JULIANA APARECIDA RONCHI

TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

EM MITOPLASTOS DE FÍGADO DE RATO

Campinas – SP

2010

JULIANA APARECIDA RONCHI

TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL EM MITOPLASTOS DE FÍGADO DE RATO

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica, da Universidade Estadual de Campinas, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento, para obtenção do título de mestre em Fisiopatologia Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANIBAL EUGENIO VERCESI **CO-ORIENTADOR:** PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO

Campinas - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

 Bibliotecário: Rosana Evangelista Poderoso CRB-8ª / 6652

 R667t
 Ronchi, Juliana Aparecida Transição de permeabilidade mitocondrial em mitoplastos de fígado de rato / Juliana Aparecida Ronchi. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

 Orientadores : Aníbal Eugênio Vercesi; Roger Frigério Castilho Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Cálcio. 2. Mitocôndria. 3. Morte celular. I. Vercesi, Aníbal Eugênio. II. Castilho, Roger Frigério. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Mitochondrial permeability transition in rat liver mitoplasts

Keywords: • Calcium

- Mitochondria
- Cell death

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica Área de Concentração: Biologia Estrutural,Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. Anibal Eugenio Vercesi Prof^a. Dr^a. Eliana Cotta de Faria Prof^o. Dr^o. José Roberto Meyer Fernandes

Data da defesa: 17-12-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Juliana Aparecida Ronchi

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Anibal Eugênio Vercesi

Membros:
Prof(a). Dr(a). Anibal Eugênio Vercesi - Muni
Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria -
Prof(a). Dr(a). José Roberto Meyer Fernandes -

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/12/2010

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 Dr. Anibal Eugenio Vercesi e co-orientação do professor Dr. Roger Frigério Castilho, na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo de Apoio ao Ensino à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX, UNICAMP) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Obesidade e Diabetes.

"A não-violência leva-nos aos mais altos conceitos de ética, o objetivo de toda evolução. Até pararmos de prejudicar todos os outros seres do planeta, nós continuaremos selvagens."

Thomas Edison

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Anibal E. Vercesi, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela experiência adquirida, pelo carinho com que fui tratada e por sua orientação;

Ao professor Dr. Roger Castilho, por sua co-orientação, pela disponibilidade e pelas sugestões;

À professora Helena pelo carinho e atenção;

Meu agradecimento especial aos colegas do Laboratório de Bioenergética que tanto me ajudaram durante o desenvolvimento deste trabalho e tornaram esse período inesquecível, dentre eles: Márcia, Dani, Franco, Rutinha, Di, Elisangela, Carlão, Betão, Guilherme, Carina, Karina, Paolo e Felipe;

Meu respeito e imensa gratidão aos animais que permitiram a realização deste trabalho;

Meu agradecimento àqueles que me apoiaram e me fizeram acreditar que era possível: Eca, Dri, Tia Dé, Angela, Tony, Valdir, Bianca, Sandra, Tia Bete, Ana Karim, Lúcia (mãe), Josi, Thiago (Kreb), Natália, Mariana, Jú Rezende e Tiago... Vocês não imaginam como fizeram a diferença e quanto significam para mim;

Agradeço principalmente a Deus, fonte de luz, que escutou minhas preces e me iluminou em todos os momentos, dando-me força para continuar nos momentos difíceis.

SUMÁRIO

/	
DAC	
PAG	۲.

RESUMO	. xiii
ABSTRACT	. XV
1- INTRODUÇÃO	. 17
Mitocôndrias – Histórico	. 18
Morfologia e Características Básicas	. 20
Cadeia de Transporte de Elétrons	. 21
Produção de EROS e Defesas Antioxidantes Mitocondriais	. 24
Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)	. 25
Mitocôndrias e Morte Celular	. 32
2- OBJETIVOS	. 35
3- MATERIAIS E MÉTODOS	. 37
Reagentes	. 38
Animais	. 38
Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato	. 38
Isolamento de mitocôndrias de rim de rato	. 39
Preparo dos mitoplastos de fígado e rim de rato	. 39
Dosagem de proteína	. 40

Condições experimentais	41
Consumo de oxigênio mitocondrial	41
Medida de inchamento mitocondrial	42
Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e Western blot	43
Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial	45
Detecção da enzima monoamino oxidase (MAO) em mitocôndrias e mitoplastos	
de fígado de rato	45
Atividade da enzima citrato sintase em mitocôndrias e mitoplastos de fígado	
de rato	46
Análise da atividade da enzima hexoquinase em mitocôndrias e mitoplastos	
de rim de rato	46
Análise estatística	47
4-RESULTADOS	48
PARTE 1: Caracterização e padronização do isolamento de mitoplastos	49
PARTE 2: Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) em mitoplastos	
de fígado de rato	57
PARTE 3: Estudo do envolvimento da enzima hexoquinase na TPM	61
5- DISCUSSÃO	64
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
7- ANEXO	87

ABREVIATURAS

- Abs absorbância
- Alam. alameticina
- ANT transportador de nucleotídeos de adenina
- ADP adenosina difosfato
- ATP adenosina trifosfato
- Benz benzilamina
- BSA albumina soro bovina
- CR controle respiratório
- CsA ciclosporina A
- CTE cadeia de transporte de elétrons
- CyD ciclofilina-D
- Cit-c citocromo c
- DTT ditiotreitol
- EGTA etileno glico bis(β-aminoetil éter)-N,N,N´,N´-ácido tetraacético
- EROs espécies reativas de oxigênio
- FADH₂ flavina adenina dinucleotídeo reduzido
- FCCP carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone
- G6PDH glicose -6-fosfato desidrogenase
- H₂O₂ peróxido de hidrogênio
- HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
- kDa quilodaltons
- MAO monoamino oxidase

MFR -	mitocôndria de fígado de rato
MME -	membrana mitocondrial externa
MMI -	membrana mitocondrial interna
MRR -	mitocôndria de rim de rato
MnSOD -	superóxido dismutase dependente de manganês
Mtpl -	mitoplastos
NADH -	nicotinamida adenina dinuclotídeo (estado reduzido)
NADPH -	nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado reduzido)
NAD ⁺ -	nicotinamida adenina dinuclotídeo (estado oxidado)
NADP ⁺ -	nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado oxidado)
Oligo -	oligomicina
P _i -	fosfato inorgânico
SDS –	dodecil sulfato de sódio
SDS- Page -	eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
t-butil -	tert butil hidroperóxido
TPM -	transição de permeabilidade mitocondrial
U.A	unidades arbitrárias
UQ -	ubiquinona (forma oxidada da coenzima Q)
UQH [•] -	radical ânion semiquinona
UQH ₂ -	ubiquinona (forma reduzida da coenzima Q)
VDAC -	canal aniônico voltagem dependente
ΔΨ -	potencial elétrico de membrana

xi

LISTA DE FIGURAS

PÁG.
Figura 1: Cadeia Transportadora de elétrons
Figura 2: Modelo proposto para explicar a formação do poro de TPM31
Figura 3: Esquema de controle respiratório
Figura 4: Determinação da atividade de monoamino oxidase (MAO) em MFR e Mtpl de
fígado de rato
Figura 5: Determinação da atividade de citrato sintase
Figura 6: Detecção das isoformas 1, 2 e 3 de VDAC em MFR e Mtpl por Western blot53
Figura 7: Controle respiratório e perda de citocromo c em MFR e Mtpl55
Figura 8: Monitoramento do potencial de membrana das organelas
Figura 9: Inchamento de organelas induzido por Ca ²⁺
Figura 10: Efeito de t-butil, EGTA, ADP + MgCl ₂ , CsA ou catalase sobre o inchamento
induzido por Ca ²⁺
Figura 11: Efeito de CsA, DTT e EGTA na queda do potencial de membrana de MRR e
Mtpl induzidos por t-butil e Ca ²⁺ 60
Figura 12: Detecção de VDAC (isoforma 3) em MRR e Mtpl por Western blot61
Figura 13: Determinação da atividade da enzima hexoquinase em MRR e Mtpl
Figura 14: Inchamento induzido por Ca ²⁺ em MRR e Mtpl63

RESUMO

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é caracterizada pela abertura de um poro protéico não seletivo na membrana mitocondrial interna, o qual é induzido por Ca²⁺ e sensível à ciclosporina A. Trabalhos anteriores do nosso laboratório demonstram que o poro de transição de permeabilidade ocorre devido a ligações entre tióis (S-S) de proteínas, ocasionando a agregação de proteínas de membrana interna. Contrariamente, dados da literatura propõem a participação de proteínas da membrana mitocondrial externa na composição do poro, como o canal aniônico voltagem dependente (VDAC), hexoquinase e receptor benzodiazepínico. Para verificar a participação de proteínas da membrana externa no poro TPM, realizamos experimentos utilizando mitocôndrias desprovidas de membrana externa (mitoplastos). Mitoplastos de fígado e rim de rato foram obtidos através do tratamento de mitocôndrias com o detergente digitonina (seletivo para colesterol) para eliminar a membrana externa. Esses mitoplastos de fígado apresentaram menos que 5% e 10% dos marcadores de membrana externa monoamino oxidase e VDAC, respectivamente. Os mitoplastos de rim apresentaram depleção parcial de hexoquinase (73%). Os mitoplastos tiveram redução de 70% na velocidade de fosforilação do ADP, o que foi parcialmente recuperado pela adição de citocromo c exógeno. Estes mitoplastos foram capazes de gerar e sustentar potencial elétrico de membrana suficiente para fosforilar ADP. Como previsto, os mitoplastos sofreram TPM induzido por Ca²⁺ de modo semelhante às mitocôndrias. Os mitoplastos foram sensíveis a conhecidos indutores de TPM como Ca²⁺ e tert-butil hidroperóxido ou inibidores como ciclosporina A, quelantes de Ca²⁺, ADP, redutor ditiol e ainda catalase. Conjuntamente, nossos resultados indicam que a membrana mitocondrial externa não é necessária para a formação/abertura do poro de TPM.

ABSTRACT

Mitochondrial permeability transition (MPT) is a Ca^{2+} -induced opening of a nonselective proteinaceous membrane pore sensitive to cyclosporin A in the inner membrane. Data from our laboratory provided evidence that MPT is assembled by the aggregation of inner membrane proteins due to the formation of thiol cross-linking. Alternatively, literature data propose the participation of a number of other outer membrane proteins in the composition of the MPT pore, such as, voltage-dependent anion channel (VDAC), hexokinase and the benzodiazepine receptor. In order to ascertain the independence of outer membrane proteins to generate the MPT we performed experiments with mitochondria devoid of outer membrane (mitoplasts). Liver and kidney mitoplasts were obtained by use of cholesterol-specific detergent digitonin to eliminate the outer membrane. Compared with the mitochondria, liver mitoplasts retained less than 5% and 10% of the markers of the outer membrane monoamine oxidase and VDAC, respectively. Kidney mitoplasts also showed a partial depletion of hexokinase (~73%). Mitoplasts presented with a 70% lower oxygen consumption rate during ADP phosphorylation , which was partially reverted by the addition of exogenous cytochrome c. Mitoplasts were able to generate and sustain a membrane potential high enough to phosphorylate ADP. As hypothesized, these mitoplasts undergo Ca²⁺ induced MTP with similar properties as compared to intact mitochondria. Mitoplast MPT was sensitive to known permeability transition inducers such as Ca^{2+} and tert-butyl hydroperoxide and to inhibitors such as cyclosporin A, Ca²⁺ chelators, ADP, dithiol reductant and catalase. Altogether, the data indicate that the outer membrane is not necessary for MPT assembling or opening.

1- INTRODUÇÃO

Mitocôndrias – Histórico

As mitocôndrias, além do fornecimento de energia para as células, apresentam uma série de outras funções incluindo o controle da morte celular. As mitocôndrias foram descritas pela primeira vez em 1857 por Rudolph Albert Von Köllinker, como compartimentos citoplasmáticos granulares presentes em músculo, denominados sarcossomos de Köllinker. Mais tarde, vários estudos com denominações diferentes para a mesma organela foram publicados, entre os quais em 1898 Benda referiu-se a esta organela como "mitochondrion", do grego mito (filamento) e chondron (grão), que foi considerado o termo que melhor refletia a característica morfológica mais comum dessa organela e foi o mais aceito para descrevê-la do final de 1930 em diante (revisado em Liesa et al., 2009). No início do século XX, com os avanços na microscopia, aconteceram as primeiras observações confiáveis da dinâmica mitocondrial, como os eventos de fusão e fissão em células vivas de galinha (Lewis & Lewis, 1914). Somente em 1948, Hogeboom, Schneider e Palade conseguiram isolar mitocôndrias intactas de fígado de rato através de centrifugação diferencial (Lehninger, 1964). Um ano mais tarde, os bioquímicos Eugene Kennedy e Albert Lehninger demonstraram que a mitocôndria é a responsável pela síntese do ATP associada à oxidação de coenzimas (NADH + H⁺ e FADH₂). Em 1950, Palade e Sjöstrand publicaram imagens em microscopia de alta resolução de mitocôndrias nas quais era possível observar suas características ultraestruturais. O conceito de organela independente foi reafirmado em 1960 com a descoberta do DNA mitocondrial que posteriormente seria um dos indícios que reforçariam a hipótese da origem endossimbiótica das mitocôndrias, como proposto por Altmann em 1890.

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, baseado 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).

No início da década de 70, foram feitos estudos que mostraram geração de H_2O_2 por suspensões mitocondriais, mais precisamente pela cadeia transportadora de elétrons. Nestes estudos também foi visto que o aumento do estado oxidado dos carreadores de elétrons diminui a formação de H_2O_2 (Boveris et al., 1972; Loschen et al., 1973). Atualmente considera-se a mitocôndria como a principal fonte celular de radicais livres.

Em 1996, Liu et al. obtiveram evidências do envolvimento da mitocôndria na morte celular por apoptose. Foi observada a liberação de citocromo c para o citosol em células em apoptose; e quando o citocromo c foi depletado observou-se diminuição da atividade apoptótica. Em 1997, dois estudos mostraram que a superexpressão de Bcl-2 (proteína presente na membrana mitocondrial externa) previne a morte de células expostas a estímulos pró-apoptóticos em um mecanismo envolvendo a prevenção do efluxo de citocromo c da mitocôndria para o citosol (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997).

Morfologia e Características Básicas

As mitocôndrias, presentes em quase todas as células eucariontes, ocupam um volume intracelular importante, podendo variar de tamanho (apresentam diâmetro médio de 1 μ m), formato, quantidade e localização, dependendo do tipo e função celular (Nelson e Cox, 2000).

Essas organelas apresentam duas membranas: a externa e a interna. A membrana mitocondrial interna é rica em proteínas e apresenta invaginações que formam as cristas mitocondriais, o espaço delimitado por essa membrana é chamado matriz mitocondrial. A membrana mitocondrial externa contém poucas proteínas e contém colesterol. O compartimento formado entre essas duas membranas é denominado espaço intermembranas.

A proteína integral mais abundante presente na membrana mitocondrial externa é chamada de porina ou canal aniônico voltagem dependente (VDAC - voltage dependent anion channel). O VDAC tem diâmetro entre 2,5 e 3 nm, e é através dele que ocorrem as trocas de nucleotídeos de adenina, água, íons e substratos entre o citosol e o espaço intermembranas (De Pinto et al, 2008). Porém, é importante lembrar que não há gradiente elétrico através da membrana mitocondrial externa, a característica "voltagem-dependente" do VDAC é observada apenas em condições experimentais (Nicholls e Ferguson, 2002). Na face interna da membrana externa, encontra-se adjacente ao VDAC a isoforma mitocondrial da hexoquinase (hexoquinase tipo I). Essa enzima é responsável pela fosforilação da glicose, primeiro passo da via glicolítica. Outras proteínas da membrana interna também se localizam proximamente ao VDAC, como o transportador de nucleotídeos de adenina (ANT) e o carreador de fosfato. Esse tipo de organização espacial entre essas proteínas

facilita o transporte de moléculas entre a matriz mitocondrial e o citosol (Vyssokikh et al., 2003).

A membrana mitocondrial interna é altamente seletiva, sendo permeável a poucas moléculas, por exemplo: O_2 , CO_2 , NO^{\cdot} e H_2O . É nesta membrana que se encontram os complexos enzimáticos da cadeia respiratória e também transportadores específicos para várias moléculas como o ATP, ADP, piruvato, Ca^{2+} e fosfatos (Nicholls e Ferguson, 2002). A membrana mitocondrial interna é constituída por cerca de 75% de proteínas; dentre os lipídios presentes o colesterol está em quantidade muito baixa e a cardiolipina representa cerca de 20% do conteúdo total de fosfolipídeos (Schlame et al., 2000). Delimitado pela membrana interna está a matriz mitocondrial, cujo volume pode variar dependendo do estado funcional da mitocôndria, tais variações são acompanhadas de alterações no volume do espaço intermembranas (Packer, 1963; Mannella et al., 2006). A matriz contém uma quantidade grande de proteínas solúveis e de substratos/metabólitos intermediários do metabolismo de nutrientes. É neste compartimento que acontece processos metabólicos vastamente conhecidos como a β -oxidação (degradação dos ácidos graxos) e reações do ciclo de Krebs (degradação do acetil-coA e redução das coenzimas NAD e FAD), (Nelson e Cox, 2000).

Cadeia Transportadora de Elétrons

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz continuamente o O_2 a H_2O . Essa energia é utilizada pela ATP sintase para fosforilar o ADP a ATP (Mitchell, 1961).

Os elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH₂, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos ao complexo I (NADH desidrogenase) e complexo II, respectivamente. O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH₂). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Em alguns tecidos, a coenzima Q pode também ser reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxirredutase (como resultado da β -oxidação de ácidos graxos). A UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH[•]), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos separados de UQH[•], um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH[•] são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo c. O citocromo c transfere elétrons para a citocromo c oxidase (complexo IV figura 1). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular (O₂), resultando na geração de água.

De acordo com Mitchell (1961), concomitantemente ao transporte de elétrons na cadeia respiratória há o bombeamento de H⁺ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Este bombeamento de prótons cria um potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna de aproximadamente -220 mV (força próton-motora). Esta força próton motora é constituída por dois componentes: elétrico ($\Delta \psi$), que atinge valores de aproximadamente -180 mV no estado de repouso; enquanto o componente químico (ΔpH) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH e corresponde ao restante da força próton-motora (-40 mV). A força próton-motora direciona o fluxo de H⁺ ao interior da mitocôndria através da

 F_0F_1 -ATP sintase (ver figura 1). Isso alimenta termodinamicamente a F_0F_1 ATP sintase para que ela fosforile o ADP a ATP. Este potencial elétrico-químico é, então, a ligação energética entre oxidação de substratos e a fosforilação do ADP.

O gradiente elétrico-químico também pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem a participação de ATP. Alguns exemplos são os processos de transporte de moléculas ionizadas, como as trocas eletroforéticas de ATP⁴⁻ por ADP³⁻, a redução de NADP⁺ pela transidrogenase específica e a captação de Ca²⁺.



Figura 1: Cadeia respiratória mitocondrial e teoria quimiosmótica (adaptado de Nelson e Cox, 2000). Os números romanos indicam os quatro complexos respiratórios. Os elétrons do NADH + H⁺ e de outros substratos oxídáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico (Δ pH) quanto elétrico ($\Delta\Psi$). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem reentrar na matriz através de canais específicos.

Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Defesas Antioxidantes Mitocondriais

A cadeia de transporte de elétrons, que reduz continuamente oxigênio para formar o potencial eletroquímico transmembrana de prótons necessário para a síntese de ATP, tem uma relevante consequência para as células: a constante produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Levando em consideração a complexidade do processo de transferência de elétrons através da cadeia respiratória, é surpreendente que menos de 2% dos elétrons que entram na cadeia respiratória não sejam usados para reduzir O_2 à H_2O . A maioria destes elétrons "perdidos" se combina com o oxigênio em passos intermediários da cadeia respiratória, promovendo a redução monoeletrônica do oxigênio, gerando assim o radical ânion superóxido (O_2^{\bullet}) (Boveris e Chance, 1973; Liu, 1997; Turrens, 1997). O O_2^{\bullet} pode ser gerado principalmente pelos complexos I e III da cadeia respiratória (Kowaltowski et al., 2009).

As EROs geradas pelas mitocôndrias podem participar de muitos processos fisiológicos como sinalizadores ou agentes tóxicos em processos de doenças, envelhecimento e morte celular (Zamzami et al., 1997; Green e Reed, 1998; Lemasters et al., 1998; Kowaltowski e Vercesi, 1999).

A produção de EROs mitocondrial é um processo contínuo e fisiológico e essas organelas possuem um eficiente sistema enzimático antioxidante que inclui superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), catalase, peroxirredoxina e glutationa peroxidases (com suas respectivas redutases dependentes de NADPH), além da presença de antioxidantes não enzimáticos como vitaminas C e E (Sutton e Winterbourn, 1989; Watabe et al., 1997, Netto et al., 2002).

Nas mitocôndrias também ocorre a geração de espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico, que é relativamente estável, atravessa membranas e está envolvido em vários processos fisiológicos como neurotransmissão, resposta imune, vasodilatação e ciclo celular (Moncada, 2006; Leite et al., 2010).

Em caso de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e os sistemas antioxidantes, essas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas na mitocôndria podem oxidar macromoléculas tanto na própria organela quanto em outros sítios intracelulares. Proteínas, principalmente da membrana mitocondrial interna, são alvos primários de danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Esses danos, em grande parte envolvem a formação de grupos carbonila e a oxidação de grupos tióis, que podem levar à permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (Kowaltowski et al., 2001).

Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)

Situações de estresse oxidativo associadas a altas concentrações de Ca²⁺ na matriz mitocondrial podem gerar a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), caracterizada por permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que se torna permeável à água, íons e outras moléculas com peso molecular até 1,5 kDa (Hunter e Havorth, 1976; Lehninger et al, 1978; Gunter e Pfeiffer, 1990; Halestrap et al., 1998; Crompton, 1999). O influxo destas moléculas para a matriz mitocondrial induz a expansão do seu volume. Como a superfície da membrana interna é muito maior do que a da membrana externa, isso pode acarretar o rompimento da membrana mitocondrial externa com consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citosol (Skulachev, 1996). Nestas condições, há diminuição do transporte de elétrons e colapso da fosforilação oxidativa. Todas essas alterações em decorrência da TPM podem induzir a morte celular.

A primeira evidência de que a TPM é sensibilizada pelo estado oxidado de nucleotídeos de piridina mitocondriais foi apresentada por Lehninger e co-autores. (Lehninger et al., 1978). A natureza redox da transição de permeabilidade mitocondrial continuou sendo investigada por vários laboratórios (Kowaltowski et al., 2001).

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados com o objetivo de elucidar a identidade molecular do poro de TPM, porém essa questão ainda é bastante controversa (Lê Quôc & Lê Quôc, 1988; Fagian et al., 1990; Szabò & Zoratti, 1993; Krauskopf et al., 2006; Woodfield et al., 1998; Marzo et al., 1998; Kokoszka et al, 2004; Baines et al., 2007; Leung et al., 2008; Halestrap, 2009; Zoratti et al., 2010).

Em 1990, Fagian et al. demonstraram que o poro de TPM seria composto por um agregado protéico de alto peso molecular formado por polimerização de proteínas da membrana mitocondrial interna através de ligações dissulfetos (S-S). As evidências acumuladas a partir de vários trabalhos indicam que o estresse oxidativo mitocondrial resulta na oxidação de tióis de proteínas da membrana interna por EROs. Por sua vez, a oxidação de tióis promove a agregação protéica e a consequente formação do poro de TPM (Fagian et al., 1990; Hermes-Lima et al., 1991; Valle et al., 1993; Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 1998; Teixeira et al., 1999).

Nos últimos anos diversos trabalhos propuseram que a estrutura do poro de TPM contém, no mínimo, ANT (translocador de nucleotídeos de adenina), localizado na membrana interna, VDAC (canal aniônico voltagem dependente), presente na membrana externa, e a CyD (ciclofilina D), localizada na matriz mitocondrial (Crompton et al., 1998; Halestrap et al., 1998; Kroemer, 2003; Kokoszka, 2004; Baines et al., 2005; Krauskopf, 2006; Juhaszova et al., 2008; Leung et al., 2008).

As primeiras evidências indicando que ANT estaria envolvido no processo de TPM surgiram em estudos utilizando ADP, boncrecato e carboxiatractilosídeo (CAT) (inibidor do ANT) (Vercesi, 1984). A adição de ADP ou boncrecato inibe a formação da TPM, enquanto CAT estimula a abertura de TPM (Vercesi, 1984; Novgorodov et al., 1991, Halestrap et al., 1997).

Mais recentemente foi demonstrado que a deleção de isoformas de ANT (camundongos que não expressam genes para as isoformas 1 e 2) diminuiu a sensibilidade da mitocôndria ao Ca^{2+} no processo de indução à TPM (Kokoszka et al., 2004).

Os estudos mostram que a CyD (presente na matriz mitocondrial) é um importante regulador do poro. A ação inibidora da ciclosporina A (utilizada como imunossupressor) sobre a abertura do poro de TPM é vastamente conhecida e seu efeito é atribuído a sua ligação à CyD (Halestrap et al., 1998). Recentemente, estudos com camundongos *knockout* para CyD, mostraram que: 1) esses animais são mais resistentes ao dano celular induzido por isquemia-reperfusão; 2) a indução de TPM requer maiores concentrações de Ca²⁺ (Nakagawa et al., 2005; Baines et al., 2005); 3) a ação inibitória da ciclosporina A sobre a abertura do poro de TPM é perdida na ausência de CyD (Nakagawa et al., 2005).

Embora já tenha sido demonstrado que fosfato aumenta a geração de EROs em mitocôndrias carregadas com Ca^{2+} estimulando a TPM, (Crompton e Costi, 1988; Kowaltowski et al., 1996A), pesquisas recentes sugerem o envolvimento do carreador de fosfato na regulação do poro de TPM (Leung et al., 2008). Foi demonstrado que na ausência de fosfato, a abertura do poro de TPM deixa de ser sensível a CsA e, semelhantemente, a mitocôndria deficiente de CyD deixa de ser menos susceptível a TPM induzida pelo Ca^{2+} . Há também evidências de que o carreador de fosfato se associa ao ANT e CyD de maneira sensível à CsA (Leung et al., 2008).

Envolvimento de proteínas da membrana mitocondrial externa na formação da TPM:

Várias proteínas localizadas na membrana mitocondrial externa ou relacionadas a ela foram propostas como participantes do poro de TPM como VDAC, receptor benzodiazepínico, creatina quinase e hexoquinase (Beutner et al., 1996; Beutner et al., 1998; Marzo et al., 1998; Crompton, 1999).

O VDAC foi alvo de vários estudos. As pesquisas iniciais que indicavam a participação do VDAC no processo de TPM basearam-se principalmente em evidências indiretas (farmacológicas ou interação de VDAC com outras proteínas julgadas ser constituintes do poro de TPM). Posteriormente foi mostrado que o VDAC pode não ser um componente essencial, uma vez que mitocôndrias deficientes das 3 isoformas de VDAC sofrem TPM com sensibilidade similar ao Ca^{2+} , quando comparadas às mitocôndrias controle (Krauskopf et al., 2006; Baines et al., 2007).

Há ainda estudos que sugerem a participação de outras proteínas da membrana externa. Por terem sítios de contato com proteínas supostamente envolvidas no poro de TPM, a hexoquinase, a creatina quinase, as proteínas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2 e o receptor benzodiazepínico poderiam estar envolvidos na regulação da TPM (Zoratti e Szabò, 1995; Beutner et al., 1998; Marzo et al., 1998; Brenner, 2000; Costantini et al., 2000; Halestrap et al., 2004).

In vitro, a TPM induzida por Ca^{2+} pode ser estimulada por um grande número de compostos conhecidos como indutores (Zoratti e Szabò, 1995), que incluem o fosfato inorgânico (Pi) (Rossi e Lehningher, 1964), oxidantes de nucleotídeos de piridina (Lehninger et al., 1978; Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 1996A, 1996B; Vercesi et al., 1997), protonóforos (Bernardi, 1992) e oxidantes de tióis (Vercesi, 1984; Lenartowicz et al., 1991; Valle et al., 1993; Bernardes et al., 1994). A maioria destes indutores são substâncias capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial promovido pelo Ca^{2+} (Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 1996 B; Vercesi et al., 1997).

A figura 2 representa o modelo proposto para explicar a formação do poro induzido por Ca²⁺ e a participação das EROs. O Ca²⁺ intramitocondrial se liga a cardiolipina na face interna da membrana mitocondrial interna causando alterações na cadeia respiratória que facilita a produção de O_2^{\bullet} e consequentemente de H_2O_2 (Grijalba et al., 1999). Simultaneamente, o Ca²⁺ mobiliza Fe²⁺ na matriz mitocondrial que estimula a reação de Fenton e a produção do radical hidroxil que ataca tióis de proteínas, lipídeos e DNA mitocondrial (Merryfield e Lardy, 1982; Castilho et al., 1995; Vercesi et al., 1997).

Devido ao alto conteúdo protéico da membrana mitocondrial interna, é esperado que estas proteínas sejam um dos principais alvos das espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas pela mitocôndria e induzidas por Ca²⁺ (Lehninger, 1964; Fagian et al., 1990; Valle et al., 1993; Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 1996A, 1996B; Nicholls e Ferguson, 2002). As EROs, principalmente o radical hidroxil, são capazes de oxidar resíduos de

cisteína e metionina protéicos, levando à formação de ligações cruzadas S-S e sulfóxido de metionina, respectivamente. Como a oxidação de resíduos de metionina tem pouco efeito sobre a estrutura e função protéica (Berlett e Stadman, 1997), a disfunção mitocondrial devido à oxidação de proteínas da membrana, provavelmente, está associada à oxidação de resíduos de cisteína (Fagian et al., 1990; Castilho et al., 1996).

A transição de permeabilidade pode ser parcialmente revertida pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou redutores ditióis, logo após a permeabilização (Hunter e Haworth, 1979; Valle et al., 1993; Castilho et al., 1996).



Figura 2: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca²⁺ e EROs. Acúmulo de EROs mitocondrial causa TPM. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais O_2^{\bullet} . Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de H₂O₂. O H₂O₂ é então reduzido à H₂O pela glutationa peroxidase (GP), peroxirredoxina (Prx) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GP, e TSH, oxidado pela TP, são recuperados pelo sistema enzimático glutationa e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então NADP⁺ usando a NAD(P) transidrogenase (TH). Quando a geração de O_2^{\bullet} aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão inativados, H_2O_2 acumula-se e na presença de Fe^{2+} , gera o radical OH[•] altamente reativo. OH[•] oxida grupos tiólicos (-SH) da membrana mitocondrial interna, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente, OH[•] pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i (Kowaltowski et al, 2001).

Mitocôndrias e Morte Celular

A morte celular acontece seja em condições fisiológicas, como a apoptose que ocorre na embriogênese, em processos de metamorfose, de regulação do desenvolvimento e da renovação celular até em situações tipicamente patológicas como a morte celular que ocorre em tecidos após injúria severa como a produzida por hipóxia.

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas (Grivicich et al., 2007) e dentre os tipos de morte destacam-se a apoptose e a necrose. A partir de 1996, vários estudos demonstraram que a mitocôndria está intimamente relacionada à morte celular apoptótica.

Diversos fatores podem desencadear a apoptose, como a ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (Grivicich et al., 2007). A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de diversos fatores. Esse mecanismo de morte pode ocorrer através de várias cascatas de sinalização, as quais podem se divididas em: via extrínseca e via intrínseca (mitocondrial). A apoptose pela via extrínseca é caracterizada pela ativação de receptores de membrana localizados na superfície celular que incluem o receptor de fator de necrose tumoral, o receptor CD95 (FAS) dentre outros. Enquanto que a apoptose pela via intrínseca é resultado de cascatas de eventos intracelulares nos quais a permeabilização da membrana mitocondrial externa tem papel fundamental.

Na via intrínseca da apoptose fatores pró-apoptóticos do espaço intermembranas, como o citocromo c, o fator indutor de apoptose (AIF) e pró-caspases são liberados da mitocôndria para o citosol (Liu et al., 1996; Green & Reed, 1998; Susin et al., 1999; Zhivotovsky et al., 1999). O citocromo c quando liberado para o citosol se liga a Apaf-1 (fator de ativação de protease pró-apoptótica1) e pró-caspase 9, formando o apoptossomo, um complexo de alto peso molecular responsável pela ativação da caspase 9 (Zou et al., 1999), a qual irá ativar caspase 3, principal caspase executora da apoptose. A pró-caspase 9 também está localizada no espaço intermembrana mitocondrial, assim como uma fração das pró-caspases 2 e 3 (Krajewski et al., 1999; Ravagnan et al., 2002). O AIF é uma proteína capaz de induzir a condensação da cromatina nuclear de modo independente da ativação de caspases (Susin et al., 1999).

As caspases pertencem à família das cisteínas proteases que tem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídeos de membrana que irão sinalizar para essas células serem fagocitadas por macrófagos (Nicholson & Thornberry, 1997).

As mitocôndrias também contém a proteína Smac/DIABLO que inativa um grupo de proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases (Du et al., 2000). No espaço intermembranas ainda se encontra a endonuclease G (Parrish et al., 2001) que promove diretamente a fragmentação do DNA nuclear. Como a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais pode envolver apenas a permeabilização da membrana externa causada por proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, nesta condição a membrana mitocondrial interna continua íntegra e há fosforilação oxidativa enquanto houver citocromo c suficiente (Tait & Green, 2010). A Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras da morte que participam ativamente da regulação da apoptose (Borner, 2003). Os membros da família Bcl-2 como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose prevenindo a liberação de citocromo c. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. Dentre as proteínas mais estudadas desta família, estão a Bax e a Bcl-2.

A morte celular do tipo necrótica na maioria das vezes é uma forma acidental e não controlada de morte celular que pode ser induzida por injúria severa, estresse oxidativo, sobrecarga intracelular de Ca^{2+} entre outros. Durante a necrose, os eventos não seguem necessariamente uma ordem. As principais características da necrose incluem aumento do volume celular (oncose) que leva à perda da integridade da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citosólico, disfunção das organelas intracelulares e perda da homeostase iônica intracelular (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺).

A TPM é um processo de disfunção mitocondrial que pode resultar na morte celular tanto por apoptose como por necrose (Zoratti e Szabò, 1995; Baines et al., 2005; Kroemer, 2007, Tait & Green, 2010). A mitocôndria pode liberar fatores apoptogênicos quando houver o inchamento mitocondrial e a ruptura da membrana externa (Green & Reed, 1998) levando à apoptose. Neste contexto a morte também poderá ocorrer por necrose por incapacidade de manter a produção de ATP (Halestrap et al., 2002; Vercesi et al., 2006). Sob essas condições, o fator determinante que leva à apoptose ou à necrose será a capacidade de manter os níveis fisiológicos de ATP intracelular (Leist et al., 1997, Lemasters et al., 1998; Halestrap, 2005). Enquanto a apoptose requer uma quantidade mínima de ATP intracelular, a necrose é geralmente acompanhada pelo seu esgotamento total (Nicotera et al., 1998).

2- OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral avaliar se existe a participação de proteínas constituintes da membrana mitocondrial externa na formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

Os objetivos específicos foram:

- Investigar se mitoplastos, mitocôndrias desprovidas de membrana externa, são susceptíveis a transição de permeabilidade mitocondrial;
- 2) Analisar os efeitos de indutores e inibidores do poro de transição de permeabilidade sobre as propriedades deste poro em organelas desprovidas de membrana externa.
3- MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Os reagentes empregados nos experimentos com mitocôndrias isoladas e mitoplastos foram adquiridos da Sigma Chemical Company, EUA. O anticorpo para VDAC 1 (ab15895) foi adquirido da Abcam, e os anticorpos para as isoformas 2 e 3 de VDAC (PA1-958 e PA1-959, respectivamente) foram adquiridos da ABR-Affinity BioReagents, EUA.

A solução estoque (1,7M) do coquetel de substratos para complexo I continha malato 0,68 M, α-cetoglutarato, 0,34 M, piruvato 0,34 M e glutamato 0,34 M.

Animais

Para os experimentos com mitocôndrias isoladas, utilizamos fígados e rins de ratos fêmeas, adultas com 60 a 90 dias de idade, da linhagem *Wistar*, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da UNICAMP.

Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo Schneider e Hogeboom (1951). O fígado foi retirado após a morte do animal por deslocamento cervical, lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão HEPES 10 mM pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material obtido foi centrifugado a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 7750 g sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio contendo sacarose 250 mM, HEPES 5 mM

pH 7,2 e EGTA 0,3 mM e novamente centrifugado a 7750 g. A fração mitocondrial (sedimento) foi ressuspensa na mesma solução, porém isenta de EGTA, para uma concentração final aproximada de 70 mg de proteína por mL.

Isolamento de mitocôndrias de rins de rato

Mitocôndrias de rins de ratos foram isoladas segundo Wallin et al., (1987). Após a morte do animal por deslocamento cervical, os rins foram retirados, lavados em meio contendo sacarose 250 mM, tampão HEPES 10 mM pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picados com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem, em seguida esse material foi centrifugado a 500 g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio composto por sacarose 250 mM, HEPES 5 mM pH 7,2 e EGTA 0,3 mM e centrifugado a 7750 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso no mesmo meio, sendo submetido a centrifugação de 7600 g por 10 minutos. O sedimento resultante desta centrifugação foi ressuspenso no mesmo meio, porém, isento de EGTA para uma concentração final próxima de 70 mg de proteína por mL.

Preparo dos mitoplastos de fígado e rins de rato

Os mitoplastos de fígado foram preparados segundo Schnaitman e Greenawalt (1968). Um mL de suspensão de mitocôndrias de fígado foi adicionado a 1,0 mL de meio contendo manitol 225 mM, sacarose 75 mM, BSA 2%, HEPES 5 mM pH 7,2 e digitonina 2,0% (Sigma, D141). Esse material foi mantido em banho de gelo por 15 minutos sob agitação constante, após esse período, a suspensão foi homogeneizada delicadamente 5 vezes em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, depois diluída pela adição de 10 mL do meio acima descrito e em seguida centrifugada a 12000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento ressuspenso em 5 mL do mesmo meio e novamente centrifugado a 12000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 5 mL do mesmo meio e centrifugado a 12100 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio contendo sacarose 250 mM e HEPES 5 mM pH 7,2, obtendo-se uma fração de mitoplastos com concentração aproximada de 30 a 35 mg por mL.

Os mitoplastos de rins foram preparados segundo Greenawalt (1974) com modificações de Lee et al. (2004), utilizando-se o mesmo meio e as mesmas centrifugações do isolamento de mitoplastos de fígado de rato. Utilizou-se digitonina 1,2% para a obtenção de mitoplastos de rins já que concentrações mais altas deste detergente comprometeram significativamente a função destas organelas.

Para os experimentos com mitocôndrias, as suspensões mitocondriais foram submetidas aos mesmos procedimentos utilizados para a obtenção de mitoplastos, exceto pela adição do detergente digitonina.

Dosagem de proteína

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 determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada

diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

Condições experimentais

Os experimentos de respiração, inchamento, potencial de membrana mitocondrial com mitocôndrias isoladas e mitoplastos foram realizados a 28 °C em meio de reação padrão contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, KH₂PO₄ 2 mM e MgCl₂ 1 mM. Como substratos respiratórios foram utilizados 5 mM de malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato. Nos experimentos de consumo de oxigênio mitocondrial foi utilizado o meio de reação padrão contendo 0,3 mM de EGTA. Outros reagentes adicionados estão indicados nas figuras.

Consumo mitocondrial de oxigênio

O consumo de oxigênio por mitocôndrias ou mitoplastos foi determinado utilizandose um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado uma câmara de vidro de 1,4 mL equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio molecular inicial no meio de reação foi considerada 225 nmol/ml a 28 °C (Robinson, 1970). A respiração de fosforilação (estado 3) foi obtida com a adição de ADP. O controle respiratório foi calculado como sendo a razão entre as velocidades de respiração nos estado 3 e 4 (velocidade de respiração observada após todo o ADP adicionado ter sido consumido) (Ver figura 3).



Figura 3: Esquema de controle respiratório

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 e do meio, e, qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (Nicholls e Åkerman, 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. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm foi feito em um espectrofotômetro Hitachi U-3000. As mitocôndrias intactas ou mitoplastos (0,5 mg de proteína/mL) foram incubados nas condições descritas anteriormente.

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e Western blot

Amostras contendo mitocôndrias e mitoplastos na concentração de 0,5 mg/mL foram coletadas e submetidas a centrifugação de 15000 *g* por 2 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em solução contendo sacarose 1,25 M, Tris-HCl 250 mM pH 7,4, SDS 5% e EDTA 10 mM (definida como *solução de dissolução de membrana*) de acordo com Liu et al., (1977). As amostras foram aquecidas a 100°C por 3 minutos e suas concentrações protéicas finais determinadas pelo método descrito por Lowry et al., (1951). Alíquotas dessas amostras (10 μ g para eletroforese e de 2,5 μ g a 50 μ g para *Western blot*) foram aplicadas no gel de eletroforese e o azul de bromofenol foi usado como indicador de corrida. Como padrão de peso molecular foi utilizado o *Page ruler protein ladders* (10 - 250 kDa) da *Fermentas*.

O gel de resolução foi composto por acrilamida 12%, Tris-HCl 375 mM, pH 8,8 e SDS 0,1% ou acrilamida 15%, Tris-HCl 470 mM, pH 8,8 e SDS 0,1%, conforme descrito por Fagian et al. (1990). A polimerização química foi feita pela adição de persulfato de amônia 0,075% e tetrametilenodiamida (Temed) 0,06% na concentração final. O gel de empacotamento com 3,5% de acrilamida foi preparado a partir das mesmas soluções estoques e continha Tris-HCl 125 mM pH 6,8 e SDS 0,1%. A polimerização química foi feita de maneira semelhante ao gel de resolução.

A corrida eletroforética foi feita em aproximadamente 2 horas, aplicando-se uma diferença de potencial de 80 volts. Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel com solução de metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,02% por 2 horas a 4 °C. Utilizou-se o método descrito por Blum et al. (1987) para coloração do gel de poliacrilamida através da impregnação pela prata.

Para *Western blot*, logo após a corrida eletroforética, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Potran, Shleicher & Schuell, EUA), em tampão contendo Tris-HCl 1,2 mM (pH 8,0), glicina 9,6 mM e 20% de metanol. A eficácia da transferência foi verificada através da coloração da membrana com o corante Ponceau S (Sigma Chemical Company, EUA), seguida por bloqueio dos sítios inespecíficos, em uma solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e 0,1% de Tween 20 (TBST) por 18 horas a 4 °C. As membranas foram incubadas com um dos seguintes anticorpos primários diluídos em TBST com 5% de leite desnatado: anti-VDAC 1, anti-VDAC 2 ou anti-VDAC 3, 1:200 por 2 horas sob agitação constante. Foram realizadas 4 lavagens de 10 minutos cada com TBST, seguidas de incubação com anticorpo secundário biotinilado na diluição de 1: 1000 por 1½ hora a 24 °C sob agitação constante.

A membrana foi revelada através de método colorimétrico utilizando-se o kit Amplified Alkaline Phosphatase Immun-Blot (BIO-RAD) e digitalizada ainda úmida em scanner HP 3052 Laser Jet.

Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial pelo método da safranina

A medida do potencial de membrana mitocondrial foi feita utilizando-se o indicador fluorescente safranina (5 μ M). A safranina é um corante lipofílico catiônico que sofre alterações ópticas em resposta a sua distribuição entre o meio externo e o compartimento intramitocondrial e também em resposta ao seu *stacking* à membrana mitocondrial interna, os quais são dependentes do potencial de membrana. A relação entre a alteração de fluorescência da safranina com o potencial de membrana permite que valores desconhecidos de potencial de membrana sejam calculados (Colonna et al., 1973). Os experimentos com mitocôndrias e mitoplastos (0,5 mg/mL) foram realizados em fluorímetro Shimadzu (RF-5301 PC) utilizando-se os comprimentos de onda de 495 nm (ex) e 586 nm (em), slit de 3 nm, sob agitação constante.

Detecção da atividade da enzima monoamino oxidase (MAO) em mitocôndrias e mitoplastos de fígado de rato

A enzima monoamino oxidase apresenta 2 isoformas (MAO-A e MAO-B) e está relacionada à degradação metabólica de neurotransmissores como a dopamina e serotonina em vários tecidos e na mitocôndria, localiza-se na membrana mitocondrial externa, podendo ser usada como indicador da mesma (Schnaitman e Greenawalt, 1967; Edmonson et al., 2009). Amostras de mitocôndrias e mitoplastos foram incubadas em tampão fosfato 50 mM pH 7,4 a 37 °C, Triton X100 0,5% e benzilamina 1 mM, que é um substrato sintético para MAO-B (segundo Tabor et al., 1954), sob agitação constante. A MAO em presença do substrato benzilamina, gera benzaldeído, amônia e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de benzaldeído foi detectada a 250 nm em espectrofotômetro modelo

Hitachi U-3000. Para calcular a quantidade de benzaldeído produzido, foi considerado o coeficiente de extinção molar de 12 800 M⁻¹cm⁻¹, de acordo com Neumann et al (1975).

Atividade da enzima citrato sintase em mitocôndrias e mitoplastos de fígado de rato

A enzima citrato sintase (CS) é um dos componentes do ciclo de Krebs, localizandose na matriz mitocondrial e é frequentemente utilizada como marcador quantitativo de mitocôndrias. Os experimentos para análise da atividade desta enzima foram feitos com mitocôndrias e mitoplastos de fígado de rato, na concentração de 30 μ g mL⁻¹, incubados em meio contendo tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0 a 37 °C, Triton X100 0,1%, oxalacetato 250 μ M, DTNB 100 μ M, acetil-CoA 50 μ M(CoA-SH), de acordo com Shepherd e Garland (1969). Leituras foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi U-3000 a 412 nm para detectar o TNB formado, conforme a reação abaixo.

Acetil-CoA + oxaloacetato + $H_2O \xrightarrow{CS}$ Citrato + CoA-SH CoA-SH + DTNB \longrightarrow **TNB** + CoA-S-S-TNB

Análise da atividade de hexoquinase em mitocôndrias e mitoplastos de rim de rato

A enzima hexoquinase catalisa a reação de fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato, o primeiro passo do catabolismo da glicose. Em mamíferos existem quatro isoformas de hexoquinase, sendo que a I e II, são mitocondriais e estão localizadas no espaço intermembrana, associadas ao VDAC e ANT (translocador de nucleotídeos de adenina), (Wilson, 1997). Mitocôndrias e mitoplastos de rim de rato (0,2 mg/mL) foram incubados em meio de reação contendo TRIS-HCl 20 mM, pH 7,4 a 37 °C, glicose 5 mM, MgCl₂ 10 mM, Triton X-100 0,5%, Ap5A 50 μ M, G6PDH 2 U/mL, NADP 1 mM.

A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM (Santiago et al., 2008). A calibração foi feita com adições sucessivas de NADPH 10 µM. Experimentos feitos em espectrofotômetro modelo Hitachi U-3000 a 340 nm. Nestas condições a atividade de hexoquinase é determinada com base na formação de NADPH a partir da conversão de glicose em glicose 6-fosfato (G6P) pela enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), conforme a reação abaixo.

Glicose + ATP \xrightarrow{HK} Glicose-6-Fosfato + ADP Glicose-6-Fosfato + NADP⁺ $\xrightarrow{G6PDH}$ 6-Fosfoglucolactona + NADPH

Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t-Student* ou ANOVA one-way, com teste de Bonferroni como *post-hoc*, onde adequado. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão. Valores de p< 0,05 foram considerados significantes.

4- RESULTADOS

Parte 1: Caracterização e padronização do isolamento de mitoplastos

Para a obtenção de mitoplastos (mitocôndrias desprovidas de membrana externa) utilizamos o protocolo descrito por Schnaitman e Greenawalt (1968), que é baseado no uso do detergente seletivo para colesterol digitonina.

Para avaliarmos o grau de pureza da preparação dos mitoplastos, realizamos experimentos com o objetivo de investigar se essas organelas estavam realmente desprovidas de membrana mitocondrial externa. Como a monoamino-oxidase (MAO) é uma enzima localizada na membrana mitocondrial externa (Schnaitman e Greenawalt, 1967; Edmonson et al, 2009), estimamos a atividade da mesma em mitocôndrias intactas e comparamos com a sua atividade em mitoplastos de fígado de rato. A MAO na presença do substrato sintético benzilamina produz amônia, peróxido de hidrogênio e benzaldeído. Este último foi detectado espectrofotometricamente a 250 nm (Tabor et al., 1954).

A figura 4A mostra um experimento representativo do monitoramento da atividade de MAO na presença de mitocôndrias e mitoplastos. Em mitocôndrias observamos uma significativa e constante produção de benzaldeído, que foi considerado como 100% de atividade para fins de comparação, enquanto que em mitoplastos a atividade se mostrou bastante inferior (em torno de 5% ou menos) quando comparada às mitocôndrias (Fig. 4B).

Para os experimentos desenvolvidos neste trabalho, foram utilizadas apenas suspensões de mitoplastos que apresentavam atividade de MAO menor que a 5% da atividade das mitocôndrias intactas.



Figura 4: Determinação da atividade de monoamino oxidase (MAO) em mitocôndrias (MFR) e mitoplastos (Mtpl) de fígado de rato. **Painel A:** MFR ou Mtpl (0,5 mg/mL) foram adicionados em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 a 37°C, triton X100 0,5% na presença ou ausência do substrato para MAO benzilamina 1 mM (benz). **Painel B:** Comparação da atividade de MAO entre MFR e Mtpl. A atividade de MAO na situação controle foi de 9,3 ± 1,3 nmol de benzaldeído produzido por minuto por mg de proteína, sendo considerada 100% para fins de comparação com mitoplastos. Os resultados são a média ± S.D. de 10 determinações independentes. *p<0,01.

Como parte da padronização da preparação de mitoplastos, avaliamos se haveria uma diferença importante de quantidade de organelas por mg de proteína nas suspensões de mitocôndrias e mitoplastos. Para essa avaliação, determinamos a atividade da enzima citrato sintase, presente na matriz mitocondrial, que é frequentemente utilizada como marcador quantitativo de organelas em isolamentos mitocondriais (Kuznetsov et al., 2002).

Observamos nas figuras 5A (traçados representativos) e 5B que a quantidade de organelas por mg de proteína das suspensões de mitocôndrias (linha preta) e mitoplastos (linha vermelha) se mostra bem próxima.



Figura 5: Determinação da atividade de citrato sintase. **Painel A:** MFR ou Mtpl (30 μ g/mL) foram adicionados em tampão de reação contendo Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a 37°C, Triton X100 0,1%, oxalacetato 250 μ M, DTNB 100 μ M e acetil-CoA 50 μ M. **Painel B:** Comparação da atividade de citrato sintase entre MFR e Mtpl. Os resultados representam a média ± S.D. de 6 determinações independentes.

Como mais uma certificação de que realmente os mitoplastos estavam desprovidos de membrana externa, utilizamos *Western blot* para detectar a presença das três isoformas de VDAC (canal aniônico voltagem dependente), que é a proteína mais abundante na membrana mitocondrial externa (De Pinto et al., 2010).

Aplicamos no gel de poliacrilamida-SDS de 2,5 a 50 μ g de proteína mitocondrial e 50 μ g de proteína de mitoplastos para que pudéssemos fazer uma análise comparativa e semi-quantitativa da depleção de VDAC em mitoplastos. Pelos resultados da Figura 6, podemos afirmar que há menos de 10% das isoformas 1, 2 e 3 de VDAC em mitoplastos quando comparados às mitocôndrias intactas. Estes resultados demonstram que o protocolo de preparo dos mitoplastos foi adequado para a realização de experimentos com o intuito de estimar a participação de proteínas da membrana mitocondrial externa na formação do poro de transição de permeabilidade.



Figura 6: Detecção das isoformas 1, 2 e 3 de VDAC em MFR e Mtpl por *Western blot*. Diferentes concentrações de proteína (2,5 - 50 µg) de MFR e Mtpl foram adicionadas nos géis.

Uma vez que foi confirmada a eficiência da preparação dos mitoplastos de fígado de rato, avaliamos se essas organelas eram capazes de manter o funcionamento da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (Figura 4A). Verificamos que os mitoplastos eram capazes de fosforilar o ADP adicionado, porém com menor eficiência quando comparados às mitocôndrias intactas. Quando suplementamos o meio de reação com citocromo c (5 μ M) notamos que a fosforilação oxidativa foi parcialmente recuperada. Provavelmente, durante a preparação dos mitoplastos, devido à localização do citocromo c no espaço intermembrana (Weiss et al., 2003), uma parte foi perdida, por isso a recuperação parcial do consumo de O₂ quando adicionado citocromo c exógeno. Oligomicina (2 μ g/mL) foi utilizada no final de cada experimento para inibir a ATP sintase. As médias dos controles respiratórios apresentados por mitocôndrias, mitoplastos e mitoplastos mais citocromo c são mostradas na figura 7B.

Para comprovar a perda de citocromo c durante a preparação dos mitoplastos, fizemos eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%) (Figura 7C). Pudemos visualizar significativa redução da banda correspondente ao citocromo c na coluna em que foi aplicada amostra protéica de mitoplastos, enquanto que a observamos nas colunas em que foram aplicadas amostras de mitocôndrias intactas ou ainda em mitoplastos incubados na presença de citocromo c exógeno.

Considerando-se estes resultados, os experimentos a seguir com mitoplastos foram realizados em meio de reação suplementados com citocromo-c $5 \mu M$.



Figura 7: Controle respiratório e perda de citocromo c em mitocôndrias (MFR) e mitoplastos (Mtpl). **Painel A:** MFR e Mtpl (0,5 mg/mL) foram adicionados ao meio de reação padrão, pH 7,2 a 28 °C, contendo 5 mM de substratos para complexo I e EGTA 100 μ M. Onde indicado, ADP 200 μ M, citocromo c 5 μ M e oligomicina (Oligo) 2 μ g/ml foram adicionados. **Painel B:** Média dos controles respiratórios ± S.D. (n=20). * p< 0,01 em relação aos outros 2 grupos.

Painel C: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS de proteínas de membrana de MFR e Mtpl. Em cada coluna, 10 μ g de proteína de MFR ou Mtpl foram aplicadas no gel de resolução 15%. A cabeça de seta indica a banda referente ao citocromo-c. As setas pequenas indicam a banda correspondente ao peso molecular do citocromo-c. As colunas são referentes às seguintes condições: Coluna 1: citocromo c (3,3 μ g); Colunas 2 e 3: Mtpl + citocromo c; Colunas 4 e 5: Mtpl; Coluna 6: MFR.

A seguir avaliamos a capacidade de mitoplastos gerar e manter um potencial de membrana. Na figura 8, observamos o potencial de membrana quando as mitocôndrias (linha preta) ou mitoplastos (linha cinza) foram adicionados ao meio de reação padrão contendo safranina e substratos para o complexo I. Após a adição de mitocôndrias ou mitoplastos ocorreu a captação da safranina, evidenciada pela deflexão dos traçados. Quando foi adicionado ADP, foi possível verificar a redução do potencial pela fosforilação oxidativa e no final induzimos a despolarização completa do potencial ao adicionarmos o desacoplador FCCP (carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona).



Figura 8: Monitoramento do potencial de membrana das organelas. MFR ou Mtpl (0,5 mg/mL) foram adicionados ao meio de reação padrão pH 7,2 a 28 °C, contendo EGTA 200 μ M, substratos para complexo I e safranina 5 μ M. ADP 200 μ M, oligomicina 1 μ g/mL (Oligo) ou FCCP 1 μ M foram adicionados onde indicado pelas setas. Nos experimentos com Mtpl o meio de reação foi suplementado com citocromo-c 5 μ M. A figura é representativa de cinco experimentos independentes.

Parte 2: Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) em mitoplastos de fígado de rato

Para avaliar o efeito de indutores e inibidores da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) em mitoplastos, acompanhamos o inchamento mitocondrial em espectrofotômetro. Quando ocorre a TPM, há uma diminuição da absorbância devido ao inchamento das organelas, devido a entrada de íons, água e outras moléculas.

Na figura 9 notamos que na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} ocorre o inchamento de mitocôndrias e mitoplastos de maneira bastante semelhante. Os mitoplastos se mostraram mais sensíveis ao inchamento induzido por Ca^{2+} , sendo que concentrações duas vezes maiores de Ca^{2+} foram necessárias para induzir o inchamento em mitocôndrias.

Nos experimentos mostrados na figura 10 avaliamos o estímulo da TPM pelo próoxidante t-butil hidroperóxido (t-butil) e o efeito dos inibidores da TPM. Conforme já é conhecido para mitocôndrias, o t-butil hidroperóxido estimulou a ocorrência de TPM em mitoplastos, enquanto este processo foi inibido pelo antioxidante catalase e pelos inibidores de TPM ciclosporina A e ADP mais magnésio (MgCl₂). Ao final dos experimentos, para induzir o máximo inchamento das organelas adicionamos alameticina, um composto que forma poros não seletivos na membrana interna (He et al., 1996).



Figura 9: Inchamento de organelas induzido por Ca²⁺. MFR e Mtpl (0,5 mg/mL) foram incubados em meio de reação padrão, pH 7,2, a 28 °C contendo 5 mM de substratos para complexo I. EGTA 100 μ M, Ca²⁺ nas concentrações indicadas e CsA 1 μ M estiveram presentes nos experimentos conforme indicado na figura. Alameticina (Alam.; 40 μ g/mg de proteína) foi adicionada onde indicado pelas setas. Nos experimentos com Mtpl, o meio de reação foi suplementado com citocromo c 5 μ M. Figura representativa de 5 experimentos independentes.



Figura 10: Efeito de t-butil hidroperóxido (t-butil), EGTA, ADP + MgCl₂, CsA ou catalase sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ (40 μ M para MFR; 20 μ M para Mtpl): MFR ou Mtpl (0,5 mg/ml) foram incubados em meio de reação padrão, pH 7,2 a 28 °C, contendo 5 mM de substratos para o complexo I . EGTA 100 μ M ou Ca²⁺, juntamente com t-butil hidroperóxido 300 μ M, CsA 1 μ M, ADP 300 μ M mais MgCl₂ 2 mM ou catalase 2 μ M estiveram presentes conforme indicado na figura. Em todos os experimentos com Mtpl, o meio de reação foi suplementado com citocromo c 5 μ M. A figura é representativa de seis experimentos independentes.

Como outra forma de comparar mitocôndrias e mitoplastos frente a indutores e inibidores do poro de TPM, verificamos a capacidade de restabelecimento do potencial de membrana mitocondrial logo após o início da perda de potencial induzida por t-butil hidroperóxido e Ca²⁺. EGTA, CsA e DTT inibiram a queda e restabeleceram parcialmente o potencial de membrana tanto em mitocôndrias quanto em mitoplastos, como pode ser observado na figura 11.



Figura 11: Efeito de ciclosporina (CsA), ditiotreitol (DTT) e EGTA na queda do potencial de membrana de MFR e Mtpl induzida por t-butil hidroperóxido (t-butil) e Ca²⁺. Os experimentos foram conduzidos na presença de t-butil 300 μ M e Ca²⁺ 10 μ M. Onde indicado pelas setas, CsA 1 μ M, DTT 3 mM ou EGTA 1 mM foram adicionados. Em todos os experimentos com Mtpl, o meio de reação foi suplementado com citocromo c 5 μ M. Figura representativa de 5 experimentos independentes.

Parte 3: Estudo do envolvimento da enzima hexoquinase na TPM

Como alguns estudos propõem que a hexoquinase também pode ter envolvimento no processo de TPM (Crompton et al., 1998; Green e Reed, 1998; Crompton, 1999; Breckenridge e Xue, 2004), nos interessamos em investigar se esse processo também poderia ocorrer em mitoplastos.

Como mitocôndrias de fígado de rato são pobres em hexoquinase (Santiago et al., 2008), optamos por preparar mitocôndrias e mitoplastos de rim de rato e verificar se ocorreria a TPM de forma semelhante nas duas preparações. Como confirmação do preparo eficiente de mitoplastos de rim, fizemos experimentos de *Western blot* para detecção de VDAC 3 (Figura 12) nas organelas. Utilizando este marcador observamos que a membrana externa foi depletada em pelo menos 90% nos mitoplastos de rim.



Figura 12: Detecção de VDAC (isoforma 3) em MRR e Mtpl de rim por *Western blot*. Diferentes concentrações de proteína (2,5 - 50 µg) foram adicionadas nos géis.

Com a finalidade de avaliar quanto da enzima hexoquinase ainda restava nas organelas depois do preparo dos mitoplastos, realizamos ensaios enzimáticos com o intuito de quantificá-la. Conforme pode ser observado na figura 13, em mitoplastos de rim, ainda restou cerca de 27% da atividade de hexoquinase quando comparados a mitocôndrias de rim intactas. Essa diferença provavelmente acontece devido à sua ligação a sítios da face externa da membrana interna (Wilson, 1997) não permitindo a total depleção somente com a remoção da membrana externa.



Figura 13: Determinação da atividade da enzima hexoquinase em mitocôndrias (MRR) e mitoplastos (Mtpl) de rim de rato. MRR e Mtpl foram submetidos a ensaios para monitoramento da atividade da enzima hexoquinase conforme descrito em Materiais e Métodos. n = 6, *p< 0,01.

Os resultados mostrados nas figuras 9, 10 e 11 indicaram que mitocôndrias e mitoplastos de fígado se comportam de forma semelhante quando submetidos a indutores e protetores da TPM. A seguir conduzimos testes comparativos semelhantes em mitocôndrias e mitoplastos de rim. De fato, observamos que o Ca^{2+} induziu o inchamento em mitocôndrias e mitoplastos de rim e este processo foi inibido por EGTA, CsA ou ADP mais MgCl₂ (Figura 14).



Figura 14: Inchamento induzido por Ca²⁺ em mitocôndrias (MRR) ou mitoplastos (Mtpl) de rim de rato (0,5 mg/mL). MRR ou Mtpl foram incubados em meio de reação padrão, pH 7,2, a 28 °C, com substrato para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM. EGTA 100 μ M, Ca²⁺ (40 μ M em MRR e 20 μ M em Mtpl), CsA 1 μ M ou ADP 300 μ M com MgCl₂ mM estiveram presentes nos experimentos conforme indicado na figura. Alameticina (40 mg/mg de proteína) foi adicionada onde indicado pelas setas. Figura representativa de 5 experimentos independentes.

5- DISCUSSÃO

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é um processo induzido por Ca²⁺ e caracterizado pela formação de poros não seletivos na membrana mitocondrial interna, promovendo o inchamento osmótico da matriz, dissipação do potencial de membrana, incapacidade de produção de ATP e morte celular (Crompton, 1998; Kowaltowski et al., 2001; Vercesi et al., 2006).

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados com o objetivo de esclarecer a identidade molecular do poro de TPM, porém esse problema ainda permanece sem solução (Lê Quôc & Lê Quôc, 1988; Fagian et al., 1990; Szabò e Zoratti, 1993; Krauskopf et al., 2006; Woodfield et al., 1998; Marzo et al., 1998; Kokoszka et al, 2004; Baines et al., 2007; Leung et al., 2008; Halestrap, 2009; Zoratti et al., 2010).

Inicialmente o VDAC, uma proteína da membrana mitocondrial externa foi considerado um componente essencial no processo de TPM (Szabò e Zoratti, 1993, Beutner et al., 1996; Marzo et al., 1998), entretanto, trabalhos recentes mostraram que mitocôndrias provenientes de fibroblastos ou de camundongos deficientes das 3 isoformas de VDAC sofrem TPM com a mesma sensibilidade ao Ca²⁺, em comparação às mitocôndrias controle (Krauskopf et al., 2006; Baines et al., 2007). Em adição, fibroblastos sem as três isoformas de VDAC apresentaram maior sensibilidade à morte celular induzida por estresse oxidativo (Baines et al., 2007). É importante ressaltar que nesses modelos há a possibilidade de células desenvolverem adaptações compensatórias e voltarem a apresentar a TPM mesmo sem o VDAC. No presente estudo, com o uso de mitoplastos depletados de VDAC (Figuras 6 e 12), obtidos a partir da remoção da membrana mitocondrial externa com o detergente seletivo para colesterol digitonina, isso não ocorreria. Os mitoplastos de fígado apresentaram uma depleção > 90% das três isoformas de VDAC (Figura 6). Assim, como

observado com mitocôndrias, o processo de TPM nos mitoplastos foi modulado (estimulado/inibido) por agentes indutores e protetores. O pró-oxidante t-butil hidroperóxido potencializou o inchamento (Figura 10) e a dissipação do potencial de membrana (Figura 11) induzidos por Ca²⁺ nos mitoplastos, enquanto, EGTA, ADP, CsA, DTT e catalase inibiram este processo (Figuras 9 a 11 e 14). Desta forma, nossos resultados indicam que a membrana mitocondrial externa e as proteínas nela contidas não são necessárias para a indução de TPM com propriedades semelhantes às observadas com mitocôndrias intactas. Apesar do VDAC não ser necessário para a TPM, Tikunov et al. (2010) demonstraram recentemente que o fechamento deste canal na membrana externa, pelo qual muitas moléculas são transportadas, aumentou a concentração do radical livre superóxido na mitocôndria e favoreceu a abertura do poro de TPM. Desta forma, não podemos descartar que proteínas da membrana mitocondrial externa possam, pelo menos indiretamente, modular o processo de TPM. Mesmo sendo dispensável para a formação da TPM, o VDAC pode interagir com proteínas pró-apoptóticas da famíla Bcl-2 resultando na formação de poros protéicos na membrana mitocondrial externa por onde ocorre a liberação de citocromo c, ativando a via intrínseca da apoptose (Shimizu et al., 1999; Banerjee & Ghosh, 2004).

Várias outras proteínas associadas à membrana mitocondrial externa também foram propostas como componentes do poro de TPM, como a hexoquinase, a creatina quinase e o receptor benzodiazepínico (Beutner et al., 1996; Beutner et al., 1998; Marzo et al., 1998). A exclusão da participação da hexoquinase poderia ser feita apenas pela observação de que a TPM ocorre em mitocôndrias que praticamente não possuem esta proteína, como mitocôndrias de fígado (Santiago et al., 2008). No entanto, mitocôndrias de fígado poderiam ter adaptações específicas para apresentar TPM mesmo sem hexoquinase. Por isso, também a ocorrência de TPM foi avaliada em mitoplastos de rim de rato (Figura 14). Nestas preparações, verificamos uma depleção parcial de hexoquinase (~73%). A quantidade residual desta proteína pode ser devido à presença de sítios de ligação com a membrana mitocondrial interna (Wilson, 1997). Em relação à análise da isoforma 3 de VDAC, utilizada como um marcador da presença de membrana externa, observou-se uma depleção > 90% desta proteína em mitoplastos de rim em comparação às mitocôndrias. A observação da TPM em mitoplastos de rim (Figura 14) indica que este fenômeno também não depende da presença de hexoquinase.

As proteínas mitocondriais com evidências sólidas de envolvimento no processo de TPM são o ANT na membrana mitocondrial interna e a CyD na matriz mitocondrial. Dados recentes também indicam que o carreador de fosfato, na membrana interna, participa no mecanismo pelo qual a CyD modula o processo de TPM (Leung et al., 2008). Drogas que mantém o ANT no estado conformacional "m", como o boncrecato, diminuem a suscetibilidade mitocondrial à TPM, enquanto a indução do estado conformacional "c" por carboxiatractilosídeo induz efeito oposto (Lê Quôc & Lê Quôc, 1988). Notadamente, foi demonstrado que ocorre TPM em mitocôndrias de camundongos que não expressam as isoformas 1 e 2 de ANT (Kokoszka et al, 2004), porém a deleção destas isoformas diminuiu a sensibilidade da mitocôndria ao Ca²⁺ no processo de TPM, indicando que o ANT desempenhe um papel regulador neste processo. A ciclofilina D, que apresenta atividade peptidil prolil cis-trans isomerase, é considerada um componente essencial além de regulador do poro de TPM, já que mitocôndrias isoladas de animais knockout apresentaram menor sensibilidade ao Ca^{2+} e a TPM foi insensível à CsA (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005).

Há dois modelos principais para explicar a constituição molecular do poro de TPM (He e Lemasters, 2002). O primeiro modelo propõe uma interação física entre proteínas específicas necessárias para a constituição do poro de TPM. Conforme discutido, já foram propostas diversas proteínas como constituintes do poro, como o VDAC, hexoquinase, ANT e CyD (Halestrap et al., 1998; Crompton, 1999; Kroemer, 2003; Zoratti et al., 2005). No segundo modelo, proposto inicialmente pelo nosso laboratório (Fagian et al., 1990), há a formação de um aglomerado protéico, devido a ligações dissulfeto entre proteínas da membrana interna, que causaria alterações conformacionais na membrana que levariam à TPM (Fagian et al., 1990; Valle et al., 1993; Vercesi et al., 1997; Kowaltowski et al., 2001; Kim et al., 2003). Nesta proposta, não haveria a participação essencial de uma proteína específica na constituição do poro de TPM. Os dados desta tese, excluindo a participação de proteínas específicas da membrana no poro de TPM. corroboram com o segundo modelo.

Em conclusão, o presente trabalho contribui para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na TPM por demonstrar que esse processo é independente de proteínas presentes na membrana mitocondrial externa.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altmann R. Die elementar organismen und ihre beziehungen zu den zellen. Leipzig 1890. Germany: Viet.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottieb RA, Dorn II GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature 2005; 434: 658-62.

Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molketin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. Nat Cell Biol. 2007; 9: 550-5

Banerjee J. & Ghosh S. Bax increase the pore size of rat brain mitochondrial voltage dependent anion channel in the presence of Bid. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 323: 310-4.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem. 1997; 272(33): 20313-6.

Bernardes CF, Meyer-Fernandes JR, Basseres DS, Castilho RF, Vercesi AE. Ca²⁺dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). Biochim Biophys Acta 1994; 1188(1-2): 93-100.

Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. J Biol Chem. 1992; 267(13): 8834-9.

Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. FEBS Lett. 1996; 396(2-3): 189-95.

Beutner G, Rück A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. Biochim Biophys Acta 1998; 1368(1): 7-18.

Blum MH, Beier H, Gross AJ. Improves silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 1987; 8: 93-9.

Borner C, The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Mol Immunol. 2003; 39: 615-47.

Boveris A, Oshino N, Change B. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem J. 1972; 128(3): 617-30.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J. 1973; 134(3): 707-16.

Breckenridge DG, Xue D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. Cell Biol. 2004; 16(6): 647-52.

Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclohier H, Reed JC, Kroemer G. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. Oncogene 2000; 19(3): 329-36.

Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE. 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. 1995; 18(3): 479-86.

Castilho RF, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca2+ plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. J Bioenerg Biomembr. 1996; 28(6): 523-9.

Colonna R, Massari S, Azzone GF. The problem of cation-binding sites in the energized membrane of intact mitochondria. Eur J Biochem. 1973; 34: 577-85.

Costantini P, Belzacq AS, Vieira HL, Larochette N, de Pablo MA, Zamzami N, Susin SA, Brenner C, Kroemer G. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. Oncogene 2000; 19(2): 307-14.

Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca2+, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. Eur J Biochem. 1988; 178(2): 489-501.

Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺ dependent pore in heart mitochondria activated by phosphate and oxidative stress. J Biochem. 1998; 255: 357-60.

Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM. The mitochondrial permeability transition pore. Biochem Soc Symp. 1999; 66: 67-79.
De Pinto V, Reina S, Guarino F, Messina A. Structure of the voltage dependent anion channel of the art. J Bionerg Biomembr. 2008; 40:139-47.

De Pinto V, Messina A, Lane DJR, Lawen A. Voltage-dependent anion selective channel (VDAC) in the plasma membrane. FEBS Lett. 2010; 584: 1793-99.

Du C, Fang M, Li Y, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome cdependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 2000; 102(1): 33-42.

Edmondson DE, Binda C, Wang J, Upadhyay AK, Mattevi A. Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. Biochemistry 2009; 48(20): 4220-30.

Fagian MM, Pereira da Silva L, Martins I S e Vercesi AE. Membrane protein thiol crosslink associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants. J Biol Chem. 1990; 265: 19955-60.

Gornall AG, Bardwill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J Biol Chem. 1949; 177: 751-66.

Green DR, Reed CJ. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281, 5381: 1309-12.

Greenawalt JW. The isolation of outer and inner mitochondrial membranes. Methods Enzymol. 1974; 31:310-23.

Grijalba MT, Vercesi AE, Schreier S. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. Biochemistry 1999; 38(40):13279-87.

Grivicich I, Regner A, Rocha, AB. Morte cellular por apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia 2007; 53(3): 335-43.

Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Am J Physiol. 1990; 258: 755-86.

Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. J Biol Chem. 1997; 272(6): 3346-54.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. Biochim Biophys Acta 1998; 1366(1-2): 79-94.

Halestrap AP, Mc Stay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. Biochimie 2002; 84: 153-66.

Halestrap AP. Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? Nature 2004; 26; 430(7003).

Halestrap AP. A pore way to die. Nature 2005; 434: 578-9.

Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? J Mol Cell Cardiol. 2009; 46(6): 821-31.

He L, Ludtke SJ, Worcester DL, Huang HW. Neutron scattering in the plane of membranes: Structure of alamethicin pores. Biophys J. 1996; 70: 2659-66.

He L, Lemasters JJ. Regulated and unregulated mitochondrial permeability pores: A new paradigm of pore structure and function? FEBS Lett. 2002; 512(1-3); 1-7.

Hermes-Lima M, Valle VG, Vercesi AE, Bechara EJ. Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. Biochim Biophys Acta 1991; 1056(1): 57-63.

Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function and permeability in calcium-treated mitochondria. J Biol Chem. 1976; 251: 5069-77.

Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺ induced membrane transition in mitochondria. The protective mechanisms. Arch Biochem Biophys.1979; 195(2): 453-9.

Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP, Sollott SJ. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. Ann NY Acad Sci. 2008; 1123: 197-212.

Kaplan RS, Pedersen NPL. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. J Biochem. 1983; 212: 279-88.

Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. Curr Mol Med. 2003; 3(6): 527-35.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 1997; 275:1132-6.

Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, Macgregor GR, Wallace DC. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. Nature 2004; 427(6973): 461-5.

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 Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate -stimulated lipid peroxidation. J Biol Chem. 1996A; 271(6): 2929-34.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. FEBS Lett. 1996B; 378(2): 150-2.

Kowaltowski AJ, Netto LE, Vercesi AE. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. J Biol Chem. 1998; 273(21): 12766-9.

Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Rad Biol Med. 1999; 26: 463-71.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett. 2001; 495(1-2): 12-5.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med. 2009; 47(4): 333-43.

Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 5752-7.

Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition in VDAC 1 (-/-) mitochondria. Biochim Biophys Acta 2006; 1757: 590-5.

Kroemer G. The mitochondrial permeability transition pore complex as a pharmacological target. An introduction. Curr Med Chem. 2003; 10(16): 1469-72.

Kroemer G, Galluzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev. 2007; 87: 99-163.

Kuznetsov A, Strobl D, Ruttmann E, Königsrainer A, Margreiter R, Gnaiger E. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. Analytical Biochemistry 2002; 305: 186-94.

Lê Quôc K, Lê Quoc D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. Arch Biochem Biophys. 1988; 265(2): 249-57.

Lee WK, Bork U, Gholamrezaei F, Thévenod F. Cd²⁺-induced cytochrome c release in apoptotic proximal tubule cells: role of mitochondrial permeability transition pore and Ca²⁺ uniporter. J Physiol Renal Physiol. 2004; 288: 27-39.

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

Lehninger AL, Reynafarje B, Vercesi A, Tew WP. Transport and accumulation of calcium in mitochondria. Ann NY Acad Sci. 1978; 28; 307: 160-76.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S & Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med. 1997; 185: 1481-6.

Leite AC, Oliveira HC, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. Biochim Biophys Acta 2010; 1797(6-7): 1210-6.

Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition: From biochemical curiosity to pathophysiological mechanism. Gastroenterology 1998; 115(3): 783-6.

Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochim Biophys Acta 1998; 1366: 177-96.

Lenartowicz E, Bernardi P, Azzone GF. Phenylarsine oxide induces the cyclosporin Asensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. J Bioenerg Biomembr. 1991; 23(4): 679-88.

Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitocondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and way play a key role in the permeability transition. J Biol Chem. 2008; 283: 26312-23.

Lewis MR, Lewis WH. Mitochondria in tissue culture. Science 1914; 39: 330-3.

Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease Physiol Rev. 2009; 89(3): 799-845.

Liu SC, Fairbanks G, Palek J. Spontaneous, reversible protein cross-linking in the human erythrocyte membrane. Temperature and pH dependence. Biochemistry 1977; 6; 16(18): 4066-74.

Liu SS. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Biosci Rep. 1997; 17(3): 259-72.

Liu X, Kim CN, Yang J., Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cellfree extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. Cell 1996; 86: 147-57

Loschen G, Azzi A, Flohé L. Mitochondrial H_2O_2 formation: Relationship with energy conservation. FEBS Lett. 1973; 33: 84-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-75.

Mannella CA. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. Biochim Biophys Acta 2006; 762(2): 140-7.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Rémy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G. The permeability transition pore complex: A target for apoptosis regulation by caspases and BcL-2-related proteins. J Exp Med. 1998; 187(8): 1261-71.

Merryfield ML, Lardy HA. Ca^{2+} -mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe²⁺ from rat liver mitochondria. J Biol Chem. 1982, 10; 257(7): 3628-35

Mitchel P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 1961; 191:144-8.

Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J Neurochem. 2006; 97: 1676-89.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature 2005; 434: 652-8.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3. ed. Worth Publishers 2000; New York, USA,

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

Neumann R, Hevey R & Abeles RH. The action of plasma amine oxidase on β -haloamines. Evidence for proton abstraction in the oxidative reaction. J Biol Chem. 1975; 250: 6362-7.

Nicholls DG, Åkerman KEO. Mitochondrial calcium transport. Biochim Biophys Acta 1982; 683: 57-88.

Nicholls DG, Ferguson SV. Proton current and respiratory control. Bionergetics, 3.3 ed. London: Academy Press Inc. 2002; p. 69-75.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci. 1997; 22: 299-306.

Nicotera P & Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. Cell Calcium 1998; 23: 173-80.

Novgorodov SA, Gudz TI, Zorov DB, Kushnareva IuE, Kudriashov IuB. The effect of cyclosporin A and oligomycin on the nonspecific permeability of the mitochondria inner membrane. Biokhimiia 1991; 56(3): 529-35.

Packer L. Size and shape transformations correlated with oxidative phosphorylation in mitochondria. J Cell Biol. 1963; 18: 487-94.

Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C.elegans. Nature 2001; 412: 90-4.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J Cell Physiol. 2002; 192(2): 131-7.

Robinson J, Cooper JM. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. Anal Biochem. 1970; 33: 390-9.

Rossi CS, Lehninger AL. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca⁺⁺ and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J Biol Chem. 1964; 239: 3971-80.

Santiago APSA, Chaves EA, Oliveira MF, Galina A. Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. Biochimie 2008; 90: 1566-77.

Schnaitman C, Erwin VG, Greenawalt JW. The submitochondrial localization of monoamine oxidase. J Cell Biol. 1967; 32: 719-35.

Schnaitman C, Greenawalt JW. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. J Cell Biol. 1968; 38(1): 158-75.

Shepherd D, Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. Biochem J. 1969; 114(3): 597-610.

Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. Prog Lipid Res. 2000; 39: 257-88. Schneider WC, Hogeboom GH. Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: A review. Cancer Res. 1951; 11:1-22.

Schulachev V. Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. FEBS Lett. 1996; 397: 7-10.

Shimizu S, Narita M & Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature 1999; 399: 483-7.

Szabò I, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. FEBS Lett. 1993; 330(2): 201-5.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion JE, Jacotot P, Costantini M, Loeffler N, Larochette DR, Goodlett R, Aebersold DP, Siderovski JM, Penninger & Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosisinducing factor. Nature 1999; 397: 441-6.

Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. Free Radic Biol Med. 1989; 6(1): 53-60.

Tabor CW, Tabor H, Rosenthal SM. Purification of amine oxidase from beef plasma. J Biol Chem. 1954; 208(2): 645-61.

Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010; 11(9): 621-32.

Teixeira BM, Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Inhibition of mitochondrial permeability transition by low pH is associated with less extensive membrane protein thiol oxidation. Biosci Rep. 1999; 19(6): 525-33.

Tikunov A, Johnson CB, Pediaditakis P, Markevich N, Macdonald JM, Lemasters JJ, Holmuhamedov E. Closure of VDAC causes oxidative stress and accelerates the Ca(2+)induced mitochondrial permeability transition in rat liver mitochondria. Arch Biochem Biophys. 2010; 15; 495(2): 174-81.

Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci Rep. 1997; 17(1): 3-8.

Valle VG, Fagian MM, Parentoni LS, Meinicke AR, Vercesi AE. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. Arch Biochem Biophys. 1993; 307(1): 1-7.

Vercesi AE. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)+ efflux from mitochondria. Biochem Biophys Res Commun. 1984; 119(1): 305-10.

Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. Biosci Rep. 1997; 17(1): 43-52.

Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Oliveira HC, Castilho RF. Mitochondrial Ca2+ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. Front Biosci. 2006; 11: 2554-64.

Vyssokikh MY, Brdiczka D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. Acta Biochim Pol. 2003; 50(2): 389-404.

Wallin A, Jones TW, Vercesi AE, Cotgreave I, Ormstad K, Orrenius S. Toxicity of S-Pentachlorobutadienyl-l-cysteine studied with isolated rat renal cortical mitochondria. Arch of Biochem and Biophysics 1987; 258: 365-72.

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. 1997; 1; 249(1): 52-60.

Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. Circ Res. 2003; 93: 292-301.

Wilson JE. Homologous and heterologous interactions between hexokinase and mitochondrial porin: evolutionary implications. J Bioenerg Biomem. 1997; 29: 97-102.

Woodfield K, Rück A, Brdiczka D, Halestrap AP. Direct demonstration of a specific interation between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. Biochem J. 1998; 336: 287-90.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Naekyung Kim C, Ibrado AM, Cai J, Peng T, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 1997; 275: 1129-32.

Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX, Kroemer G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. J Bioenerg Biomembr. 1997; 29(2):185-93.

Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A & Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. Cell Death Differ. 1999; 6: 644-51.

Zoratti M and Szabò I. The mitochondrial permeability transition. Biochimica Biophisica Acta 1995; 1241: 139-76.

Zoratti M, Szabò I, De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? Biochim Biophys Acta 2005; 1706(1-2): 40-52.

Zoratti M, De Marchi U, Biasutto L, Szabò I. Electrophysiology clarifies the megariddles of the mitochondrial permeability transition pore. FEBS Lett. 2010; 584(10): 1997-04.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J Biol Chem. 1999; 274: 11549-56.

7- ANEXO





Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº <u>1839-1</u>, sobre "<u>Transição de permeabilidade</u> <u>mitocondrial em mitoplastos de figado de rato</u>", sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi / Juliana Aparecida Ronchi</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em <u>04 de maio</u> <u>de 2009</u>.

CERTIFICATE

We certify that the protocol n° <u>1839-1</u>, entitled "<u>Mitochondrial permeability</u> <u>transition in mitoplasts of rat liver</u>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas -Unicamp) on <u>May 4, 2009</u>.

Campinas, 04 de maio de 2009.

A. Quarde

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva