



ANA CAROLINA MARQUES

***O AUMENTO DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE
EM MITOCÔNDRIAS DE CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS É CONSEQUÊNCIA DO
AUMENTO DE SÍNTESE DE COLESTEROL OU DA
DEFICÊNCIA DA NADP-TRANSIDROGENASE?***

CAMPINAS

2014



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

ANA CAROLINA MARQUES

***O AUMENTO DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE
EM MITOCÔNDRIAS DE CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS É CONSEQUÊNCIA DO
AUMENTO DE SÍNTESE DE COLESTEROL OU DA
DEFICÊNCIA DA NADP-TRANSIDROGENASE?***

Orientador: Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi

**Coorientadora: Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de
Oliveira**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Ana Carolina Marques e orientada pelo Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

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

M348a Marques, Ana Carolina, 1988-
O aumento de transição de permeabilidade em mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos é consequência do aumento de síntese de colesterol ou da deficiência da NADP-transidrogenase? / Ana Carolina Marques. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Mitocôndrias. 2. Hipercolesterolemia. 3. Estresse oxidativo. 4. Transição de permeabilidade mitocondrial. 5. Colesterol. I. Vercesi, Anibal Eugênio, 1946-. II. Oliveira, Helena Coutinho Franco de, 1958-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Is the higher mitochondrial permeability transition of hypercholesterolemic mice due to increased cholesterol synthesis or to NADPtranshydrogenase deficiency?

Palavras-chave em inglês:

Mitochondria

Hypercholesterolemia

Oxidative stress

Mitochondrial permeability transition

Cholesterol

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Anibal Eugênio Vercesi [Orientador]

Nelci Fenalti Hoehr

Gilberto Eiji Shiguemoto

Data de defesa: 26-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
ANA CAROLINA MARQUES

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

MEMBROS:

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



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



3. PROF(A). DR(A). GILBERTO EIJI SHIGUEMOTO



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

Data: 26 de fevereiro de 2014

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob orientação do Professor Dr. Anibal Eugênio Vercesi e co-orientação da Professora Dra. Helena Coutinho Franco Oliveira, na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP temático nº 11/50400-0, bolsa Processo nº 2011/15103-4), do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 302764/2009-7), INCT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Diabetes e Obesidade (Fapesp/CNPq) e Fundo de Apoio ao Ensino à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX, UNICAMP).

Dedicatória

Aos meus pais, Elisa e
Ademir, que estiveram
sempre ao meu lado,
incentivando e apoiando
minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, meu profundo respeito, por conceder a oportunidade da minha integração em seu grupo de pesquisa, por todos os sábios ensinamentos, pelas discussões científicas, pela dedicação e paciência.

À professora Dra. Helena C. F. Oliveira, pela co-orientação deste trabalho, pelas discussões científicas e pela ajuda cedida sempre que necessitei.

Ao Professor Dr. Roger Frigério Castilho, pelas sugestões e disponibilidade em ajudar sempre.

À Audrey de Moraes que me ajudou muito no andamento deste trabalho, sempre sendo uma amiga.

A todos que fazem parte do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, pela colaboração, companheirismo e pelos laços de amizade que se formaram durante este período de convivência; em especial, Hanan Chweih, Ivan Capelli, Tiago Rezende Figueira, Felipe Gustavo Ravagnani, Luiz Guilherme M. Bueno, Erika Rodrigues da Silva, Juliana Ruas, Paolo G. La Gardia, Rute A. P. Costa, Franco A. Rossato, Raffaella Ignarro, Carlos E. Benevento, Silvia Elaine Ferreira, Carina Malaguti, Sônia Gurgueira, Cláudia Carvalho Navarro, Evelyne Figueirôa, Mary Aranda, Kézia Moura, Arthur J. Hernandez, Vinicius Ferreira.

Aos funcionários do Laboratório Márcia M. Fagian, Juliana A. Ronchi, Edilene de Souza Siqueira Santos e Roberto César Stahl pelo carinho, auxílio e amizade.

Ao Thales, por ter aguentado meu estresse nos momentos mais difíceis deste trabalho, tornando meus momentos mais felizes e principalmente pela paciência para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu irmão Junior, por ter me apoiado sempre, pela dedicação, amizade e companhia.

A minha irmã Flávia, por acreditar em meu potencial e se fazer presente, ainda que longe.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão de bolsa (2011/15103-4) e pelos recursos para a liberação deste trabalho e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) .

A todos que direto ou indiretamente participaram e ajudaram de alguma maneira, mesmo não estando citado acima.

Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade.

Dalai Lama

RESUMOxix

ABSTRACTxxi

1. INTRODUÇÃO23

1.1. Mitocôndrias – Breve Histórico.....24

1.2. Bioenergética mitocondrial25

1.3. Cadeia Transportadora de Elétrons27

1.4. Estresse oxidativo mitocondrial.....30

1.5. Transição de permeabilidade mitocondrial e homeostasia de íons de Cálcio33

1.6. Alterações mitocondriais na hipercolesterolemia e a deficiência de NADP-trasidrogenase38

2. OBJETIVOS42

2.1. Objetivo geral43

2.2. Objetivos específicos43

3. MATERIAL E MÉTODOS44

3.1. Animais.....45

3.2. Determinações bioquímicas plasmáticas45

3.3. Isolamento de DNA pela técnica de *salting out*.....45

3.4.	PCR para identificação da mutação da <i>Nnt</i>	46
3.5.	Isolamento de mitocôndrias de fígado	47
3.6.	Isolamento de mitocôndrias de coração.....	48
3.7.	Determinação de proteína mitocondrial	49
3.8.	Condições experimentais	49
3.9.	Consumo de oxigênio mitocondrial	49
3.10.	Determinação do estado redox de NAD(P)H	50
3.11.	Medida de inchamento mitocondrial.....	51
3.12.	Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial.....	52
3.13.	Captação de íons de cálcio por mitocôndrias.....	53
3.14.	Estimativa da liberação de espécies reativas de oxigênio	55
3.15.	Análises estatísticas dos resultados	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1.	Níveis de colesterol e de triglicérides plasmáticos nos camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos	59
4.2.	PCR para identificação da mutação da <i>Nnt</i>	61
4.3.	Consumo de O ₂ por mitocôndrias de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos	63
4.4.	O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais em camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos em fígado de camundongo	68
4.5.	Transição de permeabilidade mitocondrial em camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos avaliada por inchamento mitocondrial, potencial elétrico de membrana e transporte de íons de Ca ²⁺	70

4.5.1. Inchamento mitocondrial: Mitocôndrias de fígado de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos	70
4.5.2. Potencial elétrico de membrana mitocondrial: Mitocôndrias de fígado de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.....	72
4.5.3. Transporte de íons de cálcio: Mitocôndrias de fígado de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos	74
4.5.4. Potencial elétrico de membrana mitocondrial: Mitocôndrias isoladas de coração de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos	77
4.5.5. Transporte de cálcio: Mitocôndrias isoladas de coração de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.....	79
4.6. Comparação da velocidade de geração de peróxido de hidrogênio em camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos em fígado de camundongo	82
5. CONCLUSÕES	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
7. ANEXOS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\mu\text{H}^+$	Potencial transmembrânico de prótons
ΔpH	Potencial químico
$\Delta\psi$	Potencial elétrico de membrana
Abs.	Absorbância
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina soro bovina
Cit-c	Citocromo C
CsA	Ciclosporina A
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
CuZnSOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
CypD	Ciclofilina D
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzido
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona, forma reduzida
GSSG	Glutaciona, forma oxidada
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	N-[2hydroxyethyl]piperazine-N'-[2enthanesulfonic acid])
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr^{-/-}	Deficiência no receptor de LDL
MCC	Mitocôndria de coração de camundongo
MFC	Mitocôndria de fígado de camundongo
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo monofosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo monofosfato, forma reduzida
NNT	NADP- transidrogenase
O₂^{•-}	Radical ânion superóxido
OH⁻	Ânion hidroxila
OH[•]	Radical hidroxila
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDH	Piruvato desidrogenase
Pi	Fosfato inorgânico
PTP	Poros de transição de permeabilidade
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferência
-SH	Grupamentos tiólicos
SDS- Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS -
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Enzima superóxido dismutase
TNA	Translocador de nucleotídeo de adenina
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
TPx	Tioredoxina redutase
U.A.	Unidades arbitrárias
UQ	Ubiquinona (forma oxidada da coenzima Q)
UQH•	Radical ânion semiquinona
UQH2	Ubiquinona (forma reduzida da coenzima Q)
VDAC	Canal aniônico voltagem dependente
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
FIGURA 1 - Imagem 3D obtida por tomografia eletrônica de mitocôndria isolada de fígado de rato.....	27
FIGURA 2 - Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria	29
FIGURA 3 - TPM induzida por aumento de Ca^{2+} e acúmulo de EROs.....	37
FIGURA 4 - Diagrama do modelo proposto para explicar o estresse oxidativo mitocondrial em células deficientes do receptor da LDL.....	39
FIGURA 5 - Esquema da reação catalisada pela NADP- transidrogenase mitocondrial e das reações redox de NADP	40
FIGURA 6 - Esquema ilustrativo para obtenção dos parâmetros respiratórios .	50
FIGURA 7 – Calibração de NADH.....	51
FIGURA 8 - Estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial	53
FIGURA 9 - Efeitos de Ca^{2+} e EGTA sobre a fluorescência de Calcium Green.....	54
FIGURA 10 - Estimativa da liberação de espécies reativas de oxigênio	56
FIGURA 11 - Determinação de colesterol e de triglicérides plasmáticos em camundongos Unib, Jackson e Hipercol.....	60
FIGURA 12 - Genotipagem e atividade da NNT em camundongos Unib, Jackson e Hipercol	62
FIGURA 13 - Consumo de O_2 por mitocôndrias de fígado isoladas de camundongos Unib, Jackson e Hipercol não apresentaram diferença significativa entre os parâmetros bioenergéticos mitocondriais	64
FIGURA 14 - Consumo de O_2 por mitocôndrias de coração isoladas de camundongos Unib, Jackson e Hipercol não apresentaram diferença significativa entre os parâmetros bioenergéticos mitocondriais	65

FIGURA 15 - Comparação do estado redox de Nucleotídeos de Piridina mitocondriais em camundongos Unib, Jackson e Hipercol, contendo diferentes substratos69

FIGURA 16 - A susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzido por Ca^{2+} é maior em camundongos Hipercol e Jackson, quando comparados à camundongos Unib71

FIGURA 17 - A dissipação do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) induzida por íons de Ca^{2+} em camundongos Hipercol e Jackson é mais rápida do que em camundongos Unib73

FIGURA 18 - A capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} é menor em camundongos Hipercol e Jackson quando comparados à camundongos Unib.75

FIGURA 19 - A capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} é menor em camundongos Hipercol e Jackson quando comparados à camundongos Unib.76

FIGURA 20 - Dissipação do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) induzida por íons de Ca^{2+} de camundongos Hipercol e Jackson é mais rápida do que em camundongos Unib78

FIGURA 21 - A capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} é menor em camundongos Hipercol e Jackson quando comparados à camundongos Unib.80

FIGURA 22 - A capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} é menor em camundongos Hipercol e Jackson quando comparados à camundongos Unib.81

FIGURA 23 - Comparação da na velocidade de geração de H_2O_2 em camundongos Unib, Jackson e Hipercol.....83

LISTA DE TABELAS

PÁG.

TABELA I – Consumo de O₂ por mitocôndrias de fígado isoladas de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos66

TABELA II – Consumo de O₂ por mitocôndrias de coração isoladas de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos..67

Resumo

Os camundongos hipercolesterolêmicos ($LDLr^{-/-}$) provenientes do Jackson Laboratory são modelos experimentais valiosos para o estudo da aterosclerose. Estes animais apresentam elevadas taxas de lipogênese, processo que consome grandes quantidades de NADPH. Pesquisas recentes revelaram que esta linhagem possui, além da deleção do gene do receptor de LDL, uma mutação no gene da NADP- transidrogenase (*Nnt*). A falta da *Nnt* pode gerar estresse oxidativo devido ao fornecimento deficiente de NADPH mitocondrial. O objetivo deste trabalho foi investigar a participação da elevação da lipogênese e da deficiência de *Nnt* sobre o estado redox mitocondrial e suscetibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Para tanto foram comparadas três linhagens de camundongos: $LDLr^{-/-}$ (deficiente do receptor de LDL e da *Nnt*), C57BL6/J (deficiente apenas da *Nnt*) e C57BL6/JUnib (controle). Foram avaliados: o controle respiratório mitocondrial (consumo de oxigênio), o estado redox de NAD(P) (fluorimetria), a susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por cálcio (inchamento e dissipação do potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) sensíveis à cicloprina A e a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Amplex red®) em mitocôndrias isoladas de coração e fígado. Observamos que não houve diferenças significativas nos parâmetros respiratórios mitocondriais nos dois tecidos das três linhagens estudadas. Como esperado, as mitocôndrias dos camundongos $LDLr^{-/-}$ e C57BL6/J não podem sustentar o estado reduzido de NADPH in vitro, uma vez que são deficientes de *Nnt*. Observamos que houve diferenças significativas entre as 3 linhagens quanto à TPM da seguinte maneira: $LDLr^{-/-}$ > C57BL6/J > C57BL6/JUnib (controle) em mitocôndrias isoladas de fígado (inchamento e dissipação de $\Delta\psi$) e em mitocôndrias de coração ($\Delta\psi$). Além disso, a produção de H_2O_2 por mitocôndrias hepáticas seguiu o mesmo padrão, sendo $LDLr^{-/-}$ > C57BL6/J > C57BL6/JUnib (controle). Em conjunto, estes resultados indicam que a maior suscetibilidade à TPM das mitocôndrias de camundongos $LDLr^{-/-}$ está correlacionada com diminuição de NADPH, tanto por aumento de consumo (devido a elevada lipogênese) quanto por diminuição de sua produção (deficiência em *Nnt*).

Abstract

Hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}) from Jackson Laboratory are valuable experimental models to study atherosclerosis development. These mice exhibit high rates of lipogenesis, a process that consumes large amounts of NADPH. It was recently discovered that the mice strain used to produce the LDLr^{-/-} also carries a homozygous NADP-transhydrogenase (*Nnt*) mutation. Loss of *Nnt* may cause oxidative stress due to a poor supply of mitochondrial NADPH. The objective of this study was to investigate the role of elevated lipogenesis and *Nnt* deficiency on the mitochondrial redox status and susceptibility to mitochondrial permeability transition (MPT). Three mice strains were compared: LDLr^{-/-} mice (deficient of both LDL receptor and NTT), C57BL6/J (deficient in *Nnt* only) and the wild type control mice C57BL6/JUnib. We evaluated the mitochondrial respiratory control (oxygen consumption), the NAD(P) redox status (fluorimetry), the susceptibility to calcium induced mitochondrial permeability transition (swelling and dissipation of membrane potential ($\Delta\psi$) sensitive to cyclosporin A) and the generation of H₂O₂ (Amplex red®) in isolated heart and liver mitochondria. We observed no significant differences in mitochondrial respiratory parameters in both tissues of the three mice strains studied. As expected, the mitochondria of LDLr^{-/-} and C57BL6/J mice cannot maintain the NADP in the reduced state in vitro, since they are deficient in *Nnt*. Regarding the susceptibility to MPT, we observed significant differences among mitochondria from the 3 strains, as follows: LDLr^{-/-} > C57BL6/J > C57BL6/JUnib (control) in isolated liver mitochondria (swelling and potential dissipation) and in heart mitochondria (potential dissipation). Furthermore, the production of H₂O₂ by the liver mitochondria followed the same MPT pattern: LDLr^{-/-} > C57BL6/J > C57BL6/JUnib (control). Together, these results indicated that the greater susceptibility of LDLr^{-/-} mitochondria to MPT is correlated with decreased NADPH which is explained by both increased consumption (due to high lipogenesis) and decreased production (deficiency *Nnt*).

1. Introdução

1.1. Mitocôndrias: Breve Histórico

Os primeiros registros sobre as mitocôndrias foram feitos por Rudolph Albert Von Kölliker, em 1857, que as classificou como compartimentos citoplasmáticos granulares presentes nos músculos, denominados sarcossomos de Kölliker. Posteriormente, vários estudos com outras denominações diferentes para a mesma organela foram publicados, entre os quais podemos destacar que, em 1898, Benda referiu-se a esta organela como “mitochondrion”, do grego mito (filamento) e chondron (grão), sendo que esta denominação melhor apresentava as características morfológicas comuns dessa organela, de modo que esta terminologia passou a ser mais utilizada desde meados de 1930 (revisado em Liesa *et al.*, 2009). Todavia, somente no ano de 1948, Hogeboom, Schneider e Palade conseguiram isolar mitocôndrias intactas de fígado de rato por meio do método de centrifugação diferencial (Lehninger, 1964) e, em 1950, Palade e Sjöstrand publicaram imagens em microscopia de alta resolução de mitocôndrias nas quais era possível observar suas características ultraestruturais.

O conceito de organela independente foi reafirmado em 1960 com a descoberta do DNA mitocondrial, que posteriormente seria um dos indícios que reforçariam a hipótese da origem endossimbiótica das mitocôndrias, como proposto por Altmann em 1890. Um ano mais tarde, os bioquímicos Eugene Kennedy e Albert Lehninger demonstraram que a mitocôndria era a organela responsável pela síntese do ATP, que estava associada à oxidação de coenzimas (NADH + H⁺ e FADH₂). Vários foram os estudos realizados visando a compreensão do mecanismo responsável pelo acoplamento entre a respiração mitocondrial e a síntese da adenosina trifosfato (ATP). Em 1961, o bioquímico Peter Mitchell propôs a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa, baseada na constatação de que, ocorrendo a redução do oxigênio molecular (O₂) à água (H₂O), pela cadeia respiratória, gerava-se um gradiente de prótons (H⁺), localizado entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas (Mitchell, 1961) e a energia contida neste gradiente seria utilizada na reação da fosforilação da adenosina difosfato (ADP) para síntese do ATP.

No início da década de 70, foram realizados diversos estudos que demonstraram a geração de H_2O_2 por suspensões mitocondriais, mais precisamente pela cadeia transportadora de elétrons, sendo constatado também que quanto mais oxidado o estado dos carreadores de elétrons menor era a formação de H_2O_2 (Boveris *et al.*, 1972; Loschen *et al.*, 1973).

Em 1996, Liu *et al.* obtiveram evidências do envolvimento da mitocôndria na morte celular por apoptose. Estes autores observaram a liberação de citocromo c das mitocôndrias para o citosol em células em apoptose, e que, quando o citocromo c foi depletado ocorreu diminuição da atividade apoptótica.

Em 1997, dois estudos mostraram que a superexpressão de Bcl-2 (proteína presente na membrana mitocondrial externa) previne a morte de células expostas a estímulos pró-apoptóticos em um mecanismo envolvendo a prevenção do efluxo de citocromo c da mitocôndria para o citosol (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997).

1.2. Bioenergética mitocondrial

Conforme já descrito, as mitocôndrias são as organelas intracelulares responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução em energia química (ATP), utilizável pelos processos celulares em seres aeróbios por meio da redução do oxigênio, no processo de respiração (Lehninger, Nelson e Cox, 2011). Além disso, estas organelas podem ser uma das principais fontes celulares geradoras de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Nicholls e Ferguson, 2002).

A membrana mitocondrial interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e a íons, incluindo H^+ , sendo permeável somente a O_2 , CO_2 , NO e H_2O . As únicas espécies que atravessam a membrana interna são aquelas para as quais existem transportadores específicos, como por exemplo, ATP^{4-} , ADP^{3-} , piruvato, cálcio (Ca^{2+}) entre outros. É na membrana interna que se encontram os componentes dos complexos multienzimáticos denominados de cadeia transportadora de elétrons, além da ATP-sintase. A integração funcional entre a cadeia transportadora de elétrons e a atividade da ATP-sintase é responsável pelo

processo de fosforilação oxidativa (Nicholls e Ferguson, 2002; Figueira *et al.*, 2013).

Também está presente na membrana interna a proteína desacopladora (UCP), a qual, quando ativada, permite o retorno de H⁺ ao interior da matriz mitocondrial dando origem ao processo de desacoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa. Esse processo dissipa o potencial eletroquímico de prótons sob a forma de calor (Nicholls e Ferguson, 2002). Em animais termogênicos predomina a UCP1, presente principalmente no tecido adiposo marrom, mas outras UCPs podem também promover desacoplamento de pequena intensidade, cuja função principal parece ser o controle da produção das EROs mitocondriais (Vercesi *et al.*, 2006a).

O compartimento delimitado pela membrana mitocondrial interna é denominado matriz mitocondrial, cujo volume pode variar dependendo do estado funcional da mitocôndria, e, tais variações são acompanhadas de alterações no volume do espaço intermembranas (Packer, 1963; Mannella *et al.*, 2006). A matriz contém ribossomos, DNA mitocondrial e enzimas, sendo estas pertencentes ao ciclo de Krebs (degradação do acetil-coA e redução das coenzimas NAD e FAD), a β -oxidação (degradação dos ácidos graxos), a oxidação de aminoácidos e ao complexo piruvato desidrogenase (Osmundsen *et al.*, 1982; Brady *et al.*, 1986; Lehninger, Nelson e Cox, 2011)

O segundo compartimento é denominado espaço intermembranas, pelo fato de localizar-se entre as membranas interna e externa, contendo cerca de 50 diferentes proteínas envolvidas em diversas funções, tais como: fatores que desencadeiam apoptose quando liberados para o citosol, transportadores de metabólitos, proteases, enzimas e um amplo número de fatores responsáveis pela formação dos arranjos dos complexos da cadeia respiratória, além de íons, metais e lípidos (Herrmann e Riemer, 2010).

A membrana mitocondrial externa tem alta permeabilidade em relação à membrana interna, que é conferida principalmente pela proteína integral porina ou canal aniônico voltagem dependente (VDAC- voltage dependent anion channel) (De Pinto *et al.*, 2008).

Em 2001, o trabalho de Mannella *et al.* revelou a correta localização da ATP sintase e dos complexos da CTE na membrana interna, demonstrando que as invaginações da crista da membrana interna mitocondrial são pleomórficas, ligadas por meio de estreitos segmentos tubulares de comprimento variável de uma superfície da membrana interna para outra (**Figura 1**).

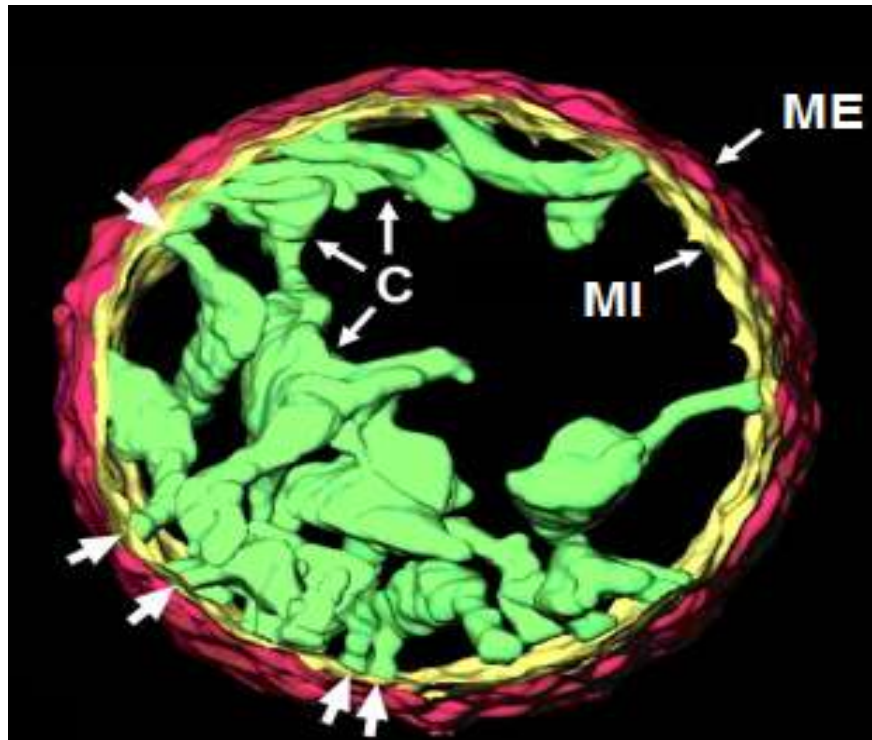


Figura 1. Imagem 3D obtida por tomografia eletrônica de mitocôndria isolada de fígado de rato. Membrana externa (ME), membrana interna (MI) e cristas (C). Os locais onde as setas não foram nomeadas apontam para regiões de ligações tubulares estreitas da crista à periferia (Mannella *et al.*, 2001).

1.3. Cadeia Transportadora de Elétrons

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

Os elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH₂, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos ao complexo I (NADH desidrogenase) e complexo II (succinato desidrogenase), respectivamente. O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH₂).

Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução desta coenzima. Em alguns tecidos, a coenzima Q pode também ser reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxirredutase (como resultado da β -oxidação de ácidos graxos).

A UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH[•]), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos separados de UQH[•], um situado na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH[•] são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo c. O citocromo c transfere elétrons para o citocromo c oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons para o O₂, resultando na geração de H₂O (**Figura 2**) (Lehninger, Nelson e Cox, 2011).

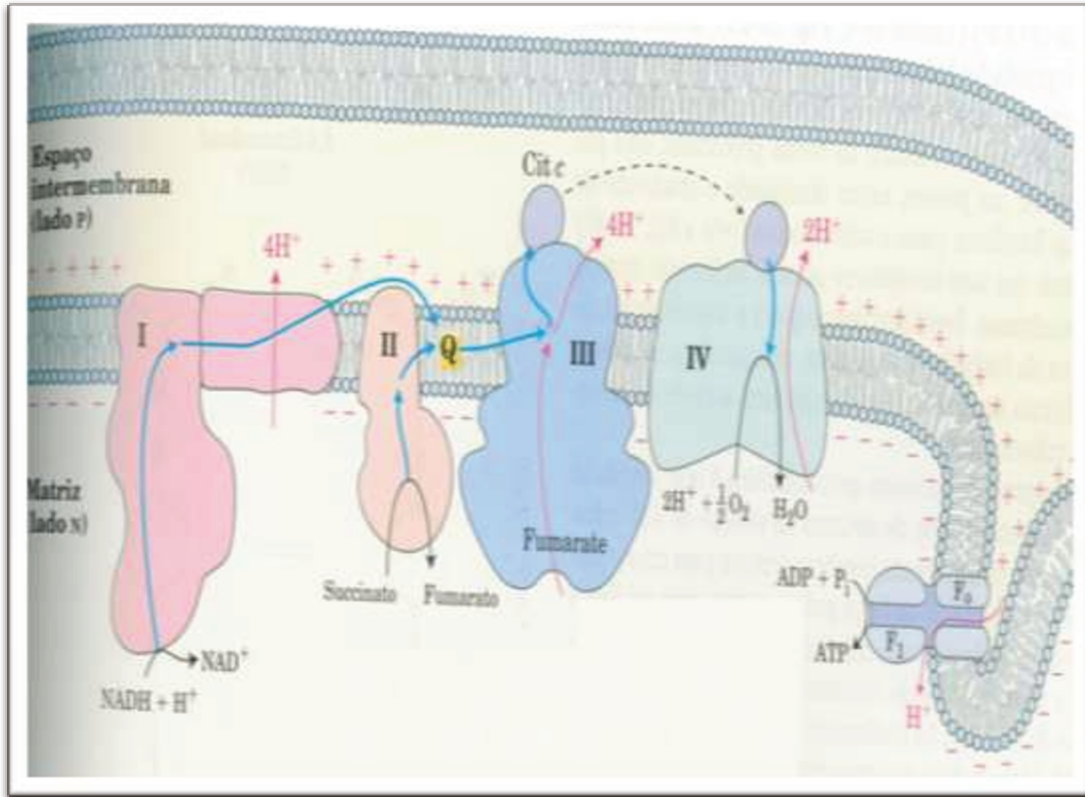


Figura 2. Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria (Lehninger, Nelson e Cox, 2011, modificado). Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de 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 retornar a matriz através de canais específicos de prótons (F_o) do complexo $F_1 F_o$ ATP sintase. 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 ao F_o .

A teoria quimiosmótica proposta por Mitchell em 1961, afirma que, com a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória, ocorre uma ejeção de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana. Durante este processo seria gerado um gradiente de H^+ (ou gradiente eletroquímico) entre a matriz e o espaço intermembranas. Este gradiente, formado pelo componente elétrico (cerca aproximadamente 180 mV) e pelo componente químico (de 0 a 1 unidade de pH) resultaria na formação de uma

força chamada força próton-motriz, que seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia para geração de ATP.

A ATP sintase é constituída de duas regiões distintas denominadas F_1 , solúvel e localizada na face matricial e a região F_0 , hidrofóbica e inserida na membrana mitocondrial interna. O fluxo de H^+ do espaço intermembranas através das subunidades $F_0 F_1$ da ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, forneceria energia diretamente para a fosforilação do ADP por P_i .

O gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ($\Delta\mu H^+$) formado não serve apenas para a síntese de ATP pelas mitocôndrias, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese em cloroplastos, além de poder 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 $NAD(P)^+$ por transidrogenases específicas, a captação eletroforética de Ca^{2+} que transporta duas cargas positivas para o interior da mitocôndria além do transporte de carboidratos e aminoácidos em bactérias.

1.4. Estresse oxidativo mitocondrial

A produção mitocondrial de EROs é um processo contínuo e fisiológico (para revisão, ver Figueira *et al.*, 2013). Normalmente, o O_2 é reduzido à H_2O na cadeia respiratória mitocondrial em quatro passos consecutivos de um elétron, pois o oxigênio molecular apresenta uma configuração triplete (Halliwell e Cross, 1994; Kowaltowski e Vercesi, 1999). A citocromo c oxidase é altamente especializada neste processo, sendo capaz de se ligar fortemente ao oxigênio parcialmente reduzido, impedindo sua liberação antes da obtenção de sua redução total (Turrens, 1997).

Desse modo, a produção de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por meio da redução monoelétrica do O_2 pelo citocromo c oxidase é praticamente inexistente. No entanto, 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido a $O_2^{\bullet-}$ (in vitro)

(Boveris, 1977; St-Pierre *et al.*, 2002; Starkov, 2004) e conseqüentemente leva à formação de H₂O₂ (Vercesi *et al.*, 1997; Harper *et al.*, 2004; Fariss *et al.*, 2005; O'Rourke, 2005; Figueira *et al.*, 2013), em passos intermediários da cadeia transportadora de elétrons (Boveris e Chance, 1973; Liu, 1997; Turrens, 1997).

Esta produção pode ocorrer principalmente no complexo I (Turrens e Boveris, 1980) ou complexo III (Cadenas *et al.*, 1977; Halliwell e Gutteridge, 1998). Há evidências que também ocorre a geração de O₂^{•-} pelas desidrogenases, tais como pela piruvato e α -cetoglutarato desidrogenase (Starkov, 2004; Tretter e Adam-Vizi, 2004).

O Ca²⁺ parece ser o principal agente estimulador da geração mitocondrial de EROs (Cadenas e Boveris, 1980; Castilho *et al.*, 1995; Castilho *et al.*, 1996; Kowaltowski *et al.*, 1996 e 2001), pois em altas concentrações, este se liga à cardiolipina, um fosfolípídeo que possui cabeça polar eletronegativa presente em altas concentrações (14-23%) na membrana mitocondrial interna em uma grande variedade de tecidos (Vercesi *et al.*, 1997; Grijalba *et al.*, 1999).

A geração mitocondrial de EROs induzida pelo Ca²⁺ pode ser estimulada pela presença concomitante de fosfato (Pi), que quando em altas concentrações, realimenta o processo, pois estimula a formação de EROs a partir de aldeídos resultantes da peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, e essas espécies multiplicam os danos à membrana (Kowaltowski *et al.*, 1996).

O H₂O₂ é formado na mitocôndria a partir do superóxido (Boveris e Chance, 1973; Turrens, 1997; Kowaltowski *et al.*, 1999), por meio da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) cuja isoforma mitocondrial é uma metaloenzima que está ligada a manganês (MnSOD) (Weisiger e Fridovich, 1973; Fridovich, 1995), enquanto que sua isoforma citoplasmática é dependente de cobre e zinco (CuZnSOD) (Okado-Matsumoto e Fridovich, 2001; Sturtz, 2001). Ao mesmo tempo Ca²⁺ desloca íons de ferro (Fe²⁺) de seus sítios de ligação aumentando sua concentração livre na matriz mitocondrial (Castilho *et al.*, 1995). Este processo consiste na estimulação da reação de Fenton ou do tipo Fenton, ocasionando a formação de radicais hidroxila (OH[•]), sendo estes altamente reativos (Halliwell e Gutteridge, 1997).

O balanço redox é mantido pelas células, por intermédio da formação e eliminação das EROs por diversos sistemas antioxidantes, (Hamanaka e Chandel, 2010; Martin, 2010) composto por enzimas tiólicas (tioredoxina peroxidase (TPx) (Rhee *et al.*, 1994), glutatona peroxidase (GPx) (a primeira enzima antioxidante tiol caracterizada em mitocôndrias) (Green e O'Brien, 1970; Dickinson e Forman 2002), superóxido dismutase (Miller, 2004), NADPH, vitaminas E e C (Sutton e Winterbourn, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1997; Watabe *et al.*, 1997; Netto *et al.*, 2002) e pela catalase (descrita em mitocôndrias de coração e fígado) (Radi *et al.*, 1991; Salvi *et al.*, 2007). Todos esses sistemas antioxidantes evitam o acúmulo de $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 e a consequente produção do OH^{\bullet} , contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa. Além do sistema antioxidante, a mitocôndria possui mecanismos que promovem um leve desacoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa, ocasionando a diminuição da geração de EROs (Skulachev, 1996). Entre eles estão as UCPs (Klingenberg *et al.*, 2001), o translocador de nucleotídeos de adenina (TNA) (Samartsev *et al.*, 1997) e os canais de K^+ sensíveis a ATP (Ferranti *et al.*, 2003). Tais mecanismos promovem uma leve diminuição do potencial eletroquímico ($\Delta\psi$), a qual é suficiente para aumentar o consumo de O_2 e mudar o estado redox dos transportadores de elétrons da cadeia respiratória, diminuindo a redução monoelétrica de oxigênio em estágios intermediários da cadeia transportadora de elétrons, principalmente nos complexos I e III (Turrens, 1997).

Em situações de estresse oxidativo, pode ocorrer a formação de OH^{\bullet} , levando à oxidação de componentes mitocondriais (Kowaltowski *et al.*, 2001). Falhas ocorridas nos sistemas antioxidantes ocasionam rompimento no equilíbrio redox em favor dos agentes oxidantes, razão pela qual a célula ou organismo se encontram sob “estresse oxidativo”, podendo ocorrer danos e morte celular (Belló-Klein, 2002; Fariss *et al.*, 2005; O'Rourke, 2005).

As EROs estão ligadas ao desenvolvimento e progressão de muitas doenças humanas, como por exemplo, câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, hipertensão, aterosclerose, infecção por HPV, injúria por isquemia-reperfusão, doença de Parkinson, artrite reumatóide, catarata, enfisema,

dentre outras, além do processo de envelhecimento (Belló-Klein, 2002; Chandel, 2010). Em todas as doenças mencionadas, a injúria inicial (isquemia, trauma, toxinas, radiação, infecção, etc) determina as alterações intracelulares, como dano mitocondrial, alterações nas defesas antioxidantes e aumento do Ca^{2+} , além de recrutamento de células do sistema imune que desencadeiam o processo inflamatório que reforça o estresse oxidativo. Essas alterações que geram o estresse oxidativo, levam o organismo a três possibilidades: 1) adaptação, por aumento na atividade dos sistemas antioxidantes, que podem gerar proteção da célula contra danos oxidativos futuros; 2) dano tecidual por lesão em lipídeos, carboidratos e proteínas; 3) morte celular, seja por necrose ou apoptose (Belló-Klein, 2002).

Historicamente, as EROs são vistas como subprodutos metabólicos tóxicos e causadores de uma infinidade de doenças humanas. Pesquisas recentes sugerem que a regulação de diversos processos celulares é mediada pela participação das EROs (Hamanaka e Chandel, 2010), que possuem um papel no controle de diversas funções fisiológicas, como o controle do tônus vascular, a sinalização intracelular e a resposta imune fagocitária (Dröge, 2002; Belló-Klein, 2002; Splettstoesser e Schuff-Werner, 2002). Podemos citar como exemplo claro disso o H_2O_2 , uma espécie reativa muito estável e que difunde facilmente entre as membranas, tendo participação ativa em processos regulatórios celulares, como o ciclo celular, a resposta ao estresse, metabolismo energético, balanço redox, dentre outros (Hamanaka e Chandel, 2010).

1.5. Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) e homeostasia de íons Ca^{2+} .

Nos últimos anos, nota-se que o papel da mitocôndria nos processos apoptóticos e necróticos tem recebido grande atenção (para revisão ver Figueira *et al.*, 2013), o qual se dá pelo processo da TPM, um dos eventos-chaves no processo de morte celular (Crompton *et al.*, 1988; Kowaltowski *et al.*, 2001).

Em 1976, Hunter *et al.* trataram mitocôndrias isoladas com Ca^{2+} e propuseram a seguinte hipótese: o acúmulo mitocondrial deste cátion resultava na permeabilização da organela, devido à formação de um poro na membrana interna. Pelo fato desse processo ser parcialmente revertido através da remoção do Ca^{2+} , esse fenômeno foi denominado “transição de permeabilidade mitocondrial” (TPM) (Hunter *et al.*, 1976; Hunter e Haworth, 1979).

A TPM é a permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna, (Vercesi *et al.*, 1997; Kowaltowski *et al.*, 2001) normalmente causada por estresse oxidativo e por acúmulo de íons de Ca^{+2} nas mitocôndrias, em um processo estimulado por uma variedade de compostos e condições (Zoratti e Szabo, 1995; Crompton, 1999; Gunter, 2004; Vercesi, 2006b). A permeabilização da membrana mitocondrial interna à H_2O , íons e outras moléculas com peso molecular de até 1500 Daltons (Bernardi, 2013) que ocorre na TPM, resulta em perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), inchamento mitocondrial e ruptura da membrana externa das mitocôndrias (Vercesi, 2006b). Como resultado, a TPM participa ativamente dos eventos que iniciam a morte celular por apoptose.

Apesar de muitas pesquisas, a natureza da TPM, caracterizada pela abertura de um canal que é conhecido como poro de transição de permeabilidade (PTP), ainda é controversa na literatura (Lê Quôc e Lê Quôc, 1988; Fagian *et al.*, 1990; Szabò e Zoratti, 1993; Woodfield *et al.*, 1998; Marzo *et al.*, 1998; Krauskopf *et al.*, 2006; Kokoszka *et al.*, 2004; Baines *et al.*, 2007; Leung *et al.*, 2008; Halestrap, 2009; Zoratti *et al.*, 2010). Tem sido sugerida a participação de proteínas da matriz e de proteínas da membrana mitocondrial interna e externa na composição do PTP, sendo que os componentes mais citados são os canais de ânions voltagem-dependentes (VDACs), o TNA, a ciclofilina D (CyP D), dentre outras moléculas (Tsujimoto e Shimizu, 2007; Lemasters *et al.*, 2009). Alterações estruturais em grupos de proteínas da membrana mitocondrial interna levariam à formação de agregados resultando no PTP mitocondrial (Fagian *et al.*, 1990; He e Lemasters, 2002). O aumento das concentrações de íons de Ca^{2+} e a produção de EROs, induziriam a oxidação de resíduos de cisteína e permitiriam a formação de ligações cruzadas de dissulfeto S-S (Fagian *et al.*, 1990; Castilho *et al.*, 1996),

promovendo uma permeabilização não-específica da membrana mitocondrial interna (Vercesi *et al.*, 1997; Kowaltowski *et al.*, 2001).

Por sua vez, variações no transporte de íons podem ocorrer por conta de modificações em lipídeos e proteínas de membranas, com aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} (Dawson e Dawson, 1996). A distribuição do Ca^{2+} intracelular é controlada por processos de transporte desse cátion através da membrana plasmática e de membranas de várias organelas ou regiões celulares, como o retículo endoplasmático liso, o núcleo e a mitocôndria. Este processo eletroforético se dá pela seguinte forma: o íon positivo é atraído pelo potencial eletroquímico de prótons que deixa o lado interno da membrana interna negativo, e é transferido através de uma proteína integral da membrana interna com alta afinidade pelo cátion (Carafoli, 1987; De Stefani *et al.*, 2011).

É bem estabelecido que o Ca^{2+} é um agente sinalizador em sistemas biológicos e que existe um complexo sistema transportador de íons, que coordena o fluxo através do plasma e das membranas intracelulares em resposta a sinais celulares e extra-celulares (Berridge *et al.*, 2003). Esta movimentação do Ca^{2+} é direta ou indiretamente direcionada pela hidrólise de ATP, indicando assim, um processo altamente dependente do estado energético da célula (Glancy *et al.*, 2012). Em eucariotos, as concentrações extracelulares de Ca^{2+} oscilam em torno de 1 a 2 mM e as concentrações intracelulares em torno de 50 a 100 nM (Carafoli, 1987). A título de exemplo, a deficiência nos mecanismos responsáveis pelo suprimento de ATP leva à desregulação da sinalização do Ca^{2+} que compromete a função celular (Hidalgo, *et al.*, 2008, Figueira, *et al.*, 2013).

Em 2010, Perocchi *et al.* mostraram a primeira evidência do gene que codifica o transportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU1, de *mitochondrial calcium uptake 1*) por meio de técnicas genômicas, incluindo RNAi (Perocchi *et al.*, 2010; Collins e Meyer, 2010, Baughman *et al.*, 2011, De Stefani *et al.*, 2011; Mallilankaraman *et al.*, 2012).

Outro fator que pode modular a susceptibilidade à abertura do PTP é o estado redox de nucleotídeos de piridina. A primeira evidência desse fenômeno foi descrita por Lehninger *et al.* (1978), que demonstraram que o poder redutor

elevado aumenta a capacidade de retenção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias. Posteriormente, pesquisas complementares demonstraram que oxidação de NADPH mitocondrial reduzia a capacidade antioxidante dessa organela, induzindo o estresse oxidativo e levando à polimerização de proteínas de membrana, via ligação cruzada de grupamentos tiólicos (Fagian *et al.*, 1990).

Vaseva *et al.* (2012) demonstraram que a proteína p53 é capaz de migrar para a matriz mitocondrial e formar um complexo com a ciclofilina D (Cyp D) (reguladora do PTP), mas não com VDAC ou com o translocador de nucleotídeos de adenina, e está relacionada à abertura do PTP.

Mais recentemente, Giorgio *et al.* (2013) mostraram que dímeros purificados de ATP sintase e reconstituídos em bicamadas lipídicas podem ter a função semelhante ao PTP, com mudanças nos padrões eletrofisiológicos, capazes de induzir a abertura de um canal equivalente ao PTP. Além disso, esses autores mostraram interação da Cyp D com a ATP sintase na regulação desse poro. Todos esses resultados mostram um papel duplo para a ATP sintase: síntese de ATP e controle da TPM (Giorgio *et al.*, 2013; Bernardi, 2013).

A TPM é inibida pelo imunossupressor ciclosporina A (Fournier *et al.*, 1987; Crompton *et al.*, 1988; Broekemeier *et al.*, 1989; Davidson e Halestrap, 1990), que se liga à proteína ciclofilina D, componente essencial do agregado proteico que forma o PTP. A TPM também pode ser parcialmente revertida logo após o início do processo pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou redutores que evitam a oxidação de grupos protéicos tiólicos (-SH) (Kowaltowski e Vercesi, 1999; Hunter e Haworth, 1979; Valle *et al.*, 1993; Castilho *et al.*, 1996).

As principais reações que explicam a relação entre estresse oxidativo e TPM estão resumidas na figura abaixo (**Figura 3**):

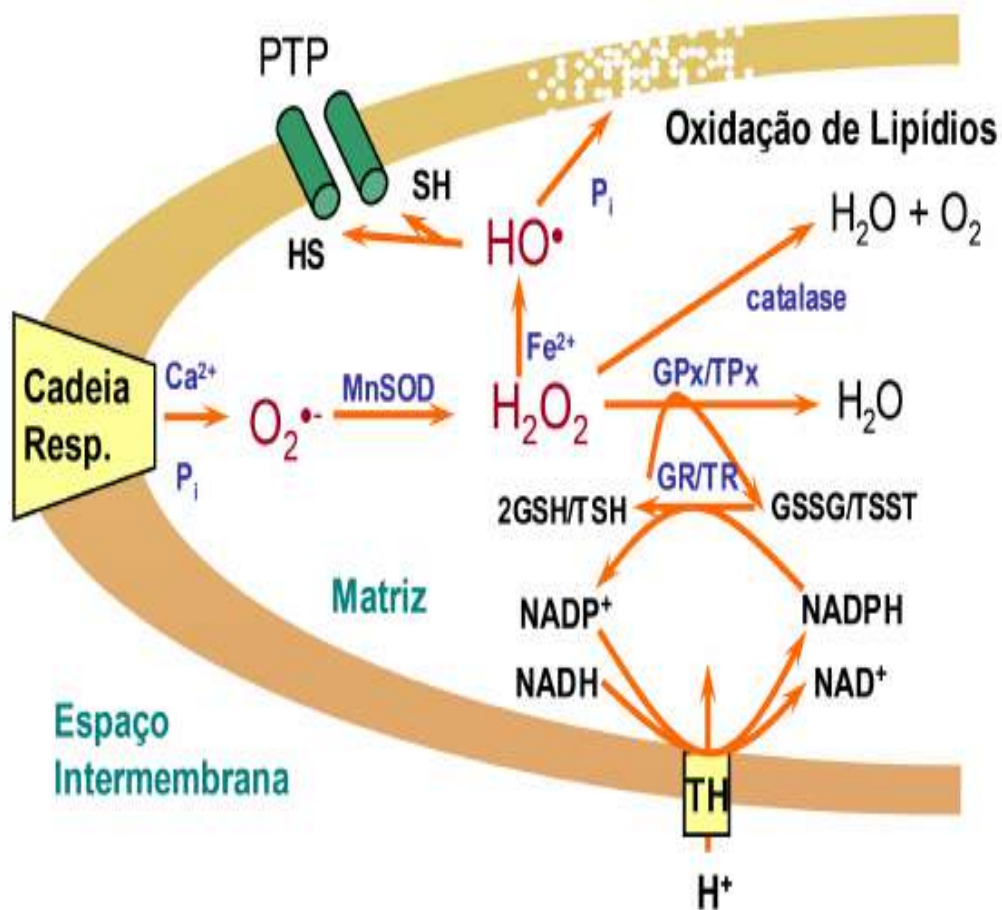


Figura 3. TPM induzida por aumento de Ca^{2+} e acúmulo de EROs. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, gera constantemente pequenas quantidades de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esses radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), a qual promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é reduzido à H_2O pelas enzimas glutatona peroxidase (GPx), tioredoxina peroxidase (TPx) ou catalase (em mitocôndria de coração). A glutatona (GSH), oxidada pela GPx, e a tioredoxina (TSH), oxidada pela TPx são recuperadas pela glutatona e pela tioredoxina redutases (GR e TR), as quais utilizam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz $NADP^+$ através da atividade da NADP-transidrogenase (TH). Quando a geração de $O_2^{\cdot-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou quando os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão desativados, H_2O_2 acumula-se em grandes quantidades e na presença de Fe^{2+} gera o radical hidroxil (OH^{\cdot}) altamente reativo. OH^{\cdot} oxida grupos tiólicos (-SH) de proteínas de membranas específicas levando à abertura do poro. OH^{\cdot} também pode promover permeabilização da membrana interna através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i (traduzido e adaptado de Kowaltowski *et al.*, 2001).

1.6. Alterações mitocondriais na hipercolesterolemia e a deficiência de NADP-trasidrogenase

Na última década acumularam-se evidências sobre o envolvimento de disfunções mitocondriais em várias doenças degenerativas e metabólicas (Lemasters e Nieminem, 2001), entre elas as dislipidemias primárias que repercutem na função mitocondrial (Vercesi *et al.*, 2006b; Vercesi *et al.*, 2007). O aumento da produção de EROs na mitocôndria, o acúmulo de danos ao DNA mitocondrial, e a progressiva disfunção da cadeia respiratória estão associados com aterosclerose ou cardiomiopatia em humanos (Madamanchi e Runge, 2007; Madamanchi e Runge, 2013).

A ideia central da hipótese oxidativa para o desenvolvimento de aterosclerose é que as EROs medeiam a modificação oxidativa de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e estas levam a formação de células espumosas (Berliner e Heinecke, 1996). Esta ideia é apoiada por estudos que demonstram a presença de LDL modificada *in vivo* e a habilidade que as EROs têm em converter lipoproteínas a uma forma potencialmente pró-aterogênica, quando adicionados à LDL natural *in vitro*.

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

Trabalhos anteriores do nosso laboratório demonstraram a relevância da participação mitocondrial no desequilíbrio redox mitocondrial para aterosclerose, em estudos realizados em camundongos hipercolesterolêmicos por knockout do gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) (Oliveira, *et al.*, 2005, Paim *et al.*, 2008). Mitocôndrias isoladas do fígado, cérebro e coração, e também células mononucleares isoladas do baço desses animais, apresentam uma produção aumentada de EROs em comparação aos camundongos controles (C57BL6/JUnib). O acúmulo de EROs na mitocôndria deveu-se à diminuição do

poder redutor na forma de NADPH, responsável por re-reduzir o sistema enzimático antioxidante dessa organela. Isso também explica a maior susceptibilidade à TPM observada nestes animais.

A hipótese proposta, ilustrada na figura abaixo (**Figura 4**), mostra que a diminuição do conteúdo de nucleotídeos reduzidos nas mitocôndrias dos animais hipercolesterolêmicos era resultante do aumento de seu consumo pela elevada taxa de lipogênese nos hepatócitos destes animais, uma vez que essas células não captam adequadamente colesterol exógeno. A biossíntese de 1 mol de colesterol oxida cerca de 24 moles de NADPH (Gaylor, 2002).

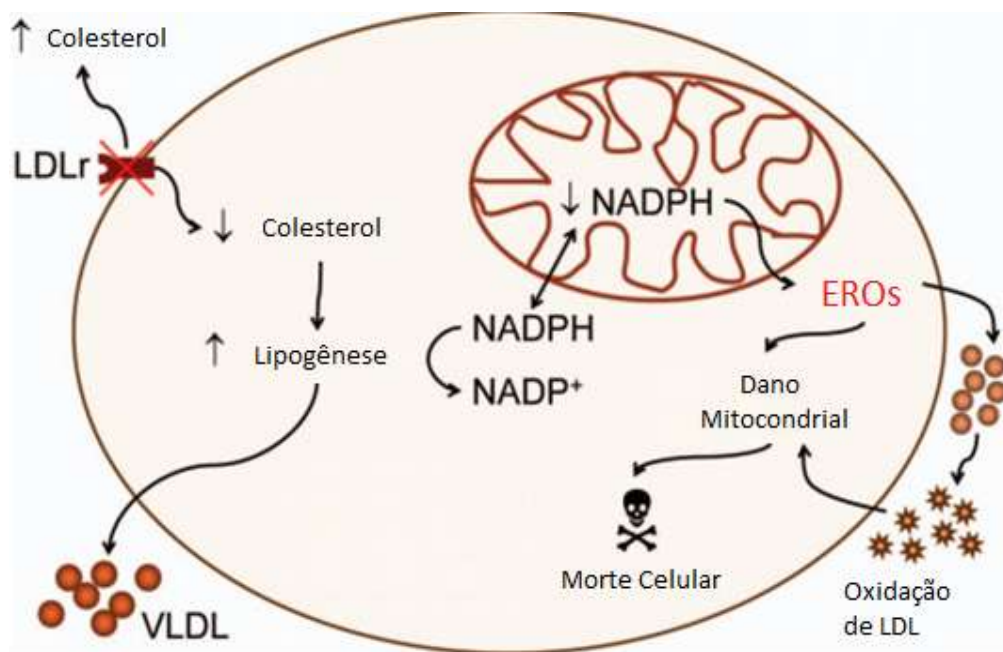


Figura 4. Diagrama do modelo proposto para explicar o estresse oxidativo mitocondrial em células deficientes do receptor da LDL. LDLr: receptor da LDL; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa; EROs (traduzido e adaptado de Vercesi *et al.*, 2007).

Todavia, recentemente foi descrito que os camundongos hipercolesterolêmicos, por serem do background C57BL6/J, além de serem portadores da deficiência do receptor de LDL, também possuem uma mutação espontânea no gene da transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (*Nnt*) (Toye *et al.*, 2005). O gene da *Nnt* codifica uma proteína integral da membrana

mitocondrial interna que tem atividade enzimática de reduzir NADP^+ à custa de oxidação de NADH e da entrada de prótons na matriz mitocondrial (**Figura 5**) (Rydström, 2006; Ronchi *et al.*, 2013).

Em seres humanos, a mutação espontânea no gene da *Nnt*, está associada a deficiência de glicocorticóides familiar. Curiosamente, os camundongos C57BL/6J também apresentam este fenótipo (Meimaridou, *et al.*, 2012).

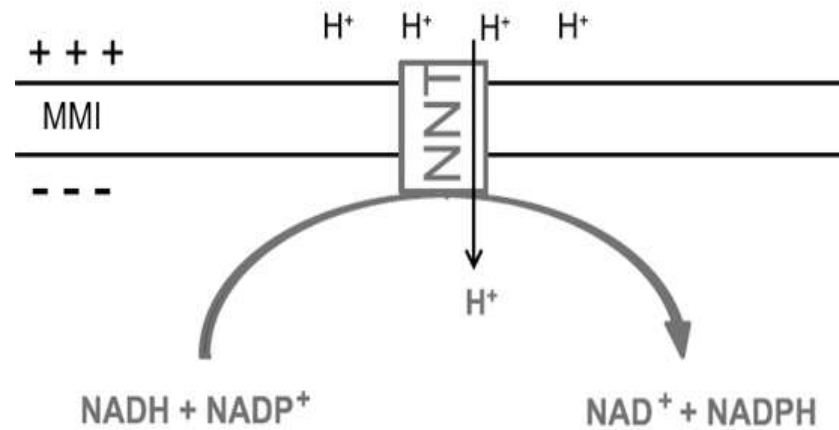


Figura 5. Esquema da reação catalisada pela NADP- transidrogenase mitocondrial e das reações redox de NADP. O H^+ é transferido da membrana mitocondrial interna (MMI) para matriz mitocondrial e o NADP^+ é reduzido à custa de NADH , resultando no deslocamento do equilíbrio para a direita pelo gradiente eletroquímico (Ronchi *et al.*, 2013, modificado).

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas linhagens de camundongos C57BL/6J obtidos do Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME, EUA) em 2009, sendo esta usada com frequência em pesquisas biomédicas, particularmente em investigações metabólicas, os quais são mutantes para *Nnt*. Há registros de que esta mutação surgiu a cerca de três décadas passadas, nas dependências da colônia do Laboratório Jackson (<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>; acessado em 05 de Outubro de 2013). É digno de nota que algumas linhagens C57BL/6J foram separadas da colônia Jackson antes do surgimento da mutação, como é o caso da linhagem C57BL6/JUnib, obtida do

Zentralinstitut für Versuchstierzucht (ZFV) (Hannover, Alemanha) em 1987 pelo CEMIB da UNICAMP.

A mutação da *Nnt* causa deficiência no estado redox de NADP e glutathione, bem como aumenta a produção de H₂O₂ mitocondrial (Ronchi *et al.*, 2013). Por outro lado, o controle respiratório de mitocôndrias isoladas de fígado com diferentes substratos respiratórios não apresentam diferenças quando comparado a linhagens que possuem o gene da *Nnt* funcional (Ronchi, *et al.*, 2013).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi esclarecer os mecanismos envolvidos nas alterações redox e na susceptibilidade à TPM em camundongos hipercolesterolêmicos, uma vez que tanto a lipogênese aumentada quanto a deficiência da transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NNT) podem ser responsáveis pela diminuição de NADPH observada nas mitocôndrias destes animais.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a eficiência da respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa de mitocôndrias isoladas de fígado e coração.
- b) Verificar o estado redox de nucleotídeos de piridina em preparações de mitocôndrias isoladas de fígado.
- c) Avaliar a susceptibilidade à transição de permeabilidade em preparações de mitocôndrias isoladas de fígado e coração, utilizando métodos de inchamento mitocondrial, medida do potencial elétrico de membrana e de transporte de íons Ca^{2+} .
- d) Verificar a produção de EROs em preparações de mitocôndrias isoladas de fígado.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

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

Camundongos machos de 2 a 4 meses de idade foram utilizados para o isolamento de mitocôndrias de fígado e coração deste estudo. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/IB/UNICAMP (protocolo nº 2549-1 de 2011) e Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), IB, UNICAMP.

Com finalidade didática denominaremos os camundongos de Hipercol (C57BL6/J/Ldlr^{-/-}), Jackson (C57BL6/J) e Unib (C57BL6/J/Unib).

3.2. Determinações bioquímicas plasmáticas

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

3.3. Isolamento de DNA pela técnica de *salting out*

Para o isolamento de DNA, utilizamos o procedimento de *salting out*, com modificações a partir de Miller *et al.* (1988). Esse procedimento consiste em aumentar a salinidade (solução saturada de NaCl) a fim de diminuir a associação de proteínas ao DNA, permitindo a extração dessa molécula. Em tubos de 2mL Cerca de 50 mg de tecido da cauda foi adicionado tampão de lise pH 8,2 (Tris-HCl

50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,5%) e proteinase K 10 mg/mL. Após digestão a 56°C overnight, com agitação constante em banho-seco.

Em seguida, os tubos de 2mL foram agitados no vortex e centrifugados a 14000 rpm por 1 minuto, os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo de 2mL, adicionando-se 200 µL de solução saturada de NaCl 6 M aos sobrenadantes e então foram agitados no vortex por 15 segundos e transferidos para um banho de gelo até que ocorresse a formação de um precipitado esbranquiçado. Após esse passo, os tubos foram centrifugados a 14000 g por 15 min a 4°C. Verificada a ausência de precipitados esbranquiçados no sobrenadante, esse foi transferido para outro tubo de 2 mL ao qual foram adicionados 550 µL de etanol absoluto 99% gelado, misturando-se bem e os tubos foram centrifugados a 10000 g por 5 min a 4°C. Descartado o sobrenadante adicionou-se 600 µl de etanol 70% gelado. Os tubos foram mantidos a -20°C por, pelo menos, duas horas para garantir a precipitação do DNA.

Realizada a etapa de precipitação do DNA em etanol gelado, os tubos foram centrifugados novamente a 10000 rpm por 2 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi seco sob jato de N₂. Uma vez completamente seco, o *pellet* foi ressuspenso em 150 µl de tampão TE pH 8,1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

Em espectrofotômetro de microvolumes Nanodrop® foi obtido o espectro da amostra e o valor da razão A260/A280 (absorbância em 260 nm / absorbância em 280 nm) e da razão A260/A230. A primeira razão indica a pureza da amostra de DNA com relação à contaminação por proteínas e deve estar sempre acima de 1,8 para a determinação de lesões oxidativas. A segunda razão indica uma possível contaminação por solventes, principalmente, o etanol da etapa de precipitação. A concentração de DNA foi obtida em ng/µL.

3.4. PCR para identificação da mutação da *Nnt*

Os grupos de camundongos foram genotipados usando três primers (todos 5' -3'):

Nnt-COM (GTAGGGCCAACTGTTTCTGCATGA)

Nnt-WT (GGGCATAGGAAGCAAATACCAAGTTG)

Nnt-MUT (GTGGAATTCCGCTGAGAGAACTCTT)

Sendo dois alelos, o alelo de tipo selvagem e o alelo mutante *Nnt*. Os produtos de amplificação por PCR foram 579 pb para o alelo de tipo selvagem e para o alelo mutante 743 pb. Os produtos da reação PCR amplificação condições utilizadas foram de fusão inicial de 95°C, 5 min, em seguida 35 ciclos de 95°C, 45 seg, 58°C, 30 seg, 72°C, 45 seg, seguido de uma extensão final de 72°C por 5 min, foram sujeitos a electroforese em gel de agarose 2%, e visualizadas sobre uma caixa de luz UV utilizando o sistema comercial de imagiologia (P-Pix Image HE, Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) (Nicholson, 2010).

3.5. Isolamento de mitocôndrias de fígado

As mitocôndrias de fígado foram isoladas utilizando-se técnicas de centrifugação diferencial, segundo Schneider e Hogeboom (1951), com algumas modificações: o animal foi sacrificado por deslocamento cervical, o fígado foi retirado, picotado e lavado em meio de isolamento I contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2). O tecido picotado foi homogeneizado em homogenizador do tipo Potter com meio de isolamento I, a suspensão foi centrifugada por 10 min a 800 x g com aceleração e desaceleração máxima em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA) para precipitação de núcleos e resíduos celulares. O sobrenadante foi separado e reservado em outro tubo e o *pellet* foi ressuspenso novamente e centrifugado por 10 minutos a 800 x g, obtendo com isso uma quantidade maior de mitocôndria para realizar os experimentos. Este segundo sobrenadante foi separado em outro tubo e juntamente com o tubo já reservado foram centrifugados por 10 minutos a 7.750 x g. Depois de desprezar os sobrenadantes e homogeneizar os *pellets* com um pincel fino, foi ressuspenso em 500 µL de meio de isolamento II (sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2)) e novamente centrifugado por 10

minutos a 7.750 x g. O sobrenadante foi novamente desprezado e o pellet foi lavado 3 vezes com 100 µL de Meio de isolamento III (mesma condição dos anteriores sendo este isento de EGTA) e então as frações mitocondriais foram ressuspensas com 100 µL do mesmo meio, obtendo-se uma concentração final de 40 - 50 mg proteína/mL. Todos os procedimentos do isolamento foram realizados a 4°C ou em gelo.

3.6. Isolamento de mitocôndrias de coração

As mitocôndrias de coração foram isoladas por meio do método de centrifugação diferencial. O animal foi sacrificado por deslocamento cervical, o coração foi retirado, picotado e lavado em meio de isolamento I que contendo sacarose 75 mM, manitol 200 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM e BSA 0,1% (pH 7,2). O tecido picotado foi então homogeneizado manualmente em homogeneizadores tipo Dounce por aproximadamente 10 vezes com pistilo frouxo e 10 vezes com o pistilo apertado para obtenção de uma suspensão homogênea.

A suspensão foi centrifugada por 10 min a 800 x g com aceleração e desaceleração máxima, em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA) para precipitação de núcleos e resíduos celulares. O sobrenadante foi separado e reservado em outro tubo e o *pellet* foi ressuspensão novamente e centrifugado por 10 minutos a 800 x g, obtendo com isso uma quantidade maior de mitocôndria para realizar os experimentos. Este segundo sobrenadante foi separado em outro tubo e juntamente com o tubo já reservado foram centrifugados por 10 min a 6.000 x g. Depois de desprezar os sobrenadantes e homogeneizar os *pellets* com um pincel fino, em 500 µL de meio de isolamento II (mesma condição do anterior sendo este isento de EGTA e BSA) e novamente centrifugado por 10 minutos a 6.000 x g. As frações mitocondriais foram ressuspensas com 100 µL do mesmo meio, obtendo-se uma concentração final de 25 - 35 mg proteína/mL (Kowaltowski *et al.*, 2001). Todos os procedimentos do isolamento foram realizados a 4°C ou em gelo.

3.7. Determinação de proteína mitocondrial

As concentrações de proteína dos homogenatos e suspensões mitocondriais foram determinadas pelo método de Biureto (Gornall *et al.*, 1949) na presença de colato 1 % (Kaplan e Pedersen, 1983) ou de Bradford (Bradford, 1976). O princípio do método baseia-se na formação de ligações peptídicas com íons cúpricos, em meio alcalino, dando origem a um complexo com tonalidade violeta. Inicialmente no método de Biureto a solução contendo os reagentes foram colocadas em um tubo de ensaio de vidro com 1 cm de caminho ótico e quantificados a 540 nm em espectrofotômetro, enquanto que pelo método de Bradford a solução contendo reagentes foram colocadas em microplacas e quantificados a 540 nm em um leitor de placas. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Soluções de BSA foram utilizadas como padrões.

3.8. Condições experimentais

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

3.9. Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de O_2 por suspensões mitocondriais isoladas de fígado ou de coração (0,5 mg/mL) em meio de reação contendo EGTA 200 μM foi monitorado utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado à uma câmara de vidro de 1,4 mL equipada com agitador magnético. A

concentração inicial de oxigênio molecular no meio de reação foi de 225 nmol/ml, a 28 °C (Robinson e Cooper, 1970).

A respiração de fosforilação (V3) foi obtida pela adição de 150 nmoles/mL ADP. A respiração de repouso (V4) é aquela observada após o término da respiração de fosforilação. O controle respiratório (CR) foi calculado como a razão entre as velocidades de respiração nos estados 3 e 4. A razão ADP/O indica o número de moléculas de ADP fosforiladas por átomo de oxigênio consumido, como mostrado no esquema da Figura 6.

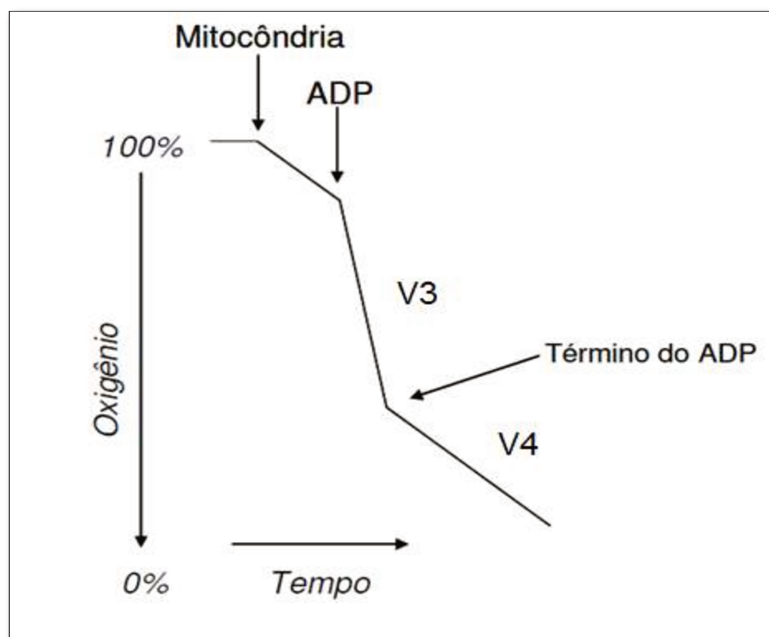


Figura 6. Esquema ilustrativo para obtenção dos parâmetros respiratórios.

3.10. Determinação do estado redox de NAD(P)H

A oxidação ou redução de nucleotídeos de piridina nas suspensões mitocondriais foram acompanhadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (Hitachi, Ltd., Tóquio, Japão) operando nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente (Vercesi, 1987). Calibrações foram realizadas por meio de adições de concentrações conhecidas de NADPH ao meio de reação padrão na ausência de mitocôndria (Figura 7).

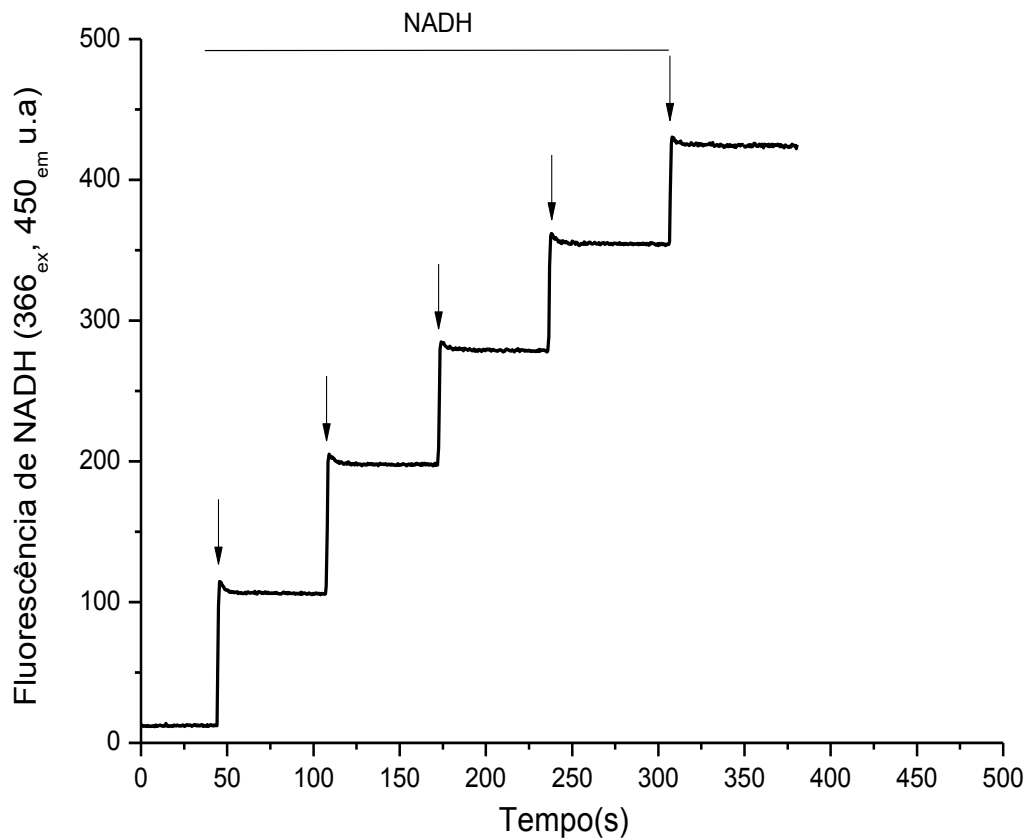


Figura 7. Calibração de NADH. Traçado representativo das alterações de fluorescência em resposta a adições de NADH 20 μ M.

3.11. Medida de inchamento mitocondrial

As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz mitocondrial e do meio, e, qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (Nicholls e Akerman, 1982).

Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a consequente diminuição da luz espalhada. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (Vercesi *et al.*, 1988) foi feito em um espectrofotômetro Hitachi U-3000

(Hitachi, Ltd., Tóquio, Japão). As medidas de inchamento mitocondrial foram calculadas utilizando retas paralelas, medindo o meio entre as elas, determinando um ponto no traçado, o qual corresponde à metade do inchamento.

3.12. Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana mitocondrial – Método da safranina

A medida do potencial de membrana mitocondrial foi determinada usando-se o indicador fluorescente safranina O, 5 μM (Figueira *et al.*, 2012). A fluorescência da safranina decresce progressivamente com sua adsorção à membrana mitocondrial interna a medida que aumenta o potencial elétrico até aproximadamente 170 mV. Usou-se espectrofluorímetro Hitachi F4500 (Hitachi, Ltd., Tóquio, Japão) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 586 nm, respectivamente. A calibração foi feita pela titulação do potencial com a captação de potássio (K^+) na presença de valinomicina, em meio de reação isento de potássio e contendo sacarose 200 mM, HEPES 20 mM pH 7,2, MgCl_2 1,0 mM, EGTA 0,3 mM. KCl foi consecutivamente adicionado para determinações dos valores de potencial elétrico de membrana usando-se a equação de Nerst para as concentrações finais de KCl (0,375 mM, 0,75 mM, 1,125 mM, 1,625 mM, 2,125 mM, 2,625 mM, 3,375 mM, 4,125 mM, 4,875 mM e 5,625 mM) seguidas de uma adição de FCCP 0,35 μM para dissipar totalmente o potencial (Ver Figura 8). As medidas do potencial elétrico de membrana mitocondrial foram calculadas utilizando retas paralelas, medindo o meio entre elas, determinando um ponto no traçado, o qual corresponde à metade da liberação do potencial.

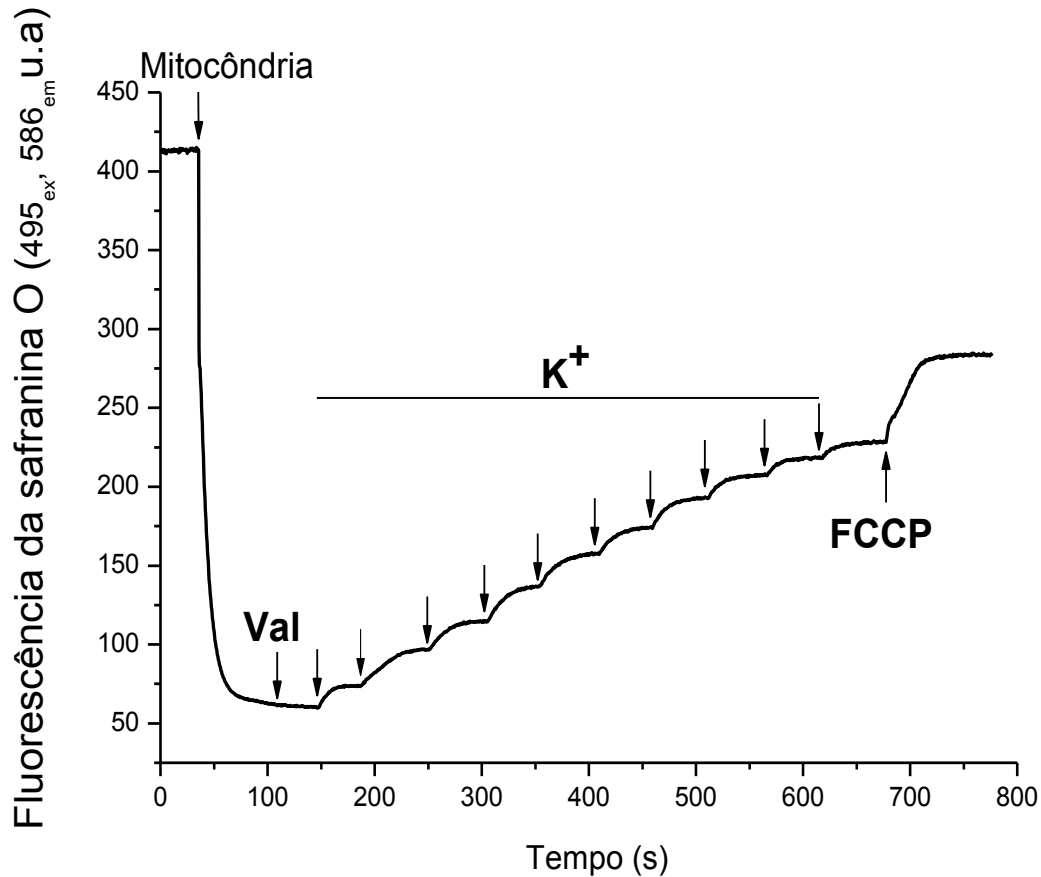


Figura 8. Estimativa do potencial elétrico de membrana mitocondrial - Método da safranina. Traçado representativo das alterações na fluorescência de safranina em resposta à titulação do potencial elétrico, com adições de KCl, na presença de valinomicina (Val) 40 ng/mL. KCl foi consecutivamente adicionado para determinar o valor de potencial elétrico de membrana usando-se a equação de Nerst para as concentrações finais de KCl (0,375 mM, 0,75 mM, 1,125 mM, 1,625 mM, 2,125 mM, 2,625 mM, 3,375 mM, 4,125 mM, 4,875 mM e 5,625 mM). Após as adições de KCl, foi adicionado o protonóforo FCCP 0,35 μ M para dissipar todo o potencial.

3.13. Captação de íons de cálcio por mitocôndrias

A captação de cálcio por mitocôndrias isoladas foi monitorada segundo as variações de fluorescência de Calcium GreenTM- 5N 0,1 μ M (Molecular Probes) em um espectrofluorímetro Hitachi F4500, operando com excitação e emissão nos comprimentos de onda de 506 e 531 nm, respectivamente (Murphy *et al.*, 1996).

A calibração foi feita pela titulação de íons de cálcio em meio de reação padrão na ausência de mitocôndria, com adições de Ca^{2+} ($10 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$) seguidas por adições de EGTA ($5 \mu\text{M}$) (ver Figura 9).

As medidas da captação de íons de Ca^{2+} foram calculadas utilizando retas paralelas, utilizando o meio entre elas, determinando um ponto no traçado, o qual corresponde à metade da liberação do cálcio.

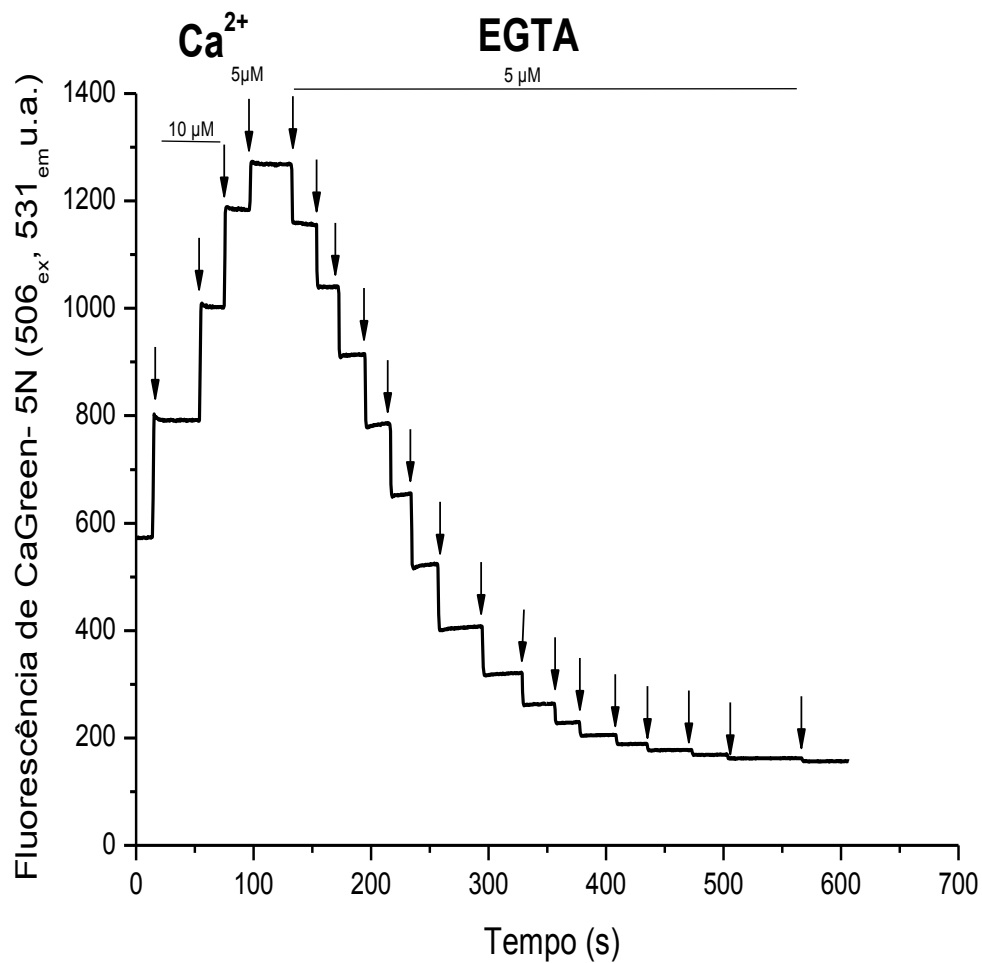


Figura 9. Efeitos de Ca^{2+} e EGTA sobre a fluorescência de Calcium Green. Traçado representativo das alterações de calcium Green em resposta a titulação com íon de Ca^{2+} e sua reversão com adições de EGTA. A fluorescência inicial aproximadamente 600 u.a. foi obtida com meio de reação padrão contendo Ca^{2+} na concentração aproximada de $15 \mu\text{M}$.

3.14. Estimativa da liberação de espécies reativas de oxigênio

A liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas mitocôndrias isoladas foi determinada fluorimetricamente por meio da conversão de Amplex Red® 10 μ M (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA), na presença de peroxidase 1 U/ml, a um composto altamente fluorescente, resofurina (Zhou *et al.*, 1997). A fluorescência foi monitorada ao longo do tempo em um espectrofluorímetro Shimadzu RF5301 usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente. Sob estas condições, um aumento linear na fluorescência indica um aumento da taxa de liberação do H_2O_2 pelas mitocôndrias.

O cálculo das velocidades foi realizado considerando-se os dois minutos finais de traçado, nos quais é feita a regressão linear e, a partir da equação da reta obtida para o intervalo de tempo adotado, foram calculadas as variações de fluorescência por unidade de tempo. Com a calibração (**Figura 10**) feita com H_2O_2 e AmplexRed®, na presença de peroxidase (HRP), os valores de fluorescência por unidade de tempo (unidades arbitrárias/min) foram convertidos a valores de quantidade por unidade de tempo (pmol/min).

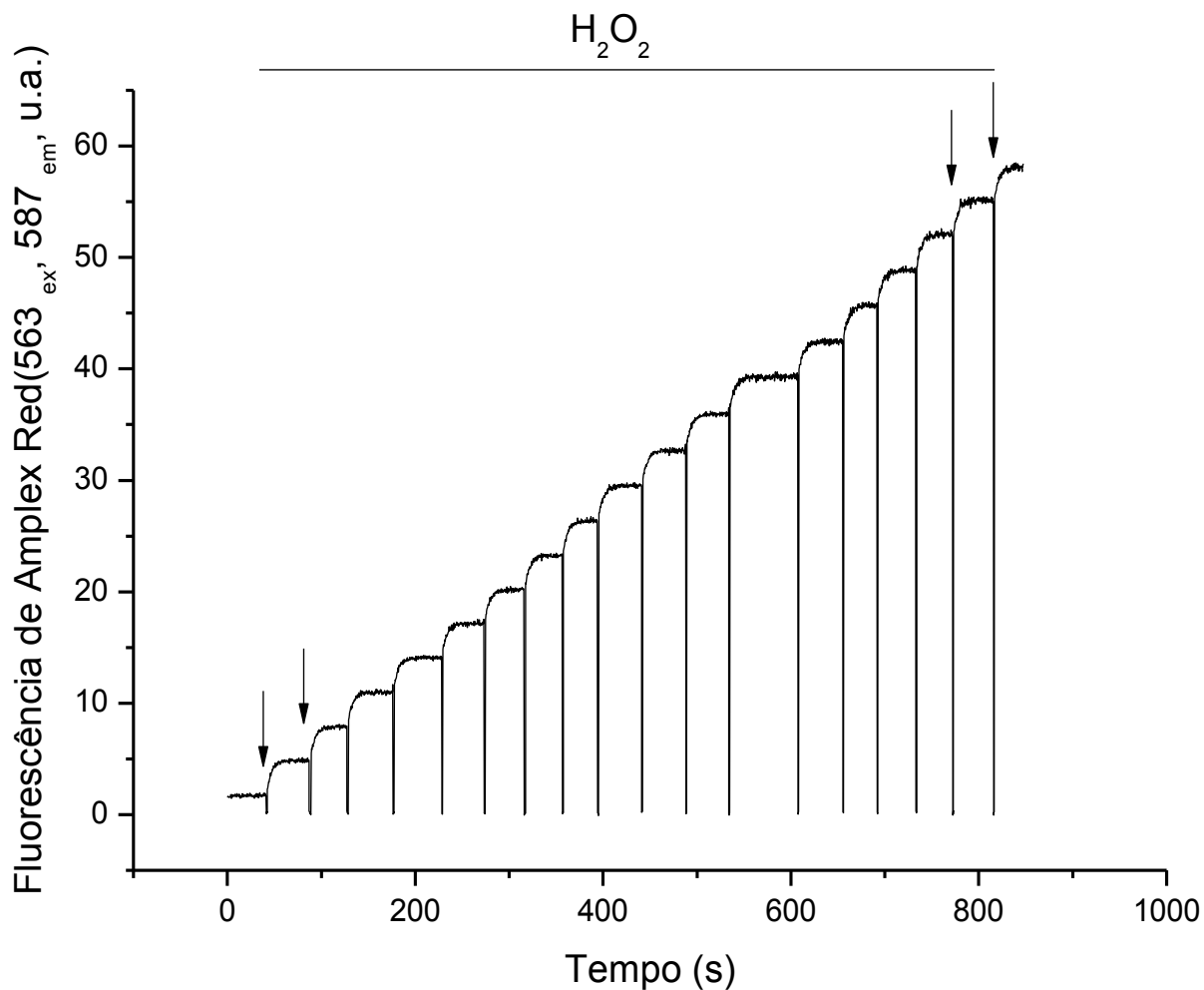


Figura 10. Estimativa da liberação de espécies reativas de oxigênio - Método do Amplex Red®. Traçado representativo das alterações na fluorescência de Amplex Red® em resposta à titulação da liberação de espécies reativas de oxigênio, com adições conhecidas de H₂O₂.

3.15. Análises estatísticas dos resultados

Os dados experimentais foram analisados utilizando-se o software OriginPro versão 8.0 e GraphPad Prism versão 5.0. Os dados foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Os dados estão representados como a média \pm erro padrão (\pm SEM) de pelo menos seis experimentos independentes. Consideramos significativo o valor de $p < 0,05$.

4. Resultados e discussão

A NADP-transidrogenase (NNT) é uma enzima da membrana mitocondrial interna importante para a manutenção do estado redox da organela. Por re-reduzir NADP a partir de NADH, a NNT é considerada o principal gerador de poder redutor do sistema enzimático antioxidante mitocondrial (Hoek e Rydstrom, 1988; Rydström, 2006; Ronchi *et al.*, 2013). Em situações de alto potencial elétrico da membrana mitocondrial interna esta enzima pode deslocar a reação:



Assim, a deficiência dessa transidrogenase poderia causar diminuição de NADPH e da capacidade de defesa mitocondrial contra EROs causando estresse oxidativo celular (Ronchi *et al.*, 2013).

Os camundongos Jackson (C57BL6/J) são modelos responsivos à obesidade induzida por dieta e amplamente utilizados para estudos metabólicos e para produção de animais geneticamente modificados. Estes camundongos quando alimentados com dietas ricas em gorduras, apresentam vários aspectos da síndrome metabólica, a saber, obesidade central, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia (Laboratório Jackson - <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>; acessado em 12 de Setembro de 2013).

Contudo, os camundongos Jackson diferem de outras linhagens C57BL6 por possuírem uma mutação no gene da *Nnt* que causa níveis extremamente baixos de expressão e atividade da enzima no fígado e pâncreas destes animais (Toye *et al.*, 2005). Recentemente importamos estes camundongos do Jackson Laboratory (2009) e observamos que estes apresentam aumento marcado de adiposidade e intolerância à glicose quando comparados aos camundongos controles Unib, obtidos do Centro Multidisciplinar da Investigação Biológica em Animais de Laboratório (CEMIB) da Unicamp (J. C. Rovani, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia da Unicamp, resultados não publicados).

Trabalhos realizados em nosso laboratório (Oliveira *et al.*, 2005 e Paim *et al.*, 2008) mostraram que os camundongos hipercolesterolêmicos (background C57BL6/J, provenientes do Jackson Laboratory) têm maior susceptibilidade à abertura do PTP quando comparados aos camundongos Unib, provenientes do CEMIB/Unicamp. Estes estudos indicaram que essa maior susceptibilidade à

abertura do PTP ocorria devido a uma deficiência de NADPH mitocondrial, sendo proposto que a síntese aumentada de colesterol era responsável por esta deficiência de NADPH (Oliveira *et al.*, 2005 e Paim *et al.*, 2008).

Como os camundongos hipercolesterolêmicos são também deficientes da NNT, existe a possibilidade de que a deficiência de NADPH nestes animais seja devido tanto ao aumento de síntese de colesterol como também à deficiência dessa transidrogenase.

4.1 Níveis de colesterol e de triglicérides plasmáticos nos camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

A **Figura 11** mostra os valores de colesterol e triglicérides plasmáticos nos camundongos hipercolesterolêmicos, Jackson e Unib. Os resultados obtidos mostram que os camundongos hipercolesterolêmicos, conforme esperado, apresentaram colesterol plasmático significativamente aumentado (270 mg/dL) (Ishibashi, 1993 e Osono *et al.*, 1995) em relação aos Jackson e Unib (110 mg/dL). Estes valores estão de acordo com os dados do Jackson Laboratory, onde os níveis de colesterol dos camundongos hipercolesterolêmicos recebendo uma dieta padrão estão entre 200 e 400 mg/dL, sendo que os valores dos camundongos Jackson e Unib estão na faixa normal, i.e., entre 50 e 100 mg/dL.

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

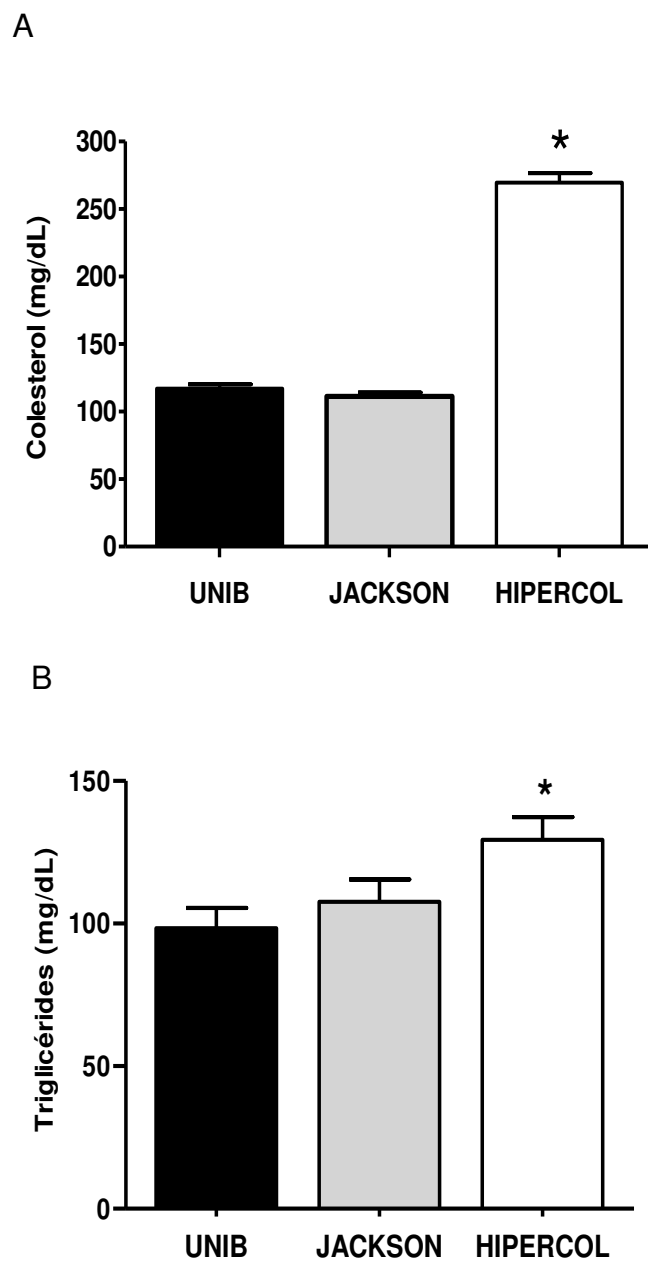


Figura 11. Concentrações de colesterol e de triglicérides plasmáticos em camundongos Unib, Jackson e Hipercol. Painel A: colesterol plasmático. Painel B: triglicérides plasmático, * $p < 0,01$ vs Unib. Média \pm e.p.m. (n=30).

4.2. PCR para identificação da mutação da *Nnt*

Para confirmar a presença da mutação da *Nnt* foi realizado a reação em cadeia da polimerase (PCR), onde os dados obtidos mostram, como esperado, que os camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson apresentam o alelo do tipo mutante, com aproximadamente 743 pb. Os camundongos Unib apresentam o alelo com aproximadamente 579 pb indicando que possuem a *Nnt* intacta (*wild type*) em seu genótipo (**Figura 12**).

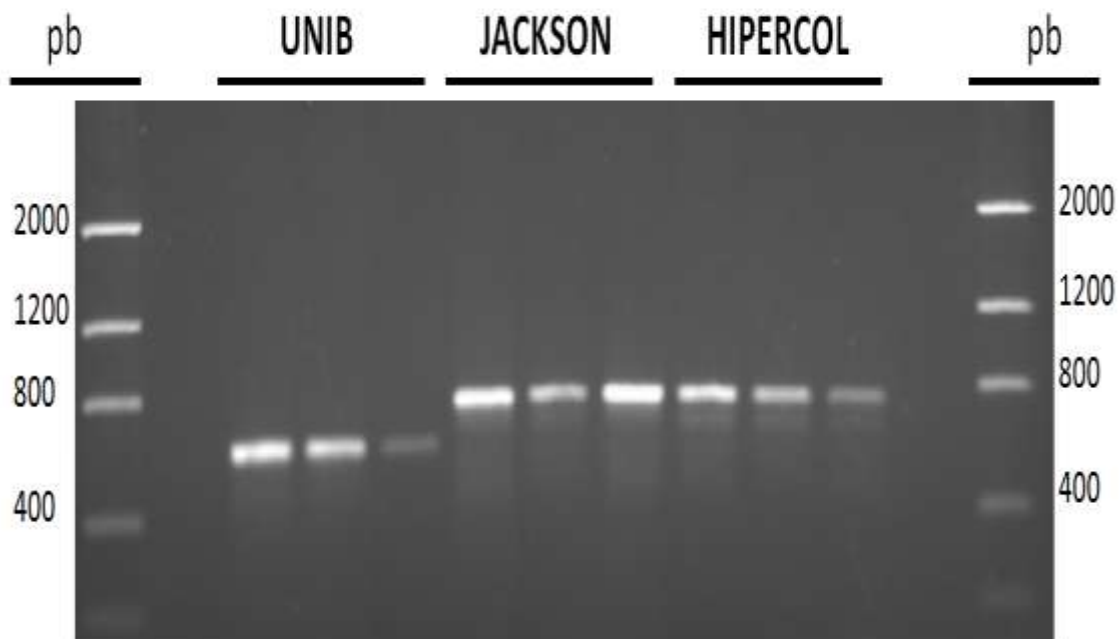


Figura 12. Genotipagem e atividade da *Nnt* em camundongos Unib, Jackson e Hipercol. A análise do DNA em gel de agarose feita por PCR, amplificação dos fragmentos de genes mutados de *Nnt* e de tipo selvagem das caudas de camundongos. Os produtos de amplificação são 579 pb para o alelo selvagem e 743 pb para o alelo mutante. Figura representativa (n=3).

4.3. Consumo de O₂ por mitocôndrias de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

Após o isolamento de mitocôndrias de fígado e de coração, foi realizada a avaliação da integridade mitocondrial por meio das medidas de controle respiratório. Os valores obtidos foram em média, acima de 4,5 para mitocôndrias de fígado e acima de 5 para mitocôndrias de coração. Como mostrado na **Figura 13 e na Tabela I** (mitocôndrias isoladas de fígado) e na **Figura 14 e na Tabela II** (mitocôndrias isoladas de coração), não houve diferenças significativas entre os parâmetros respiratórios mitocondriais das três linhagens estudadas.

Estes resultados indicam que mitocôndrias dos três grupos de camundongos são igualmente funcionais quanto ao consumo de oxigênio e conversão de energia. De acordo com Oliveira *et al.* (2005) e Paim *et al.* (2008), as mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos não apresentam diferenças no consumo de oxigênio quando comparadas às mitocôndrias de camundongos Unib.

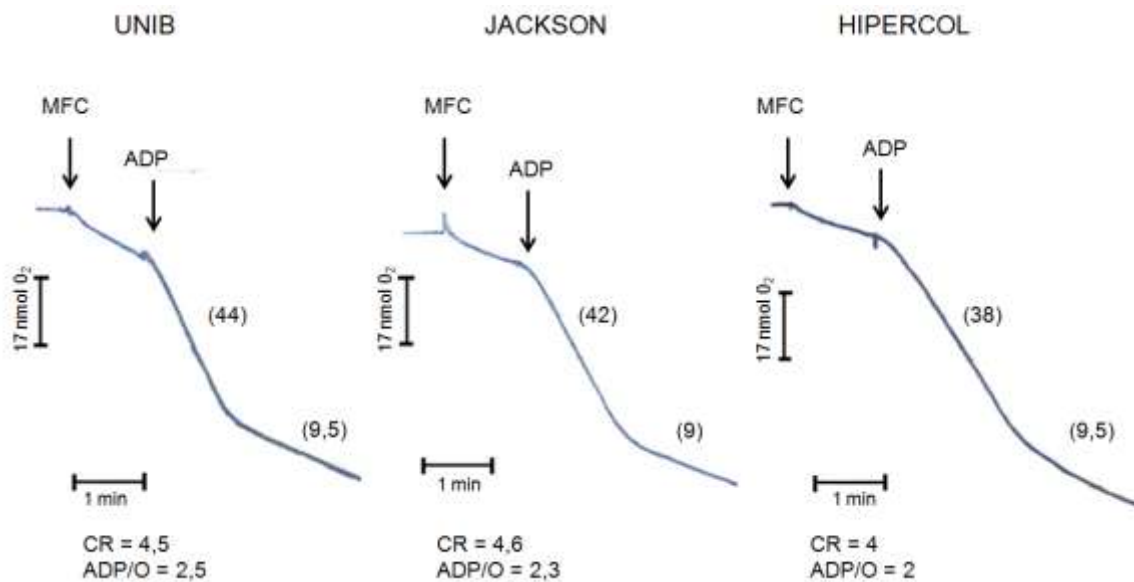


Figura 13. Consumo de O₂ por mitocôndrias de fígado isoladas de camundongos Unib, JACKSON e Hipercol não apresentaram diferença significativa entre os parâmetros bioenergéticos mitocondriais. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 µM e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM. Figura representativa (n=10). MFC = Mitocôndria de fígado de camundongo.

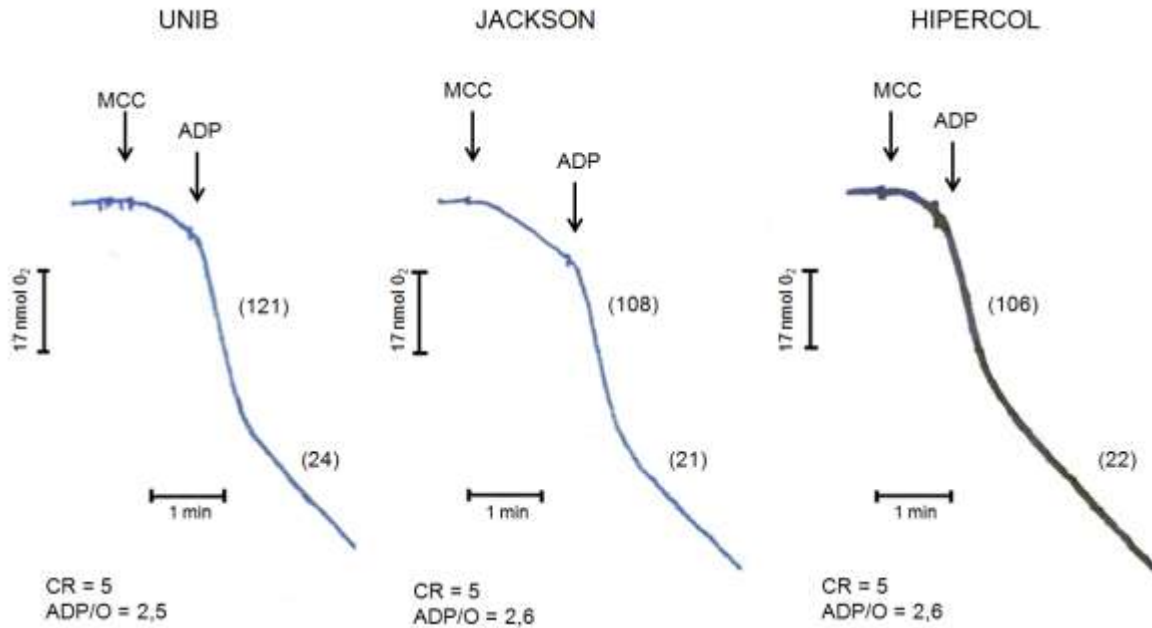


Figura 14. Consumo de O₂ por mitocôndrias de coração isoladas de camundongos Unib, JACKSON e Hipercol não apresentaram diferença significativa entre os parâmetros bioenergéticos mitocondriais. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM, KCl 65 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 µM e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM. Figura representativa (n=10). MCC = Mitocôndria de coração de camundongo.

Tabela I: Consumo de O₂ por mitocôndrias de fígado isoladas de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

	UNIB	JACKSON	HIPERCOL
V3 (nmol O ₂ / mg/min)	42,20 ± 1,38	41,39 ± 1,12	39,72 ± 2,31
V4 (nmol O ₂ / mg/ min)	10,08 ± 0,63	9,20 ± 0,14	9,57 ± 0,27
ADP/O	2,30 ± 0,05	2,27 ± 0,04	2,23 ± 0,04
CR (V3 / V4)	4,56 ± 0,52	5,04 ± 0,60	4,56 ± 0,55

Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 µM e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM. Os valores representam a média ± e.p.m. de n=10, p<0,05 (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

Tabela II: Consumo de O₂ por mitocôndrias de coração isoladas de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

	UNIB	JACKSON	HIPERCOL
V3 (nmol O ₂ / mg/min)	109,36 ± 22,11	102,22 ± 16,22	92,41 ± 14,66
V4 (nmol O ₂ / mg/ min)	21,69 ± 3,66	20,43 ± 3,21	18,93 ± 3,39
ADP/O	2,42 ± 0,06	2,48 ± 0,07	2,46 ± 0,32
CR (V3 / V4)	5,01 ± 0,26	5,00 ± 0,45	5,06 ± 1,01

Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em 1,4 mL de meio de reação padrão contendo sacarose 125 mM, Hepes 10 mM, KCl 65 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 µM e substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM. Os valores representam a média ± e.p.m. de n=8, p<0,05 (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

4.4. O estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais em camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos em fígado de camundongo.

Considerando-se a deficiência de atividade da enzima NADP-transidrogenase (NNT) nos camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson, avaliamos o estado redox dos nucleotídeos de nicotinamida (NAD(P)H) em mitocôndrias isoladas destes animais, pois sabe-se que, o estado oxidado destes nucleotídeos induz a abertura do PTP (Vercesi, 1987; Fagian *et al.*, 1990; Zago *et al.*, 2000).

Estes experimentos foram realizados por meio do monitoramento das alterações na fluorescência de NAD(P)H endógeno. O estado reduzido foi obtido pela adição de isocitrato 1 mM (**Figura 15**).

Os experimentos com as três mitocôndrias energizadas por succinato na presença de rotenona (**Figura 15A**), ou com substratos de complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) (**Figura 15B**) mostraram, como esperado, que as mitocôndrias dos camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson exibiram uma queda espontânea de fluorescência de NAD(P)H mais acentuada do que as dos camundongos Unib. A adição posterior de isocitrato, um redutor específico de NADP⁺ em mitocôndrias de fígado (Moyle e Mitchell, 1973), reverteu as fluorescências destas mitocôndrias aos níveis originais, comparáveis aos níveis das mitocôndrias dos animais Unib.

Nos experimentos realizados na presença de altas concentrações de piruvato e malato (**Figura 15C**), nenhuma das mitocôndrias dos três modelos de camundongos exibiram oxidação espontânea de NAD(P)H. Nestas condições, não há o efeito da adição de isocitrato. Na nossa interpretação, nestas concentrações de substratos ligados a NAD(P)H o ciclo de Krebs gerou isocitrato em níveis suficientes para manter NADP no estado reduzido, por via independente da NNT (**Figura 15C**).

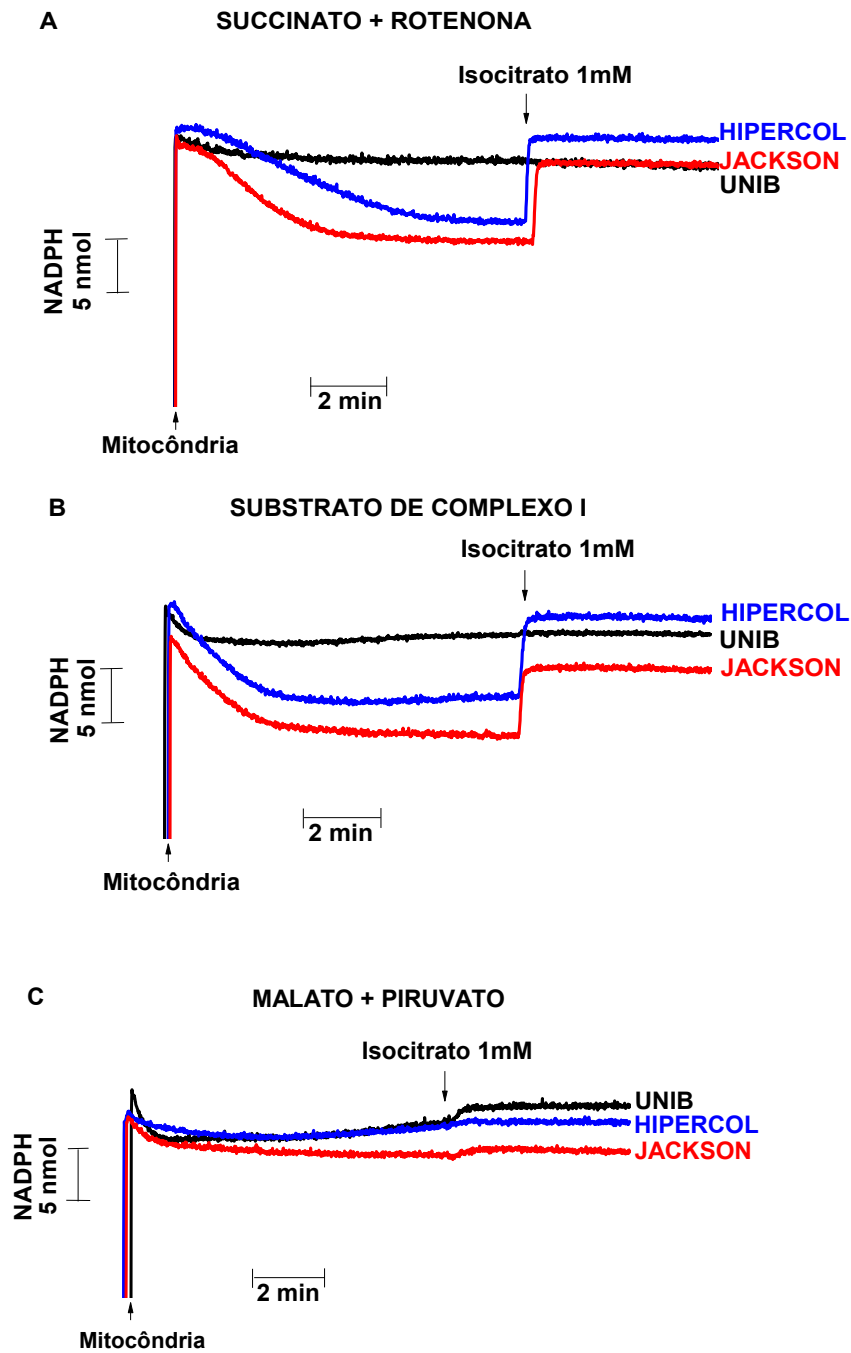


Figura 15. Comparação do estado redox de nucleotídeos de piridina mitocondriais em camundongos Unib, Jackson e Hipercol, contendo diferentes substratos. Mitocôndrias de fígado (1mg/mL) foram incubadas em 2mL meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo EGTA 200 μ M e isocitrato 1 mM foi adicionado onde indicado na figura. Paineis A: succinato 5 mM e rotenona 5 μ M. Paineis B: substratos de complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM. Paineis C: malato 5 mM e piruvato 5 mM. Figura representativa (n=6).

4.5. Transição de permeabilidade mitocondrial em camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos avaliada por inchamento mitocondrial, potencial elétrico de membrana e transporte de íons de Ca^{2+} .

4.5.1. Inchamento mitocondrial: Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

Para avaliarmos a TPM realizamos os experimentos de inchamento mitocondrial, sensível à ciclosporina A (CsA), com mitocôndrias incubadas na presença de íons de Ca^{2+} , como mostrado na **Figura 16**. Nos camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson, o inchamento completo ocorreu dentro de períodos aproximados de 9 e 10 minutos, respectivamente. Esses resultados mostram que mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson são mais susceptíveis à TPM induzida por íons de Ca^{2+} em relação aos camundongos Unib, que sofreram menor inchamento durante um período de aproximadamente de 15 minutos.

Apesar da maior susceptibilidade à TPM nos camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson em relação aos camundongos Unib, houve também diferença significativa entre hipercolesterolêmicos e Jackson no tempo médio de inchamento, como mostrado na **Figura 16B**.

Estes dados apoiam a ideia de que, além da atividade de NNT as alterações no metabolismo do colesterol também modificam a susceptibilidade das mitocôndrias à TPM.

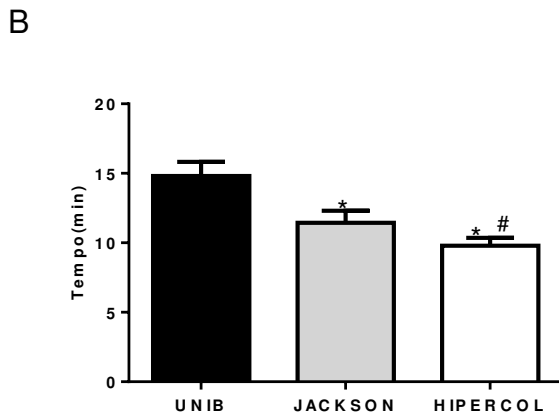
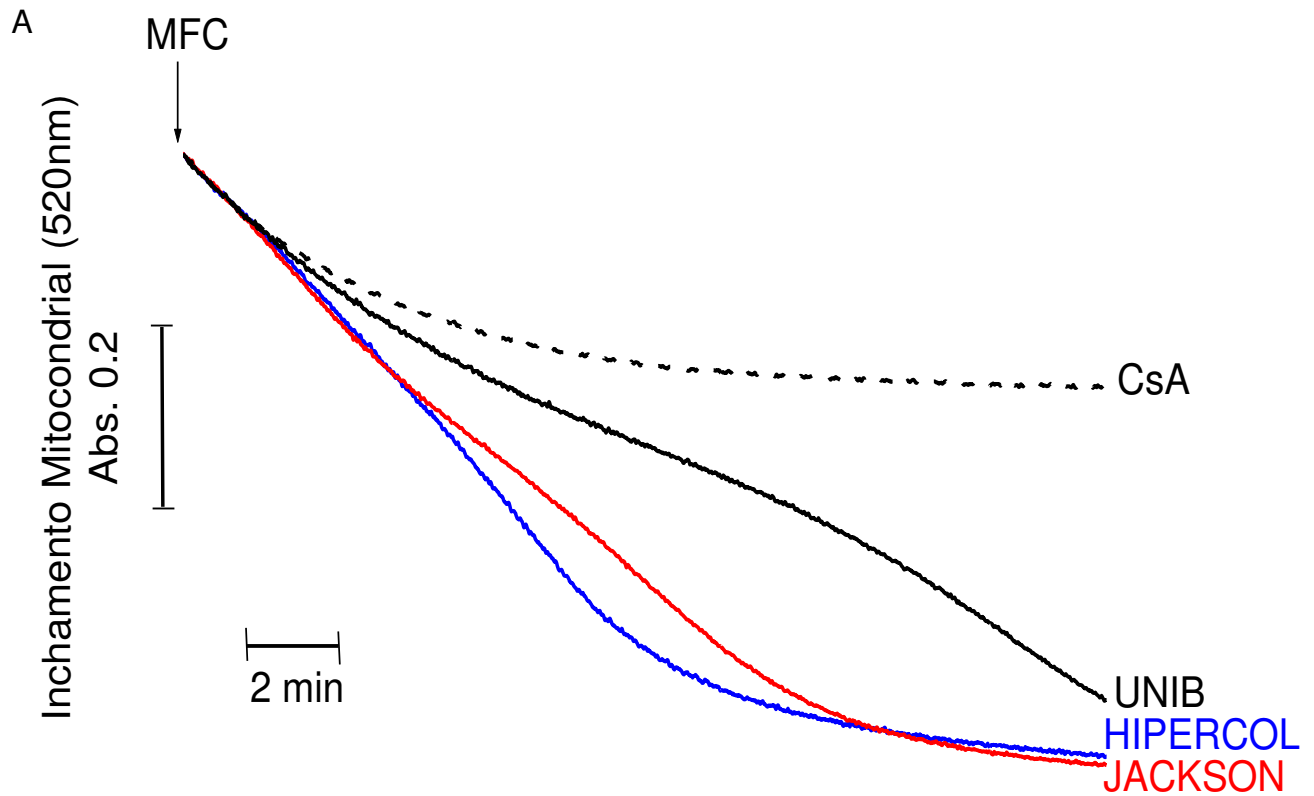


Figura 16. A susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzido por Ca^{2+} é maior em camundongos Hipercol e Jackson, quando comparados a camundongos Unib. Painel A: Mitocôndrias de fígado (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM e Ca^{2+} 35 μ M. Todos os grupos apresentam a mesma resposta na presença de CsA 1 μ M. MFC = Mitocôndria de fígado de camundongo. Figura representativa (n=6). Painel B: Os dados são apresentados em média \pm e.p.m., *p<0,01 vs Unib, #p<0,05 vs Jackson (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

4.5.2. Potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$): Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

Os experimentos representados na **Figura 17** demonstram a diferença de tempo para dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial induzida por íons de Ca^{2+} , nas mesmas condições dos experimentos anteriores nas três linhagens de camundongos estudadas.

De acordo com os experimentos de inchamento mitocondrial, as mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson dissiparam o $\Delta\psi$ dentro de períodos aproximados de 10 e 12 minutos, respectivamente. Isto demonstra que camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson possuem maior susceptibilidade à TPM em relação aos camundongos Unib que dissipam o $\Delta\psi$ após períodos de aproximadamente 18 minutos, nestas condições experimentais. Além disso, conforme **Figura 17B**, há diferença significativa entre os camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson, sendo que as mitocôndrias dos primeiros perdem seu $\Delta\psi$ mais rapidamente que as dos segundos. Estes resultados apoiam a ideia de que nos camundongos hipercolesterolêmicos há maior susceptibilidade à TPM do que nas mitocôndrias dos camundongos Jackson.

A sensibilidade à CsA (ciclosporina A) em todos os experimentos realizados, confirma que a dissipação de $\Delta\psi$ era devido à abertura do PTP.

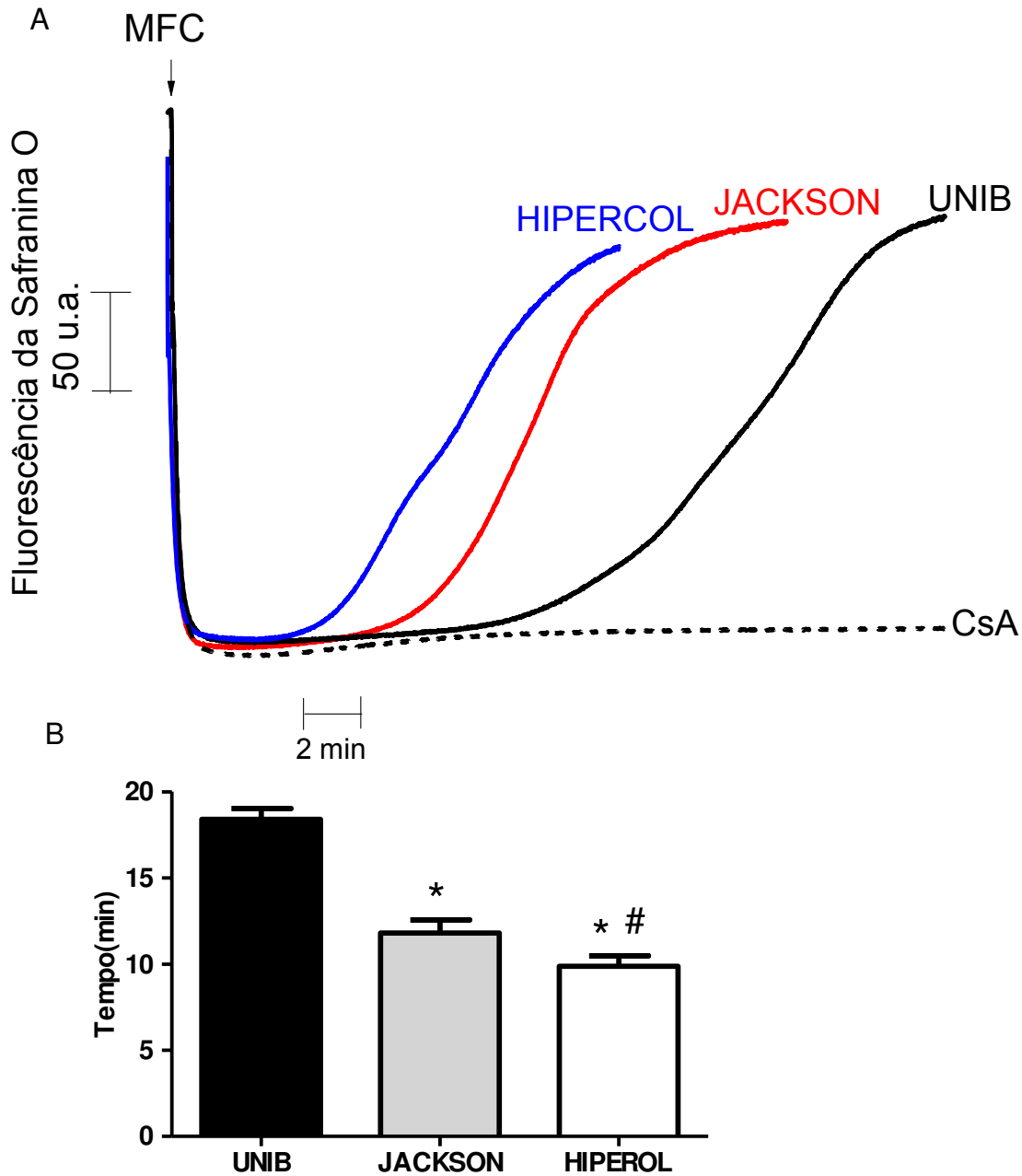


Figura 17. A dissipação do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) induzida por íons de Ca^{2+} em camundongos Hipercol e Jackson é mais rápida do que em camundongos Unib. Painel A: Mitocôndrias de fígado (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substrato para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM, safranina 5 μM e Ca^{2+} 35 μM . Todos os grupos apresentam a mesma resposta na presença de CsA 1 μM . Figura representativa (n=6). MFC = Mitocôndria de fígado de camundongo. Painel B: Os dados são apresentados em média \pm e.p.m., *p<0,01 vs Unib, #p<0,01 vs Jackson (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

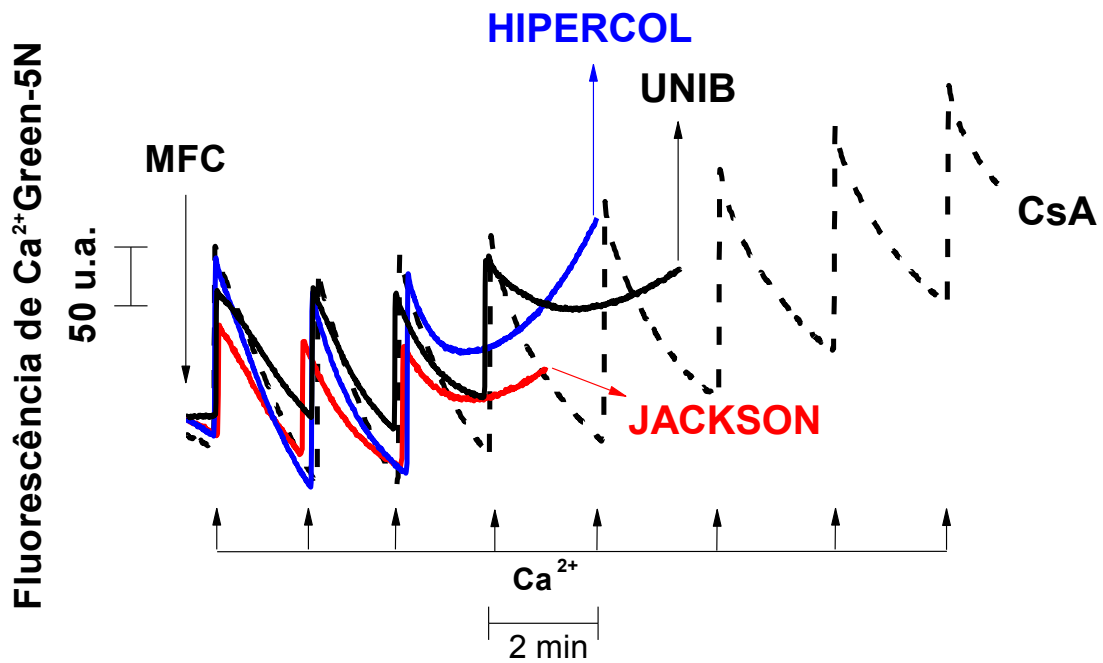
4.5.3. Transporte de íons de cálcio: Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

A **Figura 18** mostra que a adição de mitocôndrias ao meio de reação contendo 15 μM Ca^{2+} era seguida de diminuição rápida de fluorescência do probe Calcium Green-5N. Após estabilização da fluorescência, novas adições de Ca^{2+} (10 μM) eram seguidas de aumento transitório da fluorescência indicando que as mitocôndrias captavam o Ca^{2+} adicionado.

As mitocôndrias dos camundongos Unib suportaram mais adições consecutivas de Ca^{2+} (4 adições) em relação às mitocôndrias dos camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson (3 adições). Isso indica que as mitocôndrias de fígado dos camundongos Unib tem menor susceptibilidade à TPM.

Com este tipo de protocolo de adições consecutivas de Ca^{2+} , não detectamos diferenças significativas entre as tendências de abertura de PTP nas mitocôndrias dos hipercolesterolêmicos e Jackson. Como estes dados parecem estar em desacordo com os resultados das **Figuras 16 e 17** realizamos um experimento com uma dose única com maior concentração de cálcio, 50 μM Ca^{2+} (**Figura 19**). A **Figura 19** mostra que as mitocôndrias dos camundongos Unib foram capazes de reter o Ca^{2+} dentro do período aproximado de 15 minutos. Isso indica que as mitocôndrias de fígado dos camundongos Unib tem menor susceptibilidade à abertura do PTP (Oliveira *et al.*, 2005, Paim *et al.*, 2008), em relação às mitocôndrias dos camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson que retiveram o Ca^{2+} dentro de períodos aproximados de 11,5 e 12 minutos, respectivamente. Embora estes últimos resultados não sejam estatisticamente significativos, eles mostram uma tendência das mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos a sofrerem o fenômeno de TPM mais precocemente que as mitocôndrias dos animais Jackson.

A



B

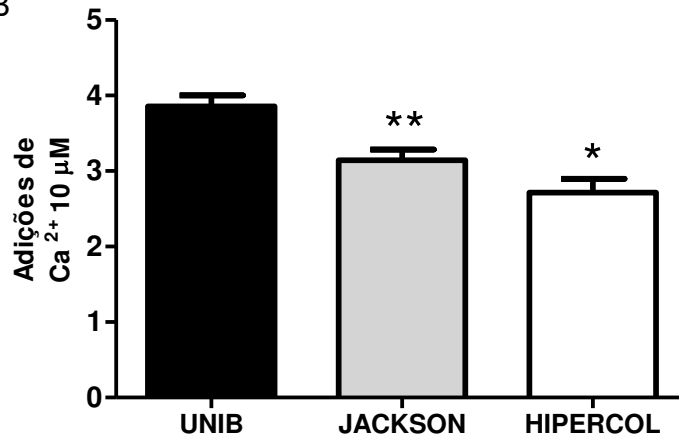


Figura 18. A capacidade mitocondrial de retenção de Ca²⁺ é menor em camundongos Hipercol e Jackson quando comparados à camundongos Unib. Painel A: Mitocôndrias de fígado (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM e Calcium Green™- 5N 0,1 µM (indicador fluorescente de Ca²⁺). As setas indicam a adição de Ca²⁺ 10 µM a cada 1,4 minutos. Todos os grupos apresentam a mesma resposta na presença de CsA 1µM. Figura representativa (n=6). MFC = Mitocôndria de fígado de camundongo. Painel B: Os dados são apresentados em média ± e.p.m., *p <0,01 vs Unib, **p < 0,05 vs Unib (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

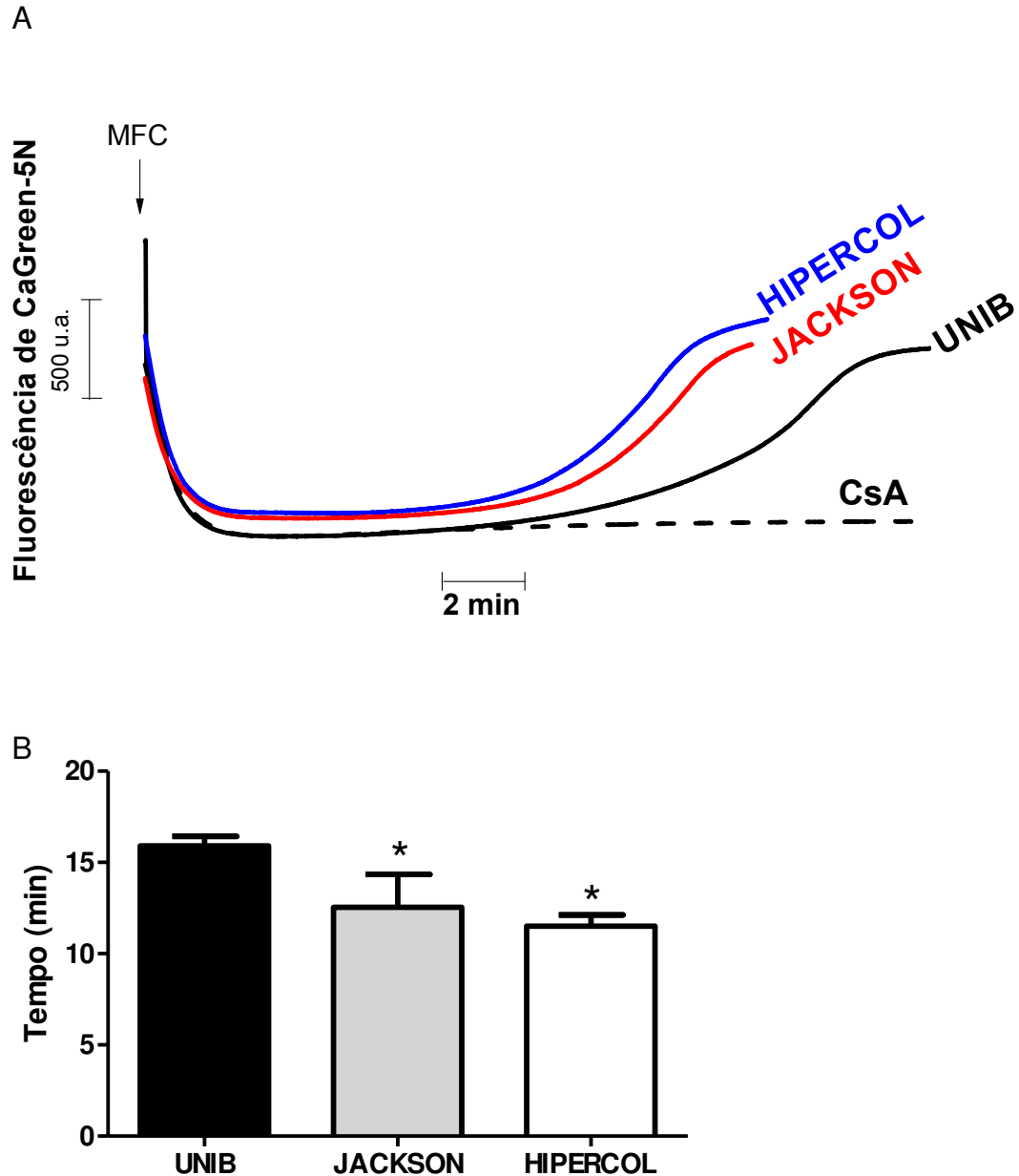


Figura 19. A capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} é menor em camundongos Hipercol e Jackson quando comparados à camundongos Unib. Painel A: Mitocôndrias de fígado (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetogluturato) 5 mM, Ca^{2+} 35 μM e Calcium Green™- 5N 0,1 μM (indicador fluorescente de Ca^{2+}). Todos os grupos apresentam a mesma resposta na presença de CsA 1 μM . Figura representativa (n=4). MFC = Mitocôndria de fígado de camundongo. Painel B: Os dados são apresentados em média \pm e.p.m., *p <0,01 vs Unib (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

4.5.4. Potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$): Mitocôndrias isoladas de coração de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

Os experimentos representados na **Figura 20** mostram o tempo de dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial por íons de Ca^{2+} , em mitocôndrias de coração nas mesmas condições dos experimentos com mitocôndrias isoladas de fígado.

De acordo com os resultados de mitocôndrias de fígado, as mitocôndrias de coração camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson dissiparam o $\Delta\psi$ dentro de períodos aproximados de 13 e 15 minutos, respectivamente. Por esta razão, camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson possuem maior susceptibilidade à TPM em relação aos camundongos Unib que dissipam o $\Delta\psi$ após períodos de aproximadamente 18 minutos, nestas condições experimentais. Os resultados alcançados também indicam a maior sensibilidade à abertura do PTP nas mitocôndrias dos camundongos hipercolesterolêmicos em relação aos Jackson (**Figura 20 B**).

Vale ressaltar que a sensibilidade à CsA é observada em todos os experimentos realizados obtendo a confirmação de que a dissipação de $\Delta\psi$ é devido à abertura do PTP.

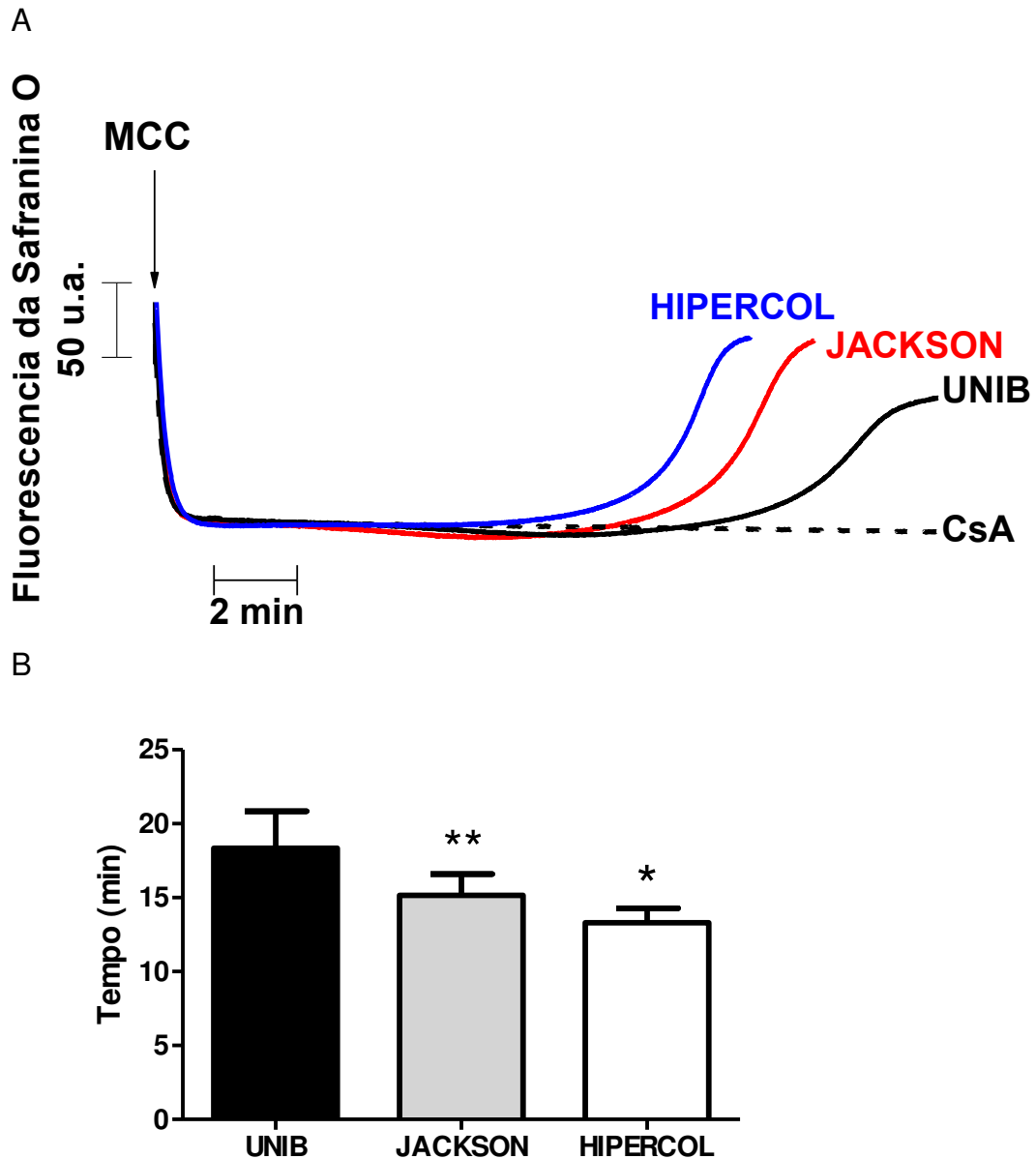


Figura 20. Dissipação do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) induzida por íons de Ca^{2+} de camundongos Hipercol e Jackson é mais rápida do que em camundongos Unib. Painei A: Mitocôndrias de coração (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2 mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substrato para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM, safranina 5 μM e Ca^{2+} 35 μM . Todos os grupos apresentam a mesma resposta na presença de CsA 1 μM . MCC = Mitocôndria de coração de camundongo. Figura representativa (n=6). Painei B: Os dados são apresentados em média \pm e.p.m., *p<0,01 vs Unib, **p<0,05 vs Unib (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

4.4.5. Transporte de cálcio: Mitocôndrias isoladas de coração de camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos.

Na **Figura 21** observa-se que a adição de mitocôndrias ao meio de reação contendo $15 \mu\text{M Ca}^{2+}$, sendo esta seguida de diminuição rápida de fluorescência do probe Calcium Green-5N. Posteriormente, após a estabilização da fluorescência, novas adições de Ca^{2+} ($10 \mu\text{M}$) foram seguidas de aumento transitório da fluorescência, indicando que as mitocôndrias captam o Ca^{2+} adicionado. Observa-se que as mitocôndrias de coração, assim como as de fígado dos camundongos Unib, suportaram um número maior de adições consecutivas de Ca^{2+} (4 adições), em relação as mitocôndrias dos camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson (3 adições). Isso caracteriza que as mitocôndrias, tanto de fígado como de coração, dos camundongos Unib tem menor susceptibilidade à TPM que a dos outros dois grupos.

Na **Figura 22** analisamos a capacidade das mitocôndrias em reter cálcio frente a uma dose única e alta deste cátion. Podemos observar que, a adição de mitocôndrias de coração ao meio de reação contendo $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ era seguida de diminuição rápida de fluorescência do probe Calcium Green-5N. As mitocôndrias dos camundongos Unib foram capazes de reter o Ca^{2+} dentro do período aproximado de 20 minutos. Isso revela que as mitocôndrias dos camundongos Unib tem menor susceptibilidade à abertura do PTP em relação às mitocôndrias dos camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson, que retiveram o Ca^{2+} dentro de períodos aproximados de 14 e 14,5 minutos, respectivamente.

Como no caso das mitocôndrias de fígado, a análise de transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias de coração também indicam que não há diferenças significativas entre os camundongos Hipercolesterolêmicos e Jackson.

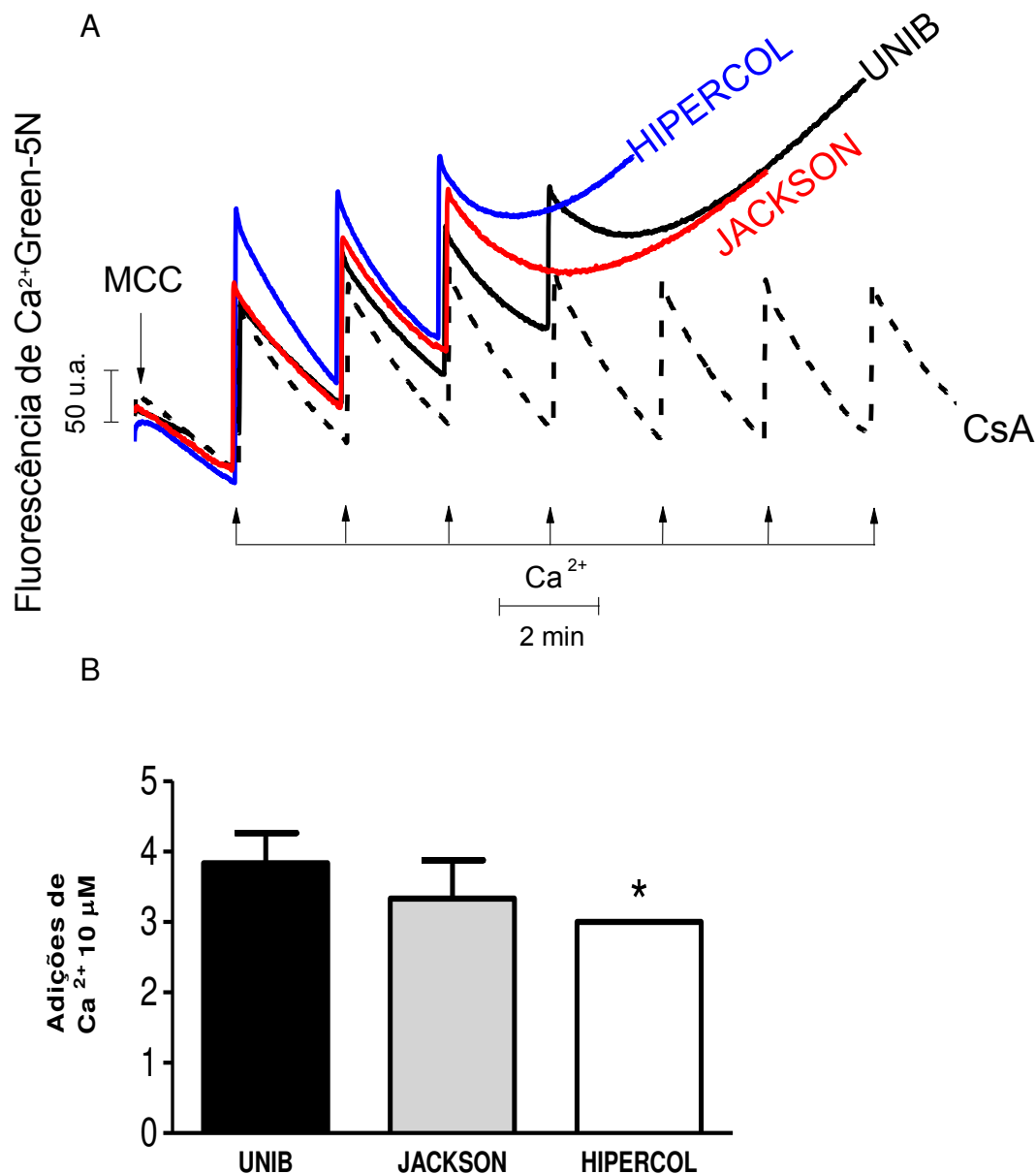


Figura 21. A capacidade mitocondrial de retenção de Ca²⁺ é menor em camundongos Hipercol e Jackson quando comparados à camundongos Unib. Painel A: Mitocôndrias de coração (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α-cetoglutarato) 5 mM e Calcium Green™- 5N 0,1 μM (indicador fluorescente de Ca²⁺). As setas indicam a adição de Ca²⁺ 10 μM a cada 2 minutos. Todos os grupos apresentam a mesma resposta na presença de CsA 1μM. Figura representativa (n=6). MCC = Mitocôndria de coração de camundongo. Painel B: Os dados são apresentados em média ± e.p.m., *p<0,01 vs Unib (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

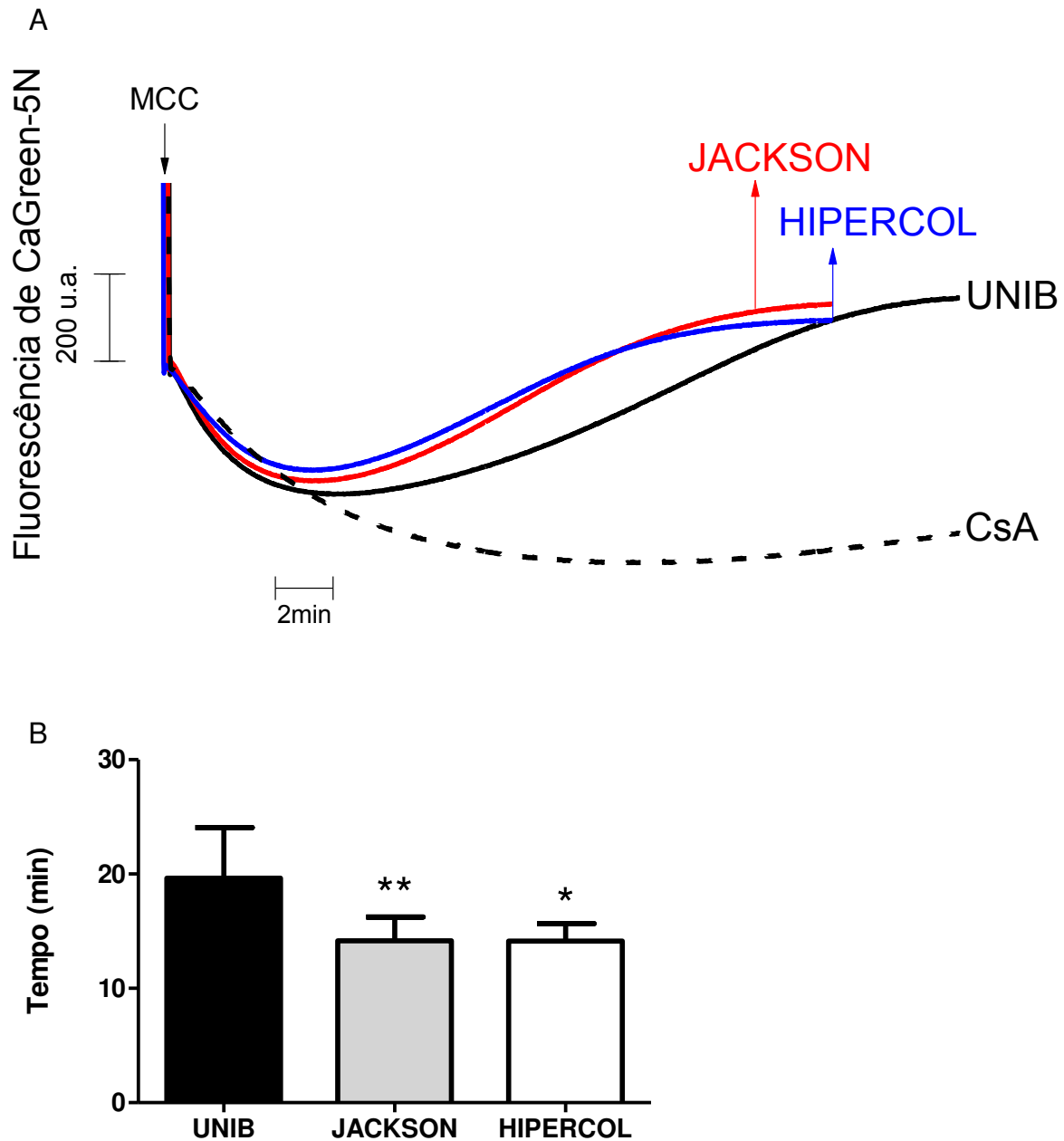


Figura 22. A capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} é menor em camundongos Hipercol e Jackson quando comparados à camundongos Unib. Painel A: Mitocôndrias de coração (0,5 mg/mL) foram incubadas em 2mL de meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato) 5 mM, Ca^{2+} 35 μM e Calcium Green™- 5N 0,1 μM (indicador fluorescente de Ca^{2+}). Todos os grupos apresentam a mesma resposta na presença de CsA 1 μM . Figura representativa (n=4). MCC = Mitocôndria de coração de camundongo. Painel B: Os dados são apresentados em média \pm e.p.m., **p<0,05 vs Unib, *p<0.01 vs Unib (One-way ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni).

4.6. Comparação da velocidade de geração de H₂O₂ em camundongos Unib, Jackson e hipercolesterolêmicos em fígado de camundongo.

Foi previamente demonstrado em nosso laboratório que a TPM induzida por Ca²⁺ encontra-se associada com aumento da geração de EROs mitocondrial devido a alterações no empacotamento lipídico e formação de domínios na membrana mitocondrial. Isso é uma consequência da interação do Ca²⁺ com cardiolipinas (Grijalba *et al.*, 1999).

Com o intuito de verificar a possibilidade do envolvimento de EROs nesta maior susceptibilidade de mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson à TPM induzida por Ca²⁺, determinamos a produção de EROs pelas mitocôndrias após adição de Ca²⁺ ao meio de reação padrão.

Os resultados já apresentados pelo nosso laboratório demonstram que nos camundongos hipercolesterolêmicos as mitocôndrias apresentam uma diminuição nos níveis de NADPH, principal fonte de poder redutor dos sistemas antioxidantes mitocondriais (Paim, *et al.*, 2008).

De fato, a **Figura 22** mostra que as mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos e Jackson produzem maiores quantidades de H₂O₂ que as de camundongos Unib, ressaltando-se que, as mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos produzem maiores quantidades de H₂O₂ em comparação aos camundongos Jackson.

Considerando-se o H₂O₂ como um fator importante nos mecanismos de abertura do PTP, podemos sugerir que realmente as mitocôndrias dos camundongos hipercolesterolêmicos são menos resistentes a abertura do PTP que as dos animais Jackson e Unib.

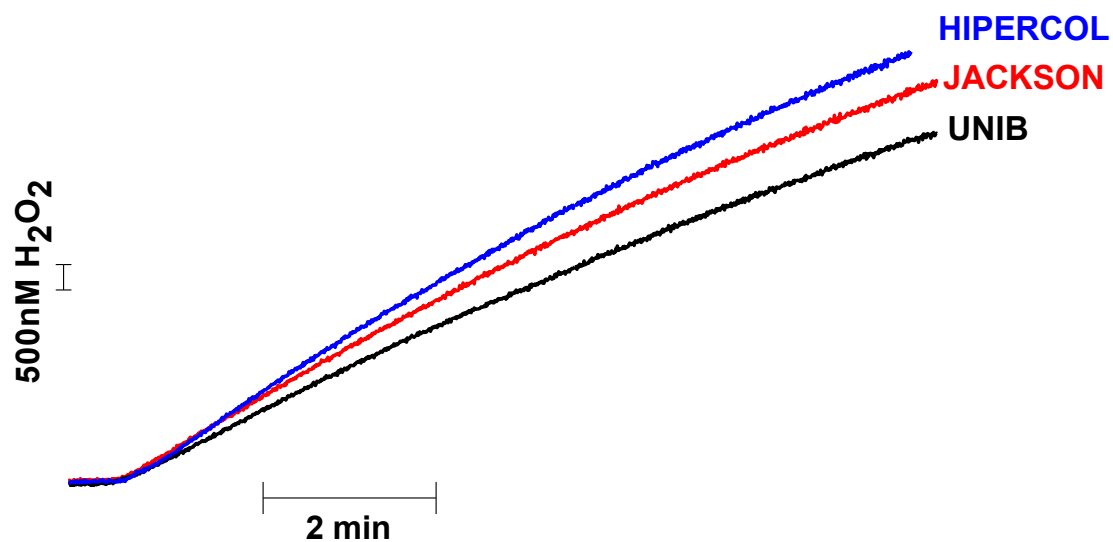


Figura 23. Comparação da na velocidade de geração de H₂O₂ em camundongos Unib, Jackson e Hipercol. Mitocôndrias de fígado (1mg/mL) foram incubadas em 2 mL meio de reação padrão, pH 7,2, 28°C, contendo substratos para complexo I (malato, piruvato, glutamato e α -cetogluturato) 5 mM, Ca²⁺ 35 μ M e Amplex Red® 10 μ M na presença de HRP 1U/mL.

5. Conclusões

- 1- A Susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial, avaliada pelo inchamento mitocondrial e pela dissipação de potencial de membrana induzidos por íons de Ca^{2+} , varia nas 3 sub-linhagens de camundongos C57BL6 estudadas da seguinte maneira: Hipercolesterolêmicos > Jackson > Unib.
- 2- A produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio varia nas 3 sub-linhagens de camundongos C57BL6 estudadas da seguinte maneira: Hipercolesterolêmicos > Jackson > Unib.
- 3- Considerando que (i) a manutenção do estado reduzido de NADPH é essencial para capacidade antioxidante das mitocôndrias e proteção contra TPM, e que, (ii) a diminuição de NADPH pode ser consequência tanto de menor síntese pela falta da NNT, como por maior consumo pelo aumento da lipogênese, nossos resultados sugerem, que ambos os processos (deficiência de *Nnt* e aumento de lipogênese) estão envolvidos na maior susceptibilidade à transição de permeabilidade das mitocôndrias dos animais hipercolesterolêmicos.

6. Referências Bibliográficas

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

Baines, C. P., R. A. Kaiser, *et al.* Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. Nat Cell Biol, v.9, n.5, Apr 8, p.550-5. 2007.

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

Baughman, J. M., F. Perocchi, *et al.* Integrativegenomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrialcalcium uniporter. Nature, v.476, n.7360, Jun 19; p.341-5. 2011.

Belló-Klein, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: Marroni, N. P. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. CANOAS: Ed. ULBRA, p. 15-19. 2002.

Berliner, J. A., J. W. Heinecke. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radic Biol Med, v.20, n.5, p.707-27. 1996.

Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? Front Physiol, v.4, p.95. 2013.

Berridge, M. J. Cardiac calcium signaling. Biochem Soc Trans, v.31, n.5, p.930-3. 2003.

Bourdi, M., J. S. Davies, L. Pohl, Mispairing C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin A liver injury.Chem Res Toxicol, v.24, p.794–796. 2011.

Boveris, A. Mitochondrial product on of superoxide radical and hydrogen peroxide. Adv Exp Med Biol, v.78, p.67-82. 1977.

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

Boveris, A, N. Oshino, B. Change. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem J, v.128, n.3, p.617-30. 1972.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brady, L. J., C. L. Hoppel, P. S. Brady. Hepatic mitochondrial inner- membrane properties, beta-oxidation and carnitine palmitoyltransferases A and B. Effects of genetic obesity and starvation. Biochem J, v.15, p.427–33. 1986.

Broekemeier, K. M., Dempsey, M. E., D. R. Pfeiffer. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. J. Biol. Chem., v.264, p.7826–7830. 1989.

Cadenas, E., A. Boveris, *et al.* Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. Arch Biochem Biophys, v.180, n.2, Apr30, p.248-57. 1977.

Cadenas, E., A. Boveris. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. Biochem J, v.188, n.1, Apr 15, p.31-7. 1980.

Carafoli, E. Intracellular calcium homeostasis. Annu Rev Biochem, v.56, p.395-433. 1987.

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

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

Chandel, N. S. Mitochondrial complex III: an essential component of universal oxygen sensing machinery? Respir Physiol Neurobio, v.174, n.3, p.175-81. 2010.

Collins, S., T. Meyer. Cell biology: A sensor for calcium uptake. Nature, v.467, n.7313, Sep 16, p.283. 2010.

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

Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J, v.341, p.233-249. 1999.

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

Crompton, M., S. Virji, J. M. Ward. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. Eur J Biochem, v.258, n.2, Dec 1, p.729-35. 1998.

Davidson, A. M., A. P. Halestrap. Partial inhibition by cyclosporin A of the swelling of liver mitochondria in vivo and in vitro induced by sub-micromolar $[Ca^{2+}]$, but not by butyrate. Evidence for two distinct swelling mechanisms. Biochem. J, v.268, p.147–152. 1990.

Dawson, V. L., T. M. Dawson. Free radicals and neuronal cell death. Cell Death Differ, v.3, n.1, Jan, p.71-8. 1996.

De Pinto, V., S. Reina, *et al.* Structure of the voltage dependent anion channel: state of the art. J Bioenerg Biomembr, v.40, n.3, p.139-47. 2008.

De Stefani, D., A. Raffaello, *et al.* A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. Nature, v.476, n.7360, Jun 19, p.336-40. 2011.

Dickinson, D. A., H. J. Forman. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. Ann. N. Y. Acad. Sci. v.973, p.488–504. 2002.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, v.82, n.1, Jan, p.47-95. 2002.

Fagian, M. M., L. Pereira-da-Silva, *et al.* Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. J Biol Chem, v. 265, n.32, Nov 15, p.19955-60. 1990.

Fariss, M. W., C. B. Chan, *et al.* Role of mitochondria in toxic oxidative stress. Mol Interv, v.5, n.2, Apr, p.94-111. 2005.

Ferranti, R., M. M. da Silva, A. J. Kowaltowski. Mitochondrial ATPsensitive K^+ channel opening decreases reactive oxygen species generation, FEBS Lett, v.536, p.51–55. 2003.

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

Figueira, T. R., M. H. Barros, *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. Antioxid Redox Signal, v.18, n.16, Jun 1, p.2029-74. 2013.

Fournier, N., G. Ducet, A. Crevat. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. J Bioenerg Biomembr, v.19, n. 3, Jun, p.297-303.1987.

Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem. v.64, p.97-112. 1995.

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

Glancy, B., R. S. Balaban. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. Biochemistry, v.51, n.14, p.2959-73. 2012.

Giorgio, V., S. Von Stockum, *et al.* Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. Proc Natl Acad Sci U S A, v.110, n.15, Apr 9, p.5887-92. 2013.

Gornall, A. G., C. J. Bardwill, M. M. David. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J Biol Chem, v.177, p.751-66. 1949.

Green, R. C., P. J. O'Brien. The cellular localisation of glutathione peroxidase and its release from mitochondria during swelling. Biochim Biophys Acta, v.197, p.31-39. 1970.

Grijalba, M. T., A. E. Vercesi, S. Schreier. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. Biochemistry, v.38, n.40, Oct 5, p.13279-87. 1999.

Gunter, T.E., D. I. Yule, *et al.* Calcium and mitochondria. FEBS Lett, v.567, p.96-102. 2004.

Halestrap, A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? J Mol Cell Cardiol, v.46, n.6, p.821-31. 2009.

Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge. Free radicals in biology and medicine, Oxford Univ. Press, 1998.

Halliwell, B., J. M. Gutteridge. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. J Neurochem, v.69, n.3, Sep, p.1330-1. 1997.

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

Hamanaka, R. B., N. S. Chandel. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictat biological outcomes. Trends Biochem Sci, v.35, n.9, p.505-13. 2010.

Harper, M. E., L. Bevilacqua, *et al.* Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. Acta Physiol Scand, v.182, n.4, Dec, p.321-31. 2004.

He, L., J. J. Lemasters. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores, a new paradigm of pore structure and function? FEBS Lett, v.512, p.1-7. 2002.

Herrmann, J. M., J. Riemer. The intermembrane space of mitochondria. Antioxid Redox Signal. v.13, n.9, Nov 1, p.1341-58. 2010.

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

Hoek, J. B., J. Rydstrom. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Biochem J, v.254, p.1-10, 1988.

Hunter, D. R., R. A. Haworth. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. Arch.Biochem. Biophys, v.195, p.453-459. 1979 a.

Hunter, D. R., R. A. Haworth, J. H. Southard. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. J Biol Chem, v.251, n.16, Aug 25, p.5069-77. 1976.

Ishibashi, S., M. S. Brown, *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest, v.92, n.2, Aug, p.883-93. 1993.

Jarmuszkiewicz, W., R. Navet, *et al.* Redox state of endogenous coenzyme q modulates the inhibition of linoleic acid-induced uncoupling by guanosine triphosphate in isolated skeletal muscle mitochondria. J Bioenerg Biomembr, v.36, n.5, Oct, p.493-502. 2004.

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

Klingenberg, M. Uncoupling protein-how do they work and how are they regulated. IUBMB Life, v.52, n.3-5, p.175-9. 2001.

Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzler, *et al.* The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science; v.275, p.1132-6. 1997.

Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, *et al.* The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. Nature, v.427, n.6973, Jan 29, p.461-5. 2004.

Kowaltowski, A. J., A. E. Vercesi. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radic Biol Med, v.26, n.3-4, Feb, p.463-71. 1999.

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

Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, *et al.* 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, v.271, n.6, Feb 9, p.2929-34. 1996.

Krauskopf, A., O. Eriksson, *et al.* Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. Biochim Biophys Acta, v.1757, n.5-6, May-Jun, p.590-5. 2006.

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

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

Lehninger, A. L., B. Reynafarje, *et al.* Transport and accumulation of calcium in mitochondria. Ann N Y Acad Sci, v.307, Apr 28, p.160-76. 1978.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson, M. M. Cox, Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed. – Porto Alegre, Artmed, 2011.

Lemasters, J. J., A. L. Nieminen. Mitochondria in Pathogenesis New York: Kluwer Academic / Penum Publishers, p.281-294. 2001.

Lemasters, J. J., T. P. Theruvath, *et al.* Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim Biophys Acta, v.1787, n.11, Nov, p.1395-401. 2009.

Leung, A.W., P. Varanyuwatana, A. P. Halestrap. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. J Biol Chem, v.283, n.39, Sep 26, p.26312-23. 2008.

Liesa, M., M. Palacín, A. Zorzano. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. Physiol Rev, v.89, n.3, p.799-845. 2009.

Liu, S. S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Biosci Rep, v.17, n.3, p.259-72. 1997.

- Liu, X., C. N. Kim, *et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. Cell, v.86, p.147-57. 1996.
- Loschen, G., A. Azzi, L. Flohé. Mitochondrial H₂O₂ formation: Relationship with energy conservation. FEBS Lett, v.33, p.84-8. 1973.
- Madamanchi, N.R., M. S. Runge. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. Circ Res, v.100, n.4, Mar 2, p.460-73. 2007
- Madamanchi, N.R., M. S. Runge. Redox signaling in cardiovascular health and disease. Free Radic Biol Med, v.61C, Apr 11, p.473-501. 2013.
- Mallilankaraman, K., C. Cárdenas, *et al.* MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. Nat Cell Biol, v.14, n.12, p.1336-43. 2012.
- Mannella, C. A. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. Biochim Biophys Acta, v.762, n.2, p.140-7. 2006.
- Mannella, C. A., D. R. Pfeiffer, *et al.* Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. IUBMB Life, v.52, n.3-5, Sep-Nov, p.93-100. 2001.
- Martin L. J. Mitochondrial and cell death mechanisms in neurodegenerative diseases. Pharmaceuticals (Basel), v.3, p.839– 915. 2010.
- Marzo, I., C. Brenner, *et al.* The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. J Exp Med, v.187, n.8, Apr 20, p.1261-71. 1998.
- Meimaridou, E., J. Kowalczyk, *et al.* Mutations in *Nnt* encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. Nat. Genet, v.44, p.740–742. 2012.
- Miller, A. F. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. Curr. Opin. Chem. Biol, v.8, n.2, p.162–168. 2004.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, *et al.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res, v.16, n.3, Feb 11, p.1215. 1988.
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, v.191, Jul 8, p.144-8. 1961.
- Moyle, J., P. Mitchell. The proton-translocating nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) transhydrogenase of rat liver mitochondria. Biochem.J, v.132, p.571–585. 1973.

- Murphy, A. N., D. E. Bredesen, *et al.* Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.18, Sep 3, p.9893-8. 1996.
- Netto, L. E., A. J. Kowaltowski, *et al.* Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. Methods Enzymol, v.348, p.260-70. 2002.
- Nicholls, D.G., S. J. Ferguson. Proton Current and Respiratory Control. In: Bioenergetics 3. London, Academic Press Inc, v.3, p.69-75. 2002.
- Nicholls, D., K. Akerman. Mitochondrial calcium transport. Biochim Biophys Acta, v.683, n.1, Sep 1, p.57-88. 1982.
- Nicholson, A., P. C. Reifsnyder, *et al.* Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. Obesity (Silver Spring), v.18, p.1902–1905; 2010.
- Okado-Matsumoto A., I. Fridovich. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. J Biol Chem, v.276, p.38388-38393. 2001.
- Oliveira H. C., R. G. Cosso, *et al.* Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. FASEB J, v.19, n.2, p.278-80. 2005.
- O'Rourke, B., S. Cortassa, *et al.* Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. Physiology (Bethesda), v.20, Oct, p.303-15. 2005.
- Osmundsen, H., J. Cervenkat, J. Bremert. A role for 2,4-enoyl-CoA reductase in mitochondrial β -oxidation of polyunsaturated fatty acids: Effects of treatment with clofibrate on oxidation of polyunsaturated acylcarnitines by isolated rat liver mitochondria. Biochem. J, v.208, p.749-57. 1982.
- Osono, Y., L. A. Woollett, *et al.* 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, v.95, p.1124-32. 1995.
- Packer, L. Size and shape transformations correlated with oxidative phosphorylation in mitochondria. J Cell Biol, v.18, p.487-94. 1963.
- Paim, B. A., J. A. Velho, *et al.* Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. Free Radic Biol Med, v.44, n.3, Feb 1, p.444-51. 2008.

Perocchi, F., V. M. Gohil, *et al.* MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. Nature, v.467, n.7313, Sep 16, p.291-6. 2010.

Radi, R., J. F. Turrens, *et al.* Detection of catalase in rat heart mitochondria. J Biol Chem, v.266, p.22028-22034. 1991.

Rhee, S. G., K. H. Kim, *et al.* Stadtman: Antioxidant defense mechanisms, a new thiol-specific antioxidant enzyme. Ann N Y Acad Sci, v.738, p.86-92. 1994.

Robinson, J., J. M. Cooper. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. Anal Biochem, v.33, n.2, Feb, p.390-9. 1970.

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

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

Salvi, M., V. Battaglia, *et al.* Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. J Biol Chem, v.282, n.33, Aug 17, p.24407-15. 2007.

Samartsev, V. N., E. N. Mokhova, V. P. Skulachev. The pH-dependent reciprocal changes in contributions of ADP/ATP antiporter and aspartate/glutamate antiporter to the fatty acid-induced uncoupling. FEBS Lett, v.412, n.1, p.179-82. 1997.

Schneider, W. C., G. H. Hogeboom. Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review. Cancer Res, v.11, n.1, Jan, p.1-22. 1951.

Skulachev, V. P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. FEBS Lett, v.397, n.1, Nov 11, p.7-10. 1996.

Splettstoesser, W. D., P. Schuff-Werner. Oxidative stress in phagocytes "the enemy within". Microsc Res Tech, v.57, n.6, Jun 15, p.441-55. 2002.

Starkov, A. A., G. Fiskum, *et al.* Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. J Neurosci, v.24, p.7779-7788. 2004.

St-Pierre, J., J. A. Buckingham, *et al.* Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. J Biol Chem, v.277, p.44784-44790. 2002.

Sturtz, L. A., K. Diekert, *et al.* A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. J Biol Chem, v.276, p.38084-38089. 2001.

Sutton, H. C. e C. C. Winterbourn. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. Free Radic Biol Med, v.6, n.1, p.53-60. 1989.

Szabó, I., V. De Pinto, M. Zoratti. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. FEBS Lett., v.330, n.2, Sep 13, p.206-10. 1993.

Toye, A. A., J. D. Lippiat, *et al.* A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL6/J mice. *Diabetologia*, V. 48, n. 4, Apr, p. 675-86. 2005.

Tretter, L., V. Adam-Vizi: Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. J Neurosci, v.24, p.7771-7778. 2004.

Tsujimoto, Y. e S. Shimizu. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. Apoptosis, v.12, n.5, May, p.835-40. 2007.

Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci Rep, v.17, n.1, Feb, p.3-8. 1997.

Turrens, J. F., A. Boveris. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J, v.191, n.2, Nov 1, p.421-7. 1980.

Valle, V. G., M. M. Fagian, *et al.* The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. Arch Biochem Biophys, v.307 n.1, Nov 15, p.1-7. 1993.

Vaseva, A. V., N. D. Marchenko, *et al.* p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. Cell, v.149, n.7, Jun 22, p.1536-48. 2012.

Vercesi A. E., R. F. Castilho, *et al.* Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. IUBMB Life, v.59, n.4-5, Apr-May, p.263-8. 2007.

Vercesi, A. E., A. J. Kowaltowski, *et al.* Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. Front Biosci, v.11, Sep 1, p.2554-64.2006b.

Vercesi, A. E., A. J. Kowaltowski, *et al.* The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. Biosci Rep, v.17, n.1, Feb, p.43-52. 1997.

Vercesi, A. E., J. Borecký, *et al.* Plant uncoupling mitochondrial proteins. Annu Rev Plant Biol, v. 57, p.383-404. 2006 a.

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, v.252, n.1, Jan, p.171-8. 1987.

Vercesi, A. E., V. L. Ferraz, *et al.* Ca²⁺-dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. Biochem Biophys Res Commun, v.154, p.934-41. 1988.

Watabe, S., T. Hiroi, *et al.* SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. Eur J Biochem, v.249, n.1, p.52-60. 1997.

Weisiger, R. A., I. Fridovich. Superoxide dismutase. Organelle specificity. J Biol Chem, v.248, p.3582-3592. 1973.

Woodfield, K, A. Rück, *et al.* Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. Biochem J, v.336, Dec 1, p.287-90. 1998.

Yang, J., X. Liu, *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science, v.275, p.1129-32. 1997.

Zago, E. B., R. F. Castilho, A. E. Vercesi. The redox state of endogenous pyridinenucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. FEBS Lett, v. 428, p.29-33. 2000.

Zhou ,M., Z. Diwu, *et al.* A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. Anal Biochem, v. 253, n.2, Nov 15, p.162-8. 1997.

Zoratti, M., I. Szabo. The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta, v.1241, n.2, p.139-176. 1995.

Zoratti, M., U. De Marchi, *et al.* Electrophysiology clarifies the megariddles of the mitochondrial permeability transition pore. FEBS Lett, v.584, n.10, May 17, p.1997-2004. 2010.

7. Anexos



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

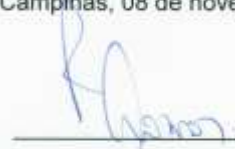
Certificamos que o projeto "O ESTADO OXIDADO DE NADP DE MITOCÔNDRIAS DE CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS É CONSEQUÊNCIA DO AUMENTO DE SÍNTESE DE COLESTEROL OU DA DEFICÊNCIA DA NADP-TRANSIDROGENASE?" (protocolo nº 2549-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi / Ana Carolina Marques, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

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

Campinas, 08 de novembro de 2011.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guardo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13063-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>