

RICARDO GUANAES COSSO

*TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE INDUZIDA QUIMICAMENTE
POR OXIGÊNIO SINGLETE EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO
DE RATO OU PELO ESTADO OXIDADO DE NADPH EM
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE CAMUNDONGO
HIPERCOLESTEROLÊMICO POR INATIVAÇÃO DO
GENE DO RECEPTOR DE LDL*

CAMPINAS

2003

RICARDO GUANAES COSSO

***TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE INDUZIDA QUIMICAMENTE
POR OXIGÊNIO SINGLETE EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO
DE RATO OU PELO ESTADO OXIDADO DE NADPH EM
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE CAMUNDONGO
HIPERCOLESTEROLÊMICO POR INATIVAÇÃO DO
GENE DO RECEPTOR DE LDL***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de
Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: ANIBAL E. VERCESI

CO-ORIENTADORA: HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA

CAMPINAS

2003

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Docente: Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi

Instituição: Departamento de Patologia Clínica – Faculdade de Ciências Médicas –
UNICAMP

Docente: Prof. Dr. Dulcineia Saes Parra Abdalla

Instituição: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas - USP

Docente: Prof. Dr. Francisco R. M. Laurindo

Instituição: Unidade de Biologia Vascular do Instituto do Coração / HC - Faculdade de
Medicina - USP

Docente: Prof. Dr. Renato Atílio Jorge

Instituição: Departamento de Físico-Química - Instituto de Química - UNICAMP

Docente: Prof. Dr. Roger Frigerio Castilho

Instituição: Departamento de Patologia Clínica - Faculdade de Ciências Médicas –
UNICAMP

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciência Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Professor Anibal Eugênio Vercesi, e co-orientação da Professora Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-Unicamp).

“Quando as coisas não acontecem do jeito que a gente imagina, é porque vão acontecer melhor do que a gente pensa”

Leila Navarro

"O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer".

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha Mãe.

Tenho muito orgulho de ser seu filho

e devo-lhe tudo que sou hoje.

Ao Professor Anibal E. Vercesi, por todos os ensinamentos, pela dedicação e paciência, pelo monumental esforço em proporcionar material e ambiente adequados para meu desenvolvimento profissional e principalmente pela chance que me ofereceu a qual culminou na minha ascendência profissional.

A Prof. Helena Coutinho Franco de Oliveira pela co-orientação deste trabalho e pela ajuda cedida todas as vezes que precisei.

A amiga Dra Claudia Campos por toda ajuda, alegria e amizade, pela leitura e sugestões neste trabalho. Pessoas como você estão ainda em falta no mundo.

A FAPESP, CNPq e CAPES, pelo inestimável auxílio financeiro, e tudo o que ele trouxe.

À Dra. Márcia Fagian, pela ajuda na hora das compras e burocracias do dia a dia.

À futura Mestre e/ou Doutora Luciane Carla Alberici pela ajuda nos experimentos dos camundongos LDLR/-.

Ao Professor Paolo Di Mascio, do Instituto de Química da USP, pelo NDPO2 fornecido para os experimentos relacionados ao 1O2.

Aos colegas de laboratório Adriana, Alexandre, Alícia, Andréia Almeida, André, Celene, Chico, Cláudia, Denise, Evelise, Fabiane, Félix, Felipe, Giuliana, Graziela, Jesus, Luciane, Michely, Natália, Renata, Roger, Rosana, Solange, pela companhia, amizade, descontração, ajuda e festas.

Às técnicas, Edilene e Elisângela, pelo isolamento de mitocôndrias, preparo de algumas soluções e principalmente pelo companheirismo.

À Cris, pela dedicação e empenho, por ter transformado seus ouvidos em lixeira por algumas vezes, por ter agüentado meu estresse nos momentos mais difíceis deste trabalho, pelo carinho e companhia.

Ao pessoal do time de futebol que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos meus amigos mais chegados “extra-campo”, Sal, Rodolpho, Zé Renato, Joly, Fabi, Japa, Mario Augusto, Gordo, Pintas, Chico, Gaúcho, pelos momentos de descontração em todos estes anos que ajudaram a amenizar muitos momentos difíceis deste período.

Aos meus dois amigos que não se encontram mais neste plano, que se afastaram fisicamente de nós nestes últimos 4 anos, Chapéu e Endrigo, que Deus esteja com vocês.

A minha querida e orgulhosa Mãe, pelo amor e TOTAL dedicação não só oferecida a mim, mas a todos seus filhos. Hoje começo a compreender um pouco melhor suas atitudes de amor.

Aos meus irmãos Mônica, Sérgio e Denise, pela amizade, amor e preocupação durante toda a minha vida.

A minha afilhada Mariana e minha sobrinha Juliana, por terem trazido luz para nossa família, por me deixarem aprender o sentido verdadeiro do amor.

A minha avó Celeste, que sempre vibrou com a vitória de todos os seus netos.

Às minhas Tias Yeda e Ivany pelo apoio e torcida durante toda minha vida.

À Deus, nome pelo qual trato esta força divina, que me deu a chance de tentar evoluir neste curto período que me foi concedido neste mundo de provações.

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi$	potencial elétrico de membrana
ΔAbs	variação de absorbância α -ceto – alpha-cetoglutarato
$\beta\text{-OH}$	beta-hidroxibutirato
ΔpH	gradiente químico de prótons
$^1\text{O}_2$	oxigênio no estado singlete
AA	antimicina A
AT(D)P	adenosina tri (di) – fosfato
BSA	albumina soro bovina
CN^-	cianeto de potássio
CsA	ciclosporina A
D ₂ O	água deuterada
DCF	diclorofluoresceína
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DTT	ditiotreitól
EGTA	etileno glico – bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FCCP	carbonyl cyanide p-(Trifluoromethoxy)Phenyl-Hydrazone
H ₂ DCF	diclorodihidrofluoresceína
H ₂ DCF-DA	diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
Hepes	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])

HP	hematoporfirina
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDLR ^{-/-}	“knock out” do receptor de LDL
MFC	mitocôndria de fígado de camundongo
MFR	mitocôndria de fígado de rato
MnSOD	Mn–superóxido dismutase
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)
NDP - 3,3'	(1,4-naftilideno)dipropionato disódico
NDPO ₂	endoperóxido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropionato disódico
Pi	fosfato inorgânico
PTP	poro de transição de permeabilidade
Rot	rotenona
r _s	anisotropia
Suc	succinato
TMPD	N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno-diamina
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial
TPP ⁺	cloreto de tetrafenilfosfonio
UQ	Ubiquinona (forma oxidada)
UQH•	radical semiquinona
UQH ₂	Ubiquinona (forma reduzida)
ΔμH ⁺	gradiente eletroquímico de prótons

	PÁG.
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
1. INTRODUÇÃO	43
Cadeia respiratória.....	45
Produção de oxigênio reativo pela mitocôndria.....	49
Sistema antioxidante mitocondrial.....	50
Estresse oxidativo e transição de permeabilidade mitocondrial (TPM).....	55
Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).....	57
Fontes biológicas de $^1\text{O}_2$	60
Fontes químicas de $^1\text{O}_2$	60
Hipercolesterolemia e espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs).....	61
Colesterol e funções de biomembranas.....	65
Camundongos deficientes de receptor de LDL.....	66
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIAL E MÉTODOS	73
Animais.....	75
Isolamento de mitocôndrias hepáticas.....	75
Dosagem de proteína.....	76
Geração de $^1\text{O}_2$ por temodissociação de NDPO ₂	76

Procedimento de incubação padrão nos experimentos com NDPO ₂	77
Consumo de oxigênio mitocondrial.....	77
Transporte de cálcio por mitocôndrias.....	77
Determinação do conteúdo de grupos tiólicos protéicos.....	78
Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana mitocondrial com eletrodo de TPP ⁺	78
Medida de inchamento mitocondrial.....	79
Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio.....	80
Medidas do conteúdo de colesterol em mitocôndrias isoladas.....	80
Medidas de fluidez de membrana.....	81
Determinação do estado redox de NAD(P).....	81
Medida da atividade da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) pelo método de redução do citocromo c.....	82
4. RESULTADOS.....	83
Parte A: Transição de permeabilidade induzida quimicamente por oxigênio singlete em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	85
Efeito do ¹ O ₂ sobre a respiração mitocondrial.....	87
¹ O ₂ gerado a partir de NDPO ₂ induz queda de $\Delta\psi$ mantido pela oxidação de TMPD/ascorbato.....	89
Ciclosporina A, DTT, ADP, ou EGTA inibem a dissipação de $\Delta\psi$ induzida por ¹ O ₂	91
D ₂ O aumenta os efeitos do ¹ O ₂	93
Liberação de Ca ²⁺ mitocondrial induzida por ¹ O ₂	95
Oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial por ¹ O ₂	97

Parte B: Animais hipercolesterolêmicos por inativação do gene do receptor de LDL são mais susceptíveis a transição de permeabilidade mitocondrial que animais controles.....	99
Concentração plasmática de lípidos e glicose, controle respiratório e razão ADP/O em mitocôndrias de fígado de camundongos controles e deficientes de receptor de LDL (LDLR ^{-/-}).....	101
Susceptibilidade à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial em mitocôndrias extraídas de fígado de camundongos controles e LDLR ^{-/-}	102
Conteúdo de colesterol nas mitocôndrias de camundongos controle e “knock out”.....	108
Atividade da superóxido dismutase em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controle e LDLR ^{-/-}	111
Cinéticas de oxidação dos nucleotídeos de piridina (NP) endógenos por diamida em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controle e LDLR ^{-/-}	113
Efeito do Ca ²⁺ sobre o estado redox dos NP em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controle e LDLR ^{-/-}	113
Oxidação espontânea de NP endógenos em mitocôndrias de animais controles e LDLR ^{-/-}	114
Efeito do isocitrato sobre a susceptibilidade à abertura do PTP em mitocôndrias de fígado de camundongos controles e LDR ^{-/-}	114
5. DISCUSSÃO.....	119
6. CONCLUSÕES.....	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

	PÁG.
Tabela I: Efeitos do ADP e DTT sobre a oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial induzido por NDPO ₂	97
Tabela II: Concentrações plasmáticas de glicose, colesterol, triglicérides e ácidos graxos livres em camundongos controles e LDLR ^{-/-} em estado de jejum.....	101
Tabela III: Controle respiratório (CR e fosforilação oxidativa (ADP/O) em mitocôndrias de fígado de camundongos controle e LDLR ^{-/-}	101
Tabela IV: Conteúdo de colesterol e anisotropia (r) de mitocôndrias de fígado de camundongos controles e LDLR ^{-/-} carregadas com DPH (sonda de regiões apolares) e HP (sonda de regiões polares) antes e após purificação com percoll.....	109

	PÁG.
Figura 1: Versão simplificada da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria.....	46
Figura 2: Diagrama esquemático do mecanismo do ciclo Q do complexo III...	47
Figura 3: Componentes estruturais e o complexo da ATP sintase da mitocôndria.....	48
Figura 4: Esquema simplificado do sistema redox mitocondrial envolvendo os NP.....	52
Figura 5: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna.....	54
Figura 6: Versão simplificada dos orbitais moleculares da molécula diatômica de oxigênio e seus derivados.....	58
Figura 7: Representação dos orbitais moleculares do oxigênio singlete.....	58
Figura 8: Esquema da decomposição térmica de um endoperóxido gerando um hidrocarboneto, oxigênio triplete e oxigênio singlete.....	61
Figura 9: Interação de EROs e ERNs em vias sinalizadoras celulares e desenvolvimento de lesões aterosclerótica.....	64
Figura 10: Decomposição térmica do sal solúvel em água endoperóxido 3,3' – (1,4-naftilideno) dipropionato disódico (NDPO_1) produzindo o hidrocarboneto similar (NDP), oxigênio molecular no estado triplete ($\text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$) e oxigênio no estado singlete ($\text{O}_2 (^1\Delta_g)$).....	76

Figura 11:	Efeito do NDPO ₂ sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato (MFR).....	88
Figura 12:	Queda do potencial transmembrânico mitocondrial causada por NDPO ₂ : efeito do tempo de incubação.....	90
Figura 13:	Efeitos protetores de CSA, DTT, ADP e EGTA sobre a perda de $\Delta\Psi$ induzido por NDPO ₂	92
Figura 14:	Perda do potencial transmembrânico mitocondrial por NDPO ₂ : efeito de D ₂ ^o	94
Figura 15:	Transporte mitocondrial de Ca ²⁺ na presença de NDPO ₂	96
Figura 16:	Mudanças no $\Delta\Psi$ induzidas por Ca ²⁺ em mitocôndrias de fígado de camundongo (MFC) controle e LDLR ^{-/-}	103
Figura 17:	Inchamento mitocondrial induzido por Ca ²⁺ em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos (MFC) controle e LDLR ^{-/-}	105
Figura 18:	Mitocôndrias de fígado camundongos (MFC) e LDLR ^{-/-} retêm altas concentrações de Ca ²⁺ por menos tempo que mitocôndrias de animais controle.....	106
Figura 19:	Estímulo por Ca ²⁺ da geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio por mitocôndrias de camundongos controle e LDLR ^{-/-}	107
Figura 20:	Mudanças $\Delta\Psi$ induzidas por Ca ²⁺ em mitocôndrias de fígado de camundongo (MFC) controle LDLR ^{-/-} purificadas com Percoll.....	110
Figura 21:	Atividade da superóxido dismutase mitocondrial em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR ^{-/-} e controles.....	112
Figura 22:	Oxidação de nucleotídeos de piridina (NP) por diamida em mitocôndrias desenergizadas de fígado de camundongos (MFC) LDLR ^{-/-} e controles.....	115

Figura 23:	Efeito Ca^{2+} sobre o estado redox de NP em mitocôndrias de fígado de camundongos (MFC) $\text{LDLR}^{-/-}$ e controles.....	116
Figura 24:	Oxidação espontânea de NP endógenos em mitocôndrias de animais $\text{LDLR}^{-/-}$ e controles.....	117
Figura 25:	Mudanças no $\Delta\Psi$ induzidas por Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de camundongo (MFC) controle e $\text{LDLR}^{-/-}$	118
Figura 26:	Exportação de citrato gerado dentro da mitocôndria para o citosol para servir como fonte de acetil CoA para a biossíntese de ácidos graxos ou esteróides.....	128
Figura 27:	Representação esquemática das lançadeiras de malato-aspartato e α -glicerol fosfato.....	130



RESUMO

Oxigênio singlete molecular ($^1\text{O}_2$) gerado por decomposição térmica do 3,3-(1,4-naphthylidene) dipropionate endoperoxide (NDPO₂), inibiu a respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato sustentada por substratos dependentes de NADH ou por succinato, mas não por *N,N,N,N*-tetramethyl-*p*-phenylene-diamine (TMPD)/ascorbato. Nesta última condição, as mitocôndrias tratadas com NDPO₂ exibiram uma diminuição do potencial elétrico transmembrânico ($\Delta\Psi$) de maneira dependente do tempo de exposição ao NDPO₂. Este processo foi sensível aos inibidores da transição de permeabilidade mitochondrial (TPM) como EGTA, ditioneitol, ADP e ciclosporina A. A presença de óxido de deutério (D₂O), que aumenta a meia vida do $^1\text{O}_2$, aumentou significativamente a permeabilização promovida por NDPO₂. Além disso, a permeabilização mitocondrial induzida por NDPO₂ foi acompanhada por oxidação tiólica de proteínas de membrana sensível à DTT ou ADP. Estes resultados indicam que a TPM induzida por oxigênio singlete gerado quimicamente é mediada por oxidação de tióis de proteínas de membrana.

Verificou-se ainda neste trabalho que mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos por inativação do gene do receptor de LDL, apresentaram controle respiratório e razão ADP/O similares às mitocôndrias isoladas a partir de camundongos controles, mas exibiram maior suscetibilidade a desenvolver TPM induzida por Ca^{2+} . Esta maior susceptibilidade à TPM parece ser consequência do estado mais oxidado de NADP mitocondrial nos camundongos hipercolesterolêmicos.



ABSTRACT

Pure singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) generated by thermal decomposition of the 3,3-(1,4-naphthylidene) dipropionate endoperoxide (NDPO₂), inhibited respiration of isolated rat liver mitochondria supported by NADH-linked substrates or succinate, but not by *N,N,N,N*-tetramethyl-*p*-phenylene-diamine (TMPD)/ascorbate. Under the latter condition, mitochondria treated with 2.7mM NDPO₂ exhibited a decrease in transmembrane potential ($\Delta\Psi$) in manner dependent on NDPO₂ exposure time. This process was sensitive to the mitochondrial permeability transition (MPT) inhibitors EGTA, dithiothreitol, ADP, and cyclosporin A. The presence of deuterium oxide (D₂O), that increases $^1\text{O}_2$ lifetime, significantly enhanced NDPO₂-promoted mitochondrial permeabilization. In addition, NDPO₂-induced mitochondrial permeabilization was accompanied by DTT or ADP-sensitive membrane protein thiol oxidation. Taken together, these results provide evidence that mitochondrial permeability transition induced by chemically generated singlet oxygen is mediated by the oxidation of membrane protein thiols.

In this work it was also observed that liver mitochondria isolated from hypercholesterolemic LDL receptor knock out mice present respiratory control and ADP/O ratio comparable to control mitochondria, but exhibit higher susceptibility to develop Ca²⁺ induced MPT. This higher susceptibility to develop MPT seems to be the consequence of a more oxidized state of mitochondrial NADP.



1. INTRODUÇÃO

Cadeia respiratória

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o O_2 à H_2O . Esta energia é utilizada pela ATP sintetase para fosforilar ADP à ATP. Assim, é a cadeia respiratória que controla a energia redox necessária para gerar este potencial de membrana mitocondrial e promover a fosforilação oxidativa.

Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas NADH e $FADH_2$, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à NADH desidrogenase (complexo I, Figura 1). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH_2). 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 oxiredutase (como resultado da β -oxidação de ácidos graxos). A UQH_2 é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona ($UQH^\bullet$), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos separados de $UQH^\bullet$, um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de $UQH^\bullet$ são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo c (ver Figura 2). O citocromo c transfere elétrons à citocromo oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (Nicholls e Ferguson, 2002).

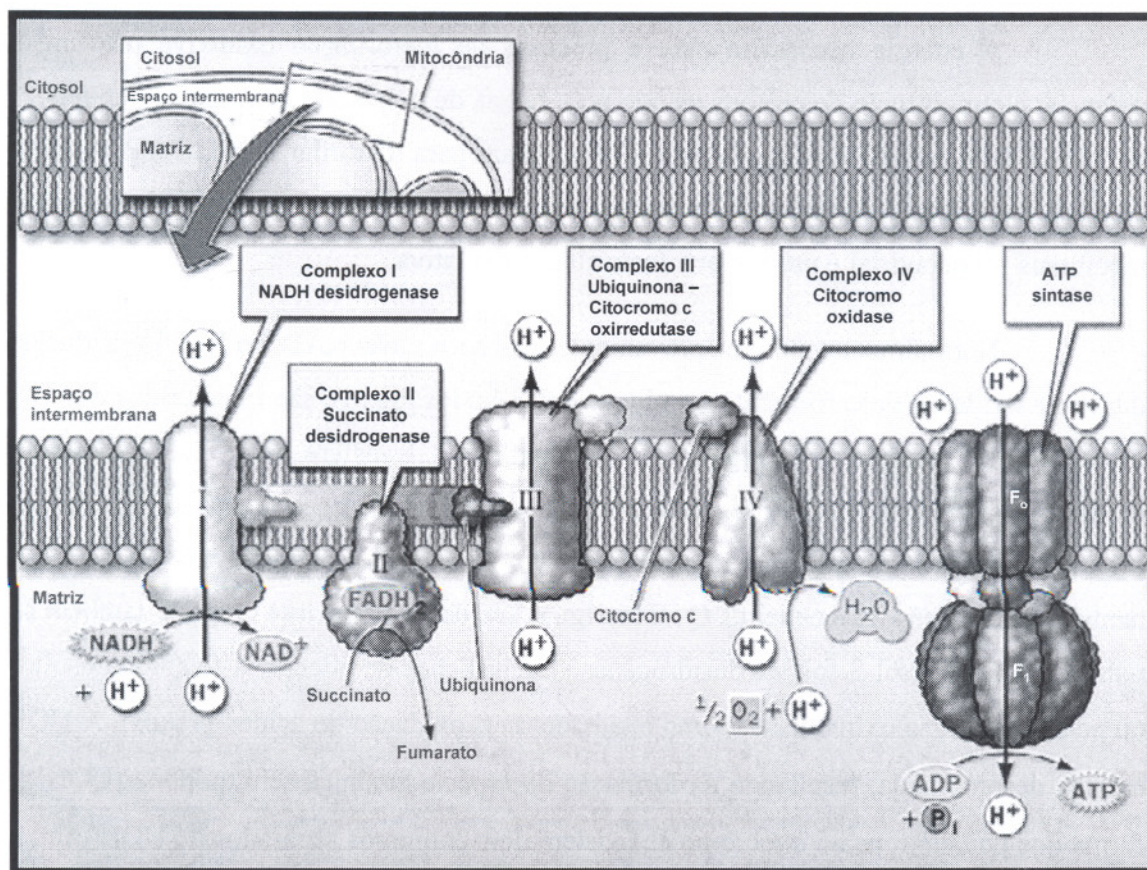


Figura 1. **Versão simplificada da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria** (Lehninger, 2000). Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto elétrico ($\Delta \Psi$). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem reentrar na matriz através de canais específicos de prótons (F_o). A força próton-motora que impulsiona os prótons de volta para a matriz fornece a energia para a síntese do ATP, catalisada pelo complexo F_1 associado com F_o .

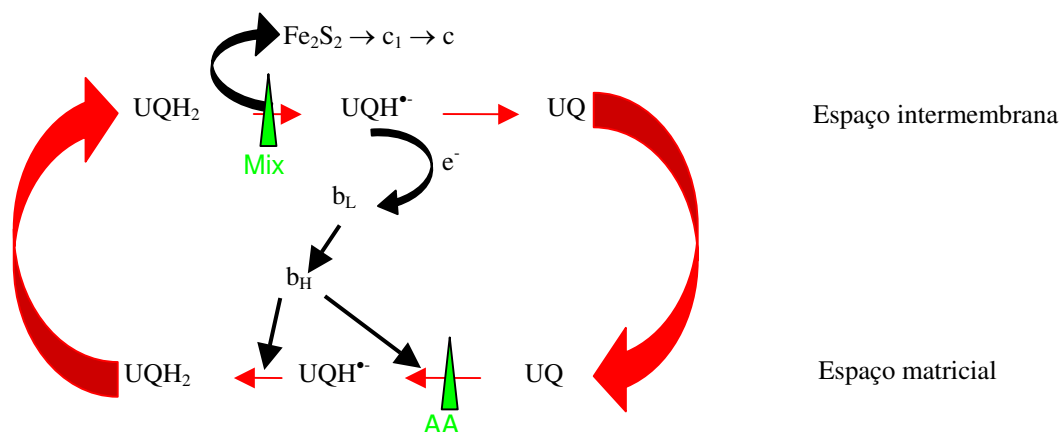


Figura 2. **Diagrama esquemático do mecanismo do ciclo Q do complexo III** (Schultz e Chan, 2001). UQ: ubiquinona; $UQH^{\bullet-}$: ubisemiquinona; UQH_2 : ubiquinol; b_L e b_H : hemes b_{565} e b_{560} do citocromo c; Fe_2S_2 : cluster da proteína ferro-enzofre; c_1 : citocromo c_1 ; c: citocromo c. Os triângulos representam os sítios respiratórios inibidos por mixotiazol (Mix) e antimicina A (AA).

Segundo Mitchell (1961), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia. O componente elétrico ($\Delta\psi$) deste potencial 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. O fluxo de H^+ através da F_0F_1 -ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado à fosforilação do ADP por P_i . A ATP sintetase, responsável por esta reação, é constituída de duas regiões bem distintas denominadas F_1 , solúvel e localizada na matriz mitocondrial e região F_0 , hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna, onde estão também localizados os complexos da cadeia respiratória. O fator F_1 contém o sítio catalítico e é composto por 3 subunidades α , 3 β , 1 γ , 1 δ e 1 ϵ . Estas três últimas estão envolvidas na interação entre F_1 e F_0 e os 3 sítios catalíticos estão

entre as subunidades α e β . Fo constitui o canal para a passagem de H^+ e é também composto por 3 tipos de subunidades (Figura 3).

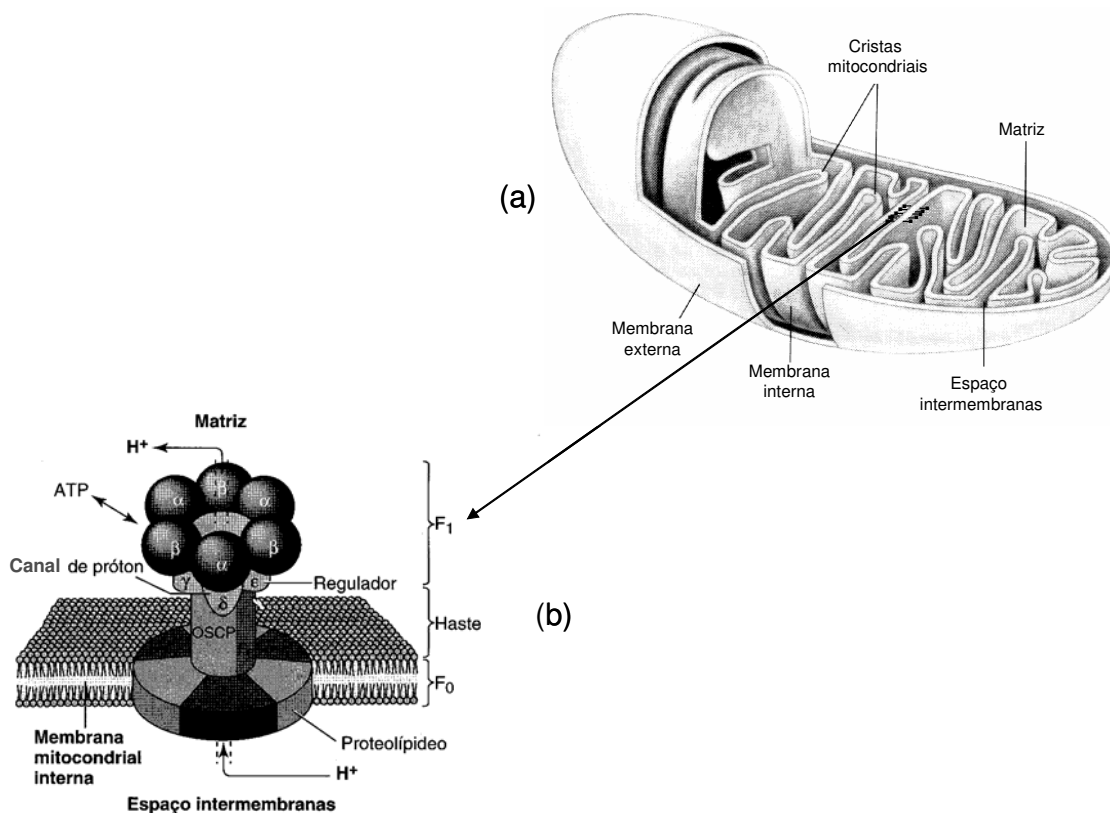


Figura 3- Componentes estruturais e o complexo da ATP sintase da mitocôndria (Devlin, 1997). (a) Esquema de uma mitocôndria. As cristas da membrana interna conferem-lhe uma área de superfície muito grande. (b) Diagrama esquemático mostrando a organização das subunidades para formar a parte F₀ condutora de prótons e a unidade F₁ sintetizadora de ATP. O complexo F₁ consiste de três subunidades α , três β e uma γ , uma δ e uma ϵ .

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente este mecanismo é fundamental, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese de ATP em cloroplastos. Além disso, este gradiente pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem a participação de ATP. São exemplos deste mecanismo de acoplamento direto as trocas eletroforéticas de ATP^{4-} por ADP^{3-} , a redução de NAD(P)^+ pela transidrogenase específica e a captação eletroforética de Ca^{2+} que transporta duas cargas positivas para o interior da mitocôndria.

Produção de oxigênio reativo pela mitocôndria

O funcionamento da cadeia de transporte de elétrons que reduz continuamente oxigênio para formar o potencial eletroquímico transmembrana de prótons necessário para a síntese de ATP, tem um importante efeito colateral para as células: a constante geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Quando se leva em conta a complexidade do processo de transferência de elétrons através da cadeia respiratória, é surpreendente que somente de 1 a 5% 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 radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Boveris e Chance, 1973; Liu, 1997; Turrens, 1997). Devido ao contínuo funcionamento da cadeia respiratória, o vazamento de 1 a 5% de elétrons é suficiente para fazer com que a geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mitocondrial seja a maior fonte celular de EROs na maioria dos tecidos (Liu, 1997; Turrens, 1997).

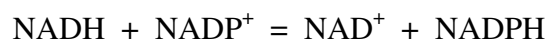
O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode ser gerado principalmente pela NADH desidrogenase (Boveris e Chance, 1973; Turrens e Boveris, 1980) e pela coenzima Q (Boveris e Chance, 1973; Cadenas et al., 1977; Turrens et al., 1985) (ver Figuras 1 e 2). Na reação de redução de oxigênio pela citocromo oxidase não ocorre produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ porque esta enzima liga-se fortemente aos intermediários de oxigênio reduzidos parcialmente, prevenindo a liberação destes intermediários antes da redução total ser alcançada (Turrens, 1997).

A produção de $O_2^{\bullet-}$ no complexo I é promovida pelos substratos dependentes de NAD tais como malato, glutamato, e piruvato e estimulada por rotenona, um inibidor da transferência de elétrons do complexo I à coenzima Q (Turrens e Boveris, 1980; Turrens, 1997). O vazamento de elétrons da cadeia respiratória na coenzima Q ocorre provavelmente durante a doação de elétrons do ânion semiquinona, que é um radical livre por si só, para o oxigênio. O vazamento de elétrons neste ponto é estimulado por succinato, cianeto, e antimicina A (Boveris et al, 1976; Cadenas et al., 1977; Kowaltowski et al., 1998; Turrens, 1997; Turrens et al., 1985). A antimicina A tem notadamente um grande papel estimulatório, porque bloqueia a formação de $UQH^{\bullet}$ na face matricial da membrana mitocondrial interna, promovendo um acúmulo de ânions semiquinona formados anteriormente na face citosólica da membrana mitocondrial interna (Figura 2). Mixotiazol, um inibidor da formação da $UQH^{\bullet}$ na face citosólica da membrana interna mitocondrial, previne a geração de $O_2^{\bullet-}$ neste ponto (Cadenas e Boveris, 1980; Dawson, 1993; Hansford et al., 1997; Kowaltowski et al., 1998; Turrens, 1997; Turrens et al., 1985).

As EROs geradas pelas mitocôndrias têm sido implicadas em muitos processos degenerativos, incluindo envelhecimento e morte celular necrótica e apoptótica (Green e Reed, 1998; Kowaltowski e Vercesi, 1999; Lemasters et al., 1998; Zamzami et al., 1996).

Sistema antioxidante mitocondrial

Como a geração mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ é um processo contínuo e fisiológico, a mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante. A mitocôndria contém Mn-superóxido dismutase (MnSOD) (Doonan et al., 1984) capaz de promover a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 . A mitocôndria também contém glutathione peroxidase (Sies e Moss, 1978; Zakowski e Tappel, 1978), uma peroxidase tiólica capaz de remover H_2O_2 usando glutathione como substrato. A forma oxidada da glutathione pode ser recuperada pelo NADPH através da glutathione redutase. Com respeito a $NAD(P)^+$ transidrogenase dependente de energia na membrana mitocondrial interna, esta tem um papel essencial no mecanismo de defesa contra estresse oxidativo (Hoek e Rydstrom, 1988), pois ela catalisa a transferência reversível de hidreto entre NADH e $NADP^+$, segundo a reação:



Esta enzima pode funcionar como uma bomba de prótons, utilizando o gradiente eletroquímico de H^+ gerado pela respiração para deslocar o equilíbrio da reação acima na direção da produção de NADPH, garantindo uma fonte de equivalentes de redução para regenerar glutathione reduzida. Esta propriedade acopla o estado redox do par $NADP^+/NADPH$ ao potencial de membrana mitocondrial. Portanto, a falta de energia gerada pelo desacoplamento ou pela queda de potencial de membrana diminui a atividade da transidrogenase dependente de energia. Deste modo, a enzima não é capaz de manter o NADPH na forma reduzida resultando em uma condição de estresse oxidativo. De fato, tratamentos com oxidantes de nucleotídeos de piridina (NP) em mitocôndrias carregadas com Ca^{2+} resultam em um severo dano oxidativo à organela (Vercesi et al., 1997). Isto foi evidenciado por estudos anteriores mostrando que acúmulo e retenção de Ca^{2+} mitocondrial foi favorecido pelo estado reduzido dos NP, uma vez que a oxidação destes nucleotídeos foi seguida pela liberação do Ca^{2+} acumulado (Lehninger et al., 1978). Esta liberação de Ca^{2+} foi mais tarde associada com a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), uma forma não específica de permeabilização da membrana interna causada por estresse oxidativo (Vercesi et al., 1997). Um esquema resumido do papel dos NP na defesa antioxidante mitocondrial é mostrado na Figura 4.

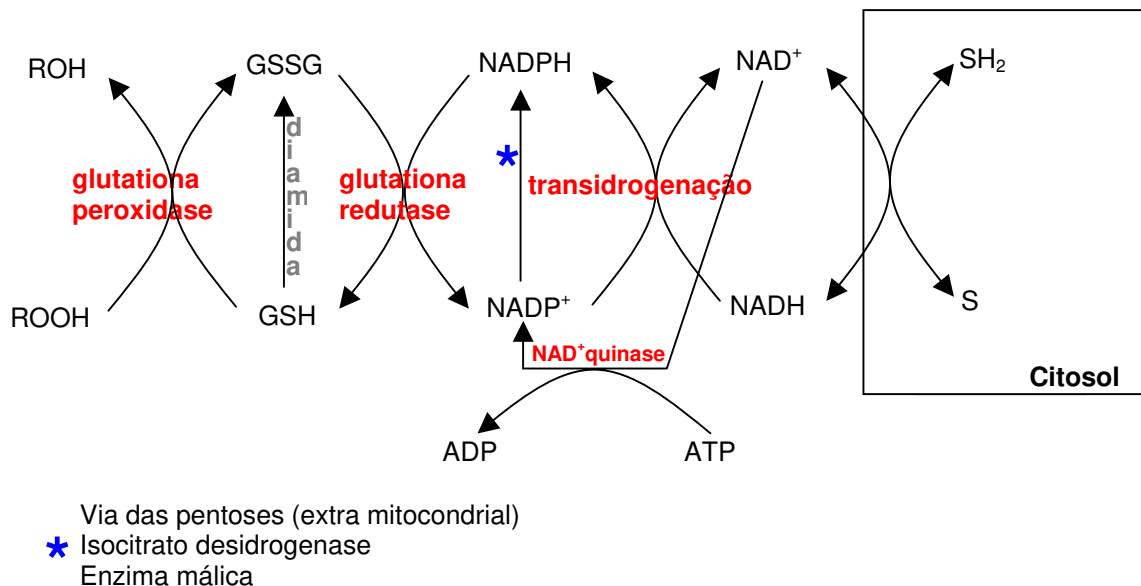


Figura 4. **Esquema simplificado do sistema redox mitocondrial envolvendo os NP** (Kehrer e Lund, 1994).

A mitocôndria também contém antioxidantes solúveis em lipídios tais como α -tocoferol (vitamina E) e UQH₂, sendo ambos potentes inibidores da peroxidação lipídica mitocondrial (Ernster et al., 1992).

O citocromo c é um outro componente mitocondrial que pode agir como um antioxidante (Revisão: Skulachev, 1998). Perda de citocromo c mitocondrial, um “disparador” de apoptose em muitos sistemas, estimula a geração de O₂^{•-} (Cai e Jones, 1998). A forma oxidada do citocromo c pode receber um elétron do O₂^{•-}, convertendo-o novamente à O₂. É interessante que neste processo o elétron “perdido” pode voltar à cadeia de transporte de elétrons.

A citocromo oxidase (complexo IV), um outro componente da cadeia respiratória, promove o catabolismo de NO[•] à NO₂⁻ e NO₃⁻, que não somente remove NO[•], mas também previne a formação de peroxinitrito (ONOO⁻) (Giulivi, 1998).

O H_2O_2 difunde-se facilmente para o meio extramitocondrial através das membranas biológicas, onde pode ser removido por antioxidantes citosólicos tais como catalase (Valle et al., 1993; Kowaltowski et al., 1996A, 1996B, 1998) e tioredoxina peroxidase (Kowaltowski et al., 1998). A catalase tem sido detectada em mitocôndrias de coração (Radi et al., 1991). De fato, medidas de H_2O_2 em mitocôndrias de coração de rato requerem pré-tratamento com o inibidor de catalase aminotriazol (Korshunov et al., 1997). Também, algumas isoformas de tioredoxina peroxidases (capazes de remover H_2O_2 usando tióis reduzidos como substrato) estão localizadas na mitocôndria (Rigobello et al., 1998; Watabe et al., 1997).

Outra linha de defesa antioxidante mitocondrial são os resíduos de metionina das proteínas mitocondriais (Berlett e Stadtman, 1997). Estes resíduos geram sulfóxido de metionina quando oxidados, não comprometendo fortemente a funcionalidade das proteínas, e protegendo contra a oxidação de resíduos de cisteína, que resulta na ligação cruzada ditiólica e em grandes alterações na estrutura e função da proteína.

Como um todo, os componentes antioxidantes mitocondriais protegem a organela da maioria dos danos oxidativos durante condições fisiológicas. Quando a geração de EROs está aumentada e/ou a capacidade das defesas antioxidantes está exaurida, as mitocôndrias acumularão EROs e sofrerão as consequências do estresse oxidativo.

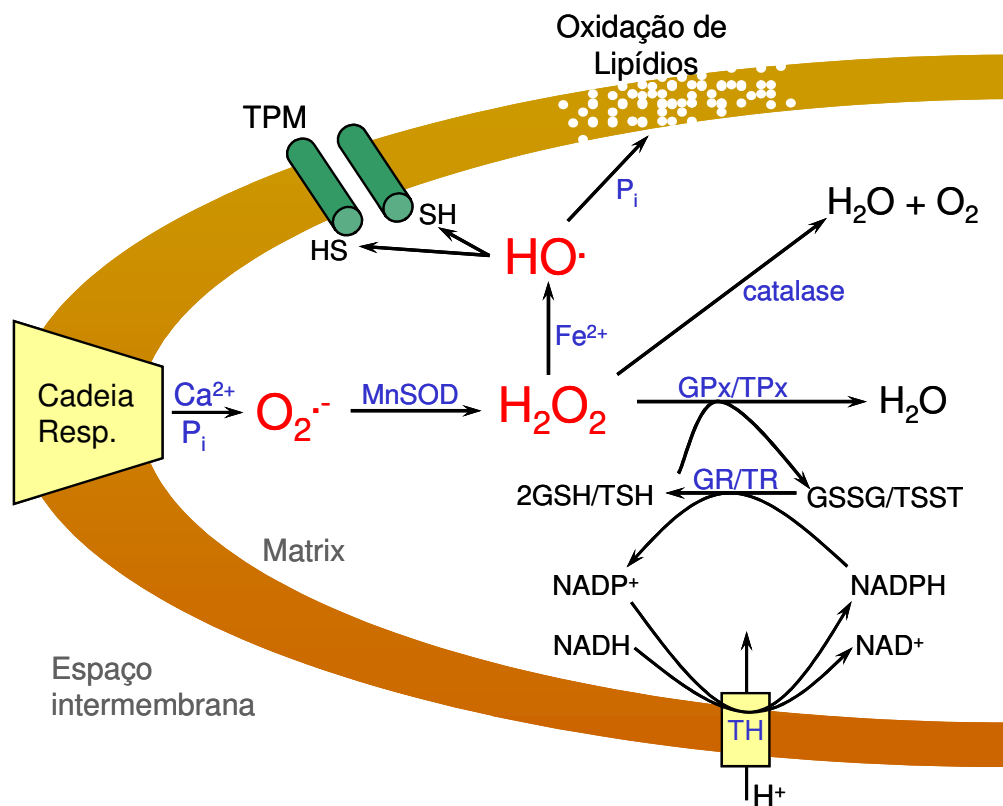


Figura 5. **Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna** (Kowaltowski et al., 2001). Acúmulo de EROs mitocondrial causa TPM. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$. Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de H_2O_2 . A H_2O_2 é então reduzido à H_2O pela glutathiona peroxidase (GP), tioredoxina peroxidase (TP) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GP, e TSH, oxidado pela TP, são recuperados pelo sistema enzimático glutathiona 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 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 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 $\text{OH}^\bullet$ altamente reativo. $\text{OH}^\bullet$ oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de TPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente, $\text{OH}^\bullet$ pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i .

Estresse oxidativo e transição de permeabilidade mitocondrial (TPM)

O Ca^{2+} parece ser o principal agente estimulador da geração mitocondrial de EROs (Kowaltowski e Vercesi, 1999). O Ca^{2+} intramitocondrial liga-se a cardiolipina na face interna da membrana mitocondrial interna causando alteração ultraestrutural da cadeia respiratória que facilita a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e conseqüentemente de H_2O_2 (Grijalba et al., 1999). Este lipídeo possui cabeça polar eletronegativa e está presente em altas concentrações (14-23%) na membrana mitocondrial interna em uma grande variedade de tecidos. Simultaneamente, o Ca^{2+} mobiliza Fe^{2+} na matriz mitocondrial que estimula a reação de Fenton e a produção de radical hidroxil que ataca tióis de proteínas, lipídeos e DNA mitocondrial (Merryfield e Lardy, 1982; Castilho et al., 1995; Vercesi et al., 1997). A diminuição de NAD(P)H e GSH causada por prooxidantes prejudica a eliminação de H_2O_2 pelas enzimas glutathione peroxidase (GP) e glutathione reductase (GR). Em contraste, a rápida difusão de H_2O_2 através da membrana mitocondrial permite seu consumo por catalase (CAT) extramitocondrial (Valle et al., 1993; Kowaltowski et al., 1996A, 1996B, 1998). Na presença de altas concentrações de fosfato inorgânico (Pi), a enolização de aldeídos (Indig et al., 1988) formados por lipoperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) leva a produção final de espécies tripletes que estimulam o processo de lipoperoxidação dos PUFA da membrana (Kowaltowski et al., 1996A, 1996B).

O conteúdo protéico das membranas mitocondriais varia entre 60 e 65%, e pode chegar a 75% na membrana mitocondrial interna (Lehninger, 1964; Nicholls e Ferguson, 2002). Devido ao alto conteúdo protéico da membrana mitocondrial interna, é esperado que estas proteínas sejam um dos principais alvos das EROs geradas pela mitocôndria. Realmente, as proteínas da membrana mitocondrial sofrem extensa oxidação em condições de estresse oxidativo mitocondrial induzido por Ca^{2+} (Fagian et al., 1990; Valle et al., 1993; Castilho et al., 1995, 1996; Kowaltowski et al. 1996A, 1996B). 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 mitocondrial, provavelmente, está associada à oxidação de resíduos de cisteína, com a formação de ligações cruzadas S-S (Fagian et al., 1990; Castilho et al., 1996).

As alterações oxidativas das proteínas da membrana mitocondrial interna, que ocorrem na presença de Ca^{2+} , levam a uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM, Zoratti e Szabò, 1995; Vercesi et al., 1997, ver Figura 5). A TPM é caracterizada por uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que gradativamente se torna permeável a prótons, íons, suporte osmótico e até mesmo pequenas proteínas. Esta permeabilização é dependente da presença de Ca^{2+} no espaço intramitocondrial, e é inibida por concentrações submicromolares de ciclosporina A, um imunossupressor (Crompton et al., 1988; Broekemeier et al., 1989), provavelmente devido à ligação da ciclosporina a ciclofilinas da membrana mitocondrial interna, que seriam necessárias para a abertura do poro da TPM (Connern e Halestrap, 1994; Nicolli et al., 1996). O nome "transição de permeabilidade" é utilizado devido à observação de que a permeabilização mitocondrial nesta situação pode ser parcialmente revertida pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou redutores ditiólicos logo após a permeabilização (Hunter e Haworth, 1979; Valle et al., 1993; Castilho et al., 1996).

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 (P_i , Rossi e Lehninger, 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 reagentes ditiólicos (Lenartowicz et al., 1991; Bernardes et al., 1994). A maioria destes indutores é composta capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial promovido pelo Ca^{2+} (Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 1996A, 1996B; Vercesi et al., 1997). A primeira evidência de que a TPM era causada por EROs geradas pela mitocôndria foi apresentada quando Lehninger e co-autores demonstraram que o estado oxidado de nucleotídeos de piridina estimulava o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial (Lehninger et al., 1978), resultados estes confirmados por trabalhos posteriores (Vercesi 1984A, 1984B; Vercesi e Pereira-da-Silva, 1984). Este efluxo foi posteriormente atribuído a uma permeabilização mitocondrial não específica (Nicholls e Brand, 1980). Os oxidantes de nucleotídeos de piridina promovem o acúmulo de H_2O_2 em mitocôndrias porque o sistema glutatona peroxidase/glutathione redutase mitocondrial é reduzido por nucleotídeos de piridina (Meister e Anderson, 1983; Chance et al., 1979). Posteriormente, experimentos

comprovando que a catalase, o-fenantrolina (quelante de Fe^{2+}) e a anóxia inibem a TPM induzida por Ca^{2+} e prooxidantes (Valle et al., 1993; Castilho et al., 1995) confirmaram que a TPM é dependente de EROs geradas pela mitocôndria. Peroxidasas tiólicas, como o ebselen e a proteína antioxidante específica para tióis (TSA) mostraram-se eficientes inibidores da TPM (Kowaltowski et al., 1998), reforçando ainda mais para esta hipótese.

O DNA mitocondrial (DNAm_t) encontra-se ligado à membrana mitocondrial interna e é particularmente sensível a lesões oxidativas devido à falta de histonas e mecanismos corretivos, e à presença de mecanismos de reparo incompletos (Clayton, 1984; Croteau e Bohr, 1997). De fato, a fragmentação de DNAm_t parece estar relacionada ao dano mitocondrial associado ao envelhecimento e as condições de estresse oxidativo descritas acima (Hayakawa et al., 1991). Como o DNAm_t codifica proteínas essenciais para a fosforilação oxidativa, a fragmentação de DNAm_t leva à disfunção mitocondrial, aumentando a geração de EROs pela cadeia respiratória e promovendo maior oxidação de DNAm_t, numa reação em cadeia que é finalizada pela apoptose (Ozawa, 1997).

Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é um estado eletronicamente excitado da molécula de oxigênio (Ogilby e Foote, 1983). Segundo a “Teoria do Orbital Molecular”, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados π_x^* e π_y^* . Esses elétrons tendem a possuir mesmo spin de forma a possuir um estado de mais baixa energia, conseqüentemente multiplicidade máxima. Essa é a razão pela qual o estado fundamental do oxigênio é um triplete. A Figura 6 apresenta, de forma simplificada, os orbitais moleculares da molécula diatômica de oxigênio e seus derivados.

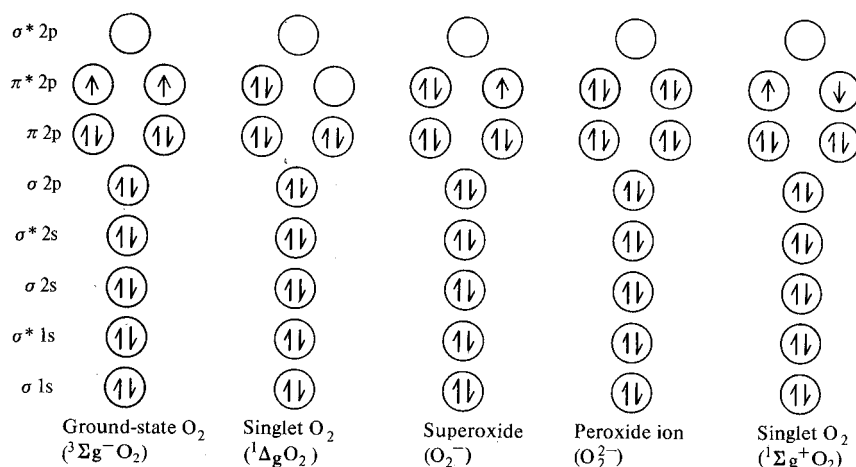


Figura 6. **Versão simplificada dos orbitais moleculares da molécula diatômica de oxigênio e seus derivados** (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Dos estados singletes, os que possuem energia intermediária ($^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$; 92,4 kJ mol⁻¹) são os responsáveis pela reatividade química do 1O_2 (Machado, 2000). A simetria dessas moléculas (ver Figura 7), diferente da do estado fundamental, lhes garante um considerável tempo de vida quando comparado com a forma de mais alta energia ($^1\Sigma$; 159,6 kJ mol⁻¹), que possui a mesma simetria do estado fundamental. Os estados $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ são degenerados e possuem uma distribuição eletrônica onde os elétrons que ocupam um dos orbitais antiligantes π^* se encontram em um dos planos mutuamente perpendiculares.

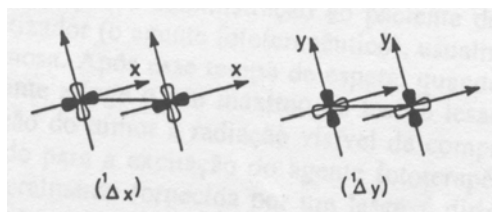


Figura 7. **Representação dos orbitais moleculares π_x^* e π_y^* relativos às formas $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ do oxigênio singlete** (Machado, 2000). Os lóbulos sombreados representam o orbital molecular antiligante que possui o par de elétrons.

Por serem degenerados, os estados $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ são, por conveniência, representados como sendo o estado $^1\Delta_g$. O orbital molecular vazio no estado $^1\Delta_g$ (ver Figura 7) garante ao oxigênio singlete caráter eletrofílico, o que favorece sua participação mais efetiva em reações químicas, principalmente no caso em que substratos possuem sítios ricos em elétrons. O estado $^1\Sigma_g^+$ decai rapidamente para o estado $^1\Delta_g$, por isso somente este último é geralmente considerado em sistemas biológicos. Embora $^1\Delta_g$ não seja um radical livre, ele pode ser formado através de algumas reações radicalares e pode levar à outras (Halliwell e Gutteridge, 2000).

O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em solução é profundamente influenciado pela natureza do solvente, pois ele pode transferir sua energia de excitação para o solvente, assim, seu tempo de vida depende em qual solvente ele é gerado. Seu tempo de vida em H_2O é aproximadamente $3,8\mu\text{s}$ e em D_2O é $62\mu\text{s}$, em hexano $31\mu\text{s}$ e em hexafluorbenzeno (C_6F_6) $3900\mu\text{s}$ (Halliwell e Gutteridge, 2000).

$^1\text{O}_2$ pode interagir com outras moléculas essencialmente por dois caminhos: pode reagir quimicamente ou transferir sua energia de excitação, retornando ao estado fundamental, excitando assim outras moléculas. Este último fenômeno é conhecido como supressão do oxigênio singlete. Várias moléculas são usadas em laboratório como supressores/sequestradores de oxigênio singlete; elas incluem histidinas, DABCO, azida e difenilisobenzofurano. Algumas vezes os dois caminhos ocorrem com a mesma molécula.

As reações químicas melhor estudadas de oxigênio singlete são aquelas envolvendo compostos que contêm ligações duplas $\text{C}=\text{C}$. Tais ligações estão presentes na maioria das moléculas biológicas, incluindo carotenóides, clorofilas e ácidos graxos. Compostos contendo ligações duplas separadas por uma ligação simples (ligações conjugadas) freqüentemente reagem resultando em endoperóxidos (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Fontes biológicas de $^1\text{O}_2$

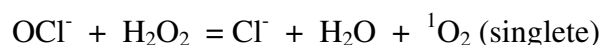
Mitocôndrias podem gerar $^1\text{O}_2$ (Costa et al., 1993; Kerver et al., 1997). Além disso, esta espécie reativa de oxigênio pode modificar várias funções biológicas como expressão gênica, fotoenvelhecimento e apoptose (Grether-Beck et al., 1996; Krutmann, 2000; Rytter e Tyrrell, 1998. Zhuang et al., 1999). $^1\text{O}_2$ é considerado também a maior fonte de EROs produzida em terapias fotodinâmicas (TFD), um novo procedimento terapêutico para o tratamento de tumores (Henderson e Dougherty, 1992; Ochsner, 1997; Weishaupt et al., 1976).

Várias doenças podem levar a uma formação excessiva de $^1\text{O}_2$. Por exemplo, as porfirias que são doenças causadas por defeitos na biossíntese do heme. Em algumas destas doenças (como na porfiria cutânea), porfirinas acumulam-se na pele e a exposição à luz causa danos levando a erupções cutâneas, cicatrizes e inchamento. A severidade do dano depende de qual porfirina é acumulada (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Várias drogas têm a propriedade de sensibilizar a formação de $^1\text{O}_2$ *in vitro*, incluindo algumas fenotiazinas (usados como tranqüilizantes) (Hassan e Khan, 1986), tetraciclina (antibióticos) (Hassan e Khan, 1986) e drogas antiinflamatórias, tais como carprofen (Bosca et al., 1997). O composto benoxaprofeno foi introduzido como agente antiinflamatório mas não é muito usado, em parte devido a sua fototoxicidade (Halliwell e Gutteridge, 2000). Tem sido sugerido também que vários constituintes de protetores solares e perfumes possam ser fotosensibilizadores (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Fontes químicas de $^1\text{O}_2$

Um sistema bem estabelecido freqüentemente usado para gerar $^1\text{O}_2$ em laboratório é a mistura de H_2O_2 e o íon hipoclorito OCl^- (Kanofsky, 1989):



A reação acima pode ser relevante biologicamente, uma vez que OCl^- é formado pela enzima mieloperoxidase (Schraufstatter et al., 1990). Contudo, HOCl/OCl^- já é altamente reativo, o que tem causado problemas na detecção de $^1\text{O}_2$ gerado por este sistema. A maioria das sondas para $^1\text{O}_2$ pode também ser oxidada por HOCl/ClO^- .

Um método limpo de produção de $^1\text{O}_2$ sem outras espécies reativas de oxigênio é a decomposição de endoperóxidos aromáticos, tais como endoperóxidos de naftaleno substituídos (Figura 8):

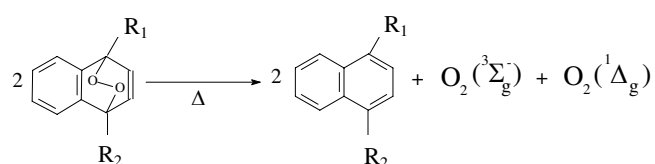


Figura 8. Esquema da decomposição térmica de um endoperóxido gerando um hidrocarboneto, oxigênio triplete e oxigênio singlete (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Geração de $^1\text{O}_2$ por este método tem sido usado para acessar os efeitos do $^1\text{O}_2$ sobre antioxidantes em plasma sanguíneo humano (Wagner et al., 1993). Exposição do plasma a um gerador de $^1\text{O}_2$ leva a perda de ascorbato, urato, grupos $-\text{SH}$ protéicos e bilirubina, mas não de α -tocoferol ou β -caroteno.

Hipercolesterolemia e espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs)

Embora a biossíntese *de novo* do colesterol ocorra em, virtualmente, todas as células, esta capacidade é maior no fígado, no intestino, no córtex adrenal e nos tecidos reprodutores, incluindo ovários, testículos e placenta (Devlin et al., 1997). Além da fonte de átomos de carbono, a biossíntese de colesterol requer um considerável poder redutor. Todos os átomos de carbono do colesterol são derivados do acetato proveniente da hidrólise de ligações tioéster de alta energia da acetil CoA e de ligações fosfoanidrido do ATP. Poder

reduzidor na forma de NADPH é fornecido principalmente pela glicose 6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, enzimas da via das pentoses.

Em condições fisiológicas, a síntese *de novo* de colesterol não é fator limitante para o funcionamento da maioria das células do corpo, mesmo na ausência de colesterol da dieta. Por outro lado, o acúmulo de colesterol intracelular é altamente citotóxico, uma vez que as células dos mamíferos não têm capacidade para degradar a molécula do colesterol. No entanto, as células desenvolveram um eficiente mecanismo homeostático de proteção contra o acúmulo de colesterol. Tal mecanismo foi elegantemente elucidado por M. Brown e J. Goldstein, laureados com o prêmio Nobel de Medicina em 1985 (Brown e Goldstein, 1986). Na vigência de aporte aumentado de colesterol, as células respondem com 3 ações contra-regulatórias principais:

- 1 - bloqueio da síntese *de novo* do colesterol, através da inibição da transcrição dos genes das enzimas hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) sintetase e HMG-CoA redutase. Esta última catalisa a etapa limitante da via da síntese do colesterol.
- 2 - bloqueio da principal via de entrada de colesterol exógeno na célula, através da inibição da transcrição do gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), principal transportador de colesterol nos seres humanos.
- 3 - aumento da esterificação do colesterol livre, através do aumento da atividade da enzima acil colesterol acil transferase (ACAT), evitando uma elevação do conteúdo de colesterol nas membranas celulares.

Assim, na condição de aporte aumentado de colesterol (dieta) ou na deficiência genética de receptores de LDL, o colesterol acumula-se nos compartimentos extracelulares, principalmente no sangue. A hipercolesterolemia resultante é um conhecido fator de risco primário para o desenvolvimento da aterosclerose.

A aterosclerose é uma doença da parede arterial que está associada com uma progressiva perda da função de células endoteliais e o acúmulo de macrófagos sobrecarregados de colesterol (Ross, 1999; Navab et al., 1995). Pesquisas recentes têm elucidado alguns dos mecanismos pelos quais a LDL natural pode ser convertida a uma forma modificada reconhecida pela família de receptores tipo “scavenger” de macrófagos e então desencadear a formação das células espumosas, características das lesões ateroscleróticas. Já é reconhecido que a modificação de resíduos de lisina presentes nas apoB (principal proteína das LDL) é uma via para a formação de LDL aterogênica e que reações oxidativas são um caminho biologicamente plausível para isto (Esterbauer et al., 1992; Darley-Usmar e Hassal, 1993; Yla-Herttuala et al., 1989; Palinski et al., 1989; Parthasarathy et al., 1986). Várias evidências sugerem que a maioria, se não todos, dos efeitos da LDL oxidada (oxLDL) são derivados de componentes de lipídios oxidados (Yong e Parthasarathy, 1994). Os lipídios “ativos” incluem peróxidos de lipídios esterificados ou não esterificados, lisofosfatidilcolina, produtos de oxidação de colesterol, aldeídos derivados da quebra de ácidos graxos esterificados e não esterificados, e talvez proteolipídios que podem possuir peróxidos de lipídios ligados a apoB-100 fragmentada (Steinbrecher et al., 1984).

A idéia central da hipótese de oxidação (ver Figura 9) (Berliner e Heinecke, 1996; Esterbauer et al., 1990) para o desenvolvimento de aterosclerose, é que espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) medeiam a modificação oxidativa de LDL e levam a formação de células espumosas (Berliner e Heinecke, 1996; Rubbo et al., 1996). Esta idéia é apoiada por estudos que demonstram a presença de LDL modificada *in vivo* e a habilidade que EROs e ERNs têm em converter lipoproteínas a uma forma potencialmente pró-aterogênica quando adicionados à LDL natural *in vitro* (Klatt e Esterbauer, 1996).

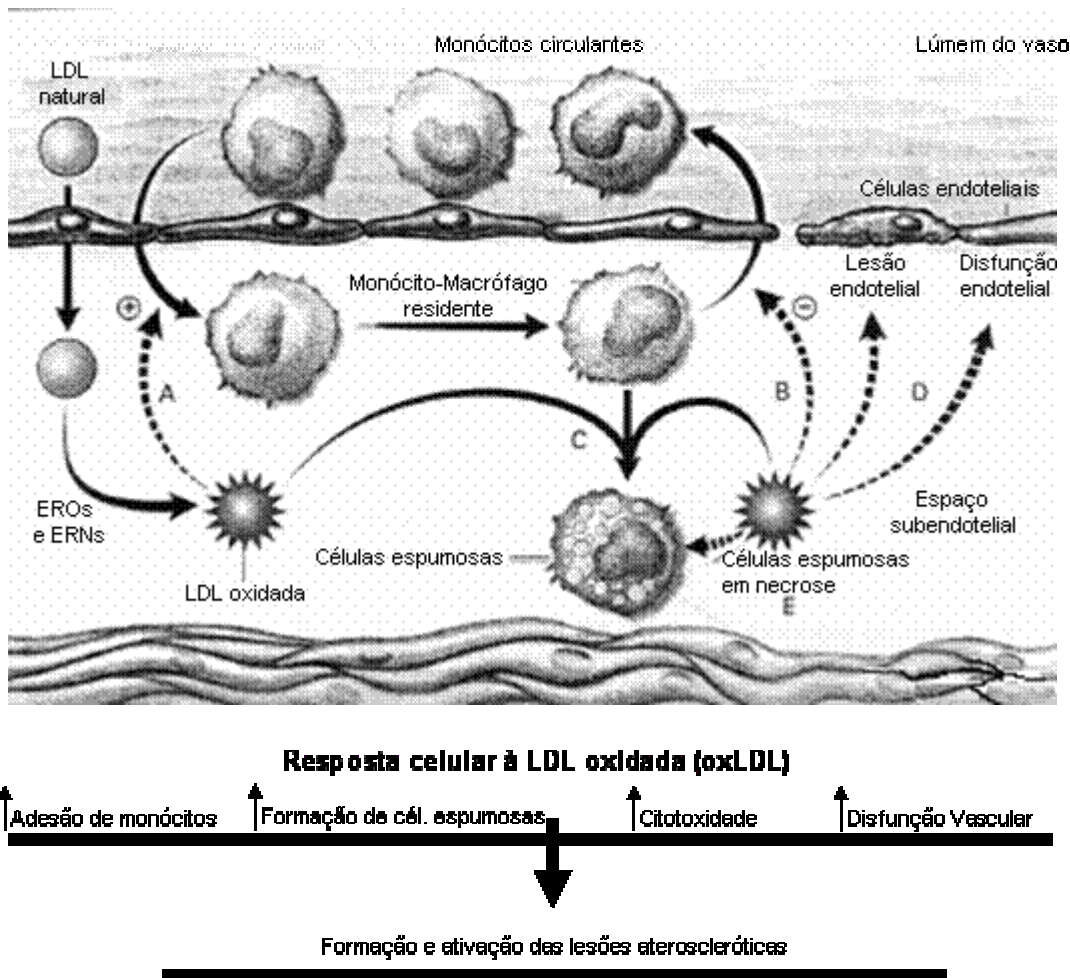


Figura 9. Interação de EROs e ERNs em vias sinalizadoras celulares e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Batlouni, 1997). Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio está intrinsicamente ligadas ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. A visão clássica, que é derivada de muitas observações experimentais, indica que EROs e ERNs oxidam a LDL localizada no espaço subendotelial nas artérias formando oxLDL. Por sua vez, esta oxLDL induz vários efeitos que levam ao desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Ross, 1999). Estes incluem, formação de células espumosas, recrutamento e adesão de monócitos ao endotélio, inibição da motilidade de macrófagos, proliferação de células musculares lisas, perda da resposta endotelial ao fator de relaxamento endotelial, e promoção de citotoxicidade. Observações mais recentes (Go et al., 1999; Suzuki e Forman, 1997) têm sugerido que este ponto de vista pode ser modificado incluindo-se efeitos diretos de EROs e ERNs nos processos de sinalização celular.

Como previsto pela hipótese oxidativa da aterosclerose, tratamentos que inibem a modificação oxidativa de LDL deveriam prevenir aterogênese. Vários compostos antioxidantes podem retardar aterogênese em modelos animais da doença (Carew et al., 1987; Bjorkhem et al., 1991; Tangirala et al., 1995; Cynshi et al., 1998;).

Dados *in vitro* com oxidação dependente de metais de transição, por ex: Cu^{2+} , têm mostrado que antioxidantes endógenos são consumidos antes da LDL se tornar a forma pró-aterogênica (Esterbauer et al., 1992). A extrapolação destes estudos para a parede vascular sugere que antioxidantes são esgotados em lesões ateroscleróticas (Niu et al., 1999; Witting et al., 1999).

Colesterol e funções de biomembranas

É cada vez mais evidente que muitas funções de biomembranas podem ser moduladas pela sua composição lipídica e por suas propriedades biofísicas (Stubbs et al., 1984). O colesterol, um dos principais componentes das membranas celulares, afeta de forma marcante as funções de muitas proteínas ligadas as membranas, incluindo a acessibilidade de receptores ou atividade de enzimas, canais e transportadores de membrana (Spector e Yorek, 1985).

Vários estudos sugerem que a concentração celular de colesterol e cálcio está intimamente relacionadas (Sorisky et al., 1990; Scherrer et al., 1991; Zhou et al., 1991; Tulenko et al., 1997). Um aumento de colesterol em membranas aumenta a microviscosidade destas, podendo facilitar o influxo e aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} em vários tipos de células, tais como células musculares lisas, endoteliais e plaquetas (Sorisky et al., 1990 e Zhou et al., 1991; Tulenko et al., 1997). Este pode ser um dos mecanismos pelos quais a hipercolesterolemia leva a aumento de sensibilidade dos vasos a vasoconstritores. Tais mudanças podem ter importância no aparecimento de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (Hughes et al., 1992, Brown e Goldstein., 1986, Fleischhacker et al., 2000).

Mudanças na composição lipídica, consistindo principalmente de diminuição da massa de fosfolípidos e de ácidos graxos poliinsaturados associados, foram observados em linfócitos de indivíduos hipercolesterolêmicos (Seres et al., 1996). Seres et al. (1996) observaram também que o conteúdo de colesterol e a concentração de cálcio livre intracelular foram significativamente aumentados nos linfócitos de indivíduos hipercolesterolêmicos.

Kochhar e Kaul (1992) constataram que pacientes hipercolesterolêmicos possuem atividade elevada de plaquetas. Observaram que um aumento no conteúdo de colesterol em plaquetas causa aumento significativo na atividade da fosfolipase A₂ que é acompanhado por uma diminuição no pH citoplasmático. Isso seria responsável por maior adesão e agregação plaquetária e redução do tempo de coagulação sanguínea nestes indivíduos.

Assim, todos esses relatos sugerem que a modificação do conteúdo do colesterol em membranas celulares, geralmente observada em situações de hipercolesterolemia, promove um desequilíbrio na homeostase celular do cálcio, e isso parece estar associado a disfunções de várias células, principalmente as circulantes e as que constituem os vasos sanguíneos.

Camundongos deficientes de receptor de LDL

Uma das principais vias de entrada do colesterol nas células é o receptor de LDL. Defeitos genéticos neste receptor levam à hipercolesterolemia e aterosclerose precoce em seres humanos (Brown e Goldstein, 1986).

Ishibashi et al. (1993) empregaram a técnica da recombinação homóloga em células embrionárias para produzir camundongos com o gene do receptor de LDL inativado e assim reproduziram o fenótipo da hipercolesterolemia familiar. Camundongos machos e fêmeas que não expressam receptor de LDL (camundongos LDLR^{-/-}) são viáveis e férteis. Sob dieta pobre em gordura e colesterol, os níveis de colesterol plasmático são duas vezes maiores que aqueles dos camundongos selvagens, devido a um aumento de sete a nove vezes nas lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e nas lipoproteínas de baixa

densidade (LDL), sem uma significativa mudança nas lipoproteínas de alta densidade (HDL). Os níveis de triglicérides são normais. O tempo de metabolização de IDL e LDL está aumentado em 30 vezes e 2 vezes respectivamente, mas de HDL é normal nos camundongos $LDLR^{-/-}$. O conteúdo de colesterol total no fígado não difere dos camundongos selvagens (Osono *et al.*, 1995).



2. OBJETIVOS

A ocorrência da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é estimulada por vários agentes indutores que incluem fosfato inorgânico, desacopladores, e prooxidantes. Sólidas evidências sobre papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) na mediação da oxidação de tióis protéicos de membrana na TPM têm sido obtidas por nosso grupo. O oxigênio singlete é uma espécie reativa de oxigênio que exibe alta reatividade com aminas, sulfetos, e lipídeos insaturados por ser bem eletrofílico e possuir uma meia vida relativamente longa (2-4 μ s em água e 400 μ s em CCl₄). Assim, investigamos se o oxigênio singlete está envolvido no processo de TPM em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

Vários trabalhos correlacionam hipercolesterolemia e EROs e concentração celular de colesterol e cálcio. Assim, este trabalho teve também como objetivo verificar o efeito de uma condição de hipercolesterolemia moderada *in vivo* sobre a susceptibilidade à TPM induzida por Ca²⁺ em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos deficientes de receptor de LDL e controles.



3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Camundongos hipercolesterolêmicos por inativação do gene do receptor de LDL (“knock out”), provenientes do laboratório Jackson (Bar Harbor, ME), foram mantidos no biotério do departamento de fisiologia e biofísica, UNICAMP. Como controle foram usados camundongos selvagens C57B16, a linhagem parental do “knock out” do receptor de LDL, adquiridos do CEMIB, UNICAMP.

Amostras de sangue dos camundongos em jejum por 12 horas foram colhidas do plexo retro-orbital de camundongos anestesiados (cetamina 50mg/kg, Parke-Davis e xilazina 16mg/kg, Bayer) usando tubos heparinizados. Glicose, triglicérides, colesterol total e ácidos graxos livres foram determinados no plasma usando métodos enzimáticos colorimétricos concordando com o manual do fabricante.

Nos experimentos relacionados ao efeito do $^1\text{O}_2$ foram utilizados ratos adultos Wistar.

Isolamento de mitocôndrias hepáticas

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos e camundongos adultos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo Schneider e Hogeboom (1950), após jejum de 12 hs. O fígado, retirado após a morte do animal por contusão cerebral, foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão HEPES 10,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500xg por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 10000xg sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em sacarose 250 mM, HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,3 mM, e novamente centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensão na mesma solução sendo que isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 50 mg de proteína por ml.

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% será utilizada como padrão.

Geração de $^1\text{O}_2$ por termodissociação de NDPO₂

Geração química de $^1\text{O}_2$ foi promovida usando o endoperóxido termodissociável NDPO₂ (Di Mascio e Sies, 1989). A decomposição química do composto solúvel em água NDPO₂ à NDP e oxigênio molecular produz metade do oxigênio no estado excitado (Figura 11) (Di Mascio et al., 1989). A velocidade máxima de geração de $^1\text{O}_2$ foi calculada pela medida da formação de NDP (Di Mascio et al., 1989). Por exemplo, 6 min depois da adição de 10 mM de endoperóxido, a velocidade máxima de geração de $^1\text{O}_2$ foi 38 $\mu\text{M}/\text{min}$ diminuindo para 10 $\mu\text{M}/\text{min}$ depois de 30 minutos. Assim, a $[^1\text{O}_2]$ no meio de incubação pode ser calculada como $31 \times 10^{-12} \text{ M}$ em 6 minutos e $8 \times 10^{-12} \text{ M}$ em 30 min depois da adição de NDPO₂ (Di Mascio et al., 1989).

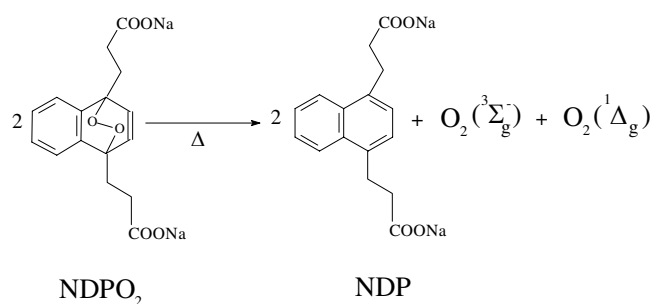


Figura 10. **Decomposição térmica do sal solúvel em água endoperóxido 3,3'-(1,4-nafitilideno)dipropionato disódico (NDPO₂) produzindo o hidrocarboneto similar (NDP), oxigênio molecular no estado tripleto ($\text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$) e oxigênio no estado singlete ($\text{O}_2 (^1\Delta_g)$) (Di Mascio et al., 1989).**

Procedimento de incubação padrão nos experimentos com NDPO₂

Com exceção da Figura 12 dos ensaios feitos com NDPO₂ (Parte A dos resultados), MFR (1,0 mg/mL) foram pré-incubadas em um meio padrão contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7.2), K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, rotenona 2 µM, antimicina A 1 µM, oligomicina 1 µM na presença de NDPO₂ 2,7 mM ou NDP 2,7 mM e de Ca²⁺ livre 14,5 µM. Como experimentos controles, foi feita a adição reversa de NDP à suspensão mitocondrial. Esta adição reversa consistiu de adições de NDPO₂ 2,7 mM ao meio de reação 4h antes da mitocôndria. NDPO₂ é totalmente degradado à NDP e O₂ dentro de 3 h à 30°C (Martinez et al., 2000).

Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio por mitocôndria foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado a oxígrafo Gilson, em uma câmara de vidro de 1,3 ml equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação é de 225 nmol/ml (Robinson e Cooper, 1970).

Transporte de cálcio por mitocôndrias

Variações nas concentrações de cálcio livre no meio de reação foram acompanhadas pela medida das mudanças no espectro de absorbância do indicador metalocrômico Arsenazzo III (40 µM) (Scarpa, 1979), usando-se o espectrofotômetro SLM Aminco DW 2000 nos comprimentos de onda 675 - 685nm à 30°C. As calibrações foram feitas pela adição sequencial de concentrações conhecidas de EGTA. A concentração inicial de Ca²⁺ foi obtida por espectroscopia de absorção atômica e as concentrações de Ca²⁺ depois de cada adição de EGTA foram calculadas conforme Vercesi e Docampo, 1992. Foi feita também uma titulação com adições de Ca²⁺ de concentrações conhecidas, ao invés da calibração com EGTA, em alguns experimentos.

Determinação do conteúdo de grupos tiólicos protéicos

Grupos tiólicos da membrana mitocondrial foram determinados usando ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (Reagente de Ellman) conforme descrito em Castilho et al., 1996 e Kowaltowski et al., 1997.

Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana mitocondrial com eletrodo de TPP⁺

O potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP⁺) entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, com eletrodo específico construído no laboratório de Bioenergética, Departamento de Patologia Clínica, FCM-UNICAMP, de acordo com Kamo et al. (1979). Neste eletrodo utiliza-se uma membrana de cloreto de polivinila (PVC) contendo tetrafenilborato (TPB⁻) como trocador de íons. Esta membrana foi preparada adicionando-se 3,0 ml de tetrafenilborato de sódio 10 mM (dissolvidos em tetrahidrofurano) a 10,0 ml de tetrahidrofurano contendo 0,5 g de cloreto de polivinila e 1,5 ml de dioctilftalato. A solução final foi colocada em placa de Petri de 60 cm² de área e o solvente evaporado lentamente à temperatura ambiente. A membrana assim obtida é transparente e possui de 0,15 a 0,20 cm de espessura. Um fragmento desta membrana foi colado, com o uso de tetrahidrofurano, à extremidade de um tubo de PVC (3,5 cm de comprimento / 0,5 cm de diâmetro) que, por sua vez, foi preenchido com TPP⁺ 1,0 mM ([TPP⁺]_{in}).

Este eletrodo de TPP⁺ foi conectado a um eletrodo de referência. Este eletrodo foi preparado a partir de um tubo de PVC, no qual uma das extremidades foi fechada com uma pequena camada de resina epóxi e preenchido com solução de KCl 3,0 M.

As concentrações de TPP⁺ no meio de reação foram monitoradas continuamente e os valores de $\Delta\psi$ calculados através da equação:

$$\Delta\psi = 2,3 RT/F \log v/V - 2,3 RT/F \log (10^{F\Delta E/2,3RT} - 1)$$

onde v representa o volume mitocondrial por mg de proteína, considerado 1,4 μ l (Kamo et al., 1979), V o volume do meio de incubação e ΔE o potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de TPP⁺ ([TPP⁺]_{in}/[TPP⁺]_{ex}) através da membrana, sendo que [TPP⁺]_{ex} refere-se à concentração de TPP⁺ no meio de reação. Esta equação é derivada

assumindo-se que a distribuição de TPP^+ entre as mitocôndrias e o meio segue a equação de Nernst (Muratsugu et al., 1977). Entretanto, uma quantidade significativa de TPP^+ se liga às membranas mitocondriais (Jensen et al., 1986) e os valores de potencial elétrico obtidos foram corrigidos utilizando-se a equação:

$$\Delta\psi = (\Delta\psi \text{ eletrodo} - 66,16 \text{ mV})/0,92$$

Os sinais do eletrodo (ΔE) foram quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de TPP^+ ao meio de reação (normalmente contendo substrato e 0,2 mM de fosfato). Os experimentos foram iniciados pela adição de 1,0 mg proteína mitocondrial/ml do meio de reação e realizados em câmara de vidro termostatzada (30°C), com agitação magnética, e eletrodo acoplado a um registrador potenciométrico (Kipp & Zonen, modelo BD121).

Suspensão mitocôndrial (1 mg/mL) foi incubada em meio de reação padrão contendo TPP^+ 3 μM . A concentração de TPP^+ no meio extramitocondrial foi monitorada continuamente com o eletrodo de íon seletivo.

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 conseqüente 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. As mitocôndrias são ideais à aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramento de suas pregas. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (Macedo et al., 1988) foi feito em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japão). As mitocôndrias de fígado de rato (0,5 - 1 mg de proteína/ml) foram incubadas no meio de reação, e os experimentos foram realizados a temperatura de 30°C.

Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio

A geração de EROs foi monitorada espectrofluorimetricamente, usando o corante permeável à membrana H₂-DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 1 μM) (LeBel et al., 1992; Garcia-Ruiz et al., 1997). Fluorescência foi monitorada em 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 nm. Calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), o produto da oxidação do H₂-DCF, que apresenta fluorescência a 525 nm quando excitado a 488 nm.

Medidas do conteúdo de colesterol em mitocôndrias isoladas

Mitocôndrias de fígado de camundongo (5 mg de proteína) foram tratadas 3 vezes com éter etílico (5 mL) com agitação por 3 minutos como descrito por Martinez et al. (1988). Depois desta extração com solvente, nenhum colesterol foi detectado na proteína remanescente. Juntou-se as três extrações de 5 mL e o extrato total foi seco sob N₂ e redissolvido em 250 μL de fase móvel usada na análise por HPLC. Foi adicionado hidroxitolueno butilado (BHT) (0,01%, m/v) como antioxidante no éter usado para a extração.

O colesterol foi separado de outros lipídeos por HPLC e quantificado por detecção no UV (210 nm), usando um sistema da marca Shimadzu composto de uma bomba modelo LC-10AD conectada a um auto-injetor modelo SIL 10AD/VP. O sistema foi equipado com uma coluna de fase reversa LUNA C18(2) (tamanho de partícula = 5 μm) (Phenomenex, Torrance, CA) protegida por uma pré-coluna Phenomenex C18 ODS 4 x 3,0 mm. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila (684 ml), tetrahidrofurano (220 ml), metanol (68 ml), e acetato de amônio 1% (m/v) (28 ml) à um fluxo de 1,0 ml/min. A aquisição de dados foi feita usando-se o programa de aquisição de dados Class-VP (Shimadzu).

A quantificação do colesterol foi feita através de uma curva de calibração que mostrou boa linearidade, com coeficiente de correlação bem próximo da unidade, na faixa de concentração dos experimentos (10 – 200 μg/ml).

Medidas de fluidez de membrana

Mudanças na fluidez de membranas mitocondriais de camundongos “knock out” e controle foram avaliadas por mudanças na anisotropia fluorescente (r_s) de corantes ligados à mitocôndria. Foram utilizados como sondas hematoporfirina (HP) e 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) que monitoram a fluidez de regiões diferentes da membrana lipídica. HP tem sido descrito acumular em regiões polares, localizadas e específicas da região lipídica, tais como regiões de proteínas na membrana mitocondrial interna (Ricchelli et al., 1995) e DPH monitora a fluidez de fases altamente hidrofóbicas (Kawato, 1977). HP 3 μ M e DPH 5 μ M foram adicionados em suspensões de mitocôndrias sob agitação contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, Hepes 10mM (pH = 7.2), K₂HPO₄ 2mM, MgCl₂ 1mM, rotenona 2 μ M e a mistura foi incubada por 5 minutos no caso do HP e mais de 1 hora no caso do DPH à 28°C antes de se medir a anisotropia.

Os valores de anisotropia foram obtidos pelas medidas de I_{vv} e I_{vh} , isto é, as intensidades do plano horizontal e perpendicular ao plano vertical da polarização da fonte de excitação, respectivamente. A anisotropia r_s foi definida pela equação:

$$r_s = (I_{vv} - GI_{vh}) / (I_{vv} + 2GI_{vh})$$

onde G é igual a I_{vh}/I_{hh} e é o fator de correção de artefatos instrumentais.

Quanto maior a anisotropia observada, menor é a fluidez da membrana.

Determinação do estado redox de NAD(P)

A oxidação ou redução de NP nas suspensões mitocondriais foram acompanhadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-4010 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japão) operando nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente, com a largura da fenda de 5 nm.

Medida da atividade da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) pelo método de redução do citocromo c

A velocidade de redução do citocromo c por radicais superóxido foi monitorada no comprimento de onda de 550 nm em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japão) utilizando o sistema xantina / xantina oxidase como fonte de $O_2^{\bullet-}$ conforme descrito por Flohé e Ötting (1984). SOD compete pelo superóxido e diminui a velocidade de redução do citocromo c.

Foram preparadas duas soluções:

Solução A. Preparou-se 5 μ mol (0,76 mg) de xantina em 10 mL de NaOH 0,001M. Adicionou-se esta solução e 2 μ mol (24,8 mg) de citocromo c em 10 mL de tampão fosfato (pH = 7,8) contendo 0,1 mM de EDTA. A solução é estável por 3 dias a 4°C.

Solução B. Preparou-se uma solução fresca de xantina oxidase em 0,1 mM de EDTA, ~ 0,4 U/mL. Como a atividade da xantina oxidase pode variar, deve-se usar enzima suficiente para produzir uma velocidade de redução de citocromo c de 0,025 unidades de absorbância / minuto nos experimentos sem SOD.

A solução B foi deixada no gelo, enquanto que a solução A foi termostatizada à 25°C. Pipetou-se 2,9 mL da solução A para uma cubeta de 3mL; adicionou-se 50 μ L da suspensão mitocondrial, contendo 0,5 mg de proteína mitocondrial ou 50 μ L de soluções padrões de SOD. O volume adicionado da suspensão mitocondrial foi previamente congelado em nitrogênio líquido e descongelado 3 vezes. Começou-se a reação com adição de 50 μ L da solução B; monitorou-se então a absorbância em 550 nm.

Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a velocidade de redução de citocromo c, sob as condições especificadas, em 50%.

Para as medidas de atividade da MnSOD relacionou-se os dados obtidos a partir das suspensões mitocondriais com as adições de padrões. Construiu-se um gráfico $1/\Delta Abs \text{ min}^{-1} \times [\text{padrões}]$, onde ΔAbs é a variação da absorbância observada, e com o auxílio da equação da reta obtida pode-se calcular a atividade da MnSOD das suspensões mitocondriais.



4. RESULTADOS

***Parte A: Transição de permeabilidade induzida quimicamente por oxigênio
singlete em mitocôndrias isoladas de fígado de rato***

Efeito do $^1\text{O}_2$ sobre a respiração mitocondrial

Para este experimento foi utilizado NDPO_2 como gerador de $^1\text{O}_2$. A Figura 11 mostra as velocidades da respiração desacoplada por FCCP e mantidas por α -cetoglutarato, succinato ou N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno-diamina (TMPD)/ascorbato. Os experimentos foram feitos a 30°C na presença de NDPO_2 2,7 mM (linha a), NDP 2,7 mM (linha b) ou na ausência de ambos (linha pontilhada). A velocidade de consumo de O_2 foi praticamente a mesma na presença e ausência de NDP (comparando-se a linha b com a linha pontilhada). NDPO_2 promoveu uma evidente inibição da respiração mantida por α -cetoglutarato e por succinato, mas não por TMPD/ascorbato. Considerando-se estes resultados, os experimentos seguintes, que tiveram o intuito de estudar os efeitos do NDPO_2 sobre a permeabilidade da membrana mitocondrial, foram realizados utilizando-se como substrato TMPD/ascorbato a fim de se manter a mesma energização entre as amostras tratadas e as controles.

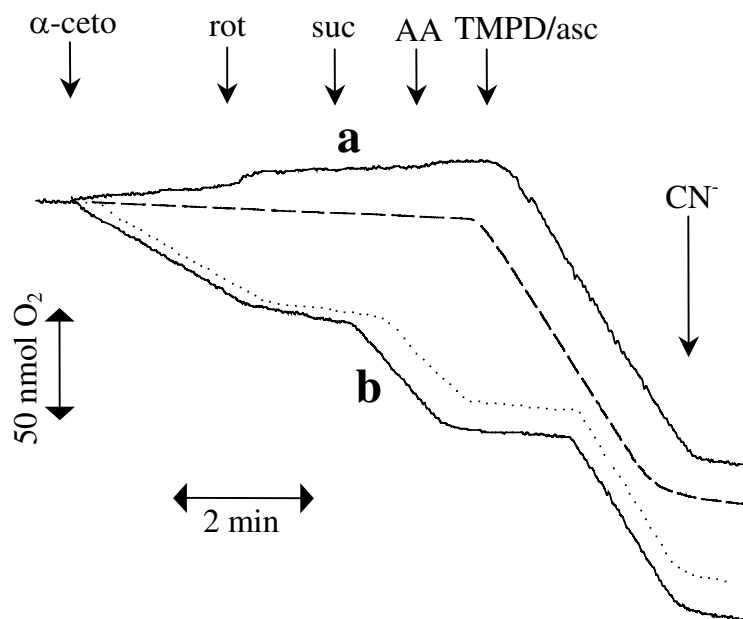


Figura 11. **Efeito do NDPO₂ sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato (MFR).** MFR (1,0 mg/mL, 30°C) foram preincubadas durante 3 min em 1.3 mL de meio de reação na presença de NDPO₂ 2,7mM (linha a), NDP 2,7mM (linha b) ou na ausência de ambos (linha pontilhada) todos contendo FCCP 1 μM. Foram adicionados onde indicado, α-cetoglutarato 10 mM, rotenona 2 μM, succinato 2 mM, antimicina A 2 μM, TMPD 100 μM/ascorbato 1 mM e KCN 2 mM. A linha tracejada contém mitocôndria (1mg/mL), α-cetoglutarato 10 mM, rotenona 2 μM, succinato 2 mM e antimicina A 2 μM.

Pode-se também notar que na presença de NDPO₂ houve um aumento contínuo na concentração de oxigênio no meio, o que é certamente resultado da decomposição do NDPO₂. Quando se compara o experimento na presença de NDPO₂ (linha a) com um controle feito com mitocôndria incubada na sua ausência (linha tracejada) é possível observar que a velocidade de produção de O₂ a partir de NDPO₂ (5nmol O₂/min) foi linear durante todo o período de observação. Este valor está de acordo com o descrito por Di Mascio et al., (1989).

¹O₂ gerado a partir de NDPO₂ induz queda de $\Delta\psi$ mantido pela oxidação de TMPD/ascorbato

Os experimentos representados na Figura 12 indicam que a queda de $\Delta\psi$ mantido pela oxidação de TMPD/ascorbato foi gradualmente aumentada com o passar do tempo de incubação com NDPO₂. Uma diminuição na capacidade da mitocôndria para sustentar o $\Delta\psi$ pode ser observada com 1 minuto de pré-incubação com NDPO₂ 2,7 mM. Com períodos de pré-incubações maiores, 10 ou 15 minutos, somente um pequeno e transiente $\Delta\psi$ pode ser observado. O traçado NDP (controle) representa um experimento controle no qual o tempo de pré-incubação (15 min) foi conduzido na presença de uma adição reversa de NDP. Foi utilizada a concentração de 2,7 mM de NDPO₂, pois foi a concentração que se observou melhor resposta com relação a queda de $\Delta\psi$, podendo-se verificar algum efeito já com 1 min de pré-incubação e efeitos maiores durante os tempos de observação (1-15 minutos).

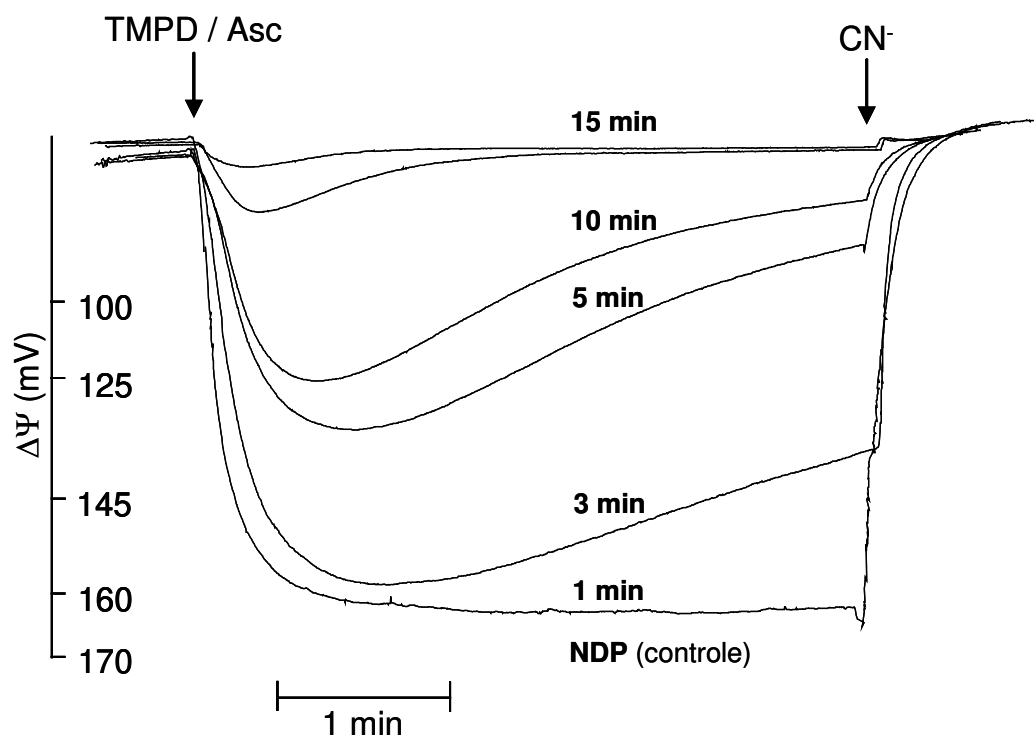


Figura 12. Queda do potencial transmembrânico mitocondrial causada por NDPO_2 : efeito do tempo de incubação. MFR (1,0 mg/mL, 30°C) foram pré-incubadas na presença de NDPO_2 2,7 mM em 1mL de meio de reação durante 1, 3, 5, 10, e 15 min. Um experimento controle foi feito com a adição reversa de NDP 2,7mM e incubação de 15 min.

Ciclosporina A, DTT, ADP, ou EGTA inibem a dissipação de $\Delta\psi$ induzida por $^1\text{O}_2$

Com a finalidade de se entender os mecanismos pelos quais ocorre a dissipação de $\Delta\psi$ por $^1\text{O}_2$, foram realizados experimentos na presença de inibidores clássicos da TPM

A Figura 13 mostra que a queda de $\Delta\psi$ induzida pela pré-incubação de MFR com NDPO₂ 2,7 mM, durante 3 minutos, pode ser inibida por ciclosporina A, DTT ou EGTA presentes no meio de incubação desde o início do experimento. ADP pode prevenir ou até reverter a queda do $\Delta\psi$, efeito este característico da TPM.

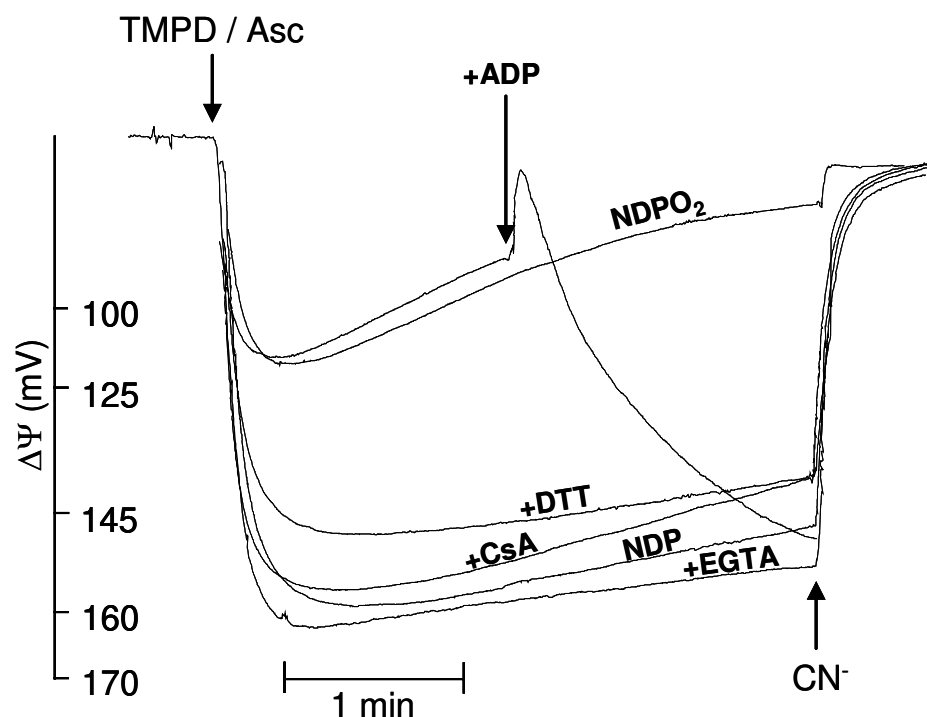


Figura 13. Efeitos protetores de CSA, DTT, ADP e EGTA sobre a perda de $\Delta\Psi$ induzido por **NDPO₂**. MFR (1,0 mg/mL, 30°C) foram pré-incubadas por 3 min em 1mL de meio de reação na presença de NDPO₂ 2,7 mM (traçado NDPO₂) ou NDPO₂ e: EGTA 500 μ M, DTT 300 μ M, ou CsA 1 μ M presentes desde o início. ADP (300 μ M) foi adicionado onde indicado no experimento contendo NDPO₂. Um experimento controle também foi feito (NDP) com a adição reversa de NDP 2,7mM.

D₂O aumenta os efeitos do ¹O₂

O experimento representado na Figura 14 mostra que o $\Delta\psi$ gerado quando a mitocôndria é pré-incubada na presença de NDPO₂ em meio contendo D₂O foi significativamente menor que quando obtido na presença de NDPO₂ em H₂O. Este resultado é esperado e confirma que ¹O₂ é responsável pelos efeitos observados do NDPO₂ uma vez que D₂O é conhecido por aumentar o tempo de vida do ¹O₂ (Kajiwara e Kearns, 1973). O experimento controle (NDP) foi feito em meio contendo ou não D₂O.

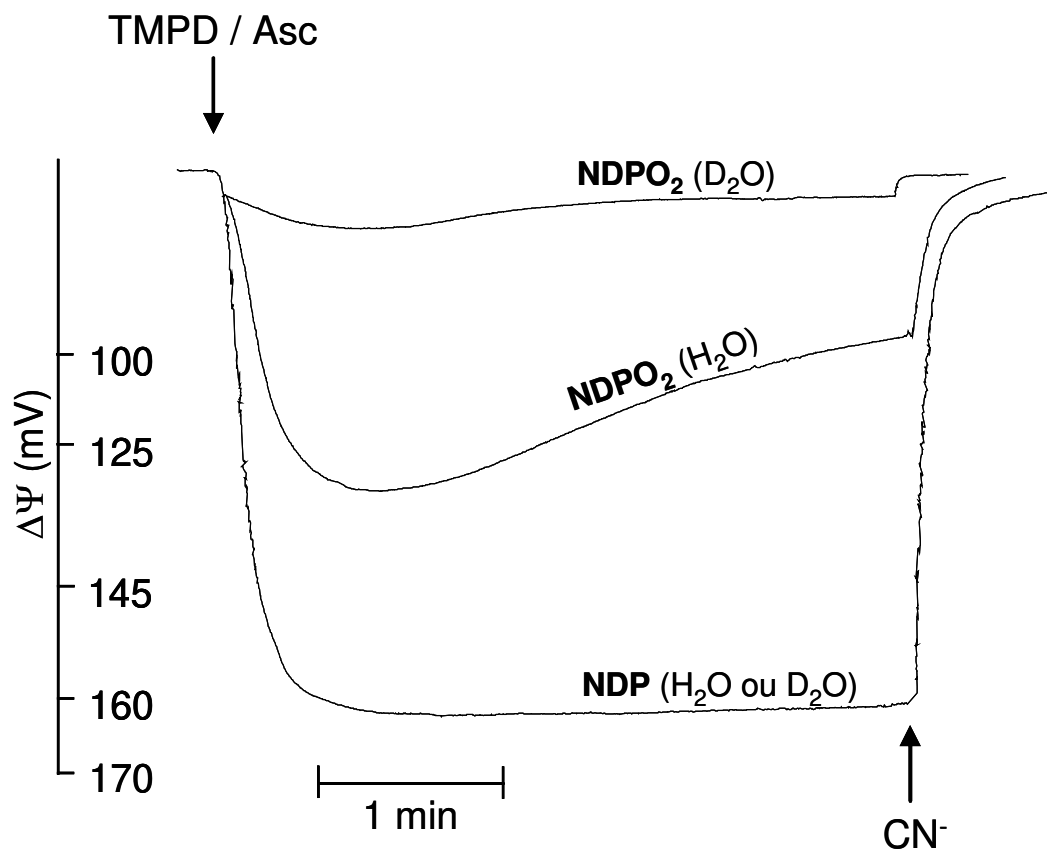


Figura 14. **Perda do potencial transmembrânico mitocondrial por NDPO₂: efeito de D₂O.** MFR (1,0 mg/mL, 30°C) foram pré-incubadas durante 3 min em 1mL de meio de reação na presença de NDPO₂ 2,7 mM em água ou NDPO₂ 2,7 mM em D₂O 90%. Um experimento controle conduzido com a adição reversa NDP 2,7mM foi feito na presença ou ausência de D₂O.

Liberação de Ca^{2+} mitocondrial induzida por $^1\text{O}_2$

Uma das características da TPM é sua dependência sobre o acúmulo de Ca^{2+} pela mitocôndria. Em concentrações relativamente baixas de Ca^{2+} usadas nestes experimentos (Ca^{2+} 14,5 μM , ver Figura 15), mitocôndrias podem sustentar o $\Delta\psi$ (Figura 12) e acumular Ca^{2+} (Figura 15, NDP) durante o intervalo dos experimentos realizados. Contudo, quando MFR foram pré-incubadas durante 3 minutos na presença de NDPO_2 2,7 mM a capacidade delas em reter Ca^{2+} diminuiu significativamente (Fig. 15, NDPO_2)

O acúmulo de Ca^{2+} foi mantido pela oxidação de TMPD/ascorbato e sua liberação foi induzida pelo protonóforo FCCP para permitir a calibração com EGTA no final do experimento.

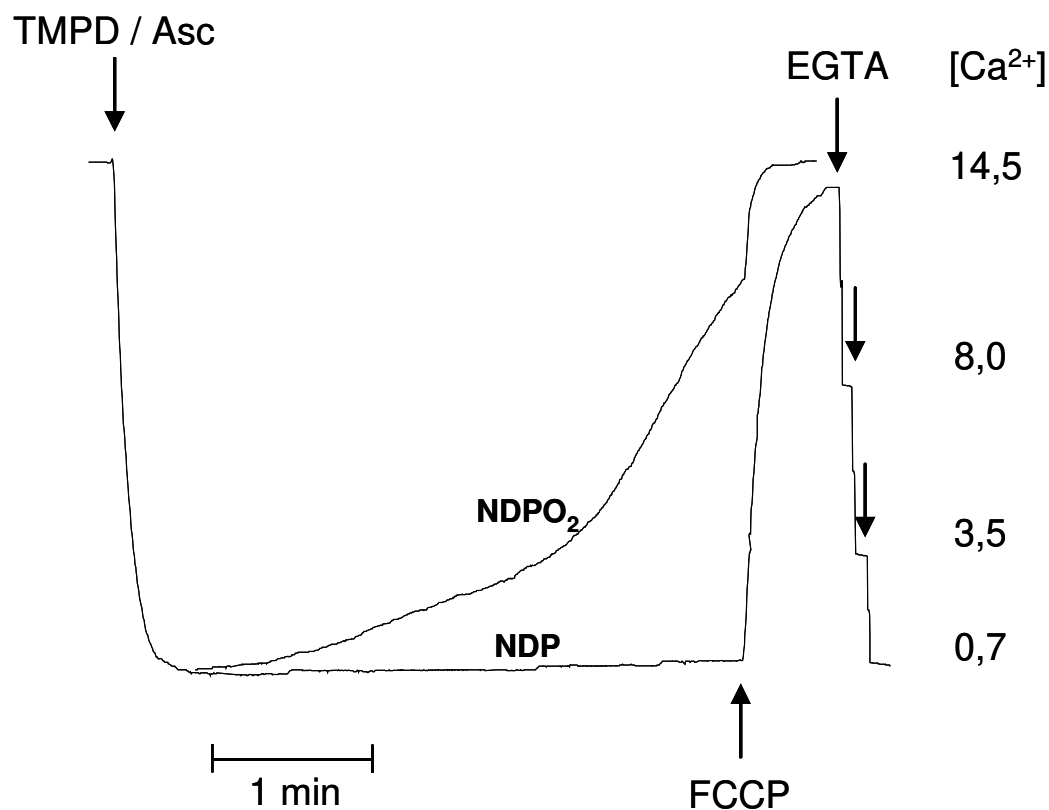


Figura 15. **Transporte mitocondrial de Ca^{2+} na presença de NDPO_2 .** MFR (1,0 mg/mL, 30°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM ($\text{pH} = 7,2$), K_2HPO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, succinato 5 mM, arsenazo III 40 μM e pré-incubadas durante 3 min na presença de NDPO_2 2,7mM ou NDP 2,7 mM (controle). Experimentos representativos ($n = 6$). Espectro das diferenças de absorbâncias entre os comprimentos de onda de 675 nm e 685 nm.

Oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial por $^1\text{O}_2$

É bem conhecido que TPM está associada à oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial (Castilho e col., 1996; Fagian e col., 1990). A inibição por DTT da queda de $\Delta\psi$ induzida por NDPO_2 na Figura 14 sugere que a oxidação tiólica está envolvida neste mecanismo. A Tabela I mostra uma significativa diminuição na absorbância a 412 nm, que é proporcional à diminuição dos grupos tiólicos protéicos da membrana mitocondrial quando mitocôndrias foram pré-incubadas na presença de NDPO_2 . Os inibidores da TPM, ADP e DTT protegeram a membrana mitocondrial contra a oxidação tiólica.

Tabela I. Efeitos do ADP e DTT sobre a oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial induzidos por NDPO_2 .

Condições	Absorbância (412 nm)
2,7 mM NDP (control)	$0,598 \pm 0,010$
2,7 mM NDPO_2	$0,385 \pm 0,009$
2,7 mM NDPO_2 + 300 μM ADP	$0,520 \pm 0,016$
2,7 mM NDPO_2 + 300 μM DTT	$0,484 \pm 0,009$

As condições experimentais foram similares àsquelas da Figura 13. MFR (1,0 mg/ml) foram pré-incubadas na presença de NDPO_2 2,7mM e ADP 300 μM ou DTT 300 μM . Foi feito um experimento controle conduzido com a adição reversa de NDP 2,7mM. O conteúdo tiólico de proteínas da membrana mitocondrial foi determinado como descrito em materiais e métodos. Os valores representam a media de três experimentos $\pm$ D.P.

Parte B: Animais hipercolesterolêmicos por inativação do gene do receptor de LDL são mais susceptíveis à transição de permeabilidade mitocondrial que animais controles

Concentração plasmática de lípidos e glicose, controle respiratório e razão ADP/O em mitocôndrias de fígado de camundongos controles e deficientes de receptor de LDL (LDLR^{-/-}).

Os níveis sanguíneos de lipídios e glicose de camundongos hipercolesterolêmicos deficientes de receptor de LDL (LDLR^{-/-}) e camundongos controles estão mostrados na Tabela II. Como esperado, os dois grupos diferiram somente na concentração de colesterol total que é 3 vezes maior nos camundongos LDLR^{-/-} do que nos controles. Apesar disto, tanto o controle respiratório quanto a razão ADP/O foram essencialmente similares nas mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo LDLR^{-/-} e controle (Tabela III). Estes resultados indicam que mitocôndrias de ambos camundongos são igualmente funcionais quanto ao consumo de oxigênio e conversão de energia.

Tabela II: Concentrações plasmáticas de glicose, colesterol, triglicérides e ácidos graxos livres em camundongos controles e LDLR^{-/-} em estado de jejum.

	Controle	LDLR ^{-/-}
Glicose (mg/dL)	98±45	76±21
Colesterol (mg/dL)	72±20	314±53**
Triglicérides (mg/dL)	71±14	105±34*
Ácidos graxos livres (nmol/L)	0,6±0.1	0,6±0.2

Os dados estão como x ± dp. Student T-Test (n = 9). *p = 0,02 and **p = 1,23E-07

Tabela III. Controle respiratório (CR) e fosforilação oxidativa (ADP/O) em mitocôndrias de fígado de camundongos controle e LDLR^{-/-}

	RC		ADP/O	
	Succinato	NAD	Succinato	NAD
Controle	3,76 ± 0.58	4,60 ± 0.81	1,76 ± 0.11	2,56± 0.24
LDLR^{-/-}	3,40 ± 0.39	4,34 ± 0.79	1,74 ± 0.11	2,51± 0.34

Mitocôndrias de fígado de camundongo (MFC) (0,5 mg/mL, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K₂HPO₄ 2mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 0,5mM na presença de succinato 5mM ou substratos ligados ao NAD (malato 2mM + glutamato 2mM + α-cetoglutarato 2mM + piruvato 2mM). O estado 3 da respiração foi iniciado pela adição de 200 nmols ADP/ mg proteína. Dados mostrados como x ± dp (n = 11).

Susceptibilidade à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial em mitocôndrias extraídas de fígado de camundongos controles e LDLR^{-/-}

Vários trabalhos correlacionam hipercolesterolemia e EROs (Berliner e Heinecke, 1996; Esterbauer et al., 1990; Klatt e Esterbauer, 1996) e concentração celular de colesterol e cálcio (Sorisky et al., 1990; Scherrer et al., 1991; Zhou et al., 1991; Tulenko et al., 1997). Assim, analisamos os efeitos de concentrações crescentes de Ca^{2+} sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). A Figura 16 (painel A), mostra que quando mitocôndrias de fígado de camundongos são adicionadas em um meio padrão contendo succinato 5 mM e TPP^+ 3 μM , há uma rápida deflexão do traçado, compatível com a formação do potencial de membrana e acúmulo de TPP^+ pelas mitocôndrias. Em mitocôndrias isoladas de camundongos controles (linha a), nas 2 primeiras adições de 100 nmol de CaCl_2/mg proteína houve um esperado decréscimo transitório no $\Delta\psi$. Depois da quarta adição de CaCl_2 , houve uma diminuição da amplitude do $\Delta\psi$, que se manteve ainda em um alto nível durante o período examinado. Em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR^{-/-} (linha b), a queda de $\Delta\psi$ induzida por Ca^{2+} foi recuperada depois dos 2 primeiros pulsos de Ca^{2+} e uma queda irreversível iniciou-se após os 2 pulsos seguintes. No painel B da Figura 16, pode-se observar que ciclosporina A (CsA) preveniu totalmente o efeito do Ca^{2+} sobre o $\Delta\psi$ em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR^{-/-} (linha b). Este efeito da CsA indica que a queda de $\Delta\psi$ em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR^{-/-} é devido à abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP), enquanto os resultados mostrados no painel A indicam que mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} são mais susceptíveis à abertura do PTP induzida por Ca^{2+} que mitocôndrias de camundongos normocolesterolêmicos.

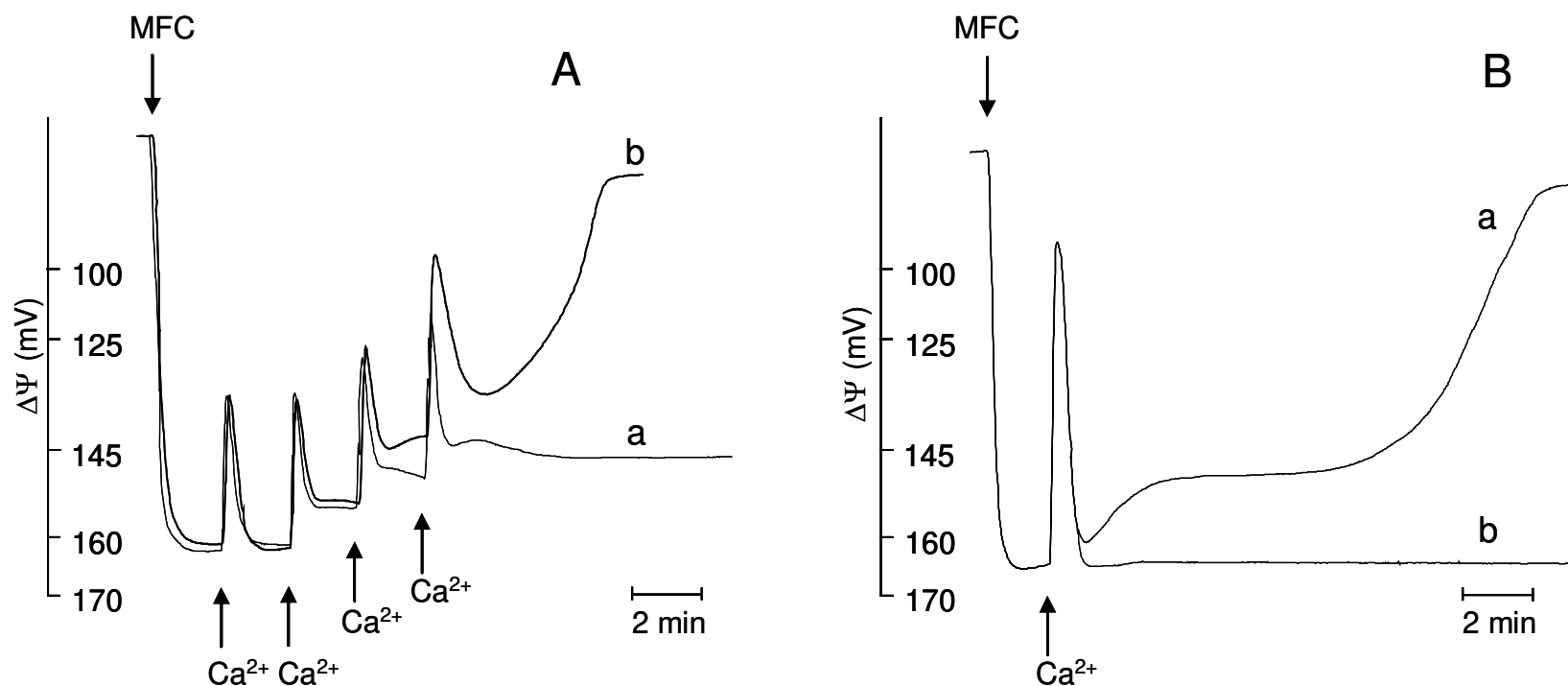


Figura 16. **Mudanças no $\Delta\Psi$ induzidas por Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de camundongo (MFC) controle e $\text{LDLR}^{-/-}$.** MFC (1,0 mg/mL, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K_2HPO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, e succinato 5 mM e TPP^+ 3 μM . Experimentos representativos (n = 11). Painel A: Ca^{2+} (100 nmols/mg proteína) foi adicionado onde indicado. A linha a representa mitocôndrias de fígado de camundongos controles e a linha b de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$. Painel B: Ca^{2+} (400 nmols/mg proteína) foi adicionado onde indicado, ambas as linhas (a e b) representam mitocôndrias de fígado de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ sem (linha a) e com (linha b) adição de CsA 1 μM no início do experimento.

Uma característica de mitocôndrias que sofrem transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é o aparecimento de um poro não-seletivo permeável a cátions e ânions de até 1,4 kDa (Kowaltowski et al, 1996A) que causa inchamento mitocondrial. Este inchamento é traduzido em diminuição da turbidez da suspensão mitocondrial e pode ser acompanhado pela diminuição da absorbância no comprimento de onda de 520 nm. Os experimentos representados na Figura 17 mostram que mitocôndrias isoladas de camundongos LDLR^{-/-} sofreram um pronunciado inchamento, sensível a CsA, quando incubadas em meio padrão contendo succinato 5 mM e CaCl₂ 200 µM. Mitocôndrias isoladas de camundongos controles não sofreram inchamento nas mesmas condições experimentais, durante o período de observação.

A Figura 18 teve o intuito de mostrar que o Ca²⁺ adicionado ao meio era realmente captado pelas mitocôndrias. Observa-se na Figura 18 um rápido aumento transitório na diferença de absorbância entre os comprimentos de onda de 685 nm e 675 nm ao se adicionar o Ca²⁺ ao meio de incubação, compatível com a presença de Ca²⁺ livre no meio (formação do complexo Ca²⁺-arsenazzo III). Esta diferença de absorbância decai rapidamente, indicando uma rápida captação do Ca²⁺ livre pelas mitocôndrias dos dois tipos de camundongos, uma vez que a membrana mitocondrial é impermeável ao arsenazzo III. Assim, pode-se verificar que ambos os tipos de mitocôndrias retêm altas concentrações de Ca²⁺. Com o decorrer do tempo, pode-se notar que mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} perderam a capacidade de reter Ca²⁺ em menor tempo quando comparadas às mitocôndrias dos animais controle. Este resultado é esperado, pois a liberação de Ca²⁺ nestas condições está relacionada com a abertura do PTP.

Foi previamente demonstrado em nosso laboratório que TPM induzida por Ca²⁺ está associada com aumento da geração de EROs pela mitocôndria como uma consequência de alterações no empacotamento lipídico e formação de domínios. Isso é uma consequência da interação do Ca²⁺ com cardiolipinas da membrana mitocondrial interna (Grijalba e col., 1999). Com o intuito de verificar a possibilidade do envolvimento de EROs nesta maior susceptibilidade de mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos à TPM induzida por Ca²⁺, determinamos a produção de EROs pelas mitocôndrias após adição de Ca²⁺ ao meio. Na Figura 19 observa-se que na ausência de Ca²⁺ (com adição de EGTA 100 µM), a fluorescência do DCF, devido à oxidação do H₂-DCF adicionado ao meio, aumentou lentamente com o tempo, indicando uma

baixa produção de EROs nos dois tipos de mitocôndria (linhas a e b). Em contraste, após adição de Ca^{2+} , o aumento na fluorescência devido a oxidação do $\text{H}_2\text{-DCF}$ à DCF foi muito maior no meio contendo mitocôndria isolada de fígado de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ (linha d) quando comparado às mitocôndrias de fígado de camundongos controles (linha c) submetidos as mesmas condições experimentais.

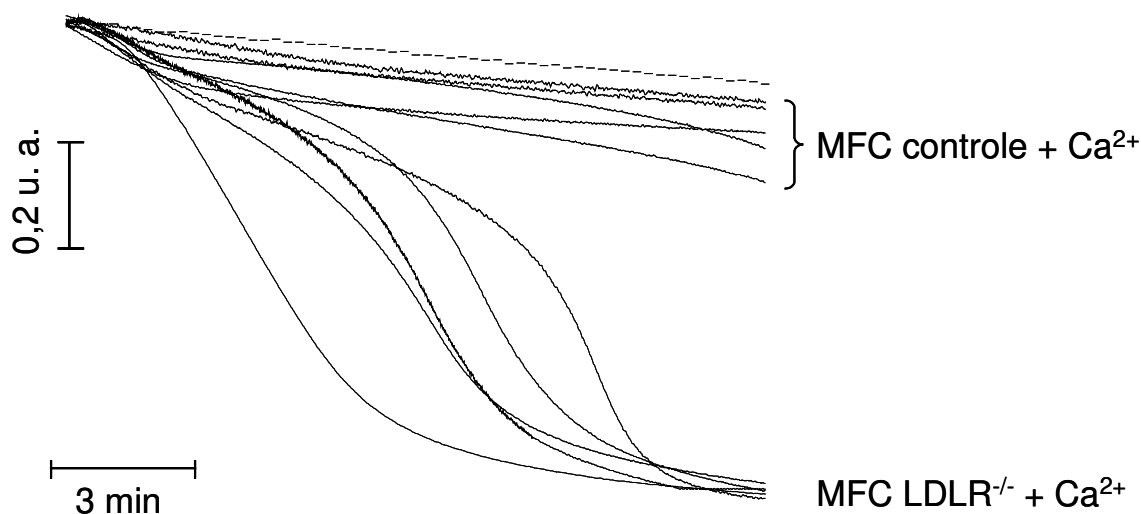


Figura 17. **Inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos (MFC) controle e $\text{LDLR}^{-/-}$.** MFC (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K_2HPO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, e succinato 5 mM mais Ca^{2+} 100 μM (n = 5). Cada linha representa mitocôndrias de fígado de um camundongo diferente. A linha tracejada representa um controle sem a adição de Ca^{2+} . Na presença de EGTA todas as linhas são coincidentes.

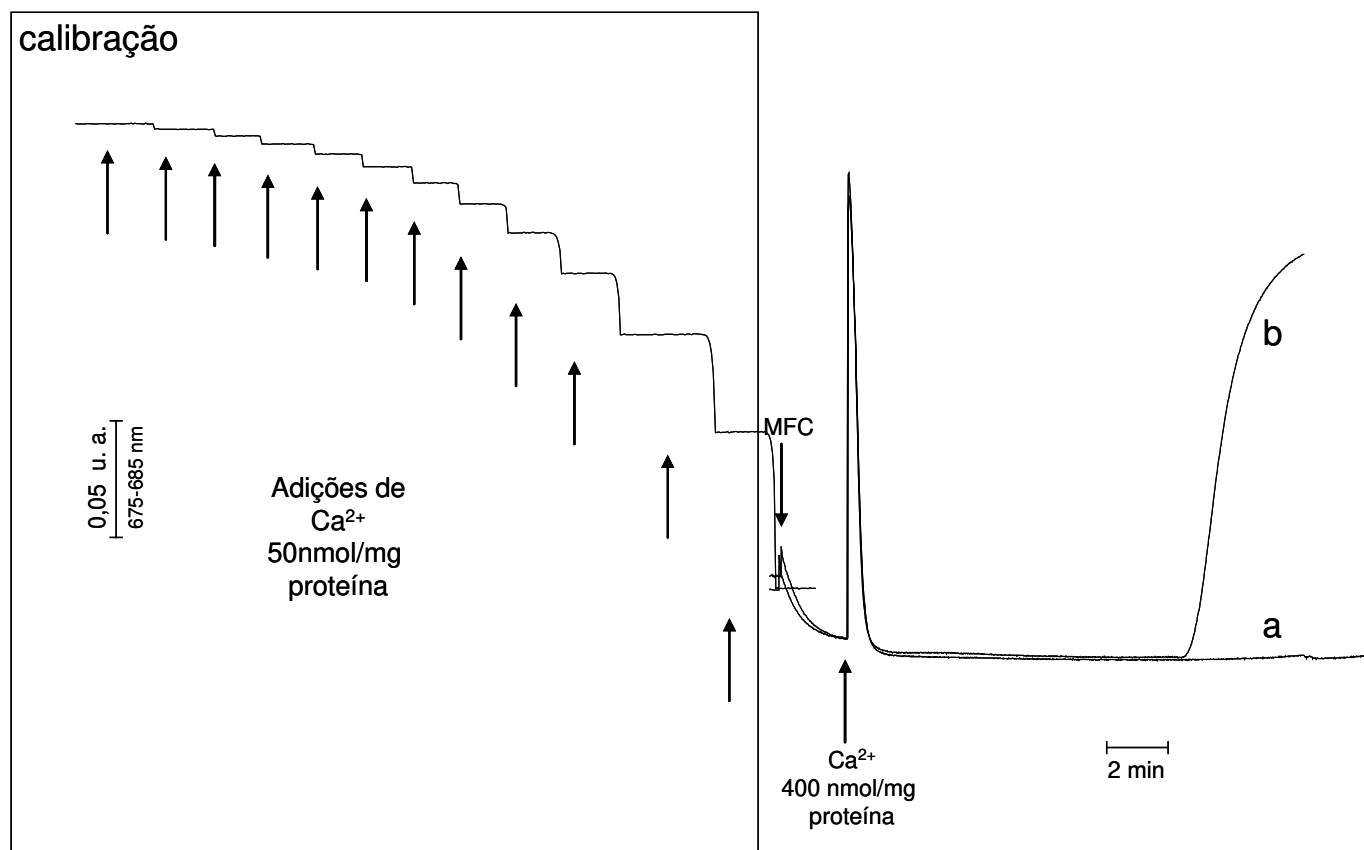


Figura 18. **Mitocôndrias de fígado camundongos (MFC) $LDLR^{-/-}$ retêm altas concentrações de Ca^{2+} por menos tempo que mitocôndrias de animais controle.** MFC (1,0 mg/mL, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K_2HPO_4 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, succinato 5 mM e arsenazo III 40 μ M. Experimentos representativos (n = 8). A linha a representa mitocôndrias de fígado de camundongos controles e a linha b de camundongos $LDLR^{-/-}$. Espectro das diferenças de absorbâncias entre os comprimentos de onda de 675 nm e 685 nm.

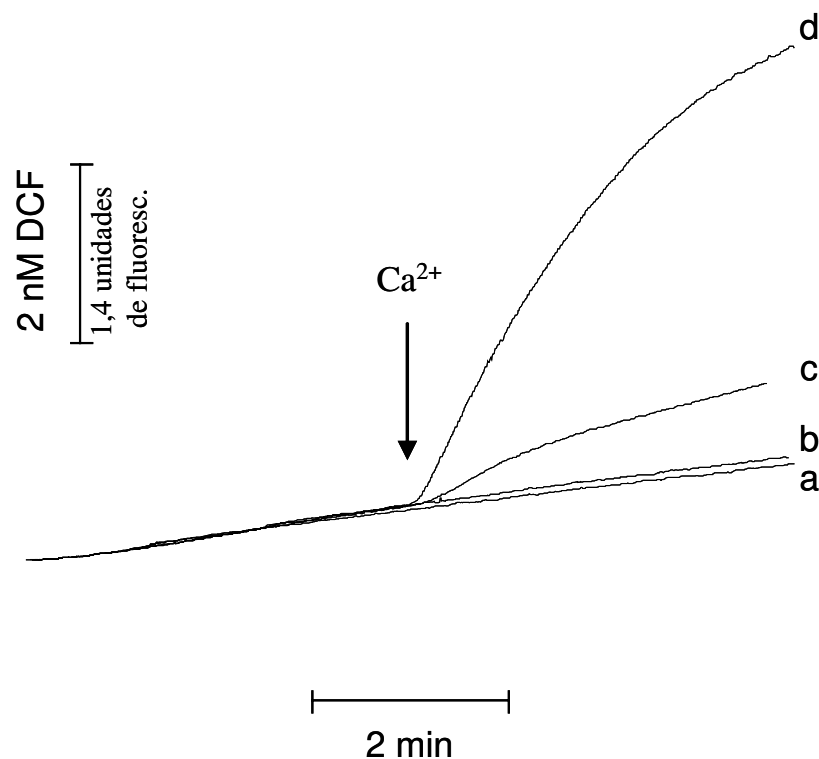


Figura 19. **Estímulo por Ca²⁺ da geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio por mitocôndrias de camundongos controle (linha c) e LDLR^{-/-} (linha d).** MFC (0,5 mg/ml, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, e succinate 5 mM mais EGTA 100 µM e H₂-DCF-DA 1 µM (diacetato de diclorodihidrofluoresceína). CaCl₂ (150 µM) foi adicionado onde indicado. Experimento representativo (n = 8). As linhas a e b são experimentos controles feitos sem a presença de Ca²⁺ utilizando-se MFC controle e LDLR^{-/-} respectivamente.

Conteúdo de colesterol nas mitocôndrias de camundongos controle e LDLR^{-/-}

Para verificar se a diferença na susceptibilidade a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{2+} poderia ser devido à diferenças no conteúdo de colesterol mitocondrial e conseqüentemente à diferenças na fluidez da membrana mitocondrial, mediu-se o conteúdo de colesterol e a fluidez de membrana de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controle e LDLR^{-/-}. Sabe-se que, mesmo depois da extração das mitocôndrias por centrifugação diferencial, há ainda alguma contaminação de outras estruturas celulares, comprovada pela presença de enzimas características de outras organelas e da membrana plasmática (Reinhart et al., 1982). Para evitar possíveis contaminações, após o isolamento por centrifugação diferencial, a suspensão mitocondrial foi repurificada por um gradiente de Percoll descontínuo (7%, 19%, 52% and 62% v/v) baseado no método descrito por Lopez-Mediavilla et al. (1989). Os resultados são apresentados na Tabela IV. Observa-se uma diferença no conteúdo de colesterol e conseqüentemente na fluidez das membranas mitocondriais entre os dois tipos de mitocôndrias antes da purificação com percoll, provavelmente devido a contaminação da suspensão mitocondrial com restos de membranas de outras organelas. Após a purificação com percoll estas diferenças não são mais observadas.

Tabela IV. Conteúdo de colesterol e anisotropia (r) de mitocôndrias de fígado de camundongos controles e LDLR^{-/-} carregadas com DPH (sonda de regiões apolares) e HP (sonda de regiões polares) antes e após purificação com percoll.

	r _s HP	r _s DPH	Colesterol (µg/mg protein)
<i>Antes da purificação com percoll</i>			
Controle	0,292* ± 0,016	0,120** ± 0,004	5,11*** ± 0,22
LDLR^{-/-}	0,278 ± 0,016	0,104 ± 0,004	4,27 ± 0,08
<i>Após a purificação com percoll</i>			
Controle	0,282 ± 0,004	0,138 ± 0,009	1,12 ± 0,13
LDLR^{-/-}	0,290 ± 0,009	0,142 ± 0,007	1,11 ± 0,14

Mitocôndrias de fígado de camundongo carregadas com HP 3µM (0,5mg/mL) e DPH 5µM (1,0 mg/mL) foram suspensas em meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K₂HPO₄ 2mM, MgCl₂ 1 mM. A anisotropia do DPH foi excitada a 340 nm (emissão λ = 460 nm) e a anisotropia da HP foi excitada a 520 nm (emissão λ = 626 nm). O colesterol foi extraído com éter e quantificado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção por UV a 210nm. Dados são mostrados como x ± dp. Teste T de Students (n = 6): *p = 0,11, **p = 7,14.10⁻⁰⁸ and ***p = 1,14.10⁻⁰⁴

Após a purificação da preparação mitocondrial com Percoll as diferenças na susceptibilidade à abertura do PTP entre os dois tipos de mitocôndrias permaneceram (Figura 20).

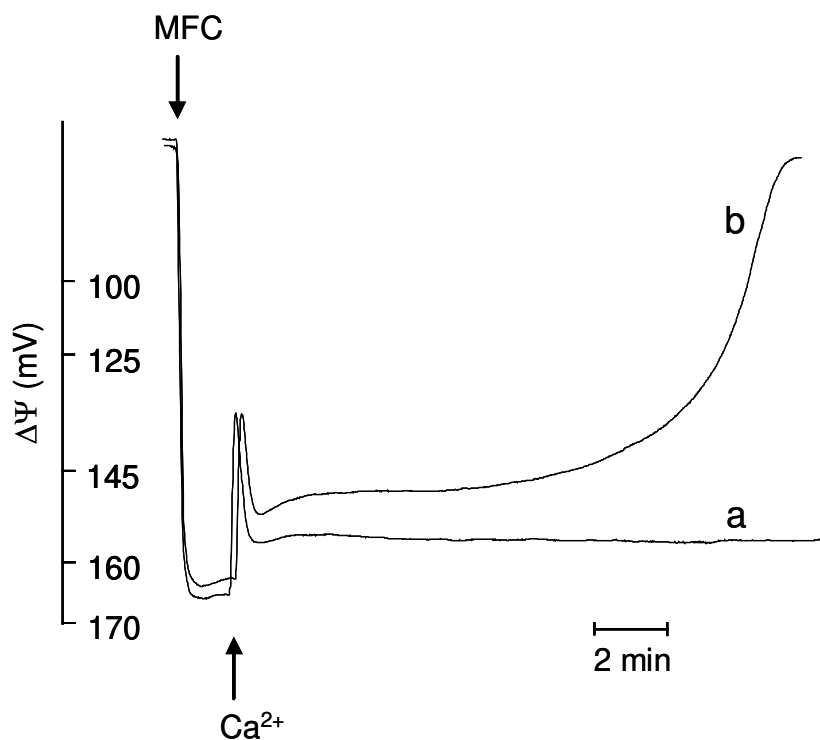


Figura 20. Mudanças no $\Delta\Psi$ induzidas por Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de camundongo (MFC) controle (linha a) e $\text{LDLR}^{-/-}$ (linha b) purificadas com Percoll. MFC (1,0 mg/mL, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K_2HPO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, succinato 5 mM e TPP^+ 3 μM . Experimentos representativos (n = 6). Ca^{2+} (400 nmols/mg proteína) foi adicionado onde indicado.

Atividade da superóxido dismutase em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controle e LDLR^{-/-}

Uma vez que a produção de EROs está aumentada nas mitocôndrias de fígado dos animais LDLR^{-/-} (Figura 18), investigamos possíveis diferenças no sistema antioxidante mitocondrial dos animais controles e LDLR^{-/-}. Assim, foi medida a atividade da enzima Mn - superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) das mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controles e LDLR^{-/-} em função da velocidade de redução do citocromo c (Figura 21).

A Figura 21, painel A (*linha 0 U*) mostra a cinética da redução do citocromo c induzida por O₂^{•-} gerado pelo sistema xantina / xantina oxidase sem a presença de superóxido dismutase (SOD). Concentrações padrões de SOD (Painel A, *linhas 0,55 U – 8,90 U*) e 0,5 mg de proteína mitocondrial de fígado de camundongos LDLR^{-/-} e controle (*linhas mitoc*) foram adicionadas ao meio contendo citocromo c, antes da adição da xantina / xantina oxidase. Como a SOD compete pelo superóxido e consequentemente diminui a velocidade de redução do citocromo c, pode-se estimar a atividade da SOD nas suspensões mitocondriais em função da diminuição da velocidade de redução do citocromo c. As adições padrões tiveram a finalidade de construir uma curva padrão $1 / \Delta \text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \times \text{unidades de SOD}$ (Figura 21, painel B), para se determinar a atividade da SOD nas suspensões mitocondriais (*linhas mitoc*, painel A).

Encontrou-se atividades similares desta enzima nas mitocôndrias isoladas de fígado dos dois tipos de camundongos. Para as mitocôndrias de fígado de camundongos controles a atividade medida foi de $4,1 \pm 0,5 \text{ U SOD/ mg proteína}$ e para o LDLR^{-/-} a atividade foi de $4,0 \pm 0,5 \text{ U SOD/ mg proteína}$.

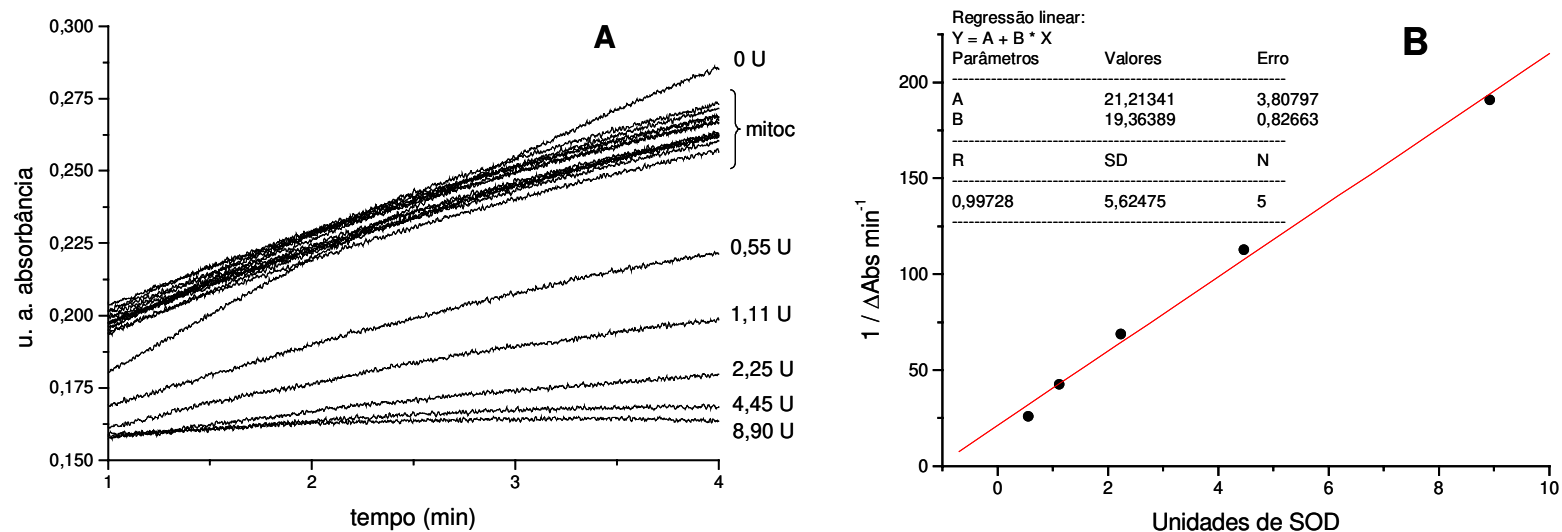


Figura 21. **Atividade da superóxido dismutase mitocondrial em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} e controles.** Painel B: Curva de calibração da redução do citocromo c para medida da atividade de SOD. A velocidade de redução do citocromo c, inibida pela SOD, está representada pelo gráfico tempo x $1 / \Delta \text{Abs min}^{-1}$. Cada ponto representa a média calculada de uma determinação em triplicata a partir dos traçados (U – 8,90 U) mostrados no painel B. O painel A representa as velocidades de redução do citocromo c inibidas por concentrações crescentes de SOD: 0 U, 0,55 U, 1,11 U, 2,25 U, 4,45 U e 8,90 U (linha 0 U; linha 0,55 U; linha 1,11 U; linha 2,25 U; linha 4,45 U; linha 8,90 U, respectivamente) e pela adição de 0,5 mg de proteína mitocondrial de fígado de camundongos controle e LDLR^{-/-} (mitoc). Os experimentos com mitocôndrias foram feitos na presença de KCN 1 mM para inibir a atividade da Cu, Zn-SOD e SOD extracelular.

Cinéticas de oxidação dos nucleotídeos de piridina (NP) endógenos por diamida em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controle e LDLR^{-/-}

Como não se encontrou diferenças significativas na atividade da MnSOD entre os dois tipos de mitocôndrias e considerando-se que o estado redox dos nucleotídeos de piridina (NP) pode influir na retenção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias (Vercesi, 1987), decidimos analisar possíveis diferenças neste sistema nos dois tipos de mitocôndrias.

Os resultados apresentados na Figura 22 mostram os efeitos de diamida (um oxidante de tióis) sobre o estado redox de NP em mitocôndrias desernegizadas pela presença de rotenona. A adição de mitocôndria ao sistema resulta no aumento da fluorescência em 366 – 450 nm (Figura 22), indicando a presença de NP no estado reduzido. Observou-se uma diferença na cinética de oxidação dos NP em mitocôndrias isoladas de fígado nos dois animais. Pode-se notar que a oxidação de NAD(P)H por diamida em mitocôndrias de fígado de camundongos controle possui uma cinética claramente bifásica enquanto que, em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-}, a cinética bifásica é pouco pronunciada. A fase de oxidação mais pronunciada em camundongos controles é provavelmente relativa à oxidação de NADH e a segunda fase de oxidação mais lenta provavelmente é relativa à oxidação de NADPH (Vercesi, 1987). O retorno da redução dos NP ao estado inicial após adição de isocitrato e DTT indica que as alterações de fluorescência observadas resultaram essencialmente de alterações redox e não de artefatos relativos à variação de espalhamento de luz pela suspensão mitocondrial.

Efeito do Ca^{2+} sobre o estado redox dos NP em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controle e LDLR^{-/-}

Os experimentos anteriores (Figura 22) sugerem que as diferenças no transporte de Ca^{2+} (Figura 18) das diferentes mitocondrias poderia estar relacionado a diferenças no estado redox nestas mitocondrias. Assim, o experimento mostrado na Figura 23 foi planejado no sentido de se obter mais informações a este respeito, utilizando-se mitocôndrias respirando com succinato, na presença de rotenona. A adição de Ca^{2+} promoveu um aumento da fluorescência nos NP endógenos de acordo com resultados observados anteriormente, devido a formação de um complexo NAD(P)H- Ca^{2+} (Chance, 1965; Vinogradov et al., 1972). Em seguida observou-se uma

oxidação espontânea muito mais pronunciada nas mitocôndrias de animais LDLR^{-/-}. Esta oxidação foi totalmente revertida por isocitrato, um redutor específico de NADP⁺ em mitocôndrias de fígado (Moyle e Mitchell, 1973). β -hidroxibutirato (β -OH), um redutor específico de NAD⁺ (Figura 23, Kehrer e Lund, 1994), e EGTA não tiveram efeito sobre esta oxidação.

Oxidação espontânea de NP endógenos em mitocôndrias de animais controles e LDLR^{-/-}

A fim de se verificar um possível papel do Ca²⁺ na oxidação de NP determinamos a oxidação espontânea de NP endógenos em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo LDLR^{-/-} e controle respirando com succinato na presença de rotenona e EGTA (Figura 24). De modo semelhante, observou-se uma oxidação espontânea somente nas mitocôndrias de animais LDLR^{-/-} indicando que o fenômeno independe da presença de Ca²⁺. Esta oxidação não foi revertida por β -hidroxibutirato, mas sim por isocitrato.

Efeito do isocitrato sobre a susceptibilidade à abertura do PTP em mitocôndrias de fígado de camundongos controles e LDLR^{-/-}

A Figura 25 mostra que a adição de isocitrato, nas mesmas condições experimentais da Figura 16, previne a queda de $\Delta\Psi$ induzida por Ca²⁺, confirmando que esta menor capacidade das mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} em sustentar $\Delta\Psi$ resulta de menor poder redutor destas mitocôndrias na forma de NADPH.

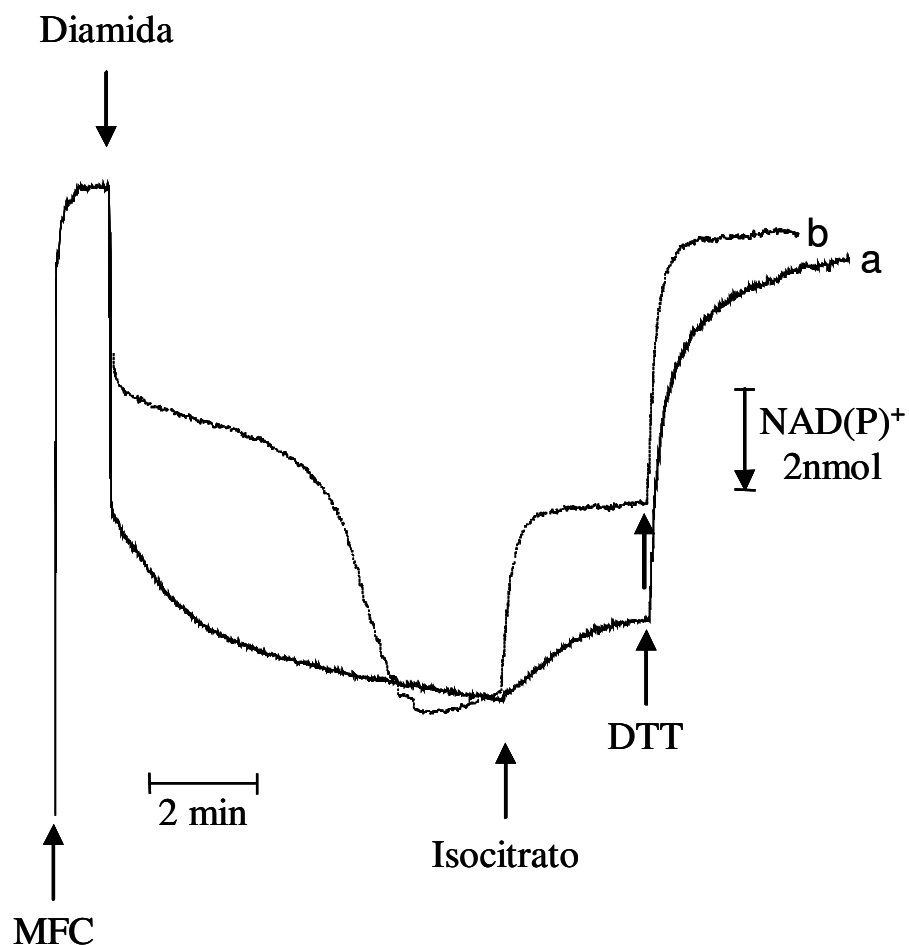


Figura 22. **Oxidação de nucleotídeos de piridina (NP) por diamida em mitocôndrias desenergizadas de fígado de camundongos (MFC) LDLR^{-/-} (linha a) e controles (linha b).** MFC (1,0 mg/mL, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, rotenona 2 μM e EGTA 500 μM. Experimentos representativos (n = 8). Onde indicado foram adicionados diamida 500 μM, isocitrato 1 mM e DTT 1 mM. Foi monitorada a fluorescência de NAD(P)H (EX:366nm; EM:450nm).

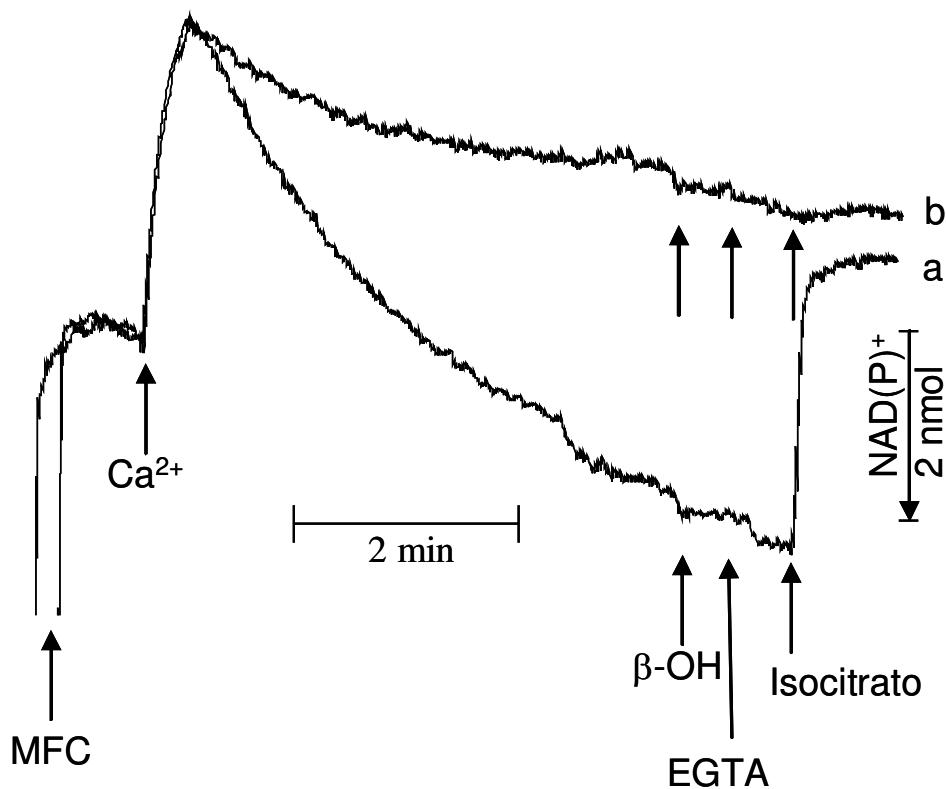


Figura. 23. Efeito de Ca²⁺ sobre o estado redox de NP em mitocôndrias de fígado de camundongos (MFC) *LDLR*^{-/-} (linha a) e controles (linha b). MFC (1,0 mg/mL, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, rotenona 2 μM, succinato 5mM. Experimentos representativos (n = 8). Onde indicado foram adicionados Ca²⁺ 150 μM, β-hidroxibutirato (β-OH) 5mM, EGTA 500 μM e isocitrato 1mM. Foi monitorada a fluorescência de NAD(P)H.

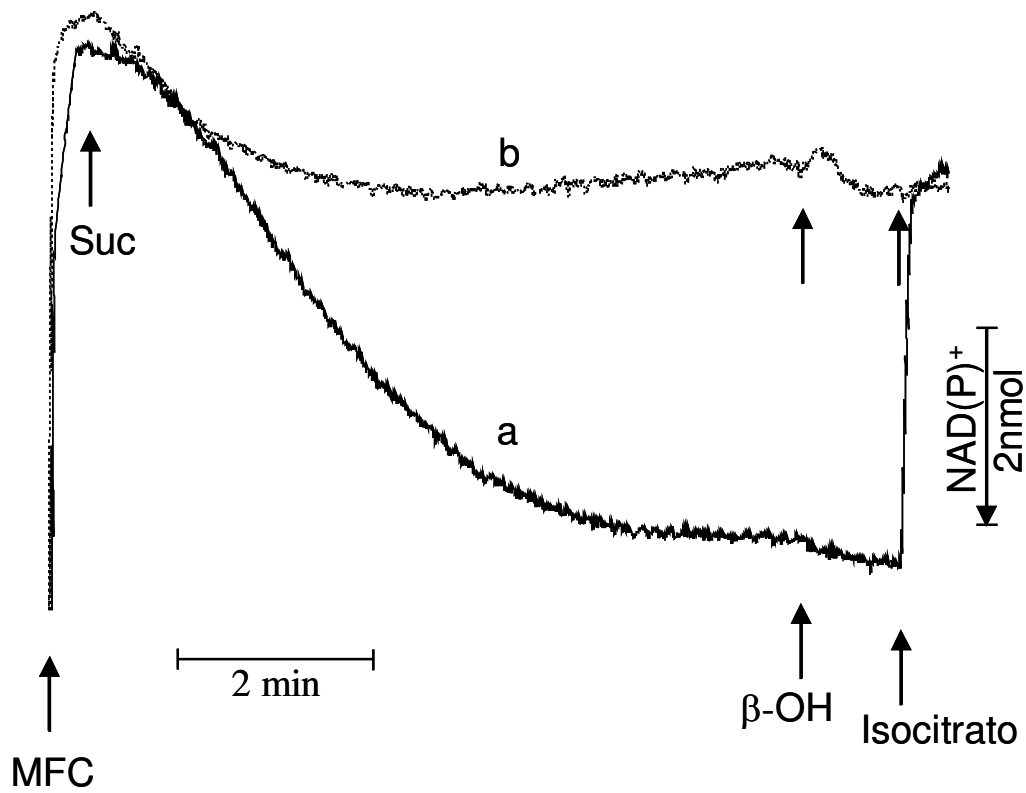


Figura 24. **Oxidação espontânea de NP endógenos em mitocôndrias de animais *LDLR*^{-/-} (linha a) e controles (linha b).** MFC (1,0 mg/mL, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 500μM e rotenona 2μM. Experimentos representativos (n = 8). Onde indicado foram adicionados succinato 5mM, β-hidroxibutirato (β-OH) 5mM e isocitrato 1mM. Foi monitorada a fluorescência de NAD(P)H.

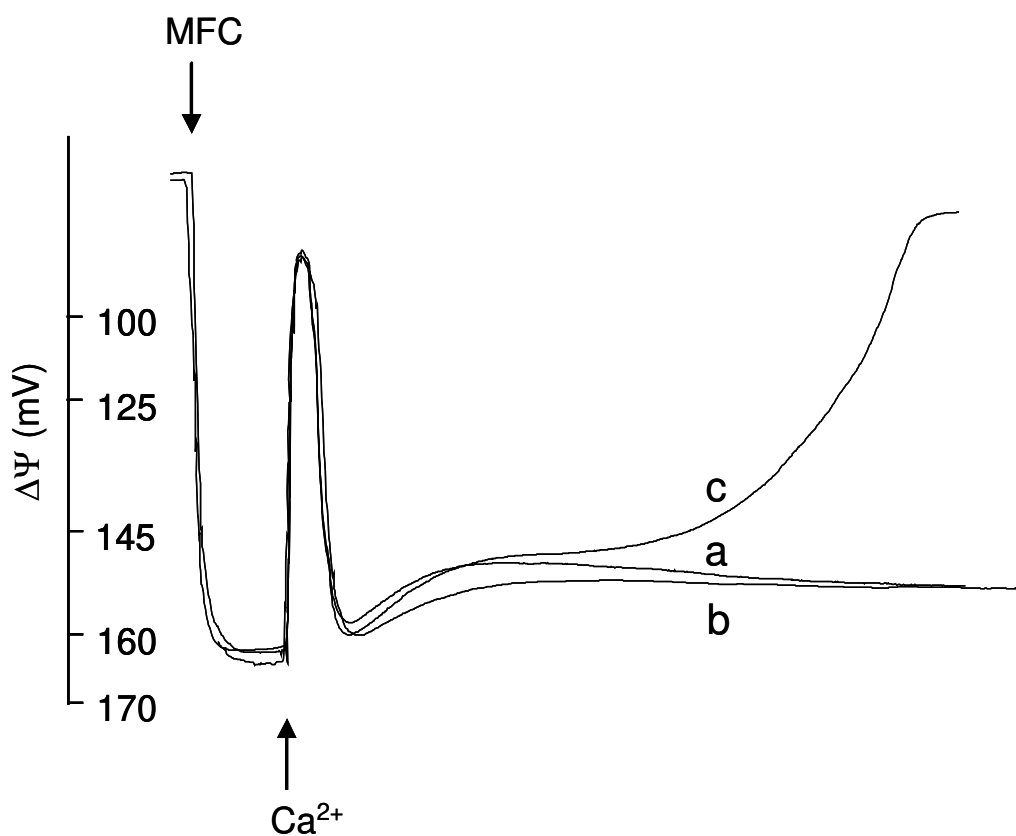


Figura 25. **Mudanças no $\Delta\Psi$ induzidas por Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de camundongo (MFC) controle (linha a) e $\text{LDLR}^{-/-}$ (linha c).** MFC (1,0 mg/mL, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH = 7,2), K_2HPO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, succinato 5 mM e TPP^+ 3 μM . A linha b representa experimentos feitos em condições similares ao experimento da linha c, mas com adição de isocitrato 1mM desde o início. Experimentos representativos (n = 6). Ca^{2+} (400 nmols/mg proteína) foi adicionado onde indicado.



5. DISCUSSÃO

PARTE A - Oxigênio singlete pode ser gerado em sistemas biológicos por foto-oxidação de vários compostos biológicos ou por processos não-fotoquímicos tais como reações enzimáticas (Kanofsky, 1984). Pode também ser gerado pela transferência de energia de espécies tripletes, produzidas durante condições de estresse oxidativo, para o oxigênio molecular triplete (Nantes e col., 1995). Foi estudado neste trabalho a natureza de danos oxidativos induzidos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato por $^1\text{O}_2$ puro, gerado a partir da termodissociação do endoperóxido solúvel em água NDPO₂ (Martinez et al., 2000).

A capacidade de $^1\text{O}_2$ oxidar grupos tiólicos (Devasagayam et al., 1991) levou-nos a investigar a possibilidade desta espécie gerar TPM. Esta hipótese foi confirmada pelos experimentos que mostraram que $^1\text{O}_2$ induz uma diminuição de $\Delta\psi$ sensível aos inibidores da TPM tais como EGTA, CsA, ADP, e DTT (Figura 13). A participação de oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial no mecanismo da TPM induzida por $^1\text{O}_2$ foi confirmada pelos experimentos que demonstram proteção por DTT e uma diminuição no conteúdo de grupos tiólicos reduzidos de membrana. O efeito do ADP contra a queda de $\Delta\psi$ e oxidação dos grupos tiólicos (Tabela I) induzida por $^1\text{O}_2$ é uma evidência adicional para o envolvimento do carreador de ADP/ATP na estrutura do PTP (Halestrap et al., 1997; para revisão: Kowaltowski et al., 2001 e Vercesi et al., 1997). Possivelmente a ligação de ADP ao carreador de ADP/ATP induz mudanças conformacionais na proteína protegendo seus grupos tiólicos contra a ação oxidante do $^1\text{O}_2$.

Com relação a estudos anteriores relativos a ação do $^1\text{O}_2$ sobre a mitocôndria, Salet et al. (1997) relataram que estas espécies, quando produzidas pela irradiação de hematoporfirinas, levam à inativação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A discordância entre os resultados destes autores e os nossos, deve resultar das diferenças na quantidade ou localização da geração de $^1\text{O}_2$. Esta possibilidade também foi sugerida por experimentos em que se usou 4,5',8-trimetilpsoraleno, um fotosensibilizador que liga-se a sítios protéicos diferentes daqueles da hematoporfirina (Moreno et al., 2001)

Em nossos experimentos com NDPO₂, a participação direta do ¹O₂ foi confirmada por duas propriedades específicas desta molécula. Primeiro, o aumento da permeabilização mitocondrial induzida por NDPO₂ em meio contendo D₂O (Figura 14), uma substância que conhecidamente aumenta a meia vida do ¹O₂ (Kajiwara e Kearns, 1973), e segundo, a inibição da respiração mitocondrial sustentada por substratos como NADH ou succinato (Figura 11) (Salet e Moreno, 1981).

Os resultados deste trabalho fornecem evidências mostrando que ¹O₂ promove danos oxidativos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato por um mecanismo sensível aos inibidores EGTA, DTT, ADP, e ciclosporina A. Isto sugere que a TPM pode ser um mecanismo pelo qual terapias fotodinâmicas levem tumores a danos mitocondriais e morte celular.

Uma vez que o oxigênio singlete abre o poro de transição de permeabilidade mitocondrial, um dos mecanismos de morte de celular em terapia fotodinâmica pode ser a abertura do poro de transição de permeabilidade em células tumorais.

Considerando-se que diminuição de $\Delta\psi$ favorece a abertura do poro de transição mitocondrial (Vercesi, 1987; Bernardi e Petronilli, 1996), pode-se propor que a toxicidade do ¹O₂ à mitocôndria *in situ* pode ser o resultado de dois efeitos independentes, isto é, oxidação tiólica e a queda de $\Delta\psi$ que ocorre devido à inibição da respiração mantida por substratos ligados ao NAD, os principais substratos respiratórios *in vivo*.

PARTE B - Espécies reativas (ERs) de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) podem alterar funções biológicas de moléculas essenciais como lipídeos, proteínas e DNA. Numerosos estudos têm relacionado o excesso de ERs com formação de lesões e defeitos vasculares (Ross, 1999; Berliner e Heinecke, 1996; Freeman et al., 1995; Beckmann et al., 1994; Hazen e Heinecke, 1997; Mohazzab et al., 1994) através do mecanismo de oxidação de LDL (Morel et al., 1984; Parthasarathy et al., 1986; Lamb et al., 1992; Patel et al., 2000), um processo que aumenta a aterogênese (Steinberg, 1993; Witztum e Steinberg, 1991). Evidências epidemiológicas associam fatores de risco comuns para doenças coronarianas e aumento dos níveis de ERs (Alexander, 1998;). Entre os sistemas intracelulares estudados capazes de gerar ERs estão a NADH/NADPH oxidase, xantina oxidase, lipoxigenase, e ciclooxigenase (Mohazzab et al., 1994; Griendling e Harrison, 1999; Honda e col., 1999; White et al., 1996; Griendling et al., 2000).

Mitocôndrias são importantes fontes e alvos biológicos de ERs (Turrens, 1997; Kowaltowski e Vercesi., 2001). Contudo, seu possível papel como mediadoras dos processos oxidativos que ocorrem em algumas doenças tais como aterogênese é incerto. Foi mostrado recentemente por Ballinger et al. (2002) a contribuição da geração de ERs mitocondriais e danos do DNA mitocondrial (DNAm_t) à progressão de lesões ateroscleróticas em artérias humanas e em artérias de camundongos propensos à aterosclerose. Danos no DNAm_t correlacionaram-se positivamente com a extensão da aterosclerose em aortas humanas e em aortas de camundongos com deficiência na apolipoproteína E (apo E^{-/-}). Estes danos também precederam o aparecimento da aterosclerose em camundongos apo E^{-/-} jovens. Camundongos apo E^{-/-} e deficientes em Mn-SOD, uma enzima antioxidante mitocondrial, exibiram aumentos precoces de danos no DNAm_t e um fenótipo de aterogênese acelerada.

Com a finalidade de investigar um possível papel da hipercolesterolemia na geração de EROs mitocondrial e suas conseqüências, examinamos as funções mitocondriais e a susceptibilidade a TPM induzida por Ca²⁺ em camundongos hipercolesterolêmicos comparadas a controles normocolesterolêmicos. Os resultados presentes indicam que mitocôndrias isoladas dos camundongos LDLR^{-/-} têm uma maior susceptibilidade à TPM induzida por Ca²⁺ e produzem maior quantidade de EROs na presença de Ca²⁺. Esta maior

susceptibilidade é ilustrada pela menor resistência ao inchamento e a perda de $\Delta\psi$ induzidos por Ca^{2+} , processos estes sensíveis à CsA. A CsA é um inibidor específico da TPM embora não previna a oxidação de NAD(P)H (Zoratti e Szabò, 1995). O translocador de nucleotídeo de adenina (TNA) parece ser um dos componentes do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Green e Reed, 1998) e o estado redox de dois de seus grupos tiólicos participam do mecanismo de TPM (Halestrap et al., 1997). A oxidação destes tióis por reagentes tiólicos, EROs ou via estado redox dos NP facilita a TPM (Kowaltowski e Vercesi, 1999). Um trabalho recente (Halestrap et al., 1997) fornece evidências de que a ligação de ciclofilina D e o deslocamento de ADP de sítios diferentes no TNA aumentam a exposição da proteína a fatores que desencadeiam a TPM. Ambos mecanismos parecem ser estimulados pela oxidação de grupos tiólicos do TNA (Halestrap et al., 1997).

Verificamos ainda que a adição de Ca^{2+} gera uma maior produção de EROs em mitocôndrias isoladas dos camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$. Esta maior produção foi detectada através da mais rápida oxidação de $\text{H}_2\text{-DCF}$ nestas mitocôndrias. As diferenças no tempo entre o inchamento mitocondrial (Figura 18) e a produção de EROs (Figura 19) indicam que uma grande produção de EROs precede o inchamento mitocondrial e que as mudanças na fluorescência do DCF não são artefatos relacionados a diminuição do espalhamento de luz pela suspensão mitocondrial, fenômeno que acompanha o inchamento mitocondrial.

Os resultados indicam que em condições basais, as mitocôndrias de fígado de camundongos controles e $\text{LDLR}^{-/-}$ possuem respiração e fosforilação oxidativa similares. No entanto, quando desafiadas com altas $[\text{Ca}^{2+}]$, as mitocôndrias dos camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ produzem maiores quantidades de EROs e uma maior susceptibilidade à TPM.

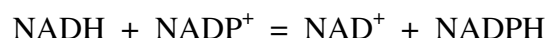
Esta maior quantidade detectada de EROs em mitocôndrias de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ em relação aos camundongos normocolesterolêmicos, pode ser resultante tanto de uma produção mais rápida de EROs por estes animais quanto de uma redução da inativação das EROs pelos sistemas de defesas antioxidantes mitocondriais.

Sabe-se que o aumento do conteúdo de colesterol provoca diminuição da fluidez da membrana e facilita a redução univalente do O_2 produzindo $\text{O}_2^{\bullet -}$ no complexo III da cadeia respiratória mitocondrial (Gille e Nohl, 2001). Assim, diferenças no conteúdo de

colesterol das membranas mitocondriais poderiam explicar a maior quantidade de EROs detectada nas mitocôndrias de fígado dos camundongos LDLR^{-/-}. No entanto, constatou-se neste trabalho que as mitocôndrias de fígado de ambos os animais possuem o conteúdo de colesterol e a fluidez de membrana similares (Tabela IV).

Como o conteúdo de colesterol encontrado nestas mitocôndrias não explica a maior detecção de EROs, verificamos a atividade dos sistemas antioxidantes. Analisamos inicialmente a atividade da Mn-superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD). Os resultados mostraram claramente que não há diferença na atividade da MnSOD entre as mitocôndrias aqui estudadas (Figura 21). Assim, passamos a investigar possíveis diferenças no estado redox dos nucleotídeos de piridina (NP) mitocondriais, uma vez que estes nucleotídeos são a principal fonte de poder redutor para os sistemas antioxidantes glutathiona peroxidase / glutathiona redutase. Sabe-se também que o estado oxidado destes nucleotídeos induz abertura do PTP (Vercesi, 1987; Fagian et al., 1990; Catisti e Vercesi, 1999; Zago et al., 2000). Entre os NP, o NADP⁺ está mais diretamente ligado à abertura do PTP (Bernardes et al., 1986; Vercesi, 1987).

Com relação ao controle do estado redox dos NP mitocondriais é importante lembrar que a transidrogenase dependente de energia transfere hidretos entre os mesmos, conforme a reação abaixo:



Esta enzima pode funcionar como uma bomba de prótons, utilizando o gradiente eletroquímico de H⁺ gerado pela respiração para deslocar o equilíbrio da reação acima na direção da produção de NADPH, garantindo uma fonte de equivalentes de redução para regenerar glutathiona reduzida (Hoek e Rydstrom, 1988). Na ausência de $\Delta\Psi$ o estado redox destes nucleotídeos é semelhante, uma vez que eles têm potencial de óxido redução idênticos.

Vercesi (1987) demonstrou que existe uma dependência da TPM em relação ao $\Delta\Psi$ mediada pela transidrogenase de NAD(P)H. Em altos valores de $\Delta\Psi$, NADP é mantido no estado reduzido, permitindo que o sistema enzimático glutathiona redutase / glutathiona

peroxidase reduza o H_2O_2 gerado pela mitocôndria à H_2O . Isto impede que o H_2O_2 seja convertido no radical $\text{OH}^\bullet$ através da reação de Fenton, protegendo a organela contra a abertura do poro de transição de permeabilidade e peroxidação lipídica. Em baixo potencial de membrana, este processo antioxidante é prejudicado e a condição de estresse oxidativo pode ser aumentada. Além disso, há evidências de que os tíóis do translocador de nucleotídeos de adenina (TNA) podem ser oxidados quando os níveis de NAD(P)H estão baixos, uma condição que favorece a TPM (Lê-Quoc e Lê-Quoc, 1989).

Com respeito à oxidação bifásica de NP observada na Figura 22, podemos concluir, com base nos resultados de Vercesi (1987) e Zago et al. (2000), que a primeira fase é provavelmente devido à oxidação de NADH, enquanto que a segunda fase é devido à oxidação de NADPH por NAD^+ via NAD(P) transidrogenase (Vercesi, 1987). A maior velocidade na oxidação de NADPH nos animais $\text{LDLR}^{-/-}$ sugere a existência de um menor conteúdo de substratos redutores desta coenzima. De fato, a adição de isocitrato, um redutor específico de NADP^+ em mitocôndrias de fígado (Moyle e Mitchell, 1973), induz uma maior reversão na oxidação de NADP^+ nas mitocôndrias de animais controle que na dos $\text{LDLR}^{-/-}$. A adição posterior de DTT reduz os nucleotídeos totais aos níveis iniciais, indicando reversão completa da oxidação dos nucleotídeos. Estes resultados demonstram que não houve interferência de mudanças de espalhamento de luz e que a diminuição de fluorescência observada foi puramente devido à oxidação de NAD(P)H. O aumento de fluorescência observado no experimento da oxidação espontânea de NADPH após adição de Ca^{2+} (Figura 23) está de acordo com resultados anteriores (Chance, 1965; Vinogradov, 1972) e é devido a formação de complexo entre NAD(P)H e Ca^{2+} .

Nas mitocôndrias dos animais $\text{LDLR}^{-/-}$, a oxidação espontânea de NADPH observada após adição de Ca^{2+} (Figura 23) é comprovada pela reversão induzida por isocitrato, mas não por β -hidroxibutirato, um redutor específico de NAD^+ (Kehrer e Lund, 1994). Como o isocitrato tem a propriedade de quelar Ca^{2+} (Harris, 1969), foi feita também uma adição de EGTA como controle para comprovar que o efeito do isocitrato foi devido a sua ação como redutor e não como quelante do Ca^{2+} . Nas mitocôndrias isoladas dos animais controles, nenhuma das adições teve qualquer efeito, indicando a maior capacidade destas mitocôndrias em manter os NP no estado reduzido.

Para eliminar o envolvimento direto do Ca^{2+} nestes resultados, foram realizados experimentos semelhantes na presença de EGTA (Figura 24), tendo sido observado resultados similares aos anteriores onde a adição de isocitrato, mas não de β -hidroxibutirato, reverte totalmente a oxidação de NP nos animais $\text{LDLR}^{-/-}$.

Se a maior susceptibilidade à abertura do PTP induzida por Ca^{2+} for devido à presença de um menor poder redutor nas mitocôndrias de fígado de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$, principalmente na forma de NADPH, a adição de isocitrato, um redutor específico de NADP^+ , evitaria esta TPM. De fato, a Figura 25 mostra que a adição de isocitrato desde o começo do experimento inibiu a queda de $\Delta\Psi$ induzida por altas concentrações de Ca^{2+} . Assim, se NADPH é reduzido novamente por isocitrato, a abertura do poro é prevenida. Este comprometimento do estado redox do sistema $\text{NAD(P)H} / \text{NAD(P)}^+$ prejudicaria a atividade do sistema enzimático glutathione redutase / glutathione peroxidase em condições de estresse oxidativo como a induzida por Ca^{2+} com consequente aumento na produção de EROs e indução de TPM.

Os resultados encontrados neste trabalho nos permite especular que a maior susceptibilidade dos animais $\text{LDLR}^{-/-}$ ao estresse oxidativo seja devido a saída de acetil CoA da matriz mitocondrial para o citosol, via exportação de citrato pela mitocôndria, conforme esquematizado na Figura 26. A saída de citrato serviria para suprir a demanda de acetil CoA para manutenção dos níveis normais de colesterol via síntese *de novo*, já que este não está entrando na célula via receptor de LDL. O citrato citosólico é então clivado a acetil CoA e oxaloacetato pela ATP:citrato liase às custas de um ATP. A deficiência causada no conteúdo de acetil CoA na matriz mitocondrial comprometeria a produção de NADPH e NADH que são produzidos pela isocitrato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, respectivamente, em mitocôndrias de fígado. O conteúdo de NADH não seria tão prejudicado, uma vez que na troca por citrato entraria malato que pode ser oxidado pela malato desidrogenase à oxaloacetato produzindo NADH. Assim, a exportação aumentada de citrato pela mitocôndria de fígado dos camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ para suprir a necessidade da síntese *de novo* de colesterol causaria diminuição nos níveis de acetil CoA necessários para manter níveis normais principalmente de NADPH via ciclo de Krebs.

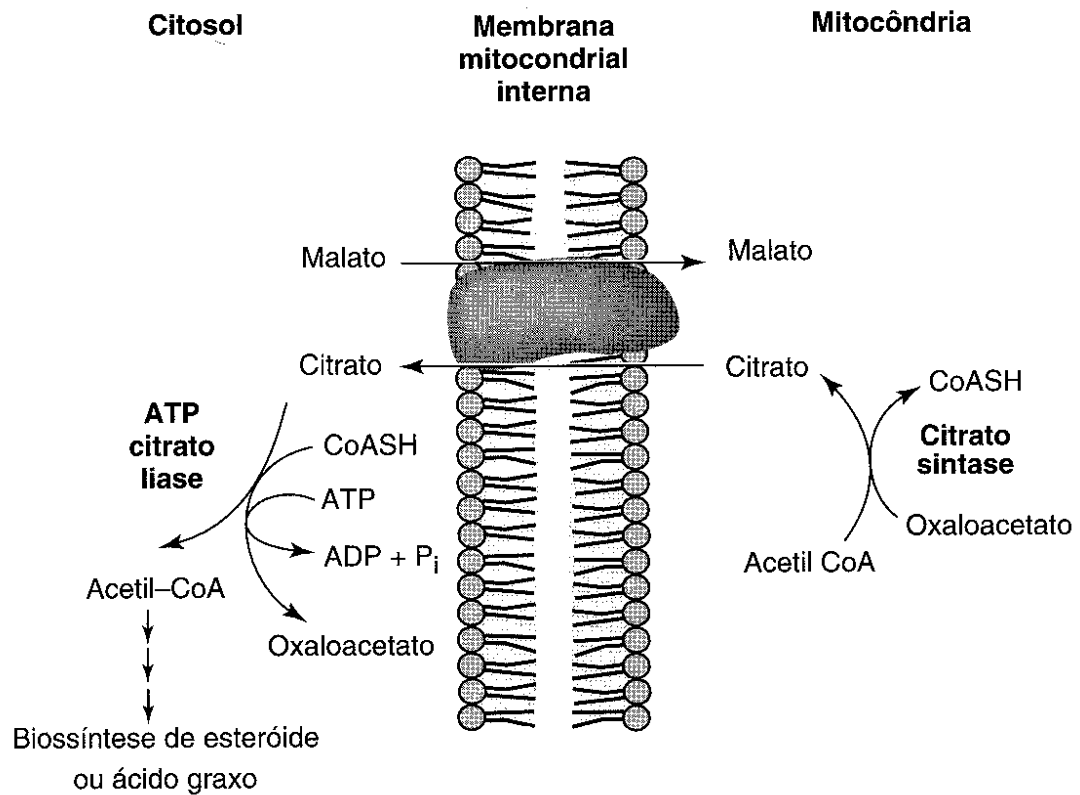


Figura 26. Exportação de citrato gerado dentro da mitocôndria para o citosol para servir como fonte de acetil CoA para a biossíntese de ácidos graxos ou esteróides (Devlin, 1997).

Além disso, o consumo de grandes quantidades de equivalentes de redução, tanto na forma de NADPH quanto na forma de NADH, pela síntese de novo de colesterol devido a presença de várias enzimas NAD(P)H-dependentes (Gaylor, 2002), reduziria grande parte do poder redutor produzido no citoplasma. Cada molécula de colesterol sintetizada consome 24 moléculas de NAD(P)H (Devlin et al, 1998; Gaylor 2002). Assim, o poder redutor produzido e consumido no citosol não poderia ser exportado para a matriz mitocondrial, via “lançadeiras” malato-aspartato e α -glicerol fosfato (Figura 27).

Os vários nucleotídeos envolvidos nas reações de oxiredução celulares (p ex: NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH , FAD e FADH_2) e CoA e seus derivados não atravessam a membrana mitocondrial interna. Assim, por exemplo, para transportar equivalentes de redução do citosol para a matriz mitocondrial, existem “mecanismos de lançadeiras de substrato” envolvendo a transferência recíproca de membros oxidados e reduzidos das várias duplas de oxiredução. Dois exemplos de como esse transporte de equivalentes de redução do citosol para a matriz acontece, estão mostrados na Figura 27. A lançadeira malato-aspartato e a lançadeira α -glicerol fosfato são empregadas em vários tecidos para transportar equivalentes de redução do citosol para a matriz mitocondrial, onde eles são oxidados para gerar energia via ciclo de Krebs e respiração ou usados na defesa antioxidante do sistema enzimático glutationala peroxidase / glutationala redutase. Outro tipo de lançadeira é a lançadeira isocitrato- α -cetoglutarato. Esta lançadeira exporta poder redutor da matriz mitocondrial para o citosol (Sazanov e Jackson, 1994), sendo encontrada em tecidos como o fígado, onde há uma maior demanda de NADPH no citosol. Existem hipóteses de que esta lançadeira funcionaria através do consumo de NADPH da matriz mitocondrial pela NADP -isocitrato desidrogenase operando no sentido de oxidação do NADP (α -cetoglutarato + $\text{NADPH} \rightarrow \text{isocitrato} + \text{NADP}^+$). O NADPH é então regenerado no citosol, pela NADP -isocitrato desidrogenase funcionando no sentido de redução do NADP^+ ($\text{isocitrato} + \text{NADP}^+ \rightarrow \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NADPH}$). A exportação de citrato e isocitrato pelo transportador de tricarboxilato e a importação de α -cetoglutarato pelo transportador de dicarboxilato completariam o processo (Sazanov e Jackson, 1994).

Assim, uma das possíveis explicações para o menor poder redutor encontrado em mitocôndrias de fígado dos camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ seria devido ao desvio de poder redutor da mitocôndria para o citosol para a síntese *de novo* de colesterol que estaria aumentada no fígado destes camundongos. Este aumento da síntese *de novo* de colesterol estaria também consumindo poder redutor normalmente importado pela mitocôndria (na forma de NADH), via lançadeiras de malato-aspartato ou via lançadeiras de α -glicerol fosfato, ou exportado pela mitocôndria (na forma de NADPH) via lançadeira isocitrato- α -cetoglutarato, deixando o sistema enzimático antioxidante mitocondrial dependente de NP reduzidos deficiente.

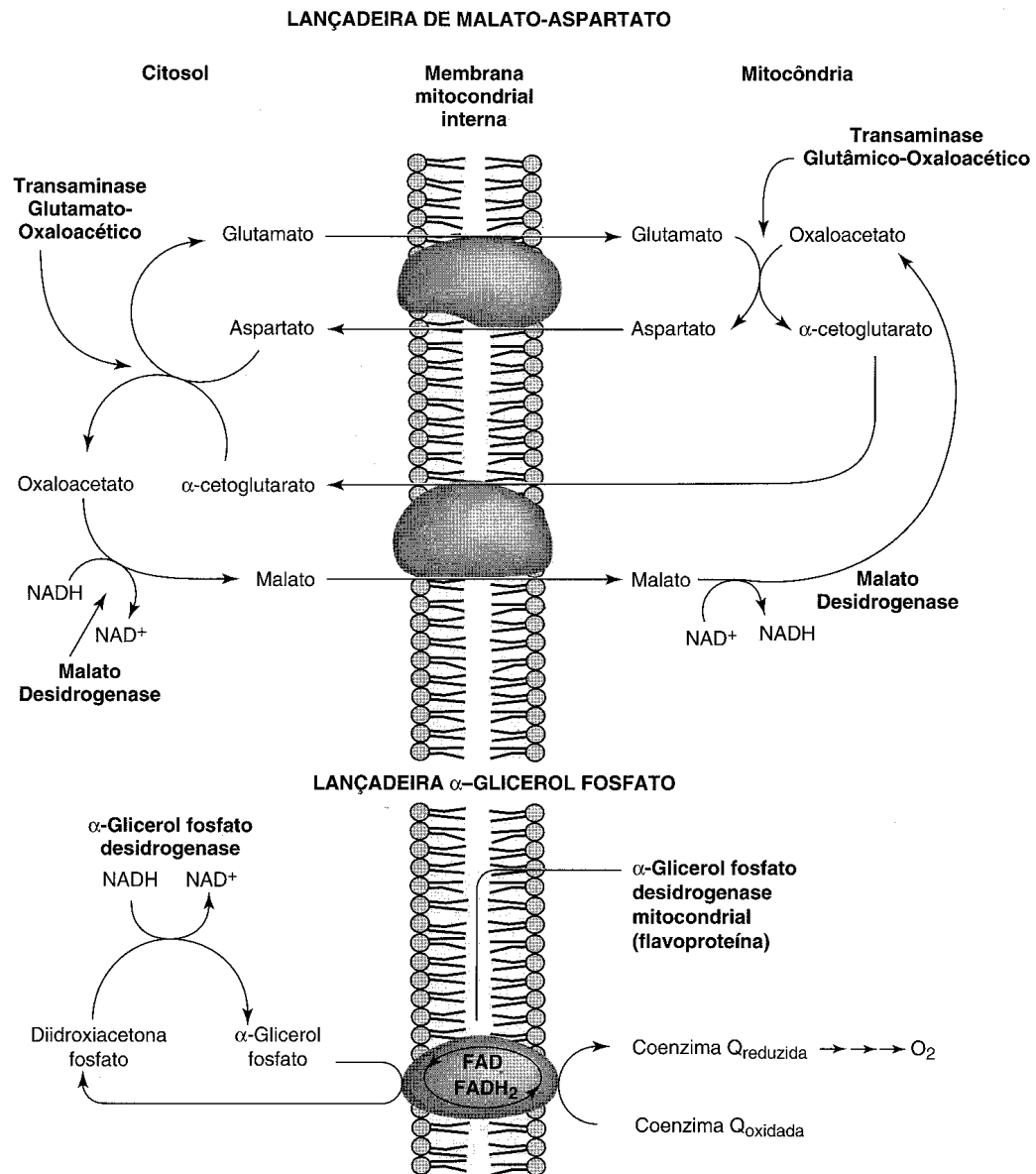


Figura 27. Representação esquemática das lançadeiras de malato-aspartato e α -glicerol fosfato (Devlin, 1997).

Assim, as hipóteses da deficiência de poder redutor causada pela exportação de citrato e/ou pela não entrada de NADH e NADPH na mitocôndria via sistema de lançadeiras justificariam os resultados encontrados neste trabalho. De fato, a maior velocidade na oxidação de NADPH nos animais LDLR^{-/-} (Figura 22) sugere a existência de um menor conteúdo de substratos redutores desta coenzima. A adição de isocitrato, mas não de β -hidroxibutirato, reverte totalmente a oxidação de NP nos animais LDLR^{-/-} (Figura 23), independente da presença de Ca²⁺ (Figura 24) e sugere que estas mitocôndrias possuem um menor poder redutor, principalmente na forma de NADPH. A principal consequência da diminuição do conteúdo mitocondrial de NADPH e/ou NADH é o comprometimento do sistema antioxidante enzimático glutationala peroxidase / glutationala redutase (ver esquema na Figura 4). A ocorrência deste processo em mitocôndrias de macrófagos ou de outras células da parede dos vasos poderia explicar a origem do estresse oxidativo que desencadearia a formação do ateroma mais precocemente em indivíduos hipercolesterolêmicos por deficiência de receptor de LDL.



6. CONCLUSÕES

- ✓ $^1\text{O}_2$ produzido a partir da termodecomposição do endoperóxido NDPO₂ oxida tióis de proteínas da membrana mitocondrial interna responsáveis pela abertura do PTP em mitocôndrias de fígado de rato.
- ✓ Mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} (hipercolesterolêmicos) apresentam uma maior susceptibilidade à condição de TPM induzida por Ca²⁺ quando comparados à animais controles (normocolesterolêmicos). Esta maior susceptibilidade parece ser consequência do menor poder redutor, principalmente na forma de NADPH, encontrado nas mitocôndrias de fígado destes camundongos.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, R. W. Atherosclerosis as disease of redox-sensitive genes. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, 109: 129-146, 1998.
- Ballinger, S. W.; Patterson, C.; Knight-Lozano, C. A.; Burow, D. L.; Conklin, C. A.; Hu, Z.; Reuf, J.; Horaist, C.; Lebovitz, R.; Hunter, G. C.; McIntyre, K.; Runge, M. S. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. **Circulation**, 106: 544-549, 2002.
- Batlouni, M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária. **Arq Bras Cardiol**, 68:, 1997.
- Beckmann, J. S.; Ye, Y. Z.; Anderson, P. G.; Chen, J.; Accavitti, M. A.; Tarpey, M. M.; White, C. R. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. **Biol Chem Hoppe Seyler**. 375: 81-88, 1994.
- Berlett, S. B.; Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem**, 272: 20313-20316, 1997.
- Berliner, J. A.; Heinecke, J. W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radic Biol Med**, 20: 707-727, 1996
- Bernardes, C. F.; Meyer-Fernandes, J. R.; Basseres, D. S.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Ca(2+)-dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). **Biochim Biophys Acta**, 1188: 93-100, 1994.
- Bernardes, C. F.; Pereira da Silva, L.; Vercesi, A. E. t-Butylhydroperoxide-induced Ca²⁺ efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg²⁺ and ATP. **Biochim Biophys Acta**, 850: 41-48, 1986.
- 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**, 267: 8834-8839, 1992.
- Bernardi, P., and Petronilli, V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. **J Bioenerg Biomembr**, 28: 131-138, 1996.

- Bjorkhem, I.; Henriksson-Freyschuss, A.; Breuer, O.; Diczfalusy, U.; Berglund, L.; Henriksson, P. The antioxidant butylated hydroxytoluene protects against atherosclerosis. **Arterioscler Thromb**, 11: 15–22, 1991.
- Bosca, F.; Encinas, S.; Heelis, P. F.; Miranda, M. A. Photophysical and photochemical characterization of a photosensitizing drug: a combined steady state photolysis and laser flash photolysis study on carprofen. **Chem Res Toxicol**, 10: 820-827, 1997.
- Boveris, A.; Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J**, 134: 707-716, 1973.
- Boveris, A.; Cadenas, E.; Stoppani, A. O. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem J**, 156: 435-444, 1976.
- Broekemeier, K. M.; Dempsey, M. E.; Pfeiffer, D. R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. **J Biol Chem**, 264: 7826-7830, 1989.
- Brown, M. S.; Goldstein, J. I. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**: 34-47.
- Brown, M. S.; Goldstein, J. L. The receptor model for transport of cholesterol in plasma. **Ann N Y Acad Sci**, 454: 178-182, 1985.
- Cadenas, E.; Boveris, A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. **Biochem J**, 188: 31-37, 1980.
- Cadenas, E.; Boveris, A.; Ragan, C. I.; Stoppani, A. O. M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 180: 248-257, 1977.
- Cai, J.; Jones, D. P. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. **J Biol Chem**, 273: 11401-1144, 1998.

Carew, T. E.; Schwenke, D. C.; Steinberg, D. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84:7725–7729, 1987.

Castilho, R. F.; Kowaltowski, A. J.; Meinicke, A. R.; Bechara, E. J. H.; Vercesi, A.E. 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 Radical Biol Med**, 18: 479-486, 1995.

Castilho, R. F.; Kowaltowski, A. J.; Vercesi, A.E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioenerg. Biomembr**, 28: 523-529, 1996.

Catisti, R.; Vercesi, A. E. The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the fatty acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria. **FEBS Letters**, 464: 97-101, 1999.

Chance, B. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. **J Biol Chem**, 240:2729-2748, 1965.

Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, 59: 527-605, 1979.

Clayton, D. A. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. **Annu Rev Biochem**, 53: 573-594, 1984.

Connern, C. P.; Halestrap, A. P. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of an inner-membrane Ca^{2+} -dependent pore. **Biochem J**, 302: 321-324, 1994.

Costa, L. E.; Llesuy, S.; Boveris, A. Active oxygen species in the liver of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. **Am J Physiol**, 264: C1395-1400, 1993.

Crompton, M.; Ellinger, H.; Costi, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem J**, 255: 357-360, 1988.

Croteau, D. L.; Bohr, V. A. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. **J Biol Chem**, 272: 25409-25412, 1997.

Cynshi, O.; Kawabe, Y.; Suzuki, T.; Takashima, Y.; Kaise, H.; Nakamura, M.; Ohba, Y.; Kato, Y.; Tamura, K.; Hayasaka, A.; Higashida, A.; Sakaguchi, H.; Takeya, M.; Takahashi, K.; Inoue, K.; Noguchi, N.; Niki, E.; Kodama, T. Antiatherogenic effects of the antioxidant BO-653 in three different animal models. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95:10123–10128, 1998.

Darley-USmar, V. M.; Hassall, D. G. The role of macrophages and the modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. In: Curtis, M. J., ed. **Immunopharmacology of the heart**, London: Academic Press: p. 43–51, 1993.

Darley-USmar, V.; Wiseman, H.; Halliwell, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Lett**, 369: 131-135, 1995.

Dawson, T. L.; Gores, G. J.; Nieminen, A. L.; Herman, B.; Lemasters, J. J. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. **Am J Physiol**, 264: C961-967, 1993.

Devasagayam, T. P.; Sundquist, A. R.; Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. **J Photochem Photobiol B**, 9: 105-116, 1991.

Devlin, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo : Edgard Blucher, 2000.

Di Mascio, P., and Sies, H. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylidene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. **J. Am. Chem. Soc.** 111: 2909-2914, 1989.

Di Mascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys**, 274, 532–538, 1989.

Doonan, S.; Barra, D.; Bossa, F. Structural and genetic relationships between cytosolic and mitochondrial isoenzymes. **Int J Biochem**, 16: 1193-1199, 1984.

Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, Spec No:548-551, 1992.

Esterbauer, H.; Dieber-Rotheneder, M.; Waeg, G.; Puhl, H.; Tatzber, F. Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. **Biochem Soc Trans**, 18: 1059-1061, 1990.

Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jurgens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radic Biol Med**, 13: 341-390, 1992.

Fagian, M. M.; Pereira da Silva, L.; Martins, I. S.; Vercesi, A. E. Membrane protein thiol cross-linking associated by Ca^{2+} plus prooxidants. **J Biol Chem**, 265: 19955-19960, 1990.

Fleischhacker, E.; Esenabhalu, V. E.; Holzmann, S.; Skrabal, F.; Koidl, B.; Kostner, G. M.; Graier, W. F. In human hypercholesterolemia increased reactivity of vascular smooth muscle cells is due to altered subcellular Ca^{2+} distribution. **Atherosclerosis**, 149: 33-42, 2000.

Flohe, L.; Otting, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymol**, 105: 93-104, 1984.

Freeman, B. A.; White, C. R.; Gutierrez, H.; Paler-Martinez, A.; Tarpey, M. M.; Rubbo, H. Oxygen radical-nitric oxide reactions in vascular diseases. **Adv Pharmacol**, 34: 45-69, 1995.

Garcia-Ruiz, C.; Colell, A.; Mari, M.; Morales, A.; Fernandez-Checa, J. C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. **J Biol Chem**, 272: 11369-77, 1997.

Gaylor, J. L. Membrane-bound enzymes of cholesterol synthesis from lanosterol. **Biochem Biophys Res Commun**. 292: 1139-1146, 2002.

- Gille, L.; Nohl, H. The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. **Arch Biochem Biophys**, 388: 34-38, 2001.
- Giulivi, C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. **Biochem J**, 332 :673-9, 1998.
- Go, Y.-M.; Patel, R. P.; Maland, M. C.; Park, H.; Beckman, J. S.; Darley-USmar, V. M.; Jo, H. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of cJun Nterminal kinase in endothelial cells **Am J Physiol**, 277: H1647– 1653, 1999.
- Goldstein, J. L.; Brown, M. S. The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism. **J Cell Sci Suppl**, 3: 131-137, 1985.
- Gornall, A.G.; Bardwill, C.J.; David, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **J Biol Chem**, 177: 751, 1949.
- Green, D.R.; Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281: 1309-1312, 1998.
- Grether-Beck, S.; Olaizola-Horn, S.; Schmitt, H.; Grewe, M.; Jahnke, A.; Johnson, J. P.; Briviba, K.; Sies, H.; Krutmann, J. Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 93: 14586-14591, 1996.
- Griendling, K. K.; Harrison, D. G. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. **Circ Res**, 85: 562-563, 1999.
- Griendling, K. K.; Sorescu, D.; Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, 86: 494-501, 2000.
- Grijalba, M. T.; Vercesi, A. E.; Schreier, S. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, 38: 13279-13287, 1999.
- Halestrap, A. P., Woodfield, K. Y., and Connern, C. P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. **J Biol Chem**, 272, 3346– 3354, 1997.

- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford University Press, 2000.
- Hansford, R. G.; Hogue, B. A.; Mildaziene, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. **J Bioenerg Biomembr**, 29: 89-95, 1997.
- Harris, E. J. Conversion of isocitrate to citrate and accumulation of citrates in mitochondria. **FEBS Lett**, 4: 259-261, 1969.
- Hassan, T.; Khan, A. U. Phototoxicity of tetracyclines: photosensitized emission of singlet delta oxygen. **Proc Natl Acad Sci**, 83: 4604, 1986.
- Hayakawa, M.; Torii, K.; Sugiyama, S.; Tanaka, M.; Ozawa, T. Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. **Biochem Biophys Res Commun**, 179: 1023-1029, 1991.
- Hazen, S. L.; Heinecke, J. W. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. **J Clin Invest**, 99: 2075-2081, 1997.
- Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochem Photobiol**, 55: 145-157, 1992.
- Hoek, J. B.; Rydstrom, J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochem J**, 254: 1-10, 1988.
- Honda, H. M.; Leitinger, N.; Frankel, M.; Goldhaber, J. I.; Natarajan, R.; Nadler, J. L.; Weiss, J. N.; Berliner, J. A. Induction of monocyte binding to endothelial cells by MM-LDL: role of lipoxygenase metabolites. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19: 680-686, 1999.
- Hughes, D. A.; Townsend, P. J.; Haslam, P. L. Enhancement of the antigen presenting function of monocytes by cholesterol: possible relevance to inflammatory mechanisms in extrinsic allergic alveolitis and atherosclerosis. **Clin Exp Immunol**, 87: 279-286, 1992.

- Hunter, D. R.; Haworth, R. A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria I: The protective mechanisms. **Arch Biochem Biophys**, 195: 453-459, 1979.
- Indig, G.; Campa, A.; Bechara, E. J. H.; Cilento, G. **Photochem Photobiol**, 48: 719-723, 1988.
- Ishibashi, S.; Brown, M.S.; Goldstein, J. L.; Gerard, R. D.; Hammer, R. E.; Herz, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J. Clin. Invest**, 92: 883-93, 1993.
- Jensen, B. D.; Gunter, K. K.; Gunter, T. E. The efficiencies of the component steps of oxidative phosphorylation. II. Experimental determination of the efficiencies in mitochondria and examination of the equivalence of membrane potential and pH gradient in phosphorylation. **Arch Biochem Biophys**, 248: 305-323, 1986.
- Kajiwara, T., and Kearns, D. R. J. Direct spectroscopic evidence for a deuterium solvent effect on the lifetime of singlet oxygen in water. **J Am Chem Soc**, 95: 5886-5890, 1973.
- Kamo, N.; Muratsugu, M; Hongoh, R.; Kobatake, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. **J Membr Biol**, 49: 105-121, 1979.
- Kanofsky, J. R. Bromine derivatives of amino acids as intermediates in the peroxidase-catalyzed formation of singlet oxygen. **Arch Biochem Biophys**, 274: 229-234, 1989.
- Kanofsky, J. R. Singlet oxygen production by chloroperoxidase-hydrogen peroxide-halide systems. **J Biol Chem**, 259: 5596-5600, 1984.
- Kaplan, R. S., and Pedersen, P. L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochem J**, 212: 279– 288, 1983.
- Kawato, S.; Kinosita, K. Jr.; Ikegami, A. Dynamic structure of lipid bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques. **Biochemistry**, 16: 2319-24, 1977.
- Kehrer JP, Lund LG. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 17: 65-75, 1994.

- Kerver, E. D.; Vogels, I. M.; Bosch, K. S.; Vreeling-Sindelarova, H.; Van den Munckhof, R. J.; Frederiks, W. M. In situ detection of spontaneous superoxide anion and singlet oxygen production by mitochondria in rat liver and small intestine. **Histochem J**, 29: 229-237, 1997.
- Klatt, P.; Esterbauer, H. Oxidative hypothesis of atherogenesis. **J Cardiovasc Risk**, 3: 346-351, 1996.
- Kochhar, N.; Kaul, D. Molecular link between membrane cholesterol and Na⁺/H⁺ exchange within human platelets. **FEBS Lett**, 299: 19-22, 1992.
- Korshunov, S. S.; Skulachev, V. P.; Starkov, A. A. High protonic potential activates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Lett**, 416: 15-18, 1997.
- Kowaltowski A. J.; Castilho R. F.; Grijalba M. T.; Bechara E.J.; Vercesi A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, 271: 2929-34, 1996A.
- Kowaltowski, A. J.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, 495: 12-15, 2001.
- Kowaltowski, A. J.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, 378: 150-152, 1996B.
- Kowaltowski, A. J.; Netto, L. E. S.; Vercesi, A. E. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. **J Biol Chem**, 273: 12766-12769, 1998.
- Kowaltowski, A. J.; Vercesi, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 26: 463-71, 1999.
- Kowaltowski, A. J.; Vercesi, A. E. Reactive oxygen generation by mitochondria, In: Lemasters, J. J. e Nieminen A. L. **Mitochondria in Pathogenesis** New York: Kluwer Academic / Penum Publishers, 2001. p. 281-294.

- Kowaltowski, A. J.; Vercesi, A. E.; Castilho, R. J. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with *N*-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, 1318: 395-402, 1997.
- Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. **J Dermatol Sci. Suppl**, 1: S22-26, 2000.
- Lamb, D. J; Wilkins, G. M.; Leake, D. S. The oxidative modification of low density lipoprotein by human lymphocytes. **Atherosclerosis**, 92: 187-192, 1992.
- LeBel, C. P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, 5: 227-31, 1992.
- Lehninger, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo : Sarvier, 2000.
- Lehninger, A. L. **The mitochondrion: molecular basis of structure and function**. W. A. Benjamin, Inc. New York, USA, 1964.
- Lehninger, A. L.; Vercesi, A. E.; Bababumni, E. A. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc Nat Acad Sci USA**, 75: 1690-1694, 1978.
- Lemasters, J. J.; Nieminen, A. L.; Qian, T.; Trost, L. C.; Elmore, S. P.; Nishimura, Y.; Crowe, R. A.; Cascio, W. E.; Bradham, C. A.; Brenner, D. A.; Herman, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 1366: 177-196, 1998.
- Lenartowicz, E.; Bernardi, P.; Azzone, G. F. Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, 23: 679-688, 1991.
- Le-Quoc, D.; Le-Quoc, K. Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 273: 466-478, 1989.
- Liu, S. S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. **Biosc. Rep**, 17: 259-272, 1997.

- Lopez-Mediavilla, C.; Orfao, A.; Gonzalez, M.; Medina, J. M. Identification by flow cytometry of two distinct rhodamine-123-stained mitochondrial populations in rat liver. **FEBS Lett**, 254: 115-120, 1989.
- Macedo, D. V.; Ferraz, V. L.; Pereira da Silva, L.; Vercesi, A. E. Ca^{2+} -dependent NAD(P)^+ -induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. **Integration of Mitochondrial Function**, Ed. J. Lemasters, Plenum, New York, 1988, p. 535-542.
- Machado, A. E. H. Terapia fotodinâmica: Princípios, Potencial de aplicação e Perspectivas. **Química Nova**, 23: 237-243, 2000.
- Martinez, F.; Eschegoyen, S.; Briones, R.; Cuellar, A. Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. **J Lipid Res**, 29: 1005-1011, 1988.
- Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. Utilização de endoperóxidos derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. **Química Nova**, 23: 686-689, 2000.
- Meister, A.; Anderson, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, 52: 711-760, 1983.
- Merryfield, M. L.; Lardy, H. A. Ca^{2+} -mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe^{2+} from rat liver **J Biol Chem**, 257:3628-3635, 1982.
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, 191: 144-148, 1961.
- Mohazzab, K. M.; Kaminski, P. M.; Wolin, M. S. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. **Am J Physiol**, 266: H2568-2572, 1994.
- Morel, D. W.; DiCorleto, P. E.; Chisolm, G. M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. **Arteriosclerosis**, 4: 357-364, 1984.

- Moreno, G., Poussin, K., Richelli, F., and Salet, C. The effects of singlet oxygen produced by photodynamic action on the mitochondrial permeability transition differ in accordance with the localization of the sensitizer. **Arch Biochem Biophys**, 386: 243–250, 2001.
- Moyle, J.; Mitchell, P. The proton-translocating nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) transhydrogenase of rat liver mitochondria. **Biochem J**, 132: 571-585, 1973.
- Muratsugu, M.; Kamo, N.; Kurihara, K.; Kobatake, Y. Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. **Biochim Biophys Acta**, 464: 613-619, 1977.
- Nantes, I.; Cilento, G.; Bechara, E. H.; Vercesi, A. E. Chemiluminescent diphenylacetaldehyde oxidation by mitochondria is promoted by cytochromes and leads to oxidative injury, and loss of viability. **Photochem Photobiol**, 62: 522–527, 1995.
- Navab, M.; Fogelman, A. M.; Berliner, J. A.; Territo, M. C.; Demer, L. L.; Frank, J. S.; Watson, A. D.; Edwards, P. A.; Lusis, A. J. Pathogenesis of atherosclerosis. **Am. J. Cardiol**, 76: 18C– 23C, 1995.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J. **Bioenergetics 3**. Academic Press Inc. London, U.K, 2002.
- Nicholls, D.G.; Åkerman, K. E. O. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**, 683: 57-88, 1982.
- Nicholls, D.G.; Brand, M. D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. **Biochem J**, 188: 113-118, 1980.
- Nicolli, A.; Basso, E.; Petronilli, V.; Wegner, R. M.; Bernardi, P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. **J Biol Chem**, 271: 2185-2192, 1996.

- Niu, X.; Zammit, V.; Upston, J. M.; Dean, R. T.; Stocker, R. Coexistence of oxidized lipids and alpha-tocopherol in all lipoprotein density fractions isolated from advanced human atherosclerotic plaques. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19: 1708–1718, 1999.
- Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J Photochem Photobiol B**, 39: 1-18, 1997.
- Ogilby, P. R.; Foote, C. S. Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$). **J Am Chem Soc**, 105: 3423-3430, 1983.
- Osono, Y.; Woollett, L. A.; Herz, J.; Dietschy, J. M. Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. **J Clin Invest**, 95: 1124-32, 1995.
- Ozawa, T. Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. **Biosci Rep**, 17: 237-250, 1997.
- Palinski, W.; Rosenfeld, M. E.; Yla-Herttuala, S.; Gurtner, G. C.; Socher, S. S.; Butler, S. W.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Steinberg, D.; Witztum J. L. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA**, 86:1372–1376, 1989.
- Parthasarathy, S.; Printz, D. J.; Boyd, D.; Joy, L.; Steinberg, D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. **Arteriosclerosis**, 6: 505–510, 1986.
- Patel, R. P.; Moellering, D.; Murphy-Ullrich, J.; Jo, H.; Beckman, J. S.; Darley-USmar, V. M. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. **Free Rad Biol Med**, 28: 1780-1794, 2000.
- Radi, R.; Turrens, J. F.; Chang, L. Y.; Bush, K. M.; Crapo, J. D.; Freeman, B. A. Detection of catalase in rat heart mitochondria. **J Biol Chem**, 266: 22028-22034, 1991.
- Reinhart, P. H.; Taylor, W. M.; Bygrave, F. L. A procedure for the rapid preparation of mitochondria from rat liver. **Biochem J.**, 294: 731-735, 1982.

- Ricchelli, F.; Gobbo, S.; Jori, G.; Salet, C.; Moreno, G. Temperature-induced changes in fluorescence properties as a probe of porphyrin microenvironment in lipid membranes. 2. The partition of hematoporphyrin and protoporphyrin in mitochondria. **Eur J Biochem**, 233: 165-170, 1995.
- Rigobello, M. P.; Callegaro, M. T.; Barzon, E.; Benetti, M.; Bindoli, A. Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability. **Free Radic Biol Med**, 24: 370-376, 1998.
- Robinson, J.; Cooper, J. M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem**, 33: 390-399, 1970.
- Ross, R. Mechanisms of disease: Atherosclerosis – An inflammatory disease. **N Eng J Med**, 340: 115-126, 1999.
- Rossi, C. S.; Lehninger, A. L. Stoichiometry of respiration stimulation, accumulation of Ca^{2+} and phosphate and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, 239: 3971-3980, 1964.
- Rubbo, H.; Darley-Usmar, V.; Freeman, B. A. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. **Chem Res Toxicol**, 9: 809–820, 1996.
- Ryter, S. W.; Tyrrell, R. M. Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radic Biol Med**, 24: 1520-1534, 1998.
- Salet, C.; Moreno, G. Photodynamic effects of haematoporphyrin on respiration and calcium uptake in isolated mitochondria. **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med**, 39: 227–230, 1981.
- Salet, C.; Moreno, G.; Ricchelli, F.; Bernardi, P. Singlet oxygen produced by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore. **J Biol Chem**, 272: 21938–21943, 1997.
- Sazanov, L. A.; Jackson, J. B. Proton-translocating transhydrogenase and NAD- and NADP-linked isocitrate dehydrogenases operate in a substrate cycle which contributes to fine regulation of the tricarboxylic acid cycle activity in mitochondria. **FEBS Lett**, 344: 109-116, 1994.

- Scarpa, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators **Methods Enzymol**, 56: 301–338, 1979.
- Scherrer, U.; Nussberger, J.; Torriani, S.; Waeber, B.; Darioli, R.; Hofstetter, J. R.; Brunner, H. R. Effect of weight reduction in moderately overweight patients on recorded ambulatory blood pressure and free cytosolic platelet calcium. **Circulation**, 83: 552-558, 1991.
- Schneider, W. C.; Hogeboom, G. H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. **J Biol Chem**, 183: 123-128, 1950.
- Schraufstatter, I. U.; Browne, K.; Harris, A.; Hyslop, P. A.; Jackson, J. H.; Quehenberger, O.; Cochrane, C. G. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. **J Clin Invest**, 85: 554-62, 1990.
- Schultz, B. E.; Chan, S. I. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. **Annu Rev Biophys Struct**, 30: 23-65, 2001.
- Sekulachev, V. P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. **FEBS Letters**, 423: 275-280, 1998.
- Seres I, Freyss-Beguin M, Mohacsi A, Kozlovsky B, Simon J, Devynck MA, Fulop T Jr. Alteration of lymphocyte membrane phospholipids and intracellular free calcium concentrations in hyperlipidemic subjects. **Atherosclerosis**, 121: 175-83, 1996.
- Sharma, R.; Dey, S.; Verma, R. Age-specific development of malate-aspartate shuttle in the liver and kidney of mice. **Biochem Int**, 27: 1059-1066, 1992.
- Sies, H.; Moss, K. M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **Eur J Biochem**, 84: 377-383, 1978.
- Sorisky, A.; Kucera, G. L.; Rittenhouse, S. E. Stimulated cholesterol-enriched platelets display increased cytosolic calcium and phospholipase A activity independent of changes in inositol triphosphates and agonist/receptor binding. **Biochem J**, 265: 747-754, 1990.
- Spector, A. A.; Yorek, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. **J Lipid Res**, 26: 1015-1035, 1985.

- Steinberg, D. Oxidative Modification of LDL in the Pathogenesis of Atherosclerosis, **Am J Geriatr Cardiol**, 2: 38-41, 1993.
- Steinbrecher, U. P.; Parthasarathy, S.; Leake, D. S.; Witztum, J. L.; Steinberg, D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 81: 3883-3887, 1984.
- Stubbs, C. D.; Smith, A. D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in regulation to membrane fluidity and function. **Biochim Biophys Acta**, 779: 89-137, 1984.
- Suzuki, Y. J.; Forman, H. J.; Sevanian, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radic Biol Med**, 22: 269-285, 1997.
- Tangirala, R. K.; Casanada, F.; Miller, E.; Witztum, J. L.; Steinberg, D.; Palinski, W. Effect of the antioxidant N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD) on atherosclerosis in apoE-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 15:1625-1630, 1995.
- Tulenko, T. N.; Laury-Kleintop, L.; Walter, M. F.; Mason, R. P. Cholesterol, calcium and atherosclerosis: is there a role for calcium channel blockers in atheroprotection? **Int J Cardiol**. 62 (Suppl 2):S55-66, 1997.
- Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosc Rep**, 17: 3-8, 1997.
- Turrens, J. F.; Alexandre, A.; Lehninger, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 237: 408-414, 1985.
- Turrens, J. F.; Boveris, A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem. J**, 191: 421-427, 1980.
- Valle, V. G. R.; Fagian, M. M.; Parentoni, L. S.; Meinincke, A. R.; Vercesi, A.E. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Arch Biochem Biophys**, 307: 1-7, 1993.

- Vercesi, A. E. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)⁺-stimulated Ca²⁺ efflux from mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, 119: 305-310, 1984B.
- Vercesi, A. E. Dissociation of NAD(P)⁺-stimulated mitochondrial Ca²⁺ efflux from swelling and membrane damage. **Arch Biochem Biophys**, 232: 86-91, 1984A.
- Vercesi, A. E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 252: 171-8, 1987.
- Vercesi, A. E., and Docampo, R. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized Leishmania donovani. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. **Biochem J**, 284: 463–467, 1992.
- Vercesi, A. E.; Hoffmann, M. E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In **Methods in Toxicology "Mitochondrial Dysfunction"**, D.P.Jones, L.H.Lash, eds, 1993, Vol.2, Chapter 21, Academic Press, New York.
- Vercesi, A. E.; Kowaltowski, A. J.; Grijalba, M. T.; Meininke, A. R.; Castilho, R. F.. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosc.Reports**, 17: 43-52, 1997.
- Vercesi, A. E.; Pereira-da-Silva, L. NADP redox state and mitochondrial Ca²⁺ efflux: a controversial issue. **Braz J Med Biol Res**, 17: 353-356, 1984.
- Vinogradov, A.; Scarpa, A.; Chance, B. Calcium and pyridine nucleotide interaction in mitochondrial membranes. **Arch Biochem Biophys**, 152: 646-654, 1972.
- Wagner, J. R.; Motchnik, P. A.; Stocker, R.; Sies, H.; Ames, B. N. The oxidation of blood plasma and LDL components by chemically generated singlet O₂. **J Biol Chem.**, 268: 18502-15506, 1993.
- Watabe, S.; Hiroi, T.; Yamamoto, Y.; Fujioka, Y.; Hasegawa, H.; Yago, N.; Takahashi, S. Y. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. **Eur J Biochem**, 249: 52-60, 1997.

- Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. **Cancer Res**, 36: 2326-2329, 1976.
- White, C. R.; Darley-USmar, V.; Berrington, W. R.; McAdams, M.; Gore, J. Z.; Thompson, J. A.; Parks, D. A.; Tarpey, M. M.; Freeman, B. A. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 8745-8749, 1996.
- Witting, P.; Pettersson, K.; Ostlund-Lindqvist, A. M.; Westerlund, C.; Wagberg, M.; Stocker, R. Dissociation of atherogenesis from aortic accumulation of lipid hydro(pero)xides in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **J. Clin. Invest.**, 104: 213–220, 1999.
- Witztum, J. L.; Steinberg, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest**, 88: 1785-1792, 1991.
- Yla-Herttuala, S.; Palinski, W.; Rosenfeld, M. E.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Butler, S.; Witztum, J. L.; Steinberg, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J Clin Invest**, 84: 1086–1095, 1989.
- Young, S. G.; Parthasarathy, S. Why are low-density lipoproteins atherogenic? **West J Med**, 160: 153-164, 1994.
- Zago, E. B.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. **FEBS Lett**, 478: 29-33, 2000.
- Zakowski, J. J.; Tappel, A. L. Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. **Biochim Biophys Acta**, 526: 65-76, 1978.
- Zamzami, N.; Susin, S. A.; Marchetti, P.; Hirsch, T.; Gomez-Monterrey, I.; Castedo, M.; Kroemer, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J Exp Med**, 183: 1533-1544, 1996.

Zhou, Q.; Jimi, S.; Smith, T. L.; Kummerow, F. A. The effect of cholesterol on the accumulation of intracellular calcium. **Biochim Biophys Acta**, 1085: 1-6, 1991.

Zhuang, S.; Lynch, M. C.; Kochevar, I. E. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. **Exp Cell Res**, 250: 203-12, 1999.

Zoratti, M.; Szabò, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, 1241: 139-176, 1995.