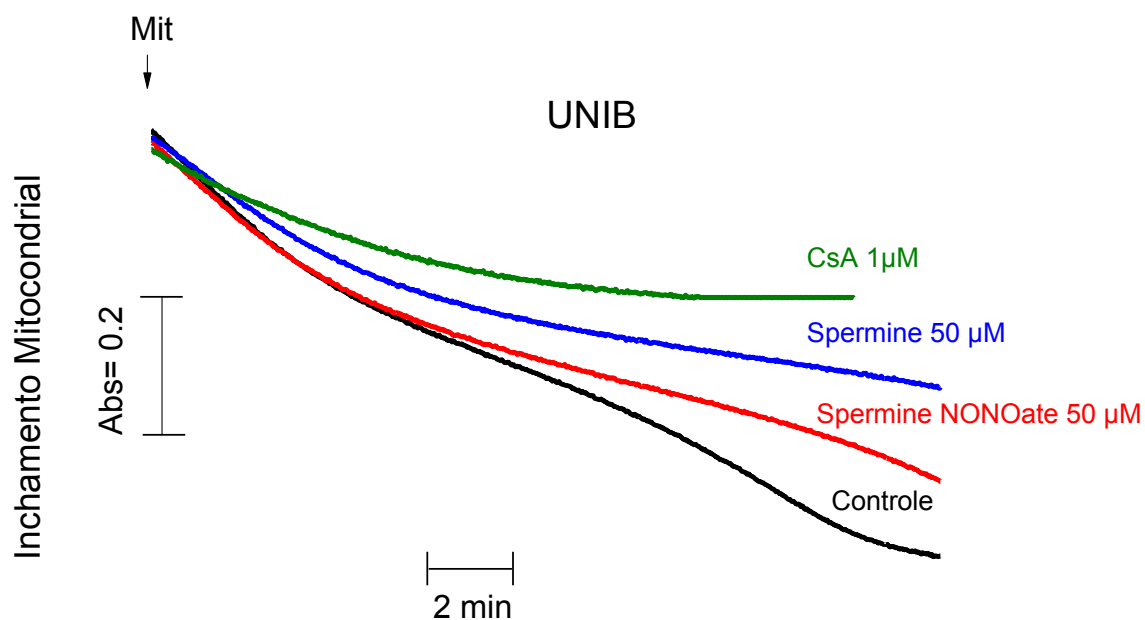


Figura 24 .O doador de NO^* spermine NONOate e a poliamina spermine diminuem a susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca^{2+} em camundongos Unib. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM e Ca^{2+} 35 μM , na presença de spermine NONOate 50 μM , spermine 50 μM ou CsA 1 μM . Figura representativa (n=3). Mit = Mitocôndria.

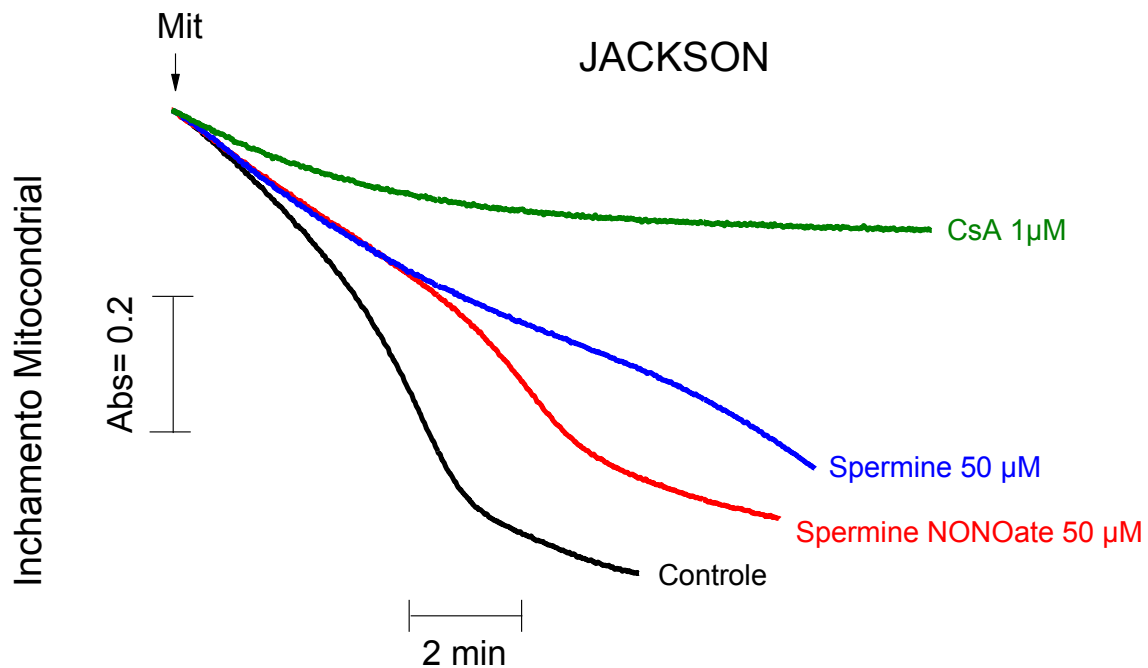


Figura 25. O doador de NO[•] spermine NONOate e a poliamina spermine diminuem a susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca²⁺ em camundongos Jackson. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM e Ca²⁺ 35 μ M, na presença de spermine NONOate 50 μ M, spermine 50 μ M ou CsA 1 μ M. Figura representativa (n=3). Mit = Mitocôndria.

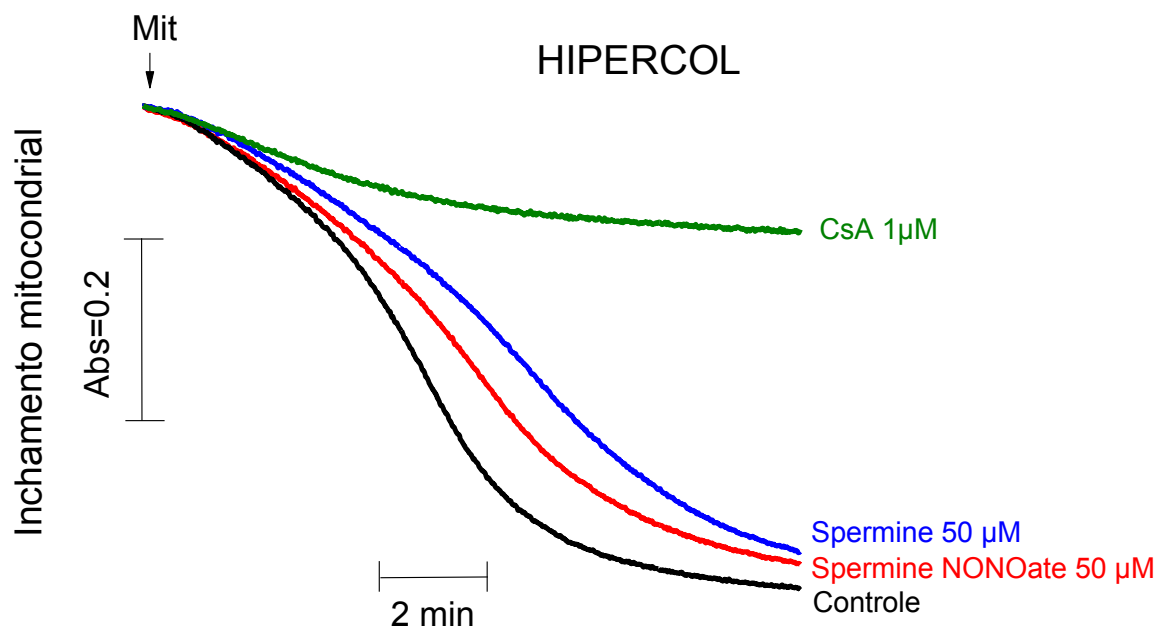


Figura 26. O doador de NO^* spermine NONOate e a poliamina spermine diminuem a susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca^{2+} em camundongos Hipercol. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM e Ca^{2+} 35 µM, na presença de spermine NONOate 50 µM, spermine 50 µM ou CsA 1 µM. Figura representativa (n=3). Mit = Mitocôndria.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem-nos concluir que:

1 - Não houve efeitos significativos de L-NAME ou cPTIO nos estados redox de NADP ou na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial em nenhum dos modelos de camundongos estudados;

2 - O doador de NO[•] spermine NONOate promoveu efeito inibitório da respiração por mecanismo dependente de dose;

3 – O composto spermine provoca maior proteção contra TPM do que spermine NONOate, indicando que NO[•] colabora para abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

4 - Tanto a hipercolesterolemia quanto a deficiência de NNT não alteram as respostas mitocondriais aos moduladores dos níveis de NO[•], conforme determinado por captação e retenção de cálcio, dissipação de potencial de membrana e inchamento mitocondriais induzidos por cálcio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akaike, T., M. Yoshida, et al. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.NO through a radical reaction. Biochemistry, v.32, n.3, p.827-32. Jan 26, 1993.

Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J, v.357, n.3, p.593-615. Aug 1, 2001.

Ballinger, S. W., C. Patterson, et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. Circulation, v.106, n.5, p.544-9. Jul 30, 2002.

Bates, T. E., A. Loesch, et al. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. Biochem Biophys Res Commun, v.213, p.896-900. 1995.

Battaglia V., Tibaldi E., et al. Effect of peroxides on spermine transport in rat brain and liver mitochondria. Amino Acids. v. 42, n. 2-3, p. 741-9, Feb, 2012.

Baughman J.M., Perochi F., et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. Nature, v.476, p. 341-345, 2011.

Berridge MJ, Bootman MD, and Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 4: p. 517–529, 2003.

Boveris A. e B. Chance. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J, Jul, v. 134, n. 3, p.707-16. 1973.

Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. J. Biol. Chem. v. 264, p.7826-30, 1989.

Brookes PS. Mitochondrial nitric oxide synthase. Mitochondrion 3: p. 187–204, 2004.

Brookes, P. S., E. P. Salinas, et al. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. J Biol Chem, v.275, n.27, p.20474-9. Jul 7, 2000.

Brown, G. C. e C. E. Cooper. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. FEBS Lett, v.356, n.2-3, p.295-8. Dec 19, 1994.

Cadenas, E; and Boveris, A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. Biochem J. v. 188, p.31-37. 1980.

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani A. OM. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. Arch Biochem Biophys; v. 180, p.248-57. 1977.

Castilho, R. F., A. J. Kowaltowski, et al. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. Free Radic Biol Med. v.18, n.3, p.479-86. Mar, 1995.

Castilho RF, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. J Bioenerg Biomembr. v. 28, n.6. p 523-9, 1996;

Cassina, A. e R. Radi. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. Arch Biochem Biophys, v.328, n.2, p.309-16. Apr 15, 1996.

Cleeter, M. W., J. M. Cooper, et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. FEBS Lett, v.345, n.1, p.50-4. May 23, 1994.

Corral-Debrinski, M., J. M. Shoffner, et al. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. Mutat Res, v.275, n.3-6, p.169- 80. Sep, 1992.

Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. Eur J Biochem.v. 178, n. 2, p. 489-501. Dec 15,1988.

Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. Biochem J. v. 255, n. 1, p. 357-60, Oct 1, 1988.

Dahm, C. C., K. Moore, et al. Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. J Biol Chem, v.281, n.15, , p.10056-65. Apr 14, 2006.

Dedkova, E. N. e L. A. Blatter. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. J Physiol, v.587, n.4, , p.851-72. Feb 15, 2009.

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. Nature, v. 19, p. 336-40, Jun, 2011.

Duvall W. L. Endothelial dysfunction and antioxidants. Mt Sinai J Med, v.72, n.2, p.71-80. 2005.

Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS, Vercesi AE. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. J. Biol. Chem. V. 265, p. 19955-60. 1990.

Ferranti R, da Silva MM, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel opening decreases reactive oxygen species generation. FEBS Lett. V. 536, p. 51-55. 2003.

Figueira, T. R., D. R. Melo, et al. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. Methods Mol Biol, v.810, p.103-17. 2012.

Frandsen, U., M. Lopez-Figueroa, et al. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun, v.227, p.88-93. 1996.

Gadelha, F. R., L. Thomson, et al. Ca^{2+} -independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. Arch Biochem Biophys, v.345, n.2, , p.243–250. Sep 15, 1997.

Gaylor, J. L. Membrane-bound enzymes of cholesterol synthesis from lanosterol. Biochem Biophys Res Commun, v.292, n.5, p.1139-46. Apr 19, 2002.

Giulivi, C. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. Novartis Found Symp, v.287, p.92-100; discussion 100-4. 2007.

Giulivi, C., J. J. Poderoso, et al. Production of nitric oxide by mitochondria. J Biol Chem, v.273, n.18, , p.11038-43, May 1, 1998.

Glancy B and Balaban RS. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. Biochemistry v. 51, p. 2959– 2973, 2012.

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, p.751-66. Feb, 1949.

Ghafourifar P and Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends Pharmacol Sci v. 26, p.190–195, 2005.

Griffith, O. W. e R. G. Kilbourn. Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. Methods Enzymol, v.268, p.375-92. 1996.

Grijalba MT, Vercesi AE, Scherer S. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. Biochemistry; v. 38, p.13279-87, 1999.

Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine, Ed Oxford. UK. 3 ed. 1999.

Halliwell B, and Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environ Health Perspect; v.10, p.5-12, 1994.

Halliwell, B, Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biology and Medicine Oxford Univ. Press. Oxford, UK, p. 188-277, 1989.

Haynes V, Elfering S, Traaseth N, and Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. J Bioenerg Biomembr v. 36, p.341–346, 2004.

Hidalgo C and Donoso P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. Antioxid Redox Signal v.10, p. 1275–1312, 2008.

Hunter, D. R. e R. A. Haworth. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. Arch Biochem Biophys, v.195, n.2, , p.453-9. Jul, 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, p.5069-77. Aug 25, 1976.

Ignarro, L. J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. Biosci Rep, v.19, n.2, p.51-71. Apr, 1999.

Janssen, Y. M., R. Soultanakis, *et al.* Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations, apoptosis, and oxidative stress in pulmonary cells. Am J Physiol, v.275, n.6 Pt 1, p.L1100-9. Dec, 1998.

Kaplan, R. S. e P. L. Pedersen. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. Biochem J, v.212, n.2, , p.279-88. May 15, 1983.

Klingenberg M. Uncoupling proteins--how do they work and how are they regulated. IUBMB Life v. 52, p.175-79, 2001.

Kobzik, L., B. Stringer, et al. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. Biochem Biophys Res Commun, v.211, p.375-381. 1995.

Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. V. 26, p. 463-71, 1999.

Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, et al. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett, v.495, n.1-2, , p.12-5. Apr 20, 2001.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Grijalba MT, Bechara EJ, Vercesi AE.. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. JBC, v. 271, p.2929-34, 1996.

Lapidus RG, Sokolove PM. Inhibition by spermine of the inner membrane permeability transition of isolated rat heart mitochondria. FEBS Lett. V. 313, n. 3, p. 314-8, Nov 30, 1992.

Lapidus RG, Sokolove PM. Spermine inhibition of the permeability transition of isolated rat liver mitochondria: an investigation of mechanism. Arch Biochem Biophys. V.306, n. 1, p. 246-53, Oct, 1993.

Lapidus RG, Sokolove PM. The mitochondrial permeability transition. Interactions of spermine, ADP, and inorganic phosphate. J Biol Chem. v. 269, n. 29, p. 18931-6, Jul 22, 1994.

Lehninger AL. The mitochondrion: molecular basis of structure and function. WA Benjamin, Inc. 1964; New York ,USA.

Lehninger AL, Vercesi AE, Bababumni EA. Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. V. 75, p.1690-94, 1978.

Lehninger, Nelson D.L. e Cox M.M., Princípios de Bioquímica, 4. Ed, Artmed, 2004.

Leite, Ana Catarina R. ; Oliveira, Helena C.F. , et al. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics, v. 1797, p. 1210-1216, 2010.

Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, and Nieminen AL. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim Biophys Acta v.1787, p. 1395–1401, 2009.

Liu SS. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Biosc. Rep, v.17, p. 259-72, 1997.

Lundberg JO and Weitzberg E. NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. Arch Pharm Res v. 32, p.1119–1126, 2009.

Mallilankaraman K, Doonan P, Ca'rdenas C, Chandramoorthy HC, Mullher M, Millher R, Hoffman NE, Gandhirajan RK, Molgo' J, TBiernbaum MJ, Rothberg BS, Mak D-OD, Foscett JK, and Madesh M. MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cell survival. Cell, v.151, p.14, 2012.

Mannella C.A., Pfeiffer D.R., et al. Topology of the Mitochondrial Inner Membrane: Dynamics and Bioenergetic Implications. IUBMB Life, v.52, p. 93-100, 2001

Mayer, B. e E. R. Werner. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.351, n.5, May, p.453-63. 1995.

Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, v.191, , p.144-8. Jul 8, 1961.

Moncada S, Bolaños J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J. Neurochem, v.97, n.6, , p.1676-89. Jun, 2006.

Murphy A.N., Bredesen D.E. , Cortopassi G., Wang E., Fiskum G. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A; v. 93, n. 18, p. 9893-8, Sep 3, 1996.

Navarro, A. e A. Boveris. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. Adv Drug Deliv Rev, v.60, p. 1534-1544. 2008.

Netto LE, Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. Methods Enzymol. V. 348, p. 260-70, 2002.

Nicholls D.G., Akerman K.E.O. Mitochondrial calcium transport. Biochim Biophys Acta; v. 683, p.57-88. 1982.

Nicholls, D. G. e S. J. Ferguson. Bioenergetics 3. Academic Press. An Elsevier Science Imprint. London, UK. 2002.

Nisoli E., et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. Science, v. 299, p. 896–899, 2003.

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, , p.278-80. Feb, 2005.

Paim, B. A., Velho J. A., et al. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. Free Radic Biol Med, v.44, n.3, p.444-51 Feb 1, 2008.

Phillips JE, Chaffee RR. Restorative effects of spermine on oxidative phosphorylation and respiration in heat-aged mitochondria. Biochem Biophys Res Commun. V. 108, n. 1, p. 174-81, Sep 16, 1982.

Prime TA, Blaikie FH, et al. A mitochondria-targeted S-nitrosothiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemiareperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A, v.106, p.10764–10769, 2009.

Pou, S., W. S. Pou, et al. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. J Biol Chem, v.267, n.34, p.24173-6. Dec 5, 1992.

Quijano, C. C., A., Castro, L., Rodrigues, M., and Radi, R. Peroxynitrite: a mediator of nitric- oxide- dependent mitochondrial dysfunction in pathology. Nitric Oxide, cell signaling and gene expression. p.100-142. 2006.

Radi, R., Cassina A., Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. Biol Chem. v. 383, n. 3-4, p 401-9, Mar-Apr. 2002.

Radi, R., M. Rodriguez, et al. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. Arch Biochem Biophys, v.308, n.1, p.89-95. Jan, 1994.

Ramachandran, A., E. Ceaser, et al. Chronic exposure to nitric oxide alters the free iron pool in endothelial cells: role of mitochondrial respiratory complexes and heat shock proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.1, , p.384-9. Jan 6, 2004.

Reinhart PH, Taylor WM, and Bygrave FL. A procedure for the rapid preparation of mitochondria from rat liver. Biochem J 204: 731–735, 1982.

Rivera-Tirado E, López-Casillas M, Wesdemiotis C. Characterization of diazeniumdiolate nitric oxide donors (NONOates) by electrospray ionization mass

spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. V. 25, n. 23, p. 3581-6, Dec 15, 2011.

Robinson, J., Cooper, J.M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. Anal Biochemistry. V. 33, p. 390-399, 1970.

Rodrigues, F. P., C. R. Pestana, et al. Release of NO from a nitrosyl ruthenium complex through oxidation of mitochondrial NADH and effects on mitochondria. Nitric Oxide, v.26, n.3, , p.174-81. Mar 31, 2012.

Ronchi J., Figueira TR, et al, A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. Free radic Biol Med. V.63, p. 446-56, Oct, 2013

Rossi C.S., Lehninger A.L., et al. Proton movements across the mitochondrial membrane supported by hydrolysis of adenosine triphosphate. Eur. J. Biochem. V. 3, p. 332-40, Oct;2, 1967

Rydström J. Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. Biochim. Biophys. Acta p. 1757:721–726;2006.

Samartsev VN, Mokhova EN. ATP/ADP antiporter- and aspartate/glutamate antiporter-mediated fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria in incubation media differing in ion composition. Biochem. Mol. Biol. Int. v. 42, p. 29-34, 1997.

Sarti, P., A. Giuffre, et al. Nitric oxide and cytochrome c oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation. Biochem Biophys Res Commun, v.274, n.1, p.183-7. Jul 21, 2000.

Sava IG, Battaglia V, et al. Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria. Free Radic Biol Med. V. 41, n. 8, p. 1272-81, Oct 15, 2006.

Schmidt, K., E. R. Werner, et al. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. Biochem J, v.281 (Pt 2), p.297-300. Jan 15, 1992.

Schneider, W.C. E Hogeboom, G.H.. Intracellular distribution of enzymes. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. J Biol Chem, v. 183, p.123-128, 1950.

Schulman, I. H., M. S. Zhou, et al. Nitric oxide, angiotensin II, and reactive oxygen species in hypertension and atherogenesis. Curr Hypertens Rep, v.7, n.1, p.61-7. 2005.

Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: H. Sies, Editor, Oxidative Stress, Academic Press, San Diego, New York, London, 1–8, 1985.

Sies H., Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, v. 311, n.1152, p.617-31. Dec 17, 1985.

Skulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. FEBS Lett. V.294, p.158-62, 1991.

Skulachev, V. P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. FEBS Lett. v.423, n.3, p.275-80. Feb 27,1998.

Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase.FEBS Lett.; v. 438, n.3, p.161-4, Nov 6, 1998.

Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. Free Radic. Biol. Med. V. 6, p. 53-60, 1989.

Tassani V, Biban C, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition by polyamines and magnesium: importance of the number and distribution of electric charges. Biochem Biophys Res Commun. V. 207, n. 2, p. 661-7, Feb 15, 1995.

Tassani V, Campagnolo M, et al. The contribution of endogenous polyamines to the permeability transition of rat liver mitochondria. Biochem Biophys Res Commun. V. 226, n. 3, p. 850-4, Sep 24, 1996.

Tiefenbacher, C. P. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.280, n.6, Jun, p.H2484-8. 2001.

Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes A, Quartermann J, Freeman HC, Ashcroft FM, Cox RD. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6Jmice. Diabetologia. V. 48, n.4, p. 675-86, Apr, 2005.

Turrens JF, and Boveris A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem. J. v.191, p.421-27, 1980.

Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci. Rep. v. 17, p. 3-8, 1997.

Valez V., Cassina A., et al. Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins. Arch Biochem Biophys. V. 529, n.1, p. 45-57, Jan 1, 2013.

Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 95, n. 16, p. 9220-5, Aug 4, 1998.

Vercesi A., The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics v. 252, n.1, p.171-178, 1987.

Vercesi A.E, Ferraz VL, Macedo DV, Fiskum G. Ca^{2+} -dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. Biochem Biophys Res Commun.v. 154, n. 3, p. 934-41. Aug 15, 1988.

Vercesi, A. E. Mitochondrial Ca^{2+} transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. Front Biosci, v.11, p.2554-64. 2006.

Villanueva C and Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. Free Radic Biol Med v. 49, p.307–316, 2010.

Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N, Takahashi SY. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. Eur. J. Biochem. V. 249, p 52-60, 1997.

West M. B., Rokosh G., et al. Cardiac Myocyte Specific Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury by Preventing Mitochondrial Permeability Transition. Circulation. V. 118, n. 19, p. 1970-8, Nov 4, 2008.

Wever, R. M., T. F. Luscher, et al. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. Circulation, v.97, n.1, , p.108-12. Jan 6-13, 1998.

Whiteman, M., Y. L. Chua, et al. Nitric oxide protects against mitochondrial permeabilization induced by glutathione depletion: role of S-nitrosylation? Biochem Biophys Res Commun, v.339, n.1, , p.255-62. Jan 6, 2006.

Xia, Y., A. L. Tsai, et al. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. J Biol Chem, v.273, n.40, , p.25804-8. Oct 2, 1998.

7. ANEXO



CEUA/Unicamp

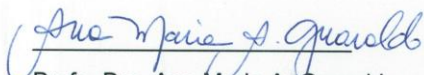
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

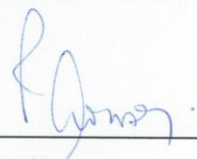
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Óxido Nítrico e transição de permeabilidade mitocondrial em camundongos hipercolesterolêmicos: possível papel da NADP-transidrogenase" (protocolo nº 2556-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi / Audrey de Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 08 de novembro de 2011.

Campinas, 08 de novembro de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva