

NATALIA MAYUMI INADA

**AÇÃO FOTODINÂMICA DE MESO-PORFIRINAS
SOBRE FUNÇÃO MITOCONDRIAL E VIABILIDADE
DE CÉLULAS LNCaP**

CAMPINAS

2006

NATALIA MAYUMI INADA

**AÇÃO FOTODINÂMICA DE MESO-PORFIRINAS
SOBRE FUNÇÃO MITOCONDRIAL E VIABILIDADE
DE CÉLULAS LNCaP**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia
Estrutural, Celular e do Desenvolvimento*

ORIENTADOR: PROF. DR. ANIBAL EUGÊNIO VERCESI

CAMPINAS

2006

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

In 1a Inada, Natalia Mayumi
Ação fotodinâmica de meso-porfirinas sobre função mitocondrial e viabilidade de células LNCaP / Natalia Mayumi Inada. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Aníbal Eugenio Vercesi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mitocondria. 2. Bioenergética. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Oxigênio. 5. Porfirinas. 6. Agentes oxidantes. I. Vercesi, Aníbal Eugenio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Photodynamic action of mesoporphyrins on mitochondrial functions and LNCaP cell viability

Keywords: • Mitochondria

- Energy Metabolism
- Photodynamic therapy
- Oxygen
- Porphyrins
- Oxidant agents

Área de concentração : Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento

Titulação: Doutorado

Banca examinadora: Prof Dr Aníbal Eugenio Vercesi

Prof Dr Luis Eduardo Soares Netto

Prof Dr Mauricio da Silva Baptista

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

Data da defesa: 27 /01/2006

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Orientador (a):

Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi

Membros:

1. Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi

2. Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

3. Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

4. Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

5. Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

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

Data: 27.01.2006

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. Aníbal Eugênio Vercesi, na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-UNICAMP).

DEDICATÓRIA

*Àqueles que em todo o meu caminhar foram minha
força, minha inspiração, meu orgulho maior:*

MEUS PAIS.

Aos que tornaram essa minha tarefa não menos árdua, porém, mais prazerosa, tentarei retribuir com uma simples lembrança, a importância de cada um:

Ao meu orientador e grande mestre Prof. Dr. Anibal E. Vercesi, por sua dedicação em me tornar uma pesquisadora cuidadosa, dedicada, meticulosa e com incessantes perguntas a serem respondidas. Sei que posso ser muito melhor do que sou, meu esforço será sem fim, graças ao alicerce que me foi oferecido!

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Luis Eduardo S. Netto, Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista, Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria e Profa. Dra. Sara T. O. Saad, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho, contribuindo com o inestimável e admirável conhecimento que têm para me oferecer.

Meu agradecimento especial ao Prof. Dr. Marcel Tabak, não somente pelo oferecimento das meso-porfirinas, mas também, por toda a sabedoria e experiência que nos foi disponibilizado.

Às Profas. Dras. Maria de Fátima Nepomuceno e Ana Célia Ruggiero, por serem as grandes responsáveis por esta minha escolha: o caminho da pesquisa. O “despertar” para este mundo veio através de suas mãos.

Agradeço por todos os momentos felizes, pela troca de conhecimentos, pela ajuda mútua e pela convivência enriquecedora, à cada amigo do Laboratório de Bioenergética: Ana Catarina, Anna Maria, Ana Luiza, Bruno, Camilinha, Dani, Denise (não esqueci de você, Dê!), Evelise, Félix, Giovanna, Jesus, Karina, Kívia, Leandro, Leda, Lulinha, Mariana, Renata Maria e Sandra.

Às amigas de todas as horas, sem medidas: Edilene e Elisângela.

Ao Prof. Dr. Roger F. Castilho, Prof. Dr. Jiri Borecký e Profa. Dra. Marcia M. Fagian por estarem sempre à disposição, oferecendo-nos valiosa experiência: minha total admiração!

À FAPESP, pelo apoio financeiro de grande valia e pelo incentivo à pesquisa. Agradeço não somente por mim, mas em nome do desenvolvimento do Estado, bem como do País.

Aos meus amados irmãos, Maurício e Thiago, por tudo o que convivemos, por tudo o que aprendemos, por tudo o que somos! Amo vocês! Agradeço também por terem escolhido esposas maravilhosas, Marinez e Bruna, as quais considero mais do que simples cunhadas, mas minhas irmãs. À vocês, agradeço pelos dois belos presentes que nos deram: Theo e Marco Antônio! Daqui a um tempo terão a certeza do imenso amor que a “tia Nat” sente por vocês!

À minha vó Lina, pelo orgulho que sempre diz sentir de mim!

Ao meu amor, Flavio, que acompanhou esta tese desde o início: acredito que tenha aprendido muito sobre as mitocôndrias! À você que me apoiou todos os dias, me fortalecendo com suas palavras de incentivo e de força, meu orgulho, agradecimento e amor eternos.

Agradeço de um modo especial ao nosso Pai e meu grande amigo, DEUS. Pela presença constante, pelo amor que me conduz, pela luz que me guia. Sem Suas bênçãos, nada nem ninguém presente nestas páginas teria a importância devida em mais essa missão.

*"O conhecimento torna a alma jovem
e diminui a amargura da velhice.
Colhe, pois, a sabedoria.
Armazena suavidade para
o amanhã".*
Leonardo da Vinci

*"A educação tem raízes amargas,
mas os frutos são doces".*
Aristóteles

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxiii</i>
ABSTRACT	<i>xxxvii</i>
1- INTRODUÇÃO	41
MITOCÔNDRIAS	43
Um Breve Histórico.....	43
Estrutura e Função.....	44
A Cadeia de Transporte de Elétrons.....	45
Fosforilação Oxidativa.....	48
A Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pela Mitocôndria..	50
Defesas Antioxidantes Mitocondriais.....	51
Transição de Permeabilidade Mitocondrial.....	52
Mitocôndrias e o Processo de Morte Celular.....	57
CÉLULAS DE TUMOR DE PRÓSTATA HUMANO LNCaP	60
TERAPIA FOTODINÂMICA	61
Princípios Fotodinâmicos.....	62
A Importância do Estudo das Porfirinas Aniônica Fe(III)TPPS ₄ e Catiônica Fe(III)TMPyP.....	65
Efeitos Fotodinâmicos de Porfirinas sobre Mitocôndrias.....	66
Efeitos Fotodinâmicos de Porfirinas sobre Células Tumorais.....	67

2- OBJETIVOS.....	69
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	73
Reagentes.....	75
Animais.....	75
Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	75
Dosagem de proteína.....	76
Condições experimentais.....	76
Condições de irradiação.....	76
Consumo de oxigênio mitocondrial.....	76
Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio.....	77
Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana mitocondrial com eletrodo de TPP ⁺	77
Medida de inchamento mitocondrial.....	78
Determinação da constante de associação (K_b).....	79
Cultura de células.....	79
Análises por citometria de fluxo.....	80
Análise da viabilidade celular por anexina-V e iodeto de propídeo.....	80
Medida da $[Ca^{2+}]_{cit}$	81
Análise estatística.....	81
4- RESULTADOS.....	83
PARTE I- AÇÃO FOTODINÂMICA DE MESO-PORFIRINAS ANIÔNICA Fe(III)TPPS₄ E CATIÔNICA Fe(III)TMPyP SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	85
Efeito de meso-porfirinas no escuro, sobre a respiração mitocondrial	85

Efeito da irradiação de MFR na presença de meso-porfirinas, sobre o controle respiratório mitocondrial (C.R.).....	88
Fe(III)TMPyP, mas não Fe(III)TPPS ₄ , induziu Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) na presença de Ca ²⁺	90
Constante de associação (K _b) das meso-porfirinas com membranas de mitocôndrias isoladas.....	94
PARTE II- AÇÃO FOTODINÂMICA DE MESO-PORFIRINAS ANIÔNICA Fe(III)TPPS₄ E CATIONICA Fe(III)TMPyP SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS LNCaP.....	95
Efeito de meso-porfirinas Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP sobre a viabilidade das células LNCaP, no escuro - método do azul de tripan.....	95
Efeito da irradiação de Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP sobre a viabilidade das células LNCaP – método do azul de tripan.....	97
Efeito da irradiação de 10 µM de Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP sobre a viabilidade das células LNCaP – método da anexina V-FITC e iodeto de Propídeo.....	98
Irradiação de meso-porfirinas Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP aumenta significativamente a [Ca ²⁺] _{cit}	100
A inviabilidade das células LNCaP induzida pela irradiação na presença de Fe(III)TPPS ₄ e de Fe(III)TMPyP é via aumento da [Ca ²⁺] _{cit}	102
Ciclosporina A preveniu a morte das células LNCaP tratadas e irradiadas na presença de Fe(III)TPPS ₄ e de Fe(III)TMPyP.....	104
5- DISCUSSÃO.....	107
6- CONCLUSÃO.....	115
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
8- ANEXO.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	antimicina A
AIF	“apoptosis inducing factor” (fator de indução de apoptose)
ANT	“adenine nucleotide transporter” (transportador de nucleotídeos de adenina)
Apaf-1	“apoptosis activating factor 1” (fator 1 de ativação de apoptose)
AT(D)P	adenosina tri (di) – fosfato
BAPTA/AM	1,2 – bis (2-aminophenoxy)-ethane- <i>N,N,N',N'</i> - tetracetic acid
BSA	albumina soro bovina
$[Ca^{2+}]_{cit}$	concentração de cálcio citosólico
CN	cianeto de potássio
C.R.	controle respiratório
CsA	ciclosporina A
CTE	cadeia de transporte de elétrons
CyD	ciclofilina-D
Cyt-c	citocromo c
D ₂ O	água deuterada
DCF	diclorofluoresceína
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DTT	ditiotreitól
EGTA	etileno glicol – bis(β -aminoetil éter)- <i>N,N,N',N'</i> -ácido tetraacético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo reduzido

FCCP	carbonyl cyanide p-(Trifluoromethoxy)Phenyl-Hydrazone
Fe(III)TPPS ₄	porfirina aniônica <i>meso</i> -tetrakis (p-sulfonatofenil)
Fe(III)TMPyP	porfirina catiônica <i>meso</i> -tetrakis (4- <i>N</i> -metil piridínio)
Fluo-4/AM	Fluo-4 acetoxymethyl ester
H ₂ DCF	diclorodihidrofluoresceína
H ₂ DCF-DA	diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N´-[2-ethanesulfonic acid])
IMS	“intermembrane space” (espaço intermembranas)
MFR	mitocôndria de fígado de rato
MnSOD	Mn–superóxido dismutase
MOMP	“mitochondrial outer membrane permeabilization” (permeabilização da membrana mitocondrial externa)
Myx	mixotiazol
NADH	nicotinamida adenina dinuclotídeo (estado reduzido)
NADPH	nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado reduzido)
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinuclotídeo (estado oxidado)
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinuclotídeo fosfato (estado oxidado)
P _i	fosfato inorgânico
PMME	permeabilização da membrana mitocondrial externa
PTP	poro de transição de permeabilidade
Rot	rotenona
r _s	anisotropia
Succ	succinato

SERCAs	“sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPases”
TFD	Terapia Fotodinâmica
TMPD	N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno-diamina
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial
TPP ⁺	cloreto de tetrafenilfosfonio
UQ	ubiquinona (forma oxidada da coenzima Q)
UQH [•]	radical ânion semiquinona
UQH ₂	ubiquinona (forma reduzida da coenzima Q)
VDAC	“voltage-dependent anion channel” (canal aniônico voltagem-dependente)
$\Delta\mu\text{H}^+$	gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta\psi_m$	potencial de membrana mitocondrial
$\Delta\Psi$	potencial elétrico de membrana
ΔpH	gradiente químico de prótons
¹ O ₂	oxigênio no estado singlete

	PÁG.
Figura 1- Cadeia respiratória mitocondrial e possíveis sítios de vazamento de elétrons e formação de $O_2^{\bullet -}$	46
Figura 2- Esquema representando os “estados respiratórios” e a determinação do controle respiratório (C.R.).....	47
Figura 3- A estrutura da ATP sintase.....	49
Figura 4- Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna.....	56
Figura 5- Esquema de apoptose via mitocondrial.....	59
Figura 6- Foto das células LNCaP.....	61
Figura 7- Mecanismos de fotooxidação de biomoléculas.....	62
Figura 8- Reações envolvidas na geração de intermediários de O_2 altamente reativos, como $\bullet O_2^-$, H_2O_2 e $\bullet OH$	64
Figura 9- Reação de geração do 1O_2 , via mecanismo do tipo II.....	64
Figura 10- Estrutura das porfirinas.....	66
Figura 11- Curva dose-resposta das porfirinas Fe(III)TMPyP e Fe(III)TPPS ₄ no controle respiratório mitocondrial (C.R.), no escuro.....	86
Figura 12- Curva dose-resposta das porfirinas Fe(III)TMPyP e Fe(III)TPPS ₄ nas velocidades de respiração mitocondrial dos estados 3 e 4, no escuro.....	87
Figura 13- Controle respiratório (C.R.) de mitocôndrias irradiadas na presença de Fe(III)TMPyP e de Fe(III)TPPS ₄	89

Figura 14-	Geração de EROs mitocondrial na presença ou ausência das porfirinas.....	91
Figura 15-	Irradiação de MFR na presença de Fe(III)TMPyP, mas não de Fe(III)TPPS ₄ , promoveu eliminação do $\Delta\Psi_m$ sensível à CsA.....	92
Figura 16-	Irradiação de MFR na presença de Fe(III)TMPyP, mas não de Fe(III)TPPS ₄ , promoveu inchamento mitocondrial sensível à CsA.....	93
Figura 17-	Determinação da constante de associação (K_b) de Fe(III)TPPS ₄ e de Fe(III)TMPyP com mitocôndrias.....	94
Figura 18-	Efeito de 0, 1, 10, 20, 35 e 50 μ M de Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP na viabilidade de células LNCaP, após 48 horas de incubação no escuro.....	96
Figura 19-	Viabilidade celular na ausência (controle) ou na presença de Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP.....	97
Figura 20-	Morte celular na ausência (controle) ou na presença de Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP.....	99
Figura 21-	Medida da $[Ca^{2+}]_{cit}$ na ausência (controle) ou na presença de Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP.....	101
Figura 22-	BAPTA/AM inibiu morte de células LNCaP irradiadas na presença de Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP.....	103
Figura 23-	Ciclosporina A inibiu morte de células LNCaP irradiadas na presença de Fe(III)TPPS ₄ e Fe(III)TMPyP.....	104

RESUMO



A ação das meso-porfirinas catiônica Fe(III)TMPyP e aniônica Fe(III)TPPS₄ sobre a função mitocondrial e viabilidade de células de tumor de próstata LNCaP foi investigada. O tratamento das suspensões mitocondriais com 1 μM de Fe(III)TMPyP por 2 minutos e 45 segundos no escuro diminuiu o controle respiratório mitocondrial (C.R.) em 3%. A irradiação potencializou este efeito, induzindo uma queda no C.R. em 28%. A porfirina aniônica Fe(III)TPPS₄, nas mesmas condições experimentais, não provocou efeito significativo algum. Ambas porfirinas aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na presença de Ca²⁺; o efeito de Fe(III)TMPyP foi significativamente maior. Esta porfirina catiônica, porém não a aniônica, promoveu o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), sensível à ciclosporina A (CsA). Além disso, Fe(III)TMPyP apresentou uma constante de associação (K_b) com mitocôndrias 11 vezes maior que Fe(III)TPPS₄, provavelmente devido às interações eletrostáticas entre a porfirina catiônica e a membrana mitocondrial interna, carregada negativamente. Observou-se também que ambas porfirinas diminuíram a viabilidade de células tumorais de maneira dose-dependente, apresentando um IC₅₀ de aproximadamente 15 μM, após 48 h de incubação no escuro. Tratando as células com a dose de 10 μM para cada porfirina e um tempo menor de exposição no escuro (1 h), observou-se efeito significativo após a irradiação das amostras. Nas condições experimentais testadas, a morte celular predominante foi a necrose (26% das células tratadas com a porfirina aniônica e 29%, com a catiônica). A apoptose ocorreu após irradiação, sendo o efeito da Fe(III)TMPyP duas vezes maior (14%) que o efeito da Fe(III)TPPS₄ (7%). Ambas porfirinas aumentaram de maneira significativa a concentração intracelular do íon Ca²⁺ ([Ca²⁺]_{cit}) após a irradiação. Tanto a necrose, como a apoptose foram mediadas pelo aumento da [Ca²⁺]_{cit}, uma vez que ambas foram inibidas pelo quelante de Ca²⁺ citosólico BAPTA/AM. A CsA preveniu as mortes necrótica e apoptótica das células LNCaP tratadas e irradiadas na presença de ambos compostos.

ABSTRACT



The action of irradiated cationic Fe(III)TMPyP and anionic Fe(III)TPPS₄ forms of mesoporphyrins on mitochondrial functions was investigated using experimental conditions that caused minimal effects on mitochondria in the dark. Treatment of mitochondria with 1 μM Fe(III)TMPyP for 2 min decreased the respiratory control by 3% in the dark and 28% after irradiation. Fe(III)TPPS₄ (1 μM) had no significant effect on respiratory control under any of the above conditions. Both porphyrins increased mitochondrial production of reactive oxygen species in the presence of Ca²⁺; however, the effect of Fe(III)TMPyP was significantly stronger. Fe(III)TMPyP but not Fe(III)TPPS₄ promoted cyclosporin A-sensitive mitochondrial permeability transition. It was also observed that the association constant of Fe(III)TMPyP with mitochondria was 11 times higher than Fe(III)TPPS₄. In conclusion, the damage to isolated mitochondria induced by Fe(III)TMPyP under illumination was larger than by Fe(III)TPPS₄, probably because its cationic charge favors association with the mitochondrial membrane. The cytotoxic effect of both porphyrins, prior the irradiation and upon the cell viability were dose-dependent and the IC₅₀ were approximately 15 μM, after 48 hours of incubation. No significantly cytotoxic effect was observed when the tumor cells were treated with 10 μM for each porphyrin, in a time of incubation in the dark of one hour. This was significant only after the photoactivation of the samples. In these conditions, the irradiation of the tumor cells induced cell death both via necrose and apoptose. Cell death via necrose was higher for both porphyrins. Irradiation of both porphyrins significantly increased the cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_{cit}) of the LNCaP cells, which mediated cell death, once BAPTA/AM (an intracellular Ca²⁺ chelator) protected against cell death. Mitochondrial permeability transition (MPT) was probably participating in these mechanisms since cyclosporin A prevented cell death.

1- INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas presentes em todas as células eucariontes e as responsáveis pelo fornecimento e controle da energia vital para a vida celular.

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial promove a redução contínua do oxigênio para gerar o potencial eletroquímico de H^+ necessário para a síntese de ATP (adenosina trifosfato). Uma das conseqüências indesejáveis deste processo é a constante geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são altamente deletérias aos componentes celulares. Assim, as defesas antioxidantes mitocondriais têm que ser efetivas para a detoxificação desses produtos oxidativos; caso contrário, danos importantes podem ocorrer nas mitocôndrias e fora delas.

Pesquisas sobre disfunções mitocondriais relacionam essas organelas como umas das responsáveis por processos de morte celular tanto por necrose, como por apoptose. Com base nessa e em outras informações, as mitocôndrias são apontadas como alvos importantes para a indução da morte de células tumorais pelo processo de Terapia Fotodinâmica (TFD).

MITOCÔNDRIAS

Um Breve Histórico

As mitocôndrias são organelas que ocupam um volume intracelular importante e são as grandes responsáveis pela produção de energia pelas células. Variam de tamanho (apresentam diâmetro médio de 1 μm , similar ao diâmetro médio de bactérias), formato, quantidade e localização, dependendo do tipo e função celular (NELSON e COX, 2000).

Desde o início dos anos 50 os bioquímicos estudam os mecanismos enzimáticos das vias oxidativas, o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa mitocondrial. É impossível especificar quem descobriu primeiramente as mitocôndrias como organelas citoplasmáticas distintas porém, Kölliker merece menção particular pois se encontra entre os primeiros que descreveram a existência de grânulos organizados no sarcoplasma de músculo esquelético e os estudou por vários anos, a partir de 1850. Esses grânulos, que por volta de 1890 foram chamados por Retzius de “sarcossomos” eram na verdade, as mitocôndrias de tecido muscular (LEHNINGER, 1964).

A “nova era” das pesquisas com mitocôndrias iniciou-se com o importante trabalho de Bensley em 1930, na tentativa de isolar mitocôndrias de células de tecido hepático por centrifugação diferencial. Apesar de todo o esforço, Bensley falhou por não conseguir extrair mitocôndrias intactas porém, o pioneirismo de seu trabalho foi destacado por reunir as pesquisas citológicas com as primeiras pesquisas bioquímicas de respiração mitocondrial. Foi apenas em 1948 que Hogeboom, Schneider e Palade alcançaram êxito em isolar mitocôndrias intactas de fígado de rato, por centrifugação diferencial e utilizando meio de reação contendo 0,88 M de sacarose (LEHNINGER, 1964). Em 1949, os bioquímicos norte-americanos Eugene Kennedy e Albert Lehninger isolaram mitocôndrias hepáticas e demonstraram que essa organela é o sítio celular responsável pela síntese de ATP, associada à oxidação dessas coenzimas. Essa observação deu origem à fase moderna da investigação sobre os mecanismos de conversão de energia em sistemas que consomem oxigênio (NELSON & COX, 2000). Durante cerca de 20 anos houve uma busca infrutífera por um suposto intermediário químico que seria responsável pelo acoplamento entre os processos de respiração e síntese de ATP. Apenas em 1961, o bioquímico inglês Peter Mitchell, baseado na constatação de que a redução do oxigênio (O_2) a água (H_2O) pela cadeia respiratória gera um gradiente de prótons (H^+) entre o meio interno (matriz) da mitocôndria e o espaço entre suas membranas interna e externa, levando-o a propor a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa (MITCHELL, 1961).

Estrutura e Função

As mitocôndrias apresentam duas membranas: a externa e a interna. A membrana mitocondrial externa contém proteínas chamadas “porinas”, que atuam como poros não-específicos para solutos de peso molecular menor que 10 kDa, com tamanhos que variam entre 2,5 – 3,0 nm, pelos quais passam livremente a água e solutos de baixo peso molecular (CESAR et al., 2004). As porinas são também chamadas de “canais aniônicos voltagem-dependentes” ou VDAC (voltage-dependent anion channel), porém é importante enfatizar que não há nenhum gradiente de potencial na membrana mitocondrial externa e a característica “voltagem-dependente” do VDAC é observada apenas em condições experimentais (NICHOLLS e FERGUSON, 2002). No VDAC se encontra a hexoquinase do tipo I, responsável pelo metabolismo catabólico, introduzindo a glicose na

glicólise para a produção de energia; com isso acopla a sua atividade à fosforilação oxidativa mitocondrial utilizando como substrato exclusivamente o ATP formado na mitocôndria (VYSSOKIKH et al., 2003). O VDAC pode se associar ao translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), que se encontra na membrana mitocondrial interna e com isso, é formado um sistema de transporte específico, permitindo a passagem de pequenas moléculas, da matriz mitocondrial ao citosol celular (VYSSOKIKH et al., 2003).

A membrana mitocondrial interna apresenta invaginações formando as cristas mitocondriais e é altamente seletiva, sendo permeável apenas para o O₂, CO₂, •NO e H₂O. É nesta membrana que se encontram os componentes enzimáticos da cadeia respiratória, bem como os transportadores específicos para o ATP, ADP, piruvato, Ca²⁺ e fosfatos (NICHOLLS e FERGUSON, 2002). É constituída por cerca de 75% de proteínas e dentre os lipídios presentes estão o colesterol, em pequenas concentrações e a cardiolipina, representando cerca de 20% do conteúdo total de fosfolipídeos (SCHLAME et al., 2000). Anexo à membrana interna está a matriz, constituída de uma solução concentrada de enzimas e intermediários químicos envolvidos no metabolismo bioenergético (NELSON & COX, 2000).

A Cadeia de Transporte de Elétrons

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o O₂ à H₂O. Esta energia é utilizada pela ATP sintetase para fosforilar o ADP à ATP. Assim, a cadeia respiratória converte a energia redox gerada pelo catabolismo em potencial de membrana mitocondrial, que é a força motriz para a fosforilação oxidativa (MITCHELL, 1961).

Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH₂, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos ao átomo de ferro da NADH desidrogenase (complexo I, Figura 1). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH₂). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Em alguns tecidos a coenzima Q pode

também ser reduzida pelo glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxirredutase (com resultado da β -oxidação de ácidos graxos). A UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH[•]), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos separados de UQH[•], um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH[•] são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo c. O citocromo c transfere elétrons para a citocromo oxidase (complexo IV, figura 1). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (NICHOLLS e FERGUSON, 2002). Com isso, a respiração mitocondrial está acoplada à fosforilação oxidativa do ADP.

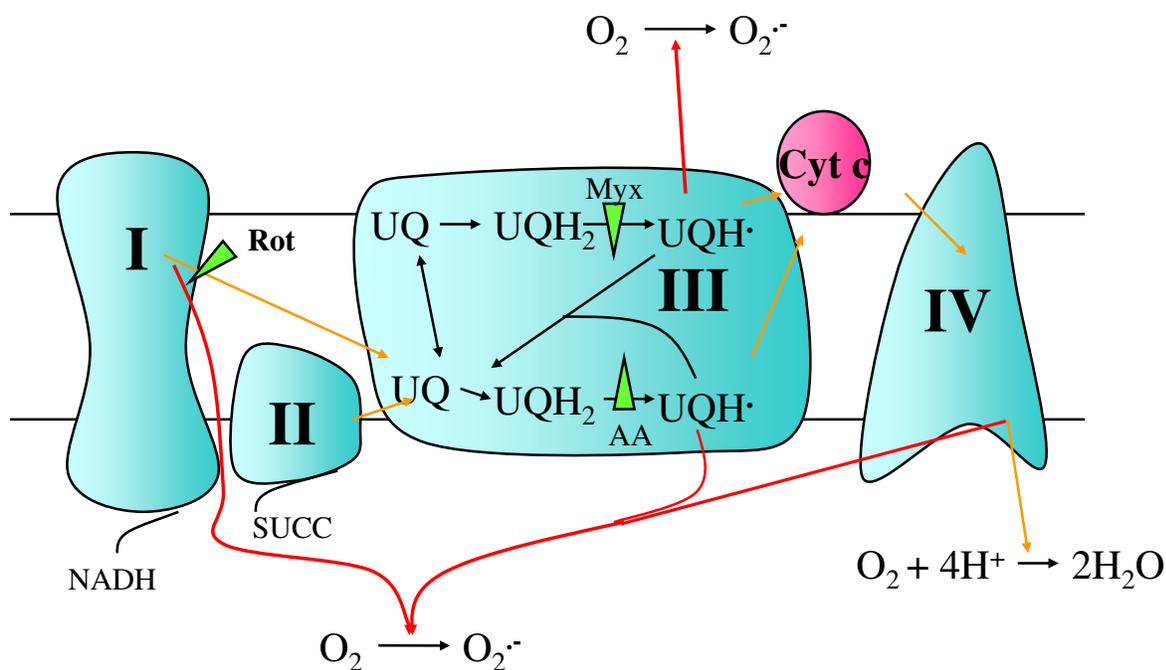


Figura 1- Cadeia respiratória mitocondrial e possíveis sítios de vazamento de elétrons e formação de $O_2^{\bullet -}$ (KOWALTOWSKI e VERCESI, 2001). O números romanos indicam os quatro complexos respiratórios. As setas “laranjas” representam a transferência de elétrons; as “vermelhas” representam os possíveis sítios de vazamentos de elétrons. Os triângulos “verdes” representam a inibição dos sítios respiratórios por mixotiazol (Mix) e antimicina A (AA).

Uma maneira de se determinar a integridade da membrana mitocondrial interna é calculando o valor do controle respiratório (C.R.). O esquema abaixo permite caracterizar alguns parâmetros bioenergéticos estudados neste trabalho: a respiração mitocondrial inicia-se quando substratos reduzidos doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. Neste processo, o O₂ é o aceptor final sendo reduzido à H₂O. A formação de um potencial eletroquímico de H⁺ mais negativo internamente, permite a síntese de ATP pela F₀F₁-ATPase, na presença de ADP e P_i (fosfato inorgânico).

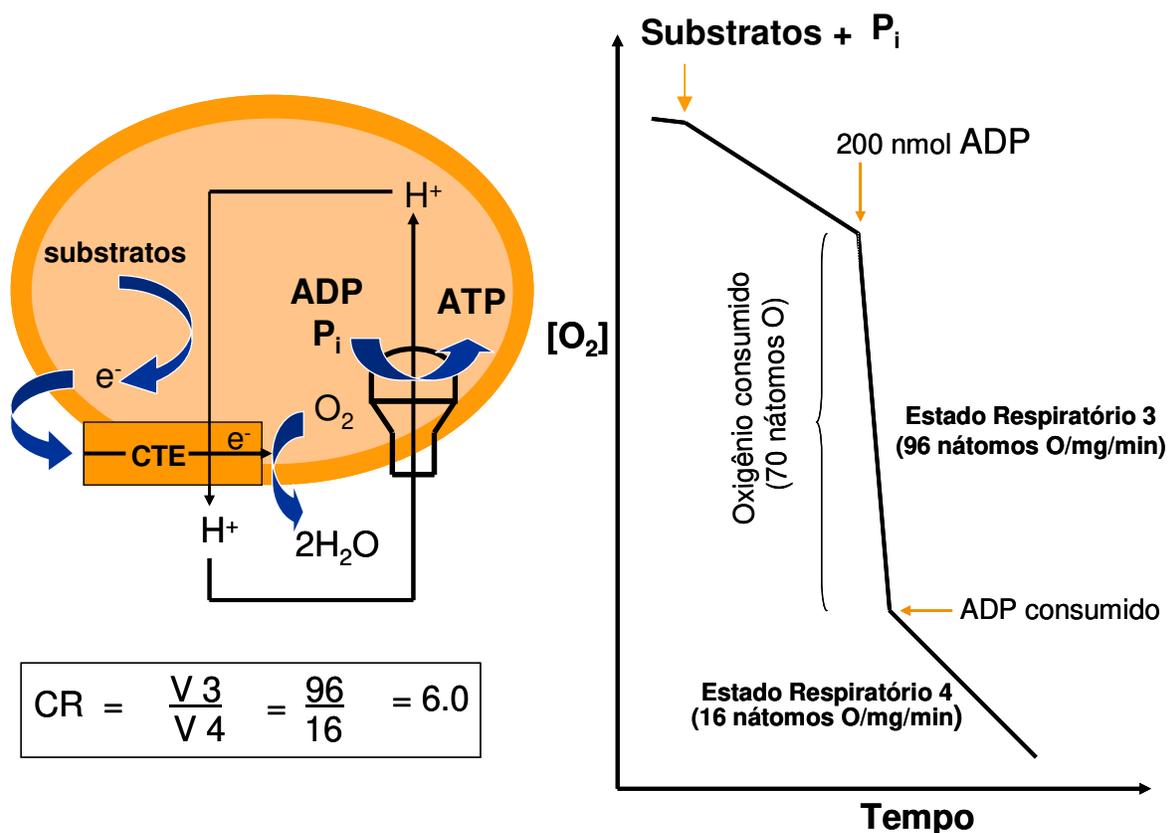


Figura 2- Esquema representando os “estados respiratórios” e a determinação do controle respiratório (C.R.). A figura em cor “laranja” representa uma mitocôndria esquematizada, com a cadeia de transporte de elétrons (CTE) e a ATP sintase, fosforilando o ADP a ATP. O gráfico representa um traçado de consumo de oxigênio pela suspensão mitocondrial na presença de substratos respiratórios, fosfato inorgânico (P_i) e ADP (eixo y), em função do tempo (eixo x).

Durante o processo de fosforilação, a velocidade de respiração é alta (estado respiratório 3 ou respiração de fosforilação, fig. 2) e diminui após fosforilação de todo ADP presente (estado respiratório 4 ou respiração de repouso, fig. 2). A razão entre as velocidades desses dois estados fornece o valor do controle respiratório (p. ex., C.R. = 6, fig. 2). A eficiência da fosforilação oxidativa pode ser avaliada através da razão ADP/O (n° de ADP fosforilado por átomo de O_2 consumido).

Fosforilação Oxidativa

Segundo MITCHELL (1961), a passagem de elétrons através da seqüência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia. O componente elétrico ($\Delta\psi$) deste potencial atinge valores de aproximadamente 180 mV no estado de repouso, enquanto o componente químico (ΔpH) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de H^+ através da F_0F_1 -ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado à fosforilação do ADP por P_i . A ATP sintase, responsável por esta reação, é uma enzima cuja composição varia um pouco de espécie para espécie e, em mitocôndrias de coração de boi, possui um peso de 500 kDa, contém 16 proteínas diferentes e é constituída de duas regiões bem distintas denominadas: F_1 , solúvel e localizada na matriz mitocondrial e região F_0 , hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna, onde estão também localizados os complexos da cadeia respiratória (LUTTER et al., 1993). Como visualizado na fig. 3, o fator F_1 contém o sítio catalítico e é composto por 3 subunidades α , 3 β , 1 γ , 1 δ e 1 ϵ . Estas três últimas estão envolvidas na interação entre F_1 e F_0 e os 3 sítios catalíticos estão entre as subunidades α e β . F_0 constitui o canal para a passagem de H^+ e é também composto por 3 subunidades: a, b e c (fig. 3).

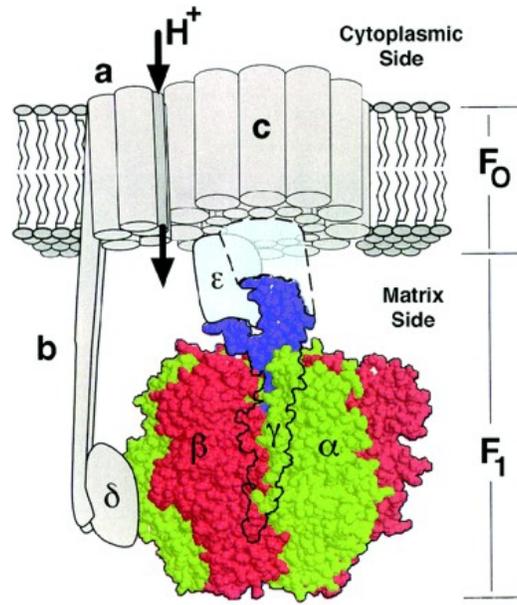


Figura 3- A estrutura da ATP sintase (WANG e OSTER, 1998). Figura mostrando a organização das subunidades $c_{12}ab_2$, para formar a porção transmembrana condutora de prótons F_0 e a unidade F_1 sintetizadora de ATP. O complexo solúvel F_1 consiste de cinco subunidades: α , β , γ , δ e ϵ , na estequiometria de 3:3:1:1:1.

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

A Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pela Mitocôndria

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

Quando se leva em conta a complexidade do processo de transferência de elétrons através da cadeia respiratória, é surpreendente que somente de 1 a 5% dos elétrons que entram na cadeia respiratória não sejam usados para reduzir O_2 à H_2O . A maioria destes elétrons “perdidos” se combina com o oxigênio em passos intermediários da cadeia respiratória, promovendo a redução monoelétrica do oxigênio, gerando assim radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (BOVERIS e CHANCE, 1973; LIU, 1997; TURRENS, 1997).

O $O_2^{\bullet-}$ pode ser gerado principalmente pela NADH desidrogenase (BOVERIS e CHANCE, 1973; TURRENS e BOVERIS, 1980) e pela coenzima Q (BOVERIS e CHANCE, 1973; CADENAS et al., 1977; TURRENS et al., 1985).

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

As EROs geradas pelas mitocôndrias têm sido implicadas em muitos processos degenerativos, incluindo envelhecimento e morte celular por necrose ou por apoptose (GREEN e REED, 1998; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999; LEMASTERS et al., 1998; ZAMZAMI et al., 1997).

Defesas Antioxidantes Mitocondriais

Pelo fato da produção de EROs mitocondrial ser um processo contínuo, ainda sob condições fisiológicas, essas organelas desenvolveram um sistema complexo de defesa antioxidante. A mitocôndria contém uma superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) similar à SOD de bactérias (DOONAN et al., 1984), capaz de dismutar o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . Este último, altamente permeável por membranas biológicas, pode ser removido por antioxidantes como a catalase, podendo ser encontrada em mitocôndrias de coração de rato (VALLE et al., 1993) e tioredoxina peroxidase (KOWALTOWSKI et al., 1998). As mitocôndrias apresentam também glutatona peroxidase, capaz de remover o H_2O_2 utilizando glutatona reduzida como substrato (SIES e MOSS, 1978; ZAKOWSKI e TAPPEL, 1978). A forma oxidada da glutatona pode ser reduzida novamente através da glutatona redutase, tendo NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então $NADP^+$ usando a NAD(P) transidrogenase (KOWALTOWSKI et al., 2001).

Resíduos de metionina de proteínas mitocondriais parecem fazer parte das defesas antioxidantes da organela. Quando oxidados esses resíduos geram sulfóxido de metionina, o que não compromete a funcionalidade das proteínas e parece ser o último recurso utilizado como defesa antioxidante para evitar a oxidação de resíduos de cisteína, o que resultaria em importantes alterações na estrutura e função protéicas (BERLETT e STADTMAN, 1997).

Antioxidantes lipossolúveis como o α -tocoferol (vitamina E) e UQH_2 , ambos potentes inibidores da peroxidação lipídica mitocondrial (ERNSTER, et al., 1992) estão presentes nas mitocôndrias. A forma oxidada do citocromo c pode receber um elétron do $O_2^{\bullet-}$ sendo este convertido novamente a O_2 . Interessantemente, neste processo, o elétron “perdido” pode retornar à cadeia de transporte de elétrons (SKULACHEV, 1998). A

citocromo oxidase, outro componente da cadeia respiratória e presente no complexo IV, promove o catabolismo do NO^\bullet à NO_2^- e NO_3^- , o qual não apenas remove o NO^\bullet , mas também previne a formação de ONOO^\bullet (GIULIVI et al., 1998).

Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)

Frente a situações de estresse oxidativo, como a exposição de mitocôndrias à agentes oxidantes e altas concentrações de Ca^{2+} , poderá ocorrer a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), que consiste na associação do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) com a proteína de membrana externa VDAC (canal iônico voltagem-dependente) e o recrutamento da ciclofilina D (CyD) a partir da matriz mitocondrial (ZORATTI e SZABÒ, 1995; CROMPTON, 2000; 2003; CROMPTON et al., 2002; RADI et al., 2002)

A TPM é caracterizada por uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que gradativamente se torna permeável a prótons, íons, suporte osmótico e até mesmo pequenas proteínas. O Ca^{2+} parece ser o principal agente estimulador da geração mitocondrial de EROs (KOWALTOWSKI et al., 2001; figura 4). Este fenômeno foi primeiramente caracterizado por Hunter e Haworth, no final dos anos 70, e foi sugerido ser o resultado da abertura de um poro de tamanho discreto (aproximadamente 1,5 kDa) na membrana mitocondrial interna (HAWORTH e HUNTER, 1979). A estrutura básica do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) é sugerida contendo o VDAC, o ANT e a ciclofilina-D (CyD), um membro de uma família de isomerases de alta homologia *cis-trans* peptil-prolil (HAWORTH e HUNTER, 1979; ZORATTI e SZABÒ, 1995; BRUSTOVETSKY e KLINGENBERG, 1996; GREEN e REED, 1998; WOODFIELD et al., 1998; CROMPTON, 1999; SCHEFFLER, 2001). Acredita-se que essas proteínas interagem com sítios específicos entre as membranas mitocondriais externa e a interna e formam a estrutura básica do PTPM, interagindo possivelmente com outros constituintes, incluindo o receptor benzodiazepínico, bem como com a creatina e adenilato quinases (FAGIAN et al., 1990; ZORATTI e SZABÒ, 1995; CROMPTON et al., 1998; GREEN e REED, 1998; CROMPTON, 1999; 2000; BRECKENRIDGE e XUE, 2004). Recentes evidências mostram que o PTPM pode ser formado na ausência de ANT

(KOKOSZKA et al., 2004) e modelos alternativos têm sido propostos para esse poro (HE e LEMASTERS, 2002). A CyD contribui para a abertura do PTPM provavelmente devido uma mudança conformacional das proteínas da membrana interna. Recentes estudos com animais deficientes de CyD mostraram que essa estrutura é importante para a TPM (NAKAGAWA et al., 2005; BAINES et al., 2005; BASSO et al., 2005) e que esses camundongos são resistentes à morte celular causada por injúria isquêmica (NAKAGAWA et al., 2005; BAINES et al., 2005). Porém, observaram que a permeabilização da membrana externa e a apoptose induzidos por severos agentes pro-apoptóticos permaneceram intactos, indicando que um mecanismo independente de CyD (presumivelmente independente de TPM) poderá atuar na morte celular apoptótica. A CsA é um dos mais efetivos membros da família dos endecapeptídeos cíclicos, que atuam como imunossuppressores e foi descoberta como um potente inibidor do PTPM (FOURNIER et al., 1987; CROMPTON et al., 1988; BROEKEMEIER et al., 1989). Muitos concordam que o efeito inibitório da CsA é mediado pela CyD (HALESTRAP et al., 1998).

A TPM induzida por Ca^{2+} pode ser estimulada por um grande número de compostos conhecidos como indutores (ZORATTI e SZABÒ, 1995), que incluem o fosfato inorgânico (P_i ; ROSSI e LEHNINGER, 1964), oxidantes de nucleotídeos de piridina (LEHNINGER et al., 1978; CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1996A, 1996B; VERCESI et al., 1997), protonóforos (BERNARDI, 1992) e reagentes ditiólicos (LENARTOWICZ et al., 1991; BERNARDES et al., 1994). A maioria destes indutores são compostos capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial promovido pelo Ca^{2+} (CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1996A, 1996B; VERCESI et al., 1997).

O Ca^{2+} intramitocondrial liga-se a cardiolipina na face interna da membrana mitocondrial interna causando alteração ultraestrutural da cadeia respiratória que facilita a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e conseqüentemente de H_2O_2 (GRIJALBA et al., 1999). Este lipídeo possui cabeça polar eletronegativa e está presente em altas concentrações (14-23%) na membrana mitocondrial interna, em uma grande variedade de tecidos. Simultaneamente, o Ca^{2+} mobiliza Fe^{2+} na matriz mitocondrial que estimula a reação de Fenton e a produção de radical hidroxil que ataca tióis de proteínas, lipídeos e DNA mitocondrial (MERRYFIELD e LARDY, 1982; CASTILHO et al., 1995; VERCESI et al., 1997). A diminuição de

NAD(P)H e GSH causada por próoxidantes prejudica a eliminação de H_2O_2 pelas enzimas glutathiona peroxidase (GP) e glutathiona redutase (GR). Em contraste, a rápida difusão de H_2O_2 através da membrana mitocondrial permite seu consumo por catalase (CAT) extramitocondrial (VALLE et al., 1993; KOWALTOWSKI et al., 1998). Na presença de altas concentrações de fosfato inorgânico (P_i), a enolização de aldeídos (INDIG et al., 1988) formados por lipoperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) leva a produção final de espécies tripletes que estimulam o processo de lipoperoxidação dos PUFA da membrana (KOWALTOWSKI et al., 1996A, 1996B).

O conteúdo protéico das membranas mitocondriais pode chegar a 75% na membrana mitocondrial interna (LEHNINGER, 1964; NICHOLLS e FERGUSON, 2002). Devido ao alto conteúdo protéico da membrana mitocondrial interna, é esperado que estas proteínas sejam um dos principais alvos das EROs geradas pela mitocôndria e induzidos por Ca^{2+} (FAGIAN et al., 1990; VALLE et al., 1993; CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1996A, 1996B). As EROs, principalmente o radical hidroxil, são capazes de oxidar resíduos de cisteína e metionina protéicos, levando à formação de ligações cruzadas S-S e sulfóxido de metionina, respectivamente. Como a oxidação de resíduos de metionina tem pouco efeito sobre a estrutura e função protéica (BERLETT e STADMAN, 1997), a disfunção mitocondrial devido à oxidação de proteínas da membrana mitocondrial, provavelmente, está associada à oxidação de resíduos de cisteína (FAGIAN et al., 1990; CASTILHO et al., 1996A).

O nome "transição de permeabilidade" é utilizado devido à observação de que a permeabilização mitocondrial nesta situação pode ser parcialmente revertida pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou redutores ditiólicos, logo após a permeabilização (HUNTER e HAWORTH, 1979; VALLE et al., 1993; CASTILHO et al., 1996A). A primeira evidência de que a TPM era causada por EROs geradas pela mitocôndria foi apresentada quando Lehninger e co-autores demonstraram que o estado oxidado de nucleotídeos de piridina estimulava o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial (LEHNINGER et al., 1978), resultados estes confirmados por trabalhos posteriores (VERCESI 1984A, 1984B; VERCESI e PEREIRA-DA-SILVA, 1984). Este efluxo foi posteriormente atribuído a uma permeabilização mitocondrial não específica (NICHOLLS e BRAND, 1980). Os oxidantes

de nucleotídeos de piridina promovem o acúmulo de H_2O_2 em mitocôndrias porque o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase mitocondrial é reduzido por nucleotídeos de piridina (MEISTER e ANDERSON, 1983; CHANCE et al., 1979). Experimentos comprovando que a catalase, o quelante de Fe^{2+} o-fenantrolina e a anóxia inibem a TPM induzida por Ca^{2+} e próoxidantes (VALLE et al., 1993; CASTILHO et al., 1995) confirmaram que a TPM é dependente de EROs geradas pela mitocôndria. Peroxidases tiólicas, como o ebselen e a proteína antioxidante específica para tióis (TSA) mostraram-se eficientes inibidores da TPM (KOWALTOWSKI et al., 1998), reforçando ainda mais esta hipótese.

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

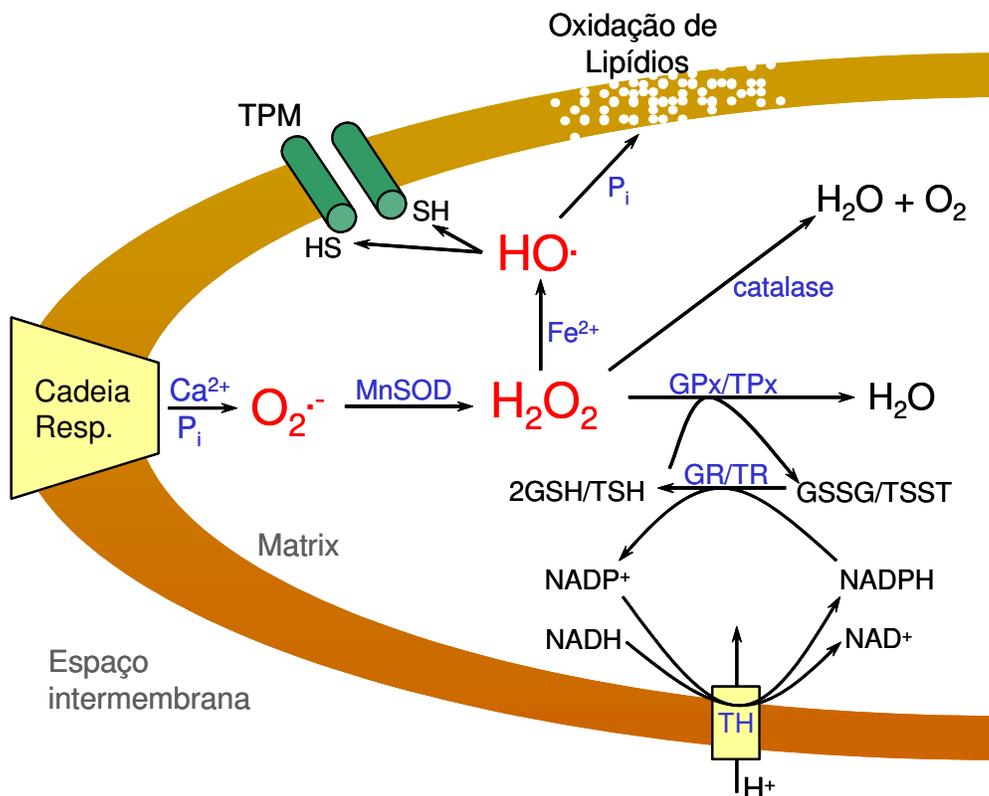


Figura 4- Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna (KOWALTOWSKI et al., 2001). Acúmulo de EROs mitocondrial causa TPM. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$. Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é então reduzido a H_2O pela glutatona peroxidase (GP), tioredoxina peroxidase (TP) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GP, e TSH, oxidado pela TP, são recuperados pelo sistema enzimático glutatona e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então NADP^+ usando a NAD(P) transidrogenase (TH). Quando a geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão inativados, H_2O_2 acumula-se e na presença de Fe^{2+} , gera o radical OH^{\bullet} altamente reativo. OH^{\bullet} oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de TPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente, OH^{\bullet} pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i .

Mitocôndrias e o Processo de Morte Celular

A TPM é um mecanismo comum de disfunção mitocondrial na morte celular, o que está relacionado à liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais, devido ao inchamento da organela, com ruptura da membrana mitocondrial externa (GREEN e REED, 1998; GREEN e KROEMER, 2005). A morte celular apoptótica ocorre de modo regulado e dependente de energia, resultando em quebra do DNA nuclear, condensação celular e fagocitose, ao contrário da morte celular necrótica, que não requer ATP, em que pode haver aumento de volume celular e até extravasamento de material citosólico (KERR et al., 1972).

Há vários mecanismos descritos pelos quais as proteínas mitocondriais regulatórias de apoptose podem ser liberadas para o citosol. Esses mecanismos são divididos em dois grupos: (i) aqueles que envolvem permeabilização da membrana interna com inchamento mitocondrial, perda do potencial de membrana e habilidade de sintetizar ATP, como ocorre após a TPM e (ii) aqueles que envolvem apenas a permeabilização da membrana externa e permitem a manutenção da função mitocondrial (GREEN e REED, 1998; CROMPTON, 1999; SPIERINGS et al., 2005). O primeiro mecanismo é típico de condições em que ocorre “apoptose acidental”. O segundo mecanismo pode ser observado tanto na “apoptose acidental” quanto na morte celular programada (CROMPTON, 1999). Neste caso, ocorre uma permeabilização da membrana externa provocada por membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 como Bax, Bak e Bok. Essas proteínas, habitualmente citosólicas, formam poros na membrana externa de modo estimulado por membros da família Bcl-2 que contém apenas o domínio BH3 (Bid e Bad) e inibido por Bcl-2, Bcl-xl e Bcl-w (Fig. 05; ADAMS e CORY, 2001, ZIMMERMANN et al. 2001; GREEN e KROEMER, 2005).

A apoptose é coordenada por um conjunto de proteases cisteína/aspartato-específicas conhecidas como caspases (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998, ZIMMERMANN et al., 2001; STRASSER et al., 2000; GREEN, 2000). Essas proteases são sintetizadas como precursores inativos e, mediante estímulos apoptóticos, sofrem ativação proteolítica. Várias proteínas podem regular a ativação de caspases, sendo que um número grande dessas proteínas tem localização ou interação mitocondrial

(RAVAGNAN et al., 2002). O citocromo *c*, normalmente localizado no espaço intermembranas mitocondrial, pode ser liberado para o citosol, onde se liga a Apaf-1 (“apoptosis activating factor 1”) e caspase 9, formando o apoptosomo, complexo de alto peso molecular responsável pela clivagem de várias pró-caspases (ZIMMERMANN et al., 2001, RAVAGNAN et al., 2002). É interessante notar que a pró-caspase 9 também está localizada no espaço intermembranas mitocondrial, assim como uma fração das pró-caspases 2 e 3 (KRAJEWSKI et al., 1999, RAVAGNAN et al., 2002). As mitocôndrias também contém a proteína Smac/DIABLO, que inativa um grupo de proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases (DU et al., 2000, VERHAGEN et al., 2000, RAVAGNAN et al., 2002). Finalmente, o AIF (“apoptosis inducing factor”), uma proteína capaz de induzir condensação da cromatina nuclear de modo independente da ativação de caspases e a endonuclease G, capaz de promover diretamente a fragmentação de DNA nuclear, estão normalmente localizados no espaço intermembranas mitocondrial e migram para o citosol mediante estímulos pró-apoptóticos (LORENZO et al., 1999, VAN LOO et al., 2001, RAVAGNAN et al., 2002).

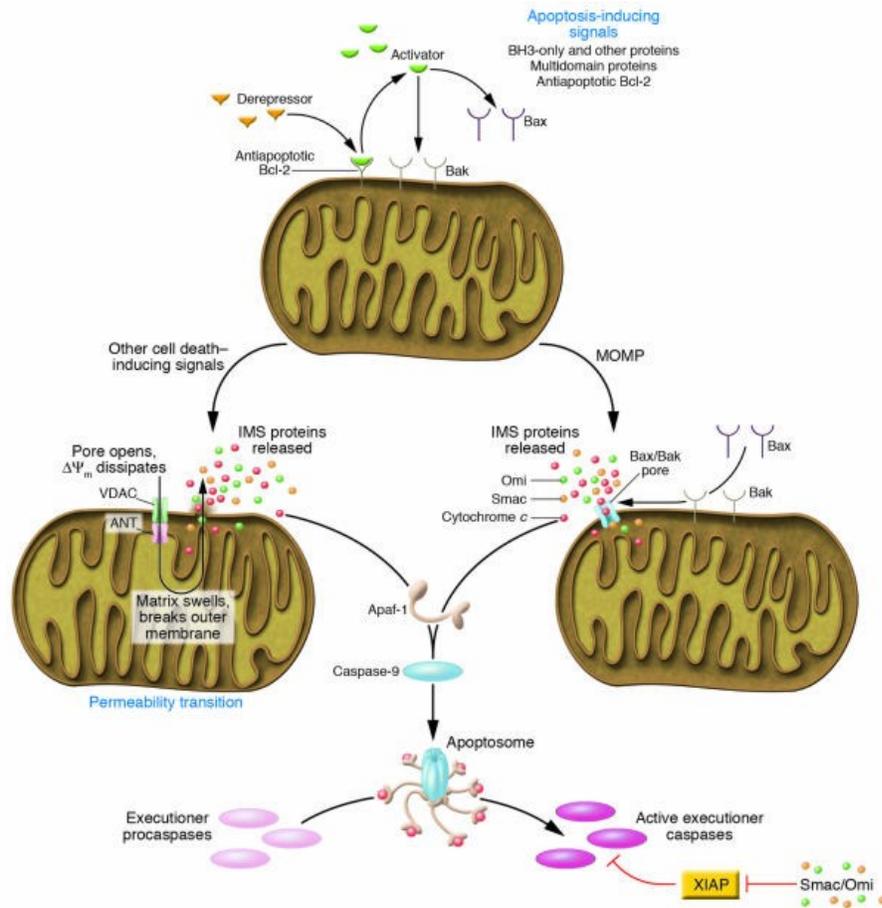


Figura 5- Esquema de apoptose via mitocondrial: Estímulos para indução da apoptose atuam recrutando membros pró-apoptóticos da família da Bcl-2, que causam permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME ou MOMP) e este evento é inibido pelos membros anti-apoptóticos da família da Bcl-2 (GREEN e KROEMER, 2005). Outros estímulos podem causar PMME através da indução da TPM; em ambos os casos, o citocromo *c*, pode ser liberado para o citosol, onde se liga a Apaf-1 (“apoptosis activating factor 1”) e caspase 9, formando o apoptosomo, complexo de alto peso molecular responsável pela clivagem de várias pró-caspases. A ativação das caspases-3, -7 e -9 é antagonizada por XIAP o que, em contrapartida, pode ser inibido por Smac, Omi e outras proteínas liberadas durante PMME. Não estão representados outras vias de ativação de caspases e apoptose, incluindo a via de receptor de morte e aquelas de ativação das caspases -1 e -2.

Outra organela que parece controlar a vida e a morte celular é o retículo endoplasmático (RE), que coordena eventos sinalizadores complexos envolvidos com os estoques de Ca^{2+} intracelular. A calcineurina, uma fosfatase serina-treonina expressa em diversos tecidos, é ativada por várias classes de receptores de superfície celular acoplados à mobilização do Ca^{2+} intracelular (FESKE et al., 2003). O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ resulta na ativação de diversas enzimas calmodulina-dependentes, incluindo a calcineurina. Uma vez que se forma o complexo Ca^{2+} /calmodulina/calcineurina, este atua desfosforilando o fator de transcrição NFAT (“nuclear factor of activated T cells”; fator nuclear de células T ativadas) e NFAT desfosforilado poderá ativar processos de morte celular. Os fatores de transcrição são moléculas que atuam diretamente sobre os genes, promovendo ou impedindo a sua expressão; são capazes de entrar no núcleo celular apenas quando desfosforilados (SHIBASAKI et al., 1996; OKAMURA et al., 2000; HOGAN et al., 2003).

CÉLULAS DE TUMOR DE PRÓSTATA HUMANO LNCaP

A linhagem celular de câncer humano de próstata LNCaP foi isolada em 1977, por J.S. Horoszewicz e seus colaboradores através de biópsia por aspiração de linfonodo supraventricular esquerdo, de um homem caucasiano de 50 anos, com diagnóstico de carcinoma metastático de próstata ((MURPHY, 1980; HOROSZEWICZ et al., 1983).

Estudos recentes sugerem grande potencial da TFD no tratamento do câncer de próstata (MUSCHTER, 2003; ZIMMERMANN et al., 2003, ORTEL et al., 2002). A escolha deste modelo celular para nossas pesquisas com as porfirinas deve-se a dois motivos principais: 1) a próstata é um órgão acessível aos procedimentos da TFD; 2) as células LNCaP provém de uma linhagem de câncer humano.

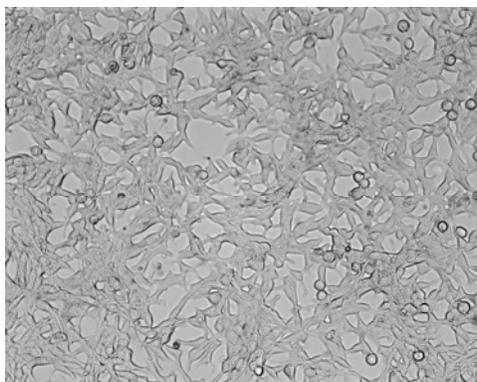


Figura 6- Foto das células LNCaP. Adquirida por microscópio LEICA DM IRB.

TERAPIA FOTODINÂMICA

O termo “fotodinâmica” significa estudo dos estímulos luminosos sobre os seres vivos. Nos últimos anos, o princípio fotodinâmico vem sendo utilizado para o tratamento de tumores (STILTS et al., 2000) e microorganismos (ROVALDI et al., 2000), sendo que, nestes casos, agentes fotossensibilizadores são usados para aumentar a eficiência fotodinâmica. Com isso, surgiu o conceito de Terapia Fotodinâmica (TFD).

Há mais de 25 anos que a TFD tem sido desenvolvida como uma terapia contra o câncer e visa a destruição localizada do tecido vivo anormal mediante sua necrose ou inviabilização, assim como também a desativação de vírus, destruição de bactérias e fungos (ROVALDI et al., 2000; POLO et al., 2000; MACHADO, 1999; VAN der MEULEN et al., 1997). Essa modalidade se mostra como alternativa promissora para tratamento de tumores e já está sendo usada no combate ao câncer de bexiga, pulmão, pele, intestino, trato digestivo superior, mama, assim como também na detecção e delineamento de lesões por fluorescência (HILMEY et al., 2002; STILTS et al., 2000), já que os compostos fotossensíveis emitem luz quando excitados.

Com a perspectiva de aplicar a TFD no tratamento de tumores diversos, surge cada vez mais a necessidade de se conhecer as bases celulares e moleculares da ação dos compostos fotossensibilizadores sobre células saudáveis, tumorais e sobre organelas subcelulares.

Princípios Fotodinâmicos

O princípio da TFD é a combinação da luz com um fotossensibilizador e oxigênio endógeno para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, a irradiação do sensibilizador e a consequente geração de EROs produz uma cascata de eventos bioquímicos que podem culminar na inativação de células cancerígenas (HILMEY et al., 2002) ou patógenos (COLUSSI et al., 1996), levando à sua morte.

A ação fotodinâmica de fotossensibilizadores sobre biomoléculas pode ocorrer por dois possíveis mecanismos, designados mecanismo do Tipo I e do Tipo II, como descrito no esquema abaixo:

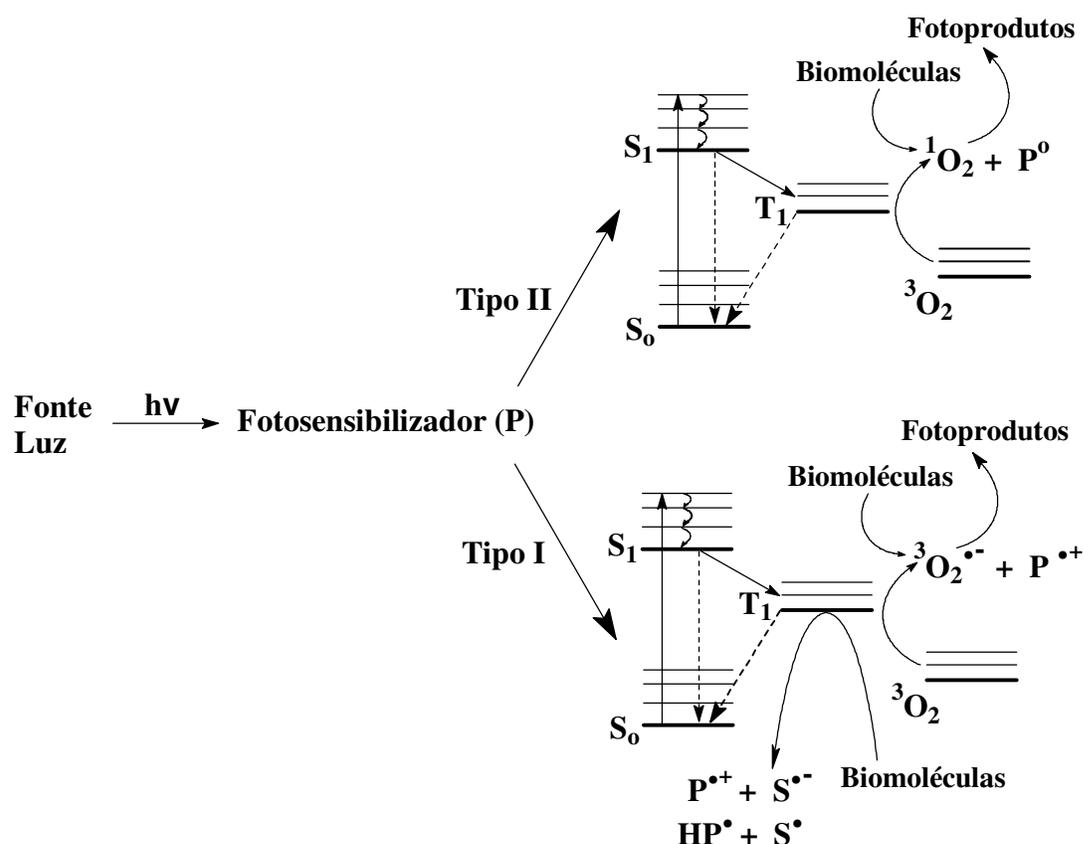


Figura 7- Mecanismos de fotoxidação de biomoléculas. Representação dos níveis de energia eletrônico e vibracional de um fotossensibilizador, o qual é excitado a um determinado nível de energia após ser irradiado (DA SILVA, 2003).

O agente fotossensibilizador no estado energético fundamental é uma molécula no estado singlete. O processo de excitação é iniciado quando o sensibilizador absorve um fóton de luz incidente de comprimento de onda adequado e, com isso, um de seus elétrons passa para um orbital energeticamente mais alto, mas de mesmo spin, resultando em um estado singlete. Após conversão interna de spin para a forma triplete com dois elétrons desemparelhados (COLUSSI et al., 1996), o agente fotossensibilizador pode ou reagir com o oxigênio via processo de transferência de energia, gerando o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$; mecanismo do tipo II), ou participar no processo de transferência de elétrons, conduzindo à formação de radical livre (mecanismo do tipo I). Em ambas situações, o produto fotodinâmico gerado é o responsável pela lesão celular (para revisão, ver ALMEIDA et al., 2004)

Como os processos de decaimentos não-radioativos, principalmente as relaxações vibracionais, são mais rápidos ($> 10^{12} \text{ s}^{-1}$) que os processo de decaimentos radioativos, como fluorescência (10^6 a 10^9 s^{-1}) e a fosforescência (10^{-2} a 10^4 a^{-1}), as moléculas excitadas do fotossensibilizador decaem por relaxações vibracionais, em geral, ao primeiro estado singlete excitado S_1 (regra de Kasha; McGLYNN et al., 1969). Deste nível de energia, as moléculas do fotossensibilizador podem decair ao estado fundamental S_0 por fluorescência (transição $S_1 \rightarrow S_0$ da fig. 7) e por processos não radioativos como relaxações vibracionais e conversões internas (não representados na fig. 7) ou podem sofrer transições não radioativas a um estado triplete via cruzamento intersistemas (transição $S_1 \rightarrow T_1$ da fig. 7). Neste nível de energia, as moléculas do fotossensibilizador podem sofrer decaimentos radioativos como fosforescência (transição $T_1 \rightarrow S_0$ da fig. 7) e não radioativos como conversões internas (não representados na fig. 7), retornando ao estado fundamental (McGLYNN et al., 1969).

No mecanismo do tipo I, os fotossensibilizadores no estado triplete interagem diretamente com o substrato e/ou solvente, através de reações de transferência de elétrons ou transferência de hidrogênio, gerando íons radicais ou radicais, os quais reagem instantaneamente com o oxigênio, produzindo uma mistura de intermediários de oxigênio altamente reativos, como o radical superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$), capaz de oxidar uma grande variedade biomoléculas (fig. 8):

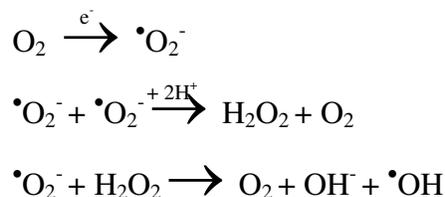


Figura 8- Reações envolvidas na geração de intermediários de O₂ altamente reativos, como $\cdot\text{O}_2^-$, H₂O₂ e $\cdot\text{OH}$.

Os processos de transferências de elétrons são claramente aumentados sobre a excitação de fotossensibilizadores a estados singlete/triplete de altas energias, em razão do aumento do caráter doador de elétrons do fotossensibilizador (OCHSNER, 1997).

No mecanismo do tipo II, os estados tripletes excitados dos fotossensibilizadores podem interagir com o estado fundamental do O₂ ($^3\Sigma_g^- \text{O}_2$ ou $^3\text{O}_2$) para produzir o oxigênio singlete ($^1\Delta_g \text{O}_2$ ou $^1\text{O}_2$), através de um processo de transferência de energia não radioativo (Fig. 9). O mecanismo do tipo II parece ser mais eficiente (constantes de velocidade de cerca de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) em comparação ao mecanismo do tipo I (constantes de velocidade das reações abaixo de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

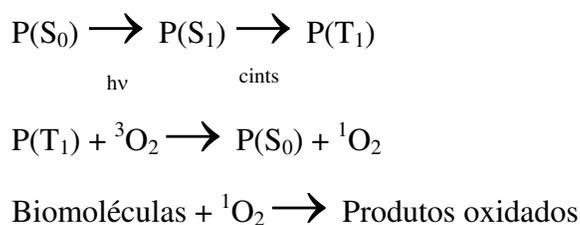


Figura 9- Reação de geração do $^1\text{O}_2$, via mecanismo do tipo II. O $^1\text{O}_2$ e outras EROs podem oxidar macromoléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e ácidos graxos poliinsaturados e promover a peroxidação de lipídeos (RYTER e TYRREL, 2000). Onde: P(S₀) = fotossensibilizador no estado fundamental; P(S₁) = fotossensibilizador no estado singlete excitado; hv = irradiação; cints = cruzamento intersistemas; P(T₁) = fotossensibilizador no estado triplete excitado.

A Importância do Estudo das Porfirinas Aniônica Fe(III)TPPS₄ e Catiônica Fe(III)TMPyP

O Photofrin® e o Photogem® são as substâncias fotossensibilizadoras mais utilizadas na terapia fotodinâmica. No entanto, como estes compostos se apresentam como misturas complexas, possuem uma absorção relativamente baixa no comprimento de onda normalmente utilizado para o tratamento fotodinâmico e também por apresentar fotossensibilidade cutânea (BROWN et al., 1999), muitos esforços têm sido concentrados nas últimas décadas para o desenvolvimento de um sensibilizador que seja puro, de estrutura menos complexa e mais eficiente do que o Photofrin® e seus derivados.

As porfirinas aniônicas TPPS₄ e catiônicas TMPyP são sintéticas e possuem uma composição química mais simples que o Photofrin®, o que facilitaria a caracterização de seus grupamentos ativos. Além disso, a hidrossolubilidade deste grupo de porfirinas auxiliaria na sua aplicação terapêutica. Estudos de caracterização espectroscópica das porfirinas constituem um passo de fundamental importância para a possível aplicação clínica das mesmas. BORISSEVITCH et al., 1997 determinaram que porfirinas catiônicas TMPyP se ligam tanto a proteínas, quanto ao DNA enquanto que, porfirinas aniônicas TPPS₄ se ligam apenas a proteínas. Esses dados, se agora comprovados com essas porfirinas de ferro, serão fundamentais para a avaliação dos danos resultantes da fotoirradiação. Estudos sobre os estados de agregação e interação com surfactantes também têm sido descritos os quais relatam a agregação de porfirinas tetrafenílicas, sulfonadas ou não em micelas (GANDINI et al., 1999) e ainda, que a solubilização da ZnTPPS₄ em regiões apolares das micelas é determinada, geralmente, por interações hidrofóbicas inespecíficas, não obstante da modulação por fatores eletrostáticos (GANDINI et al., 2001).

Estas porfirinas ainda são pouco conhecidas quanto aos seus efeitos sobre a bioenergética mitocondrial e sobre células intactas. Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que, dos grupos das porfirinas aniônicas, a que carrega o íon ferro Fe(III)TPPS₄ tem efeito deletério sobre mitocôndrias de fígado de rato na ausência de irradiação. Por outro lado, a porfirina contendo o íon manganês Mn(III)TPPS₄ foi capaz de proteger a mitocôndria dos efeitos do Ca²⁺ sobre o inchamento mitocondrial, enquanto a porfirina de

base livre (que não carrega metal no núcleo porfírico), não apresentou qualquer efeito (NEPOMUCENO et al., 2002; NEPOMUCENO et al., em preparação).

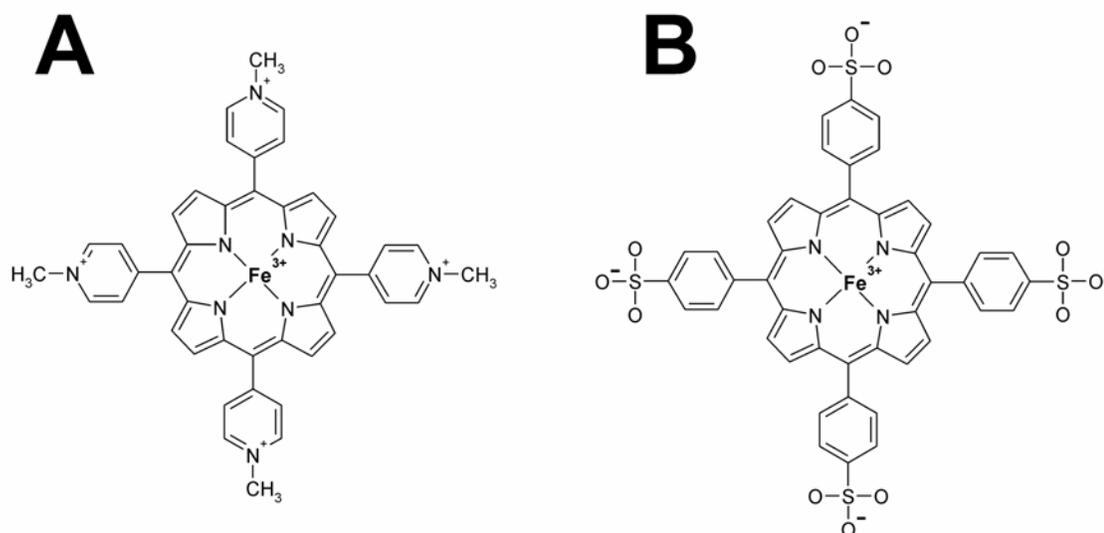


Figura 10- Estrutura das porfirinas: Painel A- porfirina catiônica *meso*-tetrakis (4-*N*-metyl pyridiniumyl) Fe(III)TMPyP; **Painel B-** porfirina aniônica *meso*-tetrakis (p-sulfonatophenyl) Fe(III)TPPS₄.

Efeitos Fotodinâmicos de Porfirinas sobre Mitocôndrias

As porfirinas são importantes fotossensibilizadores e se acumulam mais rápida e preferencialmente em células tumorais, em comparação às células normais (SEKIYA et al., 1988). Por outro lado, a afirmação de que a mitocôndria consiste no principal alvo intracelular de acúmulo de porfirinas ainda não é clara. Pesquisas recentes têm mostrado que essas organelas representam um papel fundamental na morte celular quando as membranas mitocondriais se tornam permeabilizadas (GREEN e REED, 1998; KROEMER, 2002; BRECKENRIDGE e XUE, 2004; GREEN e KROEMER, 2004). Com isso, as mitocôndrias estão sendo estudadas e vistas como alvos estratégicos para o potencial uso na terapia do câncer. Mitocôndrias isoladas de fígado de rato apresentam uma alta constante de associação com algumas porfirinas hidrossolúveis (NEPOMUCENO et al., em preparação), porém, em células intactas, porfirinas podem

associar-se à mitocôndria (BERNS et al., 1982) e também ao retículo endoplasmático (RICCHELLI et al., 1999), à membrana plasmática (MORENO e SALET, 1985) e aos lisossomos (LEUNG et al., 2002, ALI e OLIVO, 2002), sendo que todas essas organelas podem ser afetadas pela ação fotodinâmica.

Os relatos sobre a ligação de diferentes classes de porfirinas (Photofrin II® e seus derivados, hematoporfirinas, porfirinas hidrossolúveis) às mitocôndrias atribuem a esses compostos diversos efeitos lesivos. Dentre os efeitos, a peroxidação lipídica e inibição da atividade da enzima succinato desidrogenase (CHATTERJEE et al., 1997), geração de ROS em presença de fotoexcitação (CHATTERJEE et al., 1999), inchamento mitocondrial e perda do controle respiratório (ATLANTE et al., 1986), são os mais freqüentemente encontrados quando são estudadas mitocôndrias isoladas. Somado a estes relatos, existe considerável evidência mostrando que membranas são importantes alvos de fotomodificação e que, das organelas membranosas subcelulares, as mitocôndrias representam o principal alvo de dano oxidativo (CHATTERJEE et al., 1997), bem como são importantes fontes de geração de espécies reativas de oxigênio (KOWALTOWSKI et al., 2001). Esses efeitos e propriedades das porfirinas são compatíveis com a permeabilização não seletiva da membrana interna mitocondrial conhecida como transição da permeabilidade mitocondrial (TPM), que pode ocorrer em resposta a um dano oxidativo e levar a completa inativação da função mitocondrial.

Efeitos Fotodinâmicos de Porfirinas sobre Células Tumorais

Entender as bases moleculares do aparecimento e progressão de tumores tem sido um dos principais desafios da ciência nas últimas décadas. Milhões de pessoas são acometidas por essa enfermidade atualmente e milhões ainda virão a ser, principalmente com o crescente aumento da expectativa média de vida da população mundial. Muitos esforços têm sido feitos no sentido de desenvolver novas terapias, mais eficientes e mais específicas para os tumores, e menos traumáticas para os doentes.

A TFD é uma modalidade de tratamento que vem sendo utilizada para alguns tipos de tumores, principalmente os de superfície (mucosa ou epitelial), mas também em tumores sólidos. Com a perspectiva de aplicar este tipo de terapia a tumores diversos, surge

cada vez mais a necessidade de se conhecer as bases celulares e moleculares da ação dos compostos fotossensibilizadores sobre células saudáveis, células tumorais e sobre organelas subcelulares.

Qualquer tratamento ou injúria que induz a permeabilização tanto da membrana mitocondrial interna, como da externa, certamente induzirá morte da célula por apoptose ou por necrose (ARMSTRONG, 2005). Inúmeras evidências correlacionam a morte celular via despolarização mitocondrial, liberação de citocromo C e ativação de caspases minutos após a TFD (GRANVILLE et al., 1998; KESSEL e LUO, 1999).

Fotossensibilizadores que se localizam em mitocôndrias são capazes de induzir apoptose muito rapidamente (KESSEL et al., 1997) e um dos eventos apoptóticos mais conhecidos após a TFD é a liberação de citocromo c (OLEINICK et al., 2002; GRANVILLE et al., 1998). Observou-se ainda que compostos que se acumulam nessas organelas, provocam danos na proteína anti-apoptótica Bcl-2, detectado por análise de Western Blot (KIM et al., 1999, KESSEL e CASTELLI, 2001; XUE et al., 2001). Este efeito ocorre imediatamente após a irradiação, de maneira dose-dependente, em diversas linhagens de células tumorais, inclusive nas células LNCaP.

Os fotossensibilizadores que se localizam em lisossomos e em membrana plasmática podem induzir tanto necrose, como apoptose (BERG e MOAN, 1997; NOODT et al., 1999; DELLINGER, 1996). Quando o alvo dos compostos fotossensíveis é o complexo de Golgi, a apoptose é o tipo de morte celular predominante após a TFD (MATROULE et al., 2001).

A resposta à TFD é dependente do tipo celular e do fotossensibilizador utilizados, bem como dos protocolos de incubação e de irradiação (DELLINGER, 1996; RANCAN et al., 2005). ZIMMERMANN et al. (2003) observaram que a combinação de quimioterapia com TFD foi aditiva ou antagonista em células LNCaP porém aditiva ou sinérgica em células MCF-7 (linhagem de câncer de mama humano), dependendo do protocolo e concentração do quimioterápico (ZIMMERMANN et al., 2003). Esse mesmo trabalho mostrou que a combinação do quimioterápico seguido de TFD, resultou em efeitos significativos no tratamento de um paciente com carcinoma basocelular múltiplo.

2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a ação fotodinâmica de meso-porfirinas aniônica Fe(III)TPPS₄ e catiônica Fe(III)TMPyP sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato e sobre células de tumor de próstata humano LNCaP.

Os objetivos específicos compreenderam em:

- 1) Analisar os efeitos de ambas porfirinas sobre a respiração mitocondrial, abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e sobre a interação dos fotossensibilizadores com mitocôndrias;
- 2) Investigar os efeitos da irradiação dos compostos no processo de morte de células de tumor de próstata LNCaP, *in vitro*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Meso-porfirinas (Mid Century Chemicals) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marcel Tabak (IQ - USP/SC). Os reagentes utilizados nos experimentos com mitocôndrias isoladas foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Os reagentes utilizados na cultura das células LNCaP foram adquiridos da Gibco/BRL (Invitrogen Corporation), Merck & Co e Cultilab (Campinas, Brasil). Anexina V/FITC foi adquirida do Laboratório de Imunologia (Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil). BAPTA/AM, Fluo-4AM e Ácido Plurônico F-127 foram adquiridos da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

Animais

Para os experimentos com mitocôndrias isoladas, utilizamos fígados de ratos do tipo Wistar, machos, adultos e adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da UNICAMP.

Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos adultos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo SCHNEIDER e HOGEBOM (1951), após jejum de 12 h. O fígado, retirado após a morte do animal por concussão cerebral, foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES pH 7,2 e 0,5 mM de EGTA, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 8000 x g sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em 250 mM de sacarose, 5 mM de HEPES pH 7,2 e 0,3 mM de EGTA, e novamente centrifugado como a condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução sendo que isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 80 mg de proteína por mililitro de suspensão mitocondrial.

Dosagem de proteína

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (GORNALL et al., 1949), modificado pela adição de colato 1% (KAPLAN e PEDERSEN, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% será utilizada como padrão.

Condições experimentais

Os experimentos com mitocôndrias isoladas foram realizados a 28 °C em meio de reação padrão contendo 250 mM de sacarose, 10 mM de HEPES pH 7,2, 2 mM de fosfato de sódio, e 1 mM de cloreto de magnésio. Como substrato respiratório foi utilizado 5 mM de malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato. Nos experimentos de consumo de oxigênio mitocondrial foi utilizado o meio de reação padrão contendo 0,5 mM de EGTA. Outros reagentes adicionados estão indicados nas figuras.

Condições de irradiação

A irradiação foi realizada sob agitação magnética à temperatura constante de 28 °C. Foi utilizado um laser de diodo (ECCO[®] Fibras e Dispositivos LTDA, Campinas, Brasil), que emite irradiação na faixa de comprimento de onda que varia entre 650 a 660 nm. A potência e o tempo de irradiação padronizados foram de 6 mW e de 2 minutos e 45 segundos respectivamente, resultando em uma dose total de 1 J/cm², condição que não provocou efeito significativo nas amostras irradiadas na ausência dos fotossensibilizadores.

Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio por mitocôndrias foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado a um oxígrafo Gilson, em uma câmara de vidro de 1,7 ml equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação é de 225 nmol/ml (ROBINSON e COOPER, 1970).

Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio

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

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

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

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

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

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

onde v representa o volume mitocondrial por mg de proteína, considerado 1,4 μl (Kamo *et al.*, 1979), V o volume do meio de incubação e ΔE o potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de TPP^+ ($[\text{TPP}^+]_{\text{in}}/[\text{TPP}^+]_{\text{ex}}$) através da membrana, sendo que $[\text{TPP}^+]_{\text{ex}}$ refere-se à concentração de TPP^+ no meio de reação. Esta equação é derivada assumindo-se que a distribuição de TPP^+ entre as mitocôndrias e o meio segue a equação de Nernst (MURATSUGU *et al.*, 1977). Entretanto, uma quantidade significativa de TPP^+ se liga às membranas mitocondriais (JENSEN *et al.*, 1986) e os valores de potencial elétrico obtidos foram corrigidos utilizando-se a equação:

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

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

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

Medida de inchamento mitocondrial

As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio, e, qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (NICHOLLS e ÅKERMAN, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a conseqüente diminuição da luz espalhada. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples

para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias são ideais à aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramento de suas pregas. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (MACEDO et al, 1988) foi feito em um espectrofotômetro U-3000. As mitocôndrias de fígado de rato (0,5 mg de proteína/ml) foram incubadas no meio de reação, e os experimentos foram realizados a temperatura de 28° C.

Determinação da constante de associação (K_b)

Os valores de K_b foram calculados aplicando a lei de ação das massas (NASSAR et al., 1997) com algumas modificações (NEPOMUCENO et al., 1999). A determinação das constantes de associação das porfirinas Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP nas membranas mitocondriais, foi realizada com titulação das porfirinas em concentrações fixas (10 μ M), variando a concentração de proteínas mitocondriais (0,1 a 3,5 mg de proteínas/ml). As porfirinas foram adicionadas ao meio de reação contendo 250 mM de sacarose e 10 mM de HEPES pH 7,2, antes das suspensões mitocondriais e as amostras foram incubadas por 20 minutos no escuro, com agitação periódica. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 9000 x g em centrífuga Sanyo Hawk 15/05, a 4 °C e os espectros de absorção óptica das porfirinas livres nos sobrenadantes foram medidos na faixa de comprimento de onda compreendida entre 350 a 700 nm.

Cultura de células

A linhagem celular de tumor de próstata LNCaP cresce por adesão em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato, 4,5 mg/ml de glicose e antibióticos. As células são mantidas em densidades de 20 x 10⁶ células, em incubadora a 37°C sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados durante a fase exponencial de crescimento. As contagens celulares são realizadas em câmara de Neubauer após tripsinização das células com 0,25% de tripsina e 0,03% de EDTA. A viabilidade celular tanto para a manutenção da cultura, como para a padronização das condições experimentais foi determinada pelo método de exclusão pelo corante azul de tripan. Para os

experimentos, as células foram inoculadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro (8×10^5 células/placa) e crescidas durante 48 h, em estufa de CO₂ 5%, a 37 °C. Após esse tempo, os meios foram trocados por meio de cultura com 1% de SFB (para evitar a agregação das porfirinas). Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP, nas doses entre 1 e 50 µM para o experimento de curva dose-resposta ou 10 µM para os experimentos de irradiação, foram adicionadas à cultura, permanecendo outras 48 h em estufa, no escuro, para os experimentos preliminares ou 1 h para os experimentos de irradiação. Após o tratamento prévio com as porfirinas, as células foram irradiadas com laser de diodo, a 6 mW, 1 J/cm² (2 min e 45 s), na presença do meio de cultura, tripsinizadas com 0,25% de tripsina e 0,03% de EDTA e a viabilidade celular foi quantificada em Câmara de Neubauer, pelo método de exclusão por azul de tripan.

Análises por citometria de fluxo

Os experimentos para a análise da morte celular e da concentração de cálcio citosólico [Ca²⁺]_{cit} foram realizados em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson). Para cada amostra foram coletados 10000 eventos e as populações de células LNCaP foram identificadas por suas características de tamanho e granulosidade e analisadas através da intensidade de fluorescência dos marcadores utilizados para cada tipo de experimento.

Análise da viabilidade celular por anexina-V e iodeto de propídeo

Células LNCaP foram incubadas no escuro na presença de 10 µM de porfirinas, durante 1 h. Após esse tempo foram irradiadas, tripsinizadas e centrifugadas a 300 x g por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 1 ml de tampão de ligação, contendo 10 mM de HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂. Para a aquisição das células marcadas positivamente para apoptose, uma alíquota de 100 µl da suspensão celular de cada condição foi tratada com anexina-V na concentração de 1:500, durante 20 min, no escuro. As amostras foram adquiridas em canal de FL-1 do citômetro de fluxo. A aquisição das células marcadas positivamente para necrose foi realizada imediatamente após a adição de 0,2 µg/ml de iodeto de propídeo, sendo adquiridas em canal de FL-2 do citômetro de fluxo. Nos

experimentos cujo objetivo foi avaliar se o processo de morte celular induzido pela irradiação das porfirinas estava ocorrendo via aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$, foi adicionado previamente às culturas de células, num tempo de incubação de 40 minutos, 10 μ M de BAPTA/AM, um composto quelante do íon Ca^{2+} citosólico.

Medida da $[Ca^{2+}]_{cit}$

O experimento de medida da $[Ca^{2+}]_{cit}$ foi realizado com o objetivo de verificar se as mortes das células LNCaP tratadas com porfirinas estão ou não diretamente ligadas ao aumento da concentração deste cátion. As células LNCaP foram tratadas nas mesmas condições do experimento de anexina-V e iodeto de propídeo, com uma modificação que foi a retirada do EDTA nas soluções de tripsina. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 1 ml de RPMI 1640 “ Ca^{2+} free”. Após adição de BSA, ácido plurônico e o Fluo-4AM, as suspensões celulares foram incubadas durante 40 min, em estufa de CO_2 . Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas em centrífuga de “Eppendorf”, a 300 x g por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram novamente ressuspensas em 1 ml de RPMI 1640 “ Ca^{2+} free” e as amostras adquiridas imediatamente em canal de FL-1 de citômetro de fluxo.

Análise estatística

Os resultados mostrados nas figuras 11 a 14 e 17 a 23 representam a média \pm desvio do erro da média (SEM) de pelo menos três experimentos realizados em triplicata. As figuras 15 e 16 são representativas de pelo menos três experimentos. Para comparação foi utilizado o teste *t* de Student pareado, considerando o nível de significância quando $p < 0,05$ (*) e $p < 0,005$ (** ou §). Análise estatística foi realizada utilizando o software SYSTAT 5.03 para Windows (SYSTAT, Inc, Evanston, IL, USA).

4- RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados em duas partes, cada qual contendo os experimentos relativos aos seus objetivos específicos.

PARTE I- AÇÃO FOTODINÂMICA DE MESO-PORFIRINAS ANIÔNICA Fe(III)TPPS₄ E CATIÔNICA Fe(III)TMPyP SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Efeito de meso-porfirinas no escuro, sobre a respiração mitocondrial

Antes de iniciarmos os experimentos de irradiação, realizamos estudos de dose-efeito das porfirinas sobre o controle respiratório mitocondrial, no escuro.

Os resultados apresentados na fig. 11 mostram que as porfirinas aniônica e catiônica diminuíram o controle respiratório de maneira dose-dependente. A condição que diminuiu em 50% o C.R. (EC₅₀) foi observado com uma dose de 9,26 μM para a Fe(III)TMPyP e de 78,84 μM para a Fe(III)TPPS₄ (fig. 11).

Observamos nas figs. 12A e B que as porfirinas catiônica e aniônica, respectivamente, aumentaram a velocidade do estado respiratório IV de maneira dose-dependente. O efeito sobre a respiração de estado III foi de aumento até uma dose de 15 μM para a porfirina catiônica, enquanto que a aniônica provocou efeito semelhante até a dose de 50 μM. A partir destas concentrações, as duas porfirinas induziram diminuição significativa da respiração de estado III. O efeito mínimo das porfirinas sobre o consumo de O₂ mitocondrial (<5% em relação aos valores dos controles) foi determinado para a concentração de 1 μM, para ambas porfirinas.

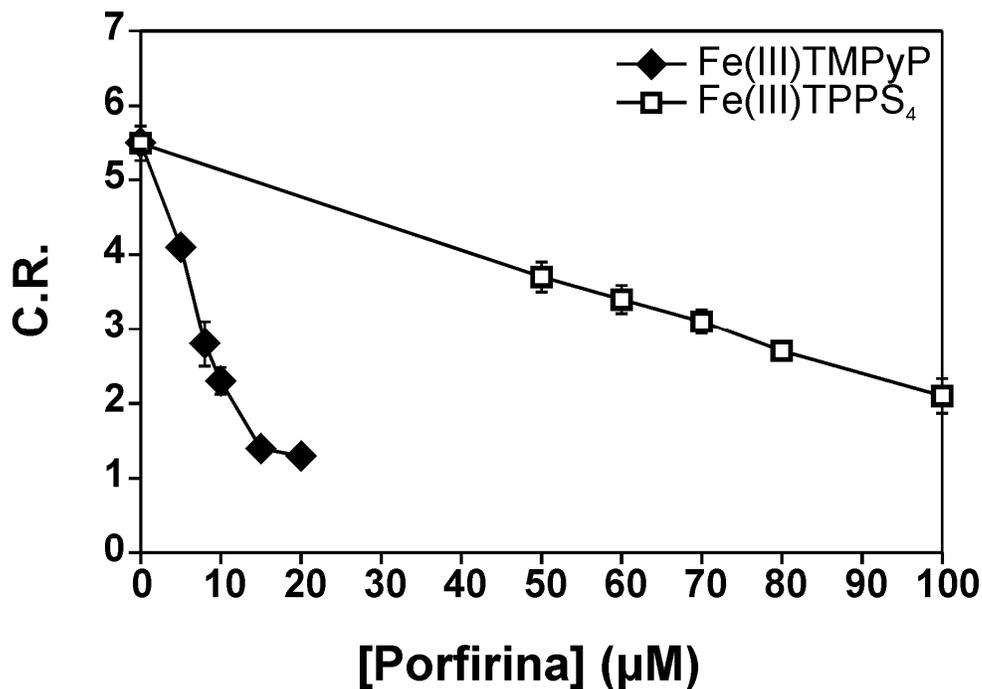


Figura 11- Curva dose-resposta das porfirinas Fe(III)TMPyP (◆) e Fe(III)TPPS₄ (□) no controle respiratório mitocondrial (C.R.), no escuro. MFR (1 mg/ml) foram incubadas por 15 min em meio de reação padrão contendo 5 mM de substratos que energizam o complexo I (malato, piruvato, α -cetogluturato e glutamato), na presença de concentrações crescentes de porfirinas. A respiração mitocondrial de fosforilação (estado 3) foi iniciado pela adição de 150 μ M de ADP. Dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata \pm SEM.

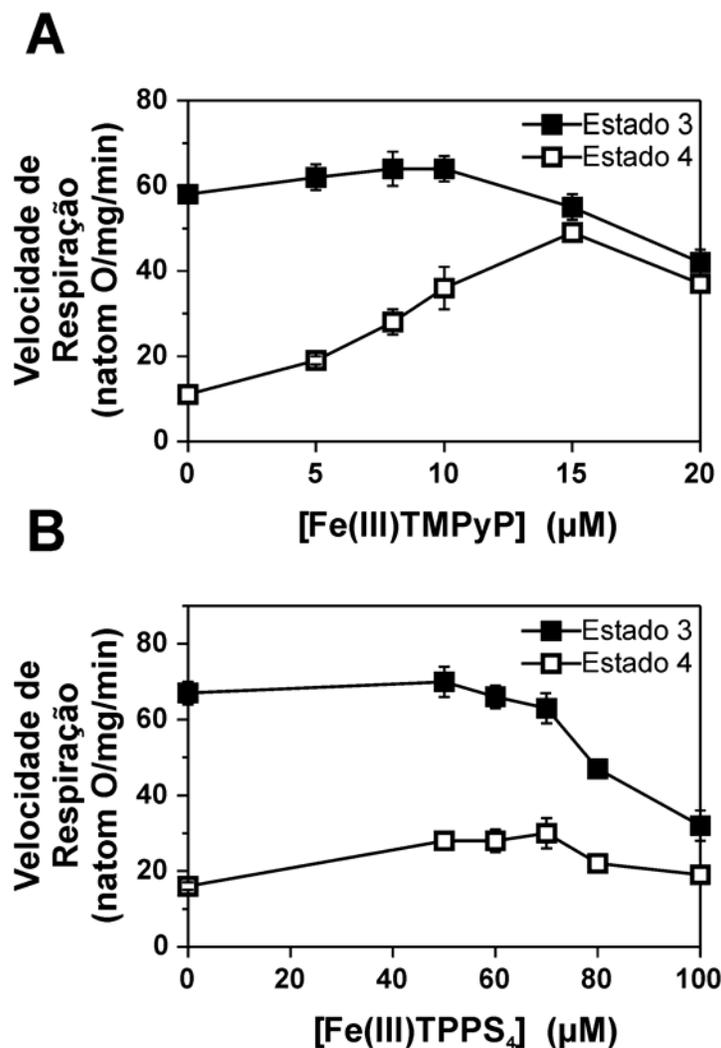


Figura 12- Curva dose-resposta das porfirinas Fe(III)TMPyP e Fe(III)TPPS₄ nas velocidades de respiração mitocondrial dos estados 3 (◆) e 4 (□), no escuro. As velocidades de respiração (natom O/mg/min) foram calculadas de acordo com o experimento da Fig.11. **Painel A:** Fe(III)TMPyP. **Painel B:** Fe(III)TPPS₄. Dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata ± SEM.

Efeito da irradiação de MFR na presença de meso-porfirinas, sobre o controle respiratório mitocondrial (C.R.)

Os experimentos de irradiação foram realizados com a concentração das porfirinas que exerceram o mínimo efeito nas mitocôndrias, no escuro (1 μM). A condição de irradiação (potência e dose) que não provocou efeito algum na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial na ausência do fotossensibilizador, foi de 6 mW e 1 J/cm^2 , respectivamente.

O laser utilizado nos nossos experimentos (Laser Biomodulador ECCO[®] Fibras e Dispositivos LTDA.) fornece automaticamente o tempo de irradiação, sendo preciso programar a potência e a dose a ser aplicada, como descrito na fórmula abaixo:

$$D = P \times \text{Tempo}$$

$$D = \text{dose: } 1 \text{ J}/\text{cm}^2$$

$$1 = 6 \times 10^{-3} \times \text{Tempo}$$

$$\text{Tempo} = 2 \text{ min } 46 \text{ s}$$

$$P = \text{potência: } 6 \text{ mW}$$

As amostras foram irradiadas nas cubetas dos próprios equipamentos, a 28 °C, com circulação de O_2 e protegidas da luz ambiente por um anteparo escuro. Terminado o tempo de irradiação, o oxígrafo foi vedado para o registro da quantidade exata de nátomos de O_2 presente nas condições do experimento. A respiração foi então iniciada pela adição dos substratos.

A irradiação de MFR na presença de 1 μM de Fe(III)TMPyP diminuiu o C.R. em 28%, enquanto que esse efeito nas amostras não-irradiadas foi de apenas 3% (fig. 13, painel A). Com isso, esses dados mostram que a irradiação estimulou em quase 10 vezes a ação da Fe(III)TMPyP.

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é uma das possíveis EROs produzidas pela ação fotodinâmica (ATHAR et al., 1988). Como se sabe que o tempo de meia-vida do $^1\text{O}_2$ é maior em água deuterada (D_2O), repetimos o experimento anterior porém utilizando um meio de reação padrão contendo 90% de D_2O . Nessas condições, a ação da Fe(III)TMPyP no C.R. mitocondrial foi estimulado em mais 10% quando comparado aos experimentos de

irradiação na presença desta porfirimina e sem D₂O (fig. 13, painel A). A irradiação da suspensão mitocondrial incubada na presença de 1 μM de Fe(III)TPPS₄ não provocou efeito algum tanto na ausência, como na presença de D₂O (fig. 13, painel B).

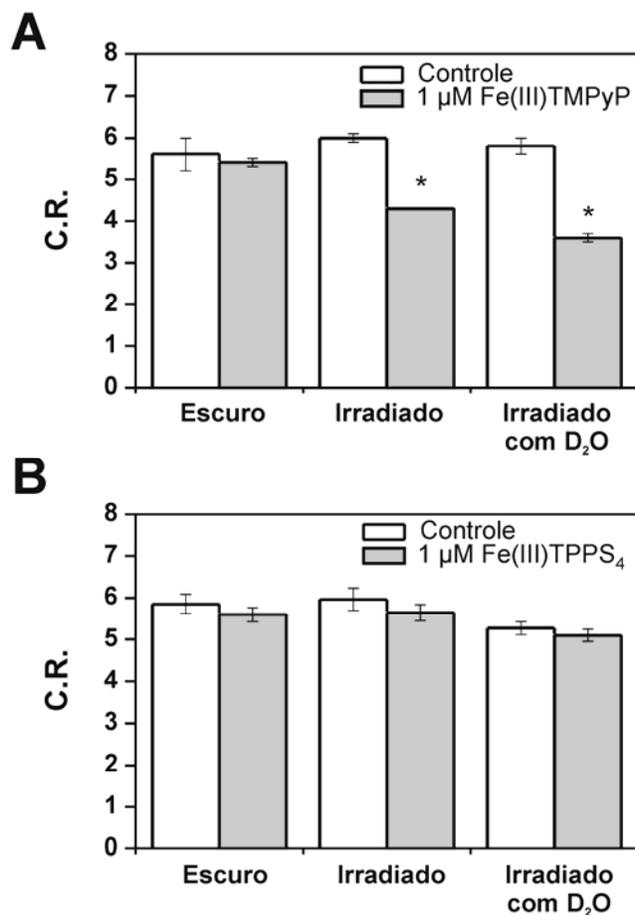


Figura 13- Controle respiratório (C.R.) de mitocôndrias irradiadas na presença de Fe(III)TMPyP (A) e de Fe(III)TPPS₄ (B). MFR (1 mg/ml) foram irradiadas em meio de reação padrão, de acordo com as condições da Fig. 11. **Painel A:** Fe(III)TMPyP. **Painel B:** Fe(III)TPPS₄. Dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata ± SEM. *MFR tratadas com porfirinas vs controle, $p < 0,005$.

Fe(III)TMPyP, mas não Fe(III)TPPS₄, induziu Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) na presença de Ca²⁺

Uma vez que Fe(III)TMPyP induziu TPM em altas doses e no escuro (NEPOMUCENO et al., 2002), o efeito da irradiação em baixas concentrações dessa e também da porfirina aniônica Fe(III)TPPS₄ foi analisado através do monitoramento da produção de EROs, das alterações do $\Delta\Psi_m$ e do inchamento mitocondrial. A produção de EROs pelas suspensões mitocondriais foi analisada utilizando o marcador fluorescente e permeável à membrana diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCFDA; GARCIA-RUIZ et al., 1997). A produção de EROs pelas mitocôndrias tanto na presença como na ausência das porfirinas no escuro, foi insignificante (fig. 12; Fe(III)TMPyP). Porém, ambas porfirinas após irradiação ou, na presença de Ca²⁺ no escuro, aumentaram a produção de EROs mitocondrial (fig. 14; ambas porfirinas; irradiação ou Ca²⁺). O efeito da irradiação e do Ca²⁺ foi aditivo (fig. 14; ambas porfirinas; irradiação + Ca²⁺). Ciclosporina A (CsA), um inibidor clássico do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), diminuiu de maneira significativa a produção de EROS e este efeito ocorreu apenas quando as suspensões mitocondriais foram tratadas com a porfirina catiônica, sendo as amostras irradiadas ou não (fig. 14; Fe(III)TMPyP; irradiação + Ca²⁺ + CsA ou Ca²⁺ + CsA). Um vez que Fe(III)TMPyP induziu um efeito importante na produção de EROs mitocondrial, a possível capacidade deste composto em ser um “indutor” de TPM foi analisada nos experimentos de $\Delta\Psi_m$ e de inchamento mitocondrial, como vistos nas figs. 15 e 16, respectivamente. Foi observado que a porfirina na forma catiônica Fe(III)TMPyP porém não a na forma aniônica Fe(III)TPPS₄, induziu eliminação do $\Delta\Psi_m$ (fig. 15) e inchamento mitocondrial (fig. 16) sensíveis ao inibidor do PTPM, CsA e somente após a irradiação e na presença de Ca²⁺.

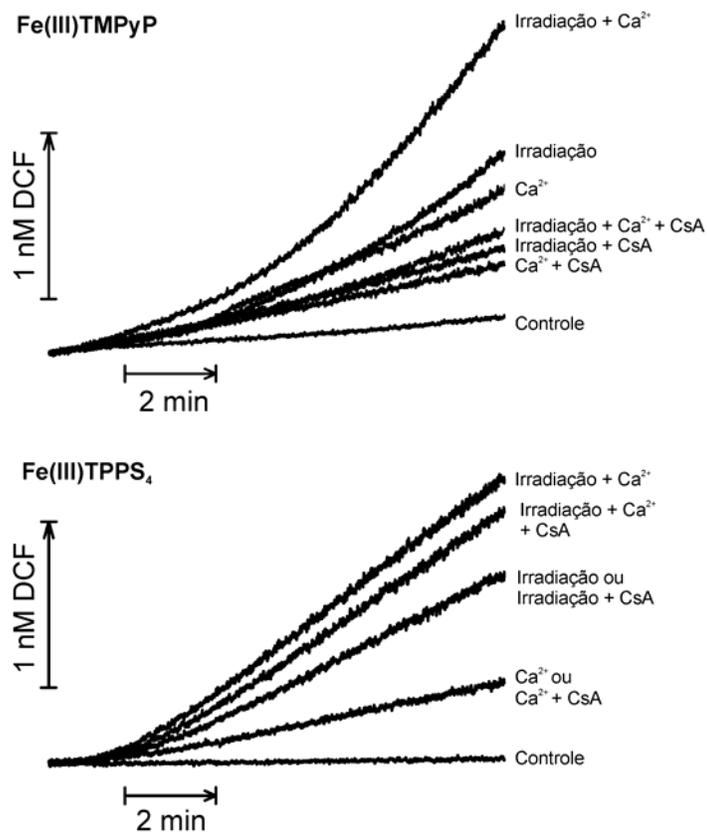


Figura 14- Geração de EROs mitocondrial na presença ou ausência das porfirinas.

MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão, na presença ou ausência de 1 μM de Fe(III)TMPyP (A) ou 1 μM de Fe(III)TPPS₄ (B) mais 50 μM de Ca²⁺, 1 μM de CsA, e irradiadas de acordo com as condições da Fig. 13, na ausência de EGTA. Dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata \pm SEM. **Painel A:** as velocidades de produção de DCF (em nmol/mg/min; 10 min de experimento) foram: 0,083 \pm 0,005 (controle), 0,204 \pm 0,021 (Ca²⁺), 0,126 \pm 0,002 (Ca²⁺ + CsA), 0,302 \pm 0,021 (irradiação), 0,144 \pm 0,01 (irradiação + CsA), 0,487 \pm 0,023 (irradiação + Ca²⁺), 0,164 \pm 0,01 (irradiação + Ca²⁺ + CsA). * “irradiação + Ca²⁺” vs “irradiação + Ca²⁺ + CsA”, $p < 0,005$. **Painel B:** as velocidades de produção de DCF (em nmol/mg/min; 10 min de experimento) foram: 0,080 \pm 0,020 (controle), 0,143 \pm 0,004 (Ca²⁺ ou Ca²⁺ + CsA), 0,235 \pm 0,01 (irradiação ou irradiação + CsA), 0,330 \pm 0,003 (irradiação + Ca²⁺), 0,290 \pm 0,002 (irradiação + Ca²⁺ + CsA). * “irradiação + Ca²⁺” vs “irradiação + Ca²⁺ + CsA”, $p > 0,05$.

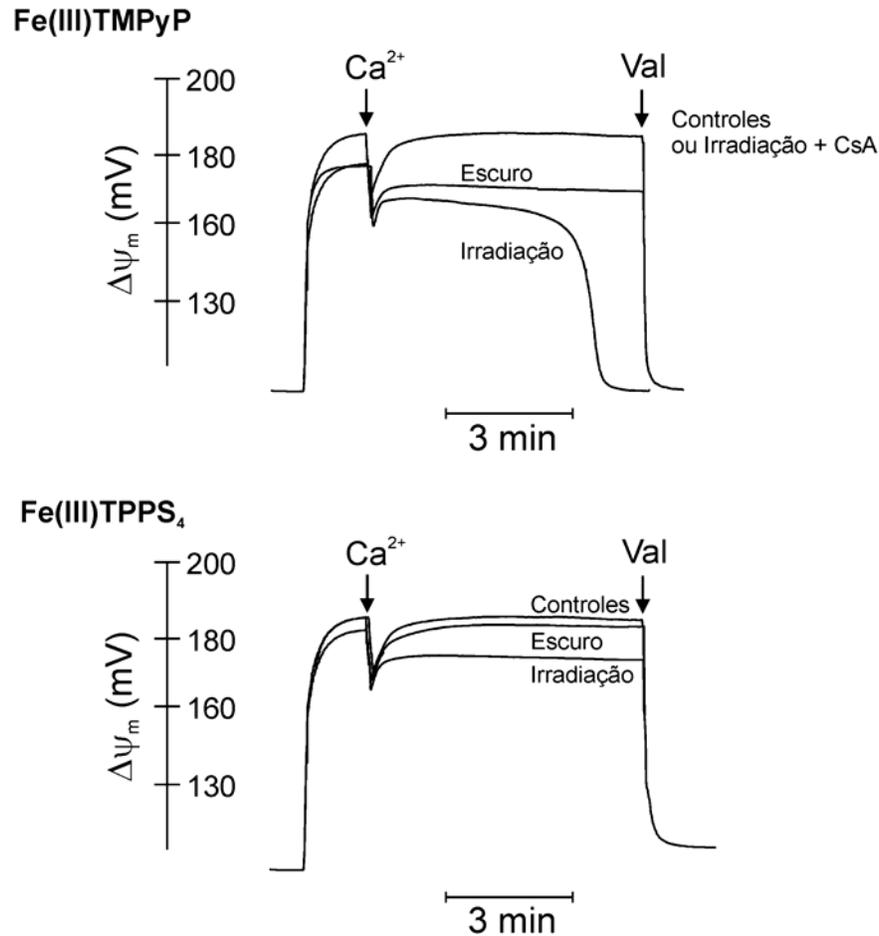


Figura 15- Irradiação de MFR na presença de Fe(III)TMPyP, mas não de Fe(III)TPPS₄, promoveu eliminação do $\Delta\Psi_m$ sensível à CsA. MFR (1 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão, na presença ou ausência de 1 μ M de Fe(III)TMPyP (A) ou 1 μ M de Fe(III)TPPS₄ (B) e irradiadas de acordo com as condições da Fig. 14, na presença de TPP⁺. O $\Delta\Psi_m$ foi colapsado pela adição de 0,06 μ g/ml de valinomicina. Os controles representam MFR na ausência de fotossensibilizadores, irradiadas ou não. As demais condições estão descritas nas figuras. Dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em duplicata.

O processo de captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias ocorre em função do $\Delta\Psi_m$. Com isso, a queda do $\Delta\Psi_m$ observada após a adição de $50\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} nas suspensões mitocondriais controle, ou seja, nas amostras que não foram irradiadas, na ausência e na presença das porfirinas e nas amostras que foram irradiadas na ausência dos compostos fotossensíveis, foi recuperado e somente colapsado após adição do desacoplador valinomicina (Fig. 15). Porém, quando as suspensões mitocondriais foram incubadas na presença da porfirina catiônica e irradiadas, ocorreu perda irreversível do $\Delta\Psi_m$ após a adição de Ca^{2+} , evento que foi inibido quando as amostras foram incubadas previamente com $1\ \mu\text{M}$ de CsA.

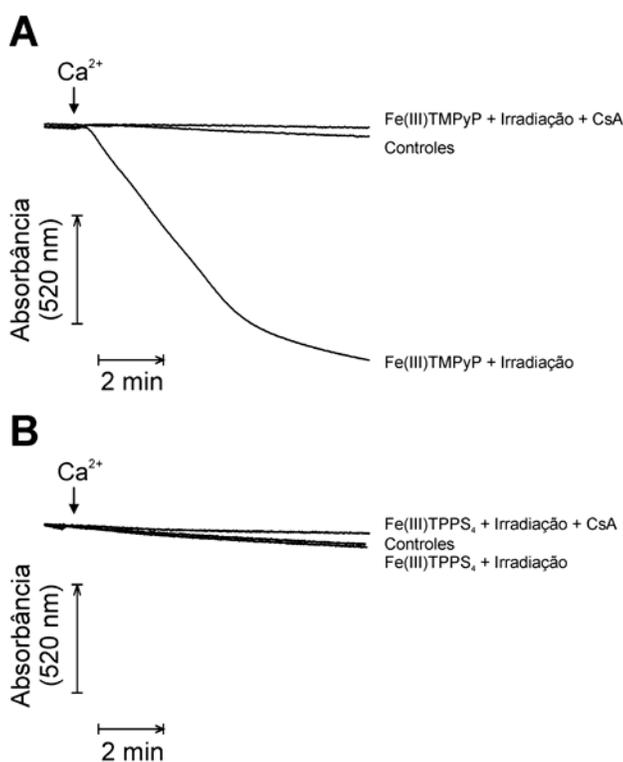


Figura 16- Irradiação de MFR na presença de Fe(III)TMPyP, mas não de Fe(III)TPPS₄, promoveu inchamento mitocondrial sensível à CsA. MFR (1 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão, na presença ou ausência de $1\ \mu\text{M}$ de Fe(III)TMPyP (A) ou $1\ \mu\text{M}$ de Fe(III)TPPS₄ (B) e irradiadas de acordo com as condições da Fig. 14. Os controles representam as suspensões mitocondriais contendo porfirinas \pm irradiação ou \pm Ca^{2+} , sem a combinação de irradiação + Ca^{2+} . Dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em duplicata.

Da mesma maneira como observado no experimento de $\Delta\Psi_m$ (Fig. 15), apenas as mitocôndrias tratadas e irradiadas na presença de Fe(III)TMPyP apresentaram o fenômeno de TPM, caracterizado pela permeabilização da membrana interna ao suporte osmótico e H₂O, inchando e provavelmente, sofrendo ruptura da membrana externa (Fig. 16). Este evento foi sensível ao inibidor do PTPM, CsA o que caracterizou o processo de TPM.

Constante de associação (K_b) das meso-porfirinas com membranas de mitocôndrias isoladas

A estrutura porfirica pode favorecer a associação dos fotossensibilizadores com membranas biológicas (WOODBURN et al., 2001). Com o objetivo de avaliar se a capacidade de associação das porfirinas catiônica e aniônica com a membrana mitocondrial foi responsável pelos diferentes resultados obtidos com esses compostos de cargas opostas, foi determinado a constante de associação das porfirinas com as mitocôndrias (Fig 17).

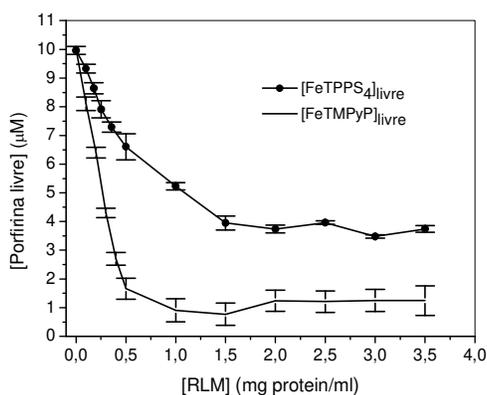


Figura 17- Determinação da constante de associação (K_b) de Fe(III)TPPS₄ (●) e de Fe(III)TMPyP (■) com mitocôndrias. MFR (0,5 a 3,5 mg de proteína/ml) foram incubadas em meio de reação padrão, na presença de porfirinas (10 µM) e os espectros de absorção ópticos dos sobrenadantes (porfirinas livres) foram adquiridos na faixa de comprimento de onda compreendido entre 350 – 700 nm. Os valores de K_b calculados foram de $12,9 \pm 2,17$ para Fe(III)TMPyP e de $1,15 \pm 0,4$ para Fe(III)TPPS₄.

O valor de K_b determinado para a Fe(III)TMPyP (12,9) foi 11 vezes maior que o valor determinado para a Fe(III)TPPS₄ (1,15), o que corrobora com os resultados obtidos e apresentados anteriormente e sugerindo que somente a porfirina catiônica estaria exercendo efeitos deletérios importantes sobre as funções mitocondriais, devido a maior associação com membranas desta organela. Para comprovar experimentalmente se a associação 11 vezes maior da Fe(III)TMPyP com as mitocôndrias é devido à interação eletrostática entre ambos (composto com predominância de carga positiva e matriz, de carga negativa), foi realizado o mesmo experimento de K_b porém, com suspensão de mitocôndrias desacopladas com 1 μ M de FCCP e observou-se que nessa condição, o valor K_b da Fe(III)TMPyP com as mitocôndrias diminuiu pela metade (5,1). Nenhum efeito significativo no valor de K_b foi encontrado para as amostras de mitocôndrias desacopladas e incubadas na presença da Fe(III)TPPS₄.

PARTE II- AÇÃO FOTODINÂMICA DE MESO-PORFIRINAS ANIÔNICA Fe(III)TPPS₄ E CATIÔNICA Fe(III)TMPyP SOBRE VIABILIDADE DE CÉLULAS LNCAP

Efeito de meso-porfirinas Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP sobre a viabilidade das células LNCaP, no escuro - método do azul de tripan -

Células de tumor de próstata humano LNCaP, foram inoculadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro (8×10^5 células/placa) e crescidas durante 48 h, em estufa de CO₂ 5%, a 37 °C. Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP (1 a 50 μ M) foram adicionadas à cultura, permanecendo outras 48 h em estufa, no escuro. Após esse tempo as células foram tripsinizadas com 0,25% de tripsina e 0,03% de EDTA e a viabilidade celular foi quantificada em Câmara de Neubauer, pelo método de exclusão por azul de tripan. Os resultados mostraram que a viabilidade das culturas celulares na presença de 1, 10, 20, 35 e 50 μ M de Fe(III)TPPS₄ apresentou uma diminuição significativa em relação ao controle (células não tratadas com a porfirina) passando de 75% da cultura controle para 60, 50, 30, 37 e 27%, respectivamente (fig. 18).

A viabilidade das culturas de células incubadas nas concentrações de Fe(III)TMPyP descritas acima apresentou também uma queda significativa, diminuindo de 75% para 58, 43, 26, 24 e 25%, respectivamente (fig. 18).

Os resultados demonstrados na fig. 18 mostram que a citotoxicidade de ambas porfirinas nas concentrações entre 10 e 50 μM e após 48 h de incubação no escuro é significativamente alta. Foram realizados outros experimentos de curva de dose e de tempo de incubação e a condição ideal encontrada para analisarmos os efeitos da irradiação das células tumorais é de 10 μM de porfirinas e 1 h de incubação no escuro.

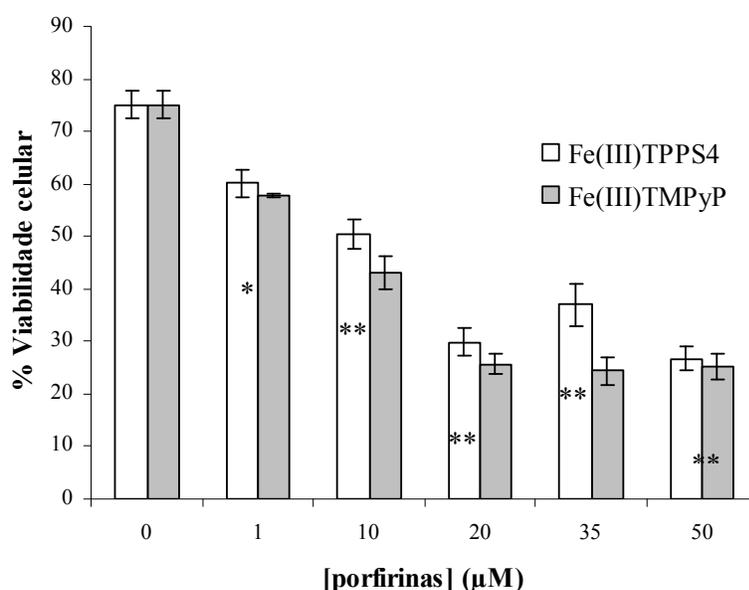


Figura 18- Efeito de 0, 1, 10, 20, 35 e 50 μM de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP na viabilidade de células LNCaP, após 48 horas de incubação no escuro. Células de tumor de próstata LNCaP foram plaqueadas a 8×10^6 células/placa em meio RPMI suplementado e incubadas em estufa a 37°C e CO₂ 5%. Doses crescentes de Fe(III)TPPS₄ e de Fe(III)TMPyP foram adicionados ao meio de cultura novo, após 48 h de crescimento celular. A viabilidade celular foi quantificada após outras 48 h de incubação, no escuro. Dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata \pm SEM. Para comparação (controle vs tratado com ambas porfirinas) foi aplicado o teste *t*

de Student, considerando as diferenças significativas (*) para $p < 0,05$ e (**) para $p < 0,005$.

Com isso, diminuimos o tempo de incubação no escuro de 4 para 1 h e os próximos experimentos mostram que esta é a condição experimental ideal para analisarmos a morte celular por citometria de fluxo.

Efeito da irradiação de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP sobre a viabilidade das células LNCaP – método do azul de tripan –

Células LNCaP foram inoculadas de acordo com o experimento anterior porém, após as 48 h de crescimento, os meios de cultura foram trocados com meios contendo 10 μ M das porfirinas, permanecendo 1 h incubadas, no escuro. Após esse tempo, as células foram irradiadas, tripsinizadas e analisadas pelo método do azul de tripan.

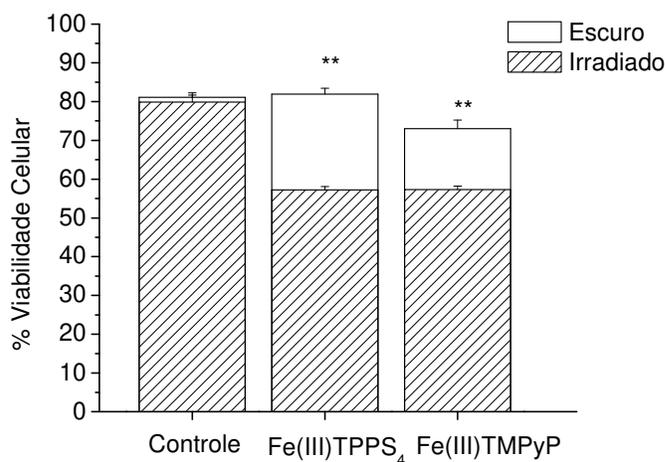


Figura 19- Viabilidade celular na ausência (controle) ou na presença de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP. LNCaP foram plaqueadas de acordo com as condições da Fig. 18 e tratadas com 10 μ M de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP. Após 1 h de incubação no escuro, as amostras foram irradiadas e a morte celular quantificada por azul de tripan. Os valores são dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata \pm SEM. Para comparação (tratado com porfirina no escuro vs tratado com porfirina e

irradiado) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (**) para $p < 0,005$.

Efeito da irradiação de 10 μM de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP sobre a morte celular

– método da anexina V-FITC e iodeto de propídeo -

Células LNCaP foram incubadas no escuro com 10 μM de porfirinas, durante 1 h e após esse tempo, foram irradiadas, tripsinizadas e centrifugadas a 300 x g por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e os “pellets” ressuspensos em 1 ml de tampão de ligação. Para a aquisição das células marcadas positivamente para apoptose, uma alíquota de 100 μl da suspensão celular de cada condição foi tratada com anexina-V, durante 20 min, no escuro. A aquisição das células marcadas positivamente para necrose foi realizada imediatamente após a adição de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de iodeto de propídeo.

Os resultados mostraram que a irradiação na presença de Fe(III)TPPS₄ e de Fe(III)TMPyP induziu a morte de 33 e de 43% das células LNCaP, respectivamente. Desse total, 7% das células tratadas com Fe(III)TPPS₄ morreram por apoptose e 26%, por necrose, enquanto que 14% das células tratadas com Fe(III)TMPyP morreram por apoptose e 29%, por necrose (fig. 20, painéis A e B). Não observamos morte via apoptose das células que foram somente irradiadas, bem como após 1 h de incubação das células na presença das porfirinas, no escuro. Porém, esta última condição inviabilizou as células por necrose em 12 e 14%, na presença de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP, respectivamente (fig. 20, painel B).

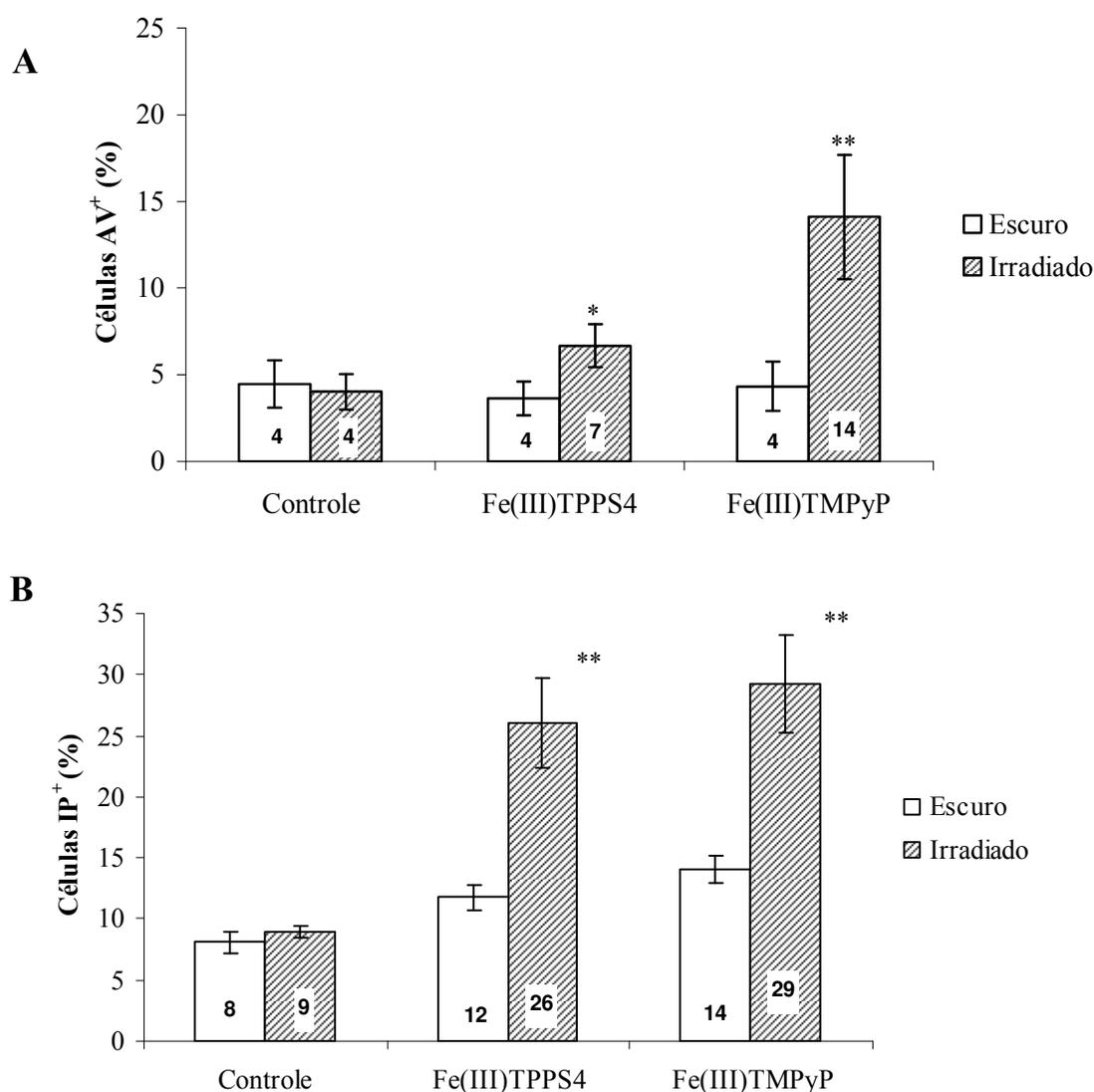


Figura 20- Morte celular na ausência (controle) ou na presença de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP. LNCaP foram plaqueadas de acordo com as condições da fig. 19 e tratadas com 10 μ M de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP. Após 1 h de incubação no escuro, as amostras foram irradiadas e a morte celular quantificada por citometria de fluxo, pelo método da anexina V-FITC e iodeto de propídeo. **Painel A:** apoptose. **Painel B:** necrose. Os valores são dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata \pm SEM. Para comparação (tratado com porfirina no escuro vs tratado com porfirina e irradiado) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (*) para $p < 0,05$ e (**) para $p < 0,005$.

Efeito da irradiação de meso-porfirinas Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP no aumento da concentração do Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_{cit})

Realizamos o experimento de medida da [Ca²⁺]_{cit} com o objetivo de verificar se as mortes das células LNCaP tratadas com porfirinas estão ou não diretamente ligadas ao aumento da concentração deste cátion. As células LNCaP foram tratadas nas mesmas condições do experimento de anexina-V e iodeto de propídeo. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 1 ml de RPMI 1640 “Ca²⁺ free”. Após adição de BSA, ácido plurônico e o Fluo-4/AM, as suspensões celulares ficaram durante 40 min incubadas em estufa de CO₂. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas em centrífuga de “eppendorf”, a 300 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células novamente ressuspensas em 1 ml de RPMI 1640 “Ca²⁺ free”. As amostras foram adquiridas imediatamente em canal de FL-1 do citômetro de fluxo.

Os resultados da fig. 21 mostram um aumento significativo da [Ca²⁺]_{cit} das células irradiadas na presença das porfirinas e este aumento é um pouco maior nas células tratadas com Fe(III)TPPS₄ (280% maior quando comparado às células tratadas com a porfirina, no escuro), enquanto que as células tratadas e irradiadas na presença de Fe(III)TMPyP apresentou um aumento de 223% na [Ca²⁺]_{cit} quando comparado à esta condição, no escuro. A porfirina aniônica aumentou a [Ca²⁺]_{cit} de maneira significativa, antes mesmo da irradiação (aumento de 197% quando comparado às células controle não irradiadas). Podemos concluir que ambas porfirinas aumentam de maneira significativa a [Ca²⁺]_{cit} após a irradiação e os efeitos mais importantes foram alcançados pela Fe(III)TPPS₄.

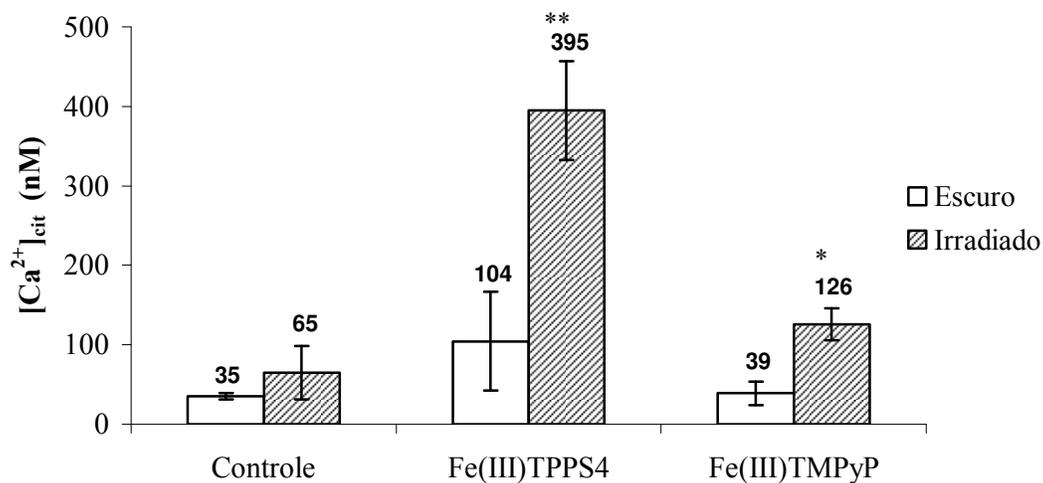


Figura 21- Medida da $[Ca^{2+}]_{cit}$ na ausência (controle) ou na presença de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP. Células de tumor de próstata LNCaP foram plaqueadas e tratadas conforme as condições da fig. 19. Em seguida, as amostras foram irradiadas e a $[Ca^{2+}]_{cit}$ quantificada por citometria de fluxo, utilizando-se o composto fluorescente e permeável à membrana Fluo-4/AM. Os valores são dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata \pm SEM. Para comparação (tratado com porfirina no escuro vs tratado com porfirina e irradiado) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (*) para $p < 0,05$ e (**) para $p < 0,005$.

A inviabilidade das células LNCaP induzida pela irradiação na presença de Fe(III)TPPS₄ e de Fe(III)TMPyP é via aumento da [Ca²⁺]_{cit}

Para tentarmos responder se a morte celular nessas condições está sendo ou não mediada pelo aumento da [Ca²⁺]_{cit}, nos próximos experimentos de morte celular por anexina V-FITC e iodeto de propídeo, foi testado o quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA/AM (fig. 22). Os experimentos foram realizados conforme padronizado, porém foi adicionado previamente às adições das porfirinas, 10 µM de BAPTA/AM (composto quelante do íon Ca²⁺ citosólico). Após incubação de 40 minutos para a captação do composto pelas células, foi adicionado aos meios de cultura, 10 µM de Fe(III)TMPyP e de Fe(III)TPPS₄, e após incubação de 1 h no escuro, as células foram irradiadas, conforme já descrito.

A adição do BAPTA/AM inibiu de maneira significativa as mortes das células irradiadas tanto na presença de Fe(III)TPPS₄, como de Fe(III)TMPyP, indicando que os processos de mortes das células tumorais após TFD provavelmente ocorreram via aumento da [Ca²⁺]_{cit}. Vários trabalhos correlacionam os efeitos anti-tumorais de certos compostos fotossensíveis, com aumento da concentração citosólica do íon Ca²⁺ (TAJIRI et al., 1998; GRANVILLE et al., 2001; ZHOU et al., 2003. DING et al., 2004), indicando que a localização de certos compostos fotossensíveis no retículo endoplasmático (RE) pode causar danos importantes na organela, como por exemplo a degradação da SERCA₂, o que pode impedir o processo de captação de Ca²⁺ pelo RE.

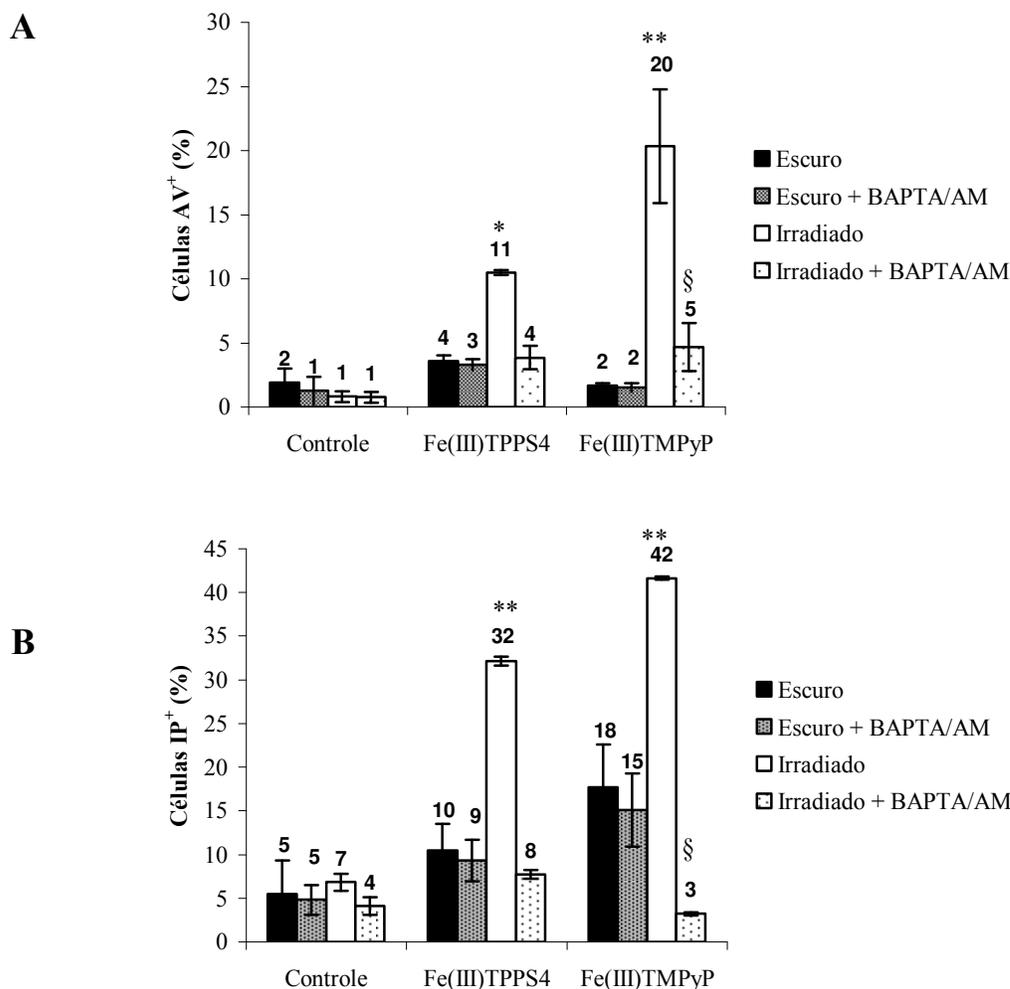


Figura 22- BAPTA/AM inibiu morte de células LNCaP irradiadas na presença de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP. LNCaP foram plaqueadas conforme as condições da fig. 19 e tratadas com 10 μ M de BAPTA/AM por 40 min. Após esse tempo, 10 μ M de Fe(III)TPPS₄ e de Fe(III)TMPyP foram adicionados aos meios de cultura, permanecendo mais 1 h de incubação no escuro; após esse tratamento, as amostras foram irradiadas e a morte celular quantificada por citometria de fluxo, pelo método da anexina V-FITC e iodeto de propídeo. **Painel A:** apoptose. **Painel B:** necrose. Os valores são dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata \pm SEM. Para comparação (irradiado vs irradiado + CsA) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (*) para $p < 0,05$ e (**) ou (§) para $p < 0,005$.

Ciclosporina A preveniu a morte das células LNCaP tratadas e irradiadas na presença de Fe(III)TPPS₄ e de Fe(III)TMPyP

Com o objetivo de analisarmos se os processos de morte celular estariam ocorrendo via mecanismo de abertura do PTPM, testamos o inibidor clássico do poro, ciclosporina A (CsA). Células LNCaP foram tratadas como já descrito no experimento da Fig. 19 porém, foi adicionado previamente às porfirinas, 1 μ M de CsA.

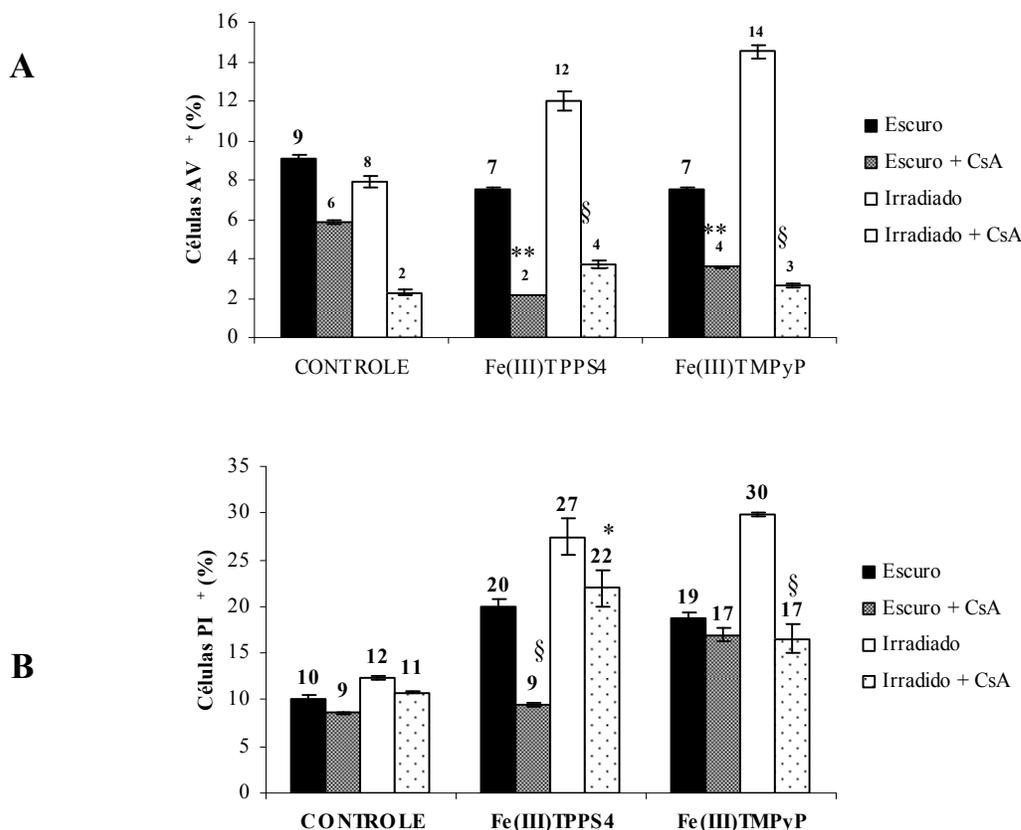


Figura 23- CsA inibiu morte de células LNCaP irradiadas na presença de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP. LNCaP foram plaqueadas conforme as condições da fig. 19 e tratadas com 1 μ M de CsA, antes da adição de 10 μ M de Fe(III)TPPS₄ e de Fe(III)TMPyP. Após incubação no escuro e por 1 h, as amostras foram irradiadas e a morte celular quantificada por citometria de fluxo, pelo método da anexina V-FITC e iodeto de propídeo. **Painel A:** apoptose. **Painel B:** necrose. Os valores são dados representativos de no mínimo três experimentos independentes, em triplicata \pm SEM. Para comparação (tratado com porfirina no escuro vs tratado com porfirina no escuro + CsA e irradiado vs irradiado + CsA) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (*) para $p < 0,05$ e (**) ou (§) para $p < 0,005$.

A CsA preveniu significativamente ambos tipos de morte celular que ocorreram após o processo fotodinâmico (fig. 23, painéis A e B). A condição que apresentou efeito mais expressivo da CsA foi na condição na qual inibiu a morte celular por apoptose (fig. 23, painel A). Nessa condição, todas as comparações apresentaram $p < 0,005$.

5- DISCUSSÃO

A eficiência dos fotossensibilizadores depende da capacidade de serem ativados em baixas doses e após a irradiação. Nesse trabalho, foram estabelecidas condições experimentais nas quais porfirinas irradiadas exerceram efeitos significativos nas funções de mitocôndrias isoladas e na viabilidade de células tumorais *in vitro*, em baixas concentrações (1 e 10 μM , respectivamente). Primeiramente, foram realizados experimentos para se determinar os efeitos dose-dependente das porfirinas catiônica Fe(III)TMPyP e aniônica Fe(III)TPPS₄ sobre a respiração mitocondrial, no escuro. A condição que diminuiu em 50% o C.R. (EC₅₀) foi observado com uma dose de 9,26 μM para a Fe(III)TMPyP e de 78,84 μM para a Fe(III)TPPS₄. (fig. 11), indicando que a porfirina catiônica é muito mais tóxica para a mitocôndria, que a aniônica. Essa diminuição do C.R. apresenta dois componentes: primeiramente, um aumento progressivo na velocidade de consumo de O₂ mitocondrial no estado 4 (não-fosforilante) nas concentrações próximas dos EC₅₀ de ambas porfirinas (fig. 12). O efeito desacoplador causado por Fe(III)TMPyP foi maior que o provocado por Fe(III)TPPS₄. Em outro ponto, a velocidade de respiração no estado 3 (fosforilante) foi gradualmente inibido (fig. 12) em concentrações acima dos EC₅₀ das respectivas porfirinas. Uma diminuição similar no consumo de O₂ no estado 4 foi induzido por outras porfirinas, na mesma faixa de concentração apresentada neste trabalho e os autores interpretaram os resultados como sendo uma conseqüência da desorganização dos componentes da cadeia de transporte de elétrons (RICCHELLI et al., 2005). A irradiação potencializou a ação de Fe(III)TMPyP na respiração mitocondrial em cerca de 10 vezes, numa dose que apresentou o mínimo de efeito no escuro (fig. 13, painel A). Nenhum efeito da irradiação foi observado quando a porfirina testada foi a Fe(III)TPPS₄ (Fig 13, painel B).

Considerando que apenas a irradiação da porfirina catiônica provocou uma queda significativa do C.R., os próximos experimentos foram realizados em meio de reação padrão contendo 90% de D₂O onde se observou que, em comparação ao experimento realizado em meio sem D₂O, o C.R. diminuiu de 28 para 38%, indicando que dentre as EROs geradas no processo fotodinâmico da Fe(III)TMPyP, o ¹O₂ poderá estar participando do processo através do mecanismo do tipo II (fig 13, painel A). O efeito aditivo do D₂O foi grande, mas não expressivo como se esperava, indicando que outras EROs (mecanismo do tipo I), além do ¹O₂ estão sendo gerados (fig. 13, painel A). Outra explicação para o fato é devido às propriedades paramagnéticas de porfirinas de ferro, que apresentam uma queda

não radioativa dos seus estados excitados e, conseqüentemente, um tempo de vida do estado singlete relativamente baixo (KALYANASUNDARAM, 1992). E ainda, foi mostrado que interfaces de micelas carregadas negativamente induziu a formação de dímeros de fotossensibilizadores carregados positivamente, o que praticamente aboliu a geração de $^1\text{O}_2$ (JUNQUEIRA et al., 2002) o que, em condições semelhantes a essas, são favoráveis para ação fotodinâmica via mecanismo do tipo I.

A irradiação de mitocôndrias incubadas na presença de $1\ \mu\text{M}$ de Fe(III)TPPS_4 , com e sem a D_2O , não provocou efeito algum sobre o C.R. (fig. 13, painel B).

A produção de EROs pela mitocôndria pode induzir TPM, provavelmente via oxidação de tióis de proteínas (KOWALTOWSKI et al., 2001). Esse evento é importante para a TFD uma vez que a TPM poderá levar a célula a entrar em processo de apoptose ou necrose (POLYAK et al., 1997; ZAMZAMI et al., 1997). As mitocôndrias são consideradas as principais fontes de geração de EROs intracelular, o que é aumentado pelo íon Ca^{2+} e esse efeito é ainda aumentado na condição de TPM (KOWALTOWSKI et al., 2001). Neste trabalho, foi mostrado que porfirinas de ferro são capazes de prejudicar as função mitocondriais através de geração de EROs e esses efeitos foram potencializados tanto pelo Ca^{2+} como pela irradiação; os efeitos da combinação de ambos foram aditivos (fig. 14, painéis A e B).

Nas condições experimentais realizadas neste trabalho, a TPM foi observada apenas quando o Ca^{2+} foi adicionado às mitocôndrias incubadas e irradiadas na presença da porfirina Fe(III)TMPyP , condição cuja produção de EROs foi máxima.

Interessantemente, o inibidor do PTPM - CsA -, diminuiu significativamente a produção de EROs, sugerindo que o dano mitocondrial associado com a TPM é possivelmente responsável por uma porção significativa das EROs geradas pelas mitocôndrias irradiadas na presença de Fe(III)TMPyP e Ca^{2+} (fig. 14, painel A). Em contraste, CsA não provocou diminuição significativa da produção de EROs quando a porfirina testada foi a aniônica (fig. 14, painel B). Isso sugere que a Fe(III)TPPS_4 foi responsável para quase toda a produção de EROs, nas condições experimentais aqui apresentadas.

Sabe-se que Fe(III)TMPyP apresenta uma atividade tipo superóxido dismutase, o que poderá iniciar peroxidação lipídica mitocondrial (KASUGAI et al., 2002). Além disso, o sistema redox mitocondrial provavelmente poderá enfraquecer a ligação do metal ferro no núcleo porfírico, favorecendo as reações de Fenton, que levam à geração de OH^\bullet (RYTER e TYRRELL, 2000). Ambos mecanismos podem ser responsáveis pelos efeitos dose-dependente das porfirinas no consumo de O_2 mitocondrial, no escuro. Por outro lado, após irradiação, o estado singlete da porfirina catiônica poderá estar atuando via transferência de prótons ou elétrons diretamente ao substrato, conseqüentemente causando todas as alterações nas funções mitocondriais descritas neste trabalho. O mesmo processo de transferência de prótons ou elétrons foi mostrado para explicar a eficiência do composto Cu(II)benzoclorina (fotossensibilizador paramagnético) em provocar danos em células tumorais AY-27 (HAMPTON et al., 1993; SELMA et al., 1993).

Como foi observado que Fe(III)TMPyP induziu um efeito importante na produção de EROs mitocondrial, a possível capacidade deste composto em ser um “indutor” de TPM foi comprovada nos experimentos de $\Delta\Psi_m$ e de inchamento mitocondrial, como vistos nas Figs. 15 e 16, respectivamente. De fato, somente a porfirina catiônica Fe(III)TMPyP e não a aniônica Fe(III)TPPS₄ induziu eliminação de $\Delta\Psi_m$ (Fig. 15, painéis A e B, respectivamente) e inchamento mitocondrial (Fig. 16, painéis A e B, respectivamente) sensíveis à CsA, após irradiação e presença de Ca^{2+} .

A carga predominante das cadeias laterais das porfirinas pode influenciar a localização intracelular dos compostos: as porfirinas catiônicas têm uma tendência em estarem localizadas em mitocôndrias, enquanto que as aniônicas geralmente apresentam uma localização preferencial em lisossomos (WOODBURN et al., 1991). Portanto, a estrutura porfírica favorece a associação dos fotossensibilizadores com membranas biológicas. Com o objetivo de avaliar se a capacidade de associação das porfirinas catiônica e aniônica com a membrana mitocondrial foi responsável pelos diferentes resultados obtidos com esses compostos de cargas opostas, foi determinado a constante de associação das mitocôndrias com as porfirinas. Os resultados apresentados na fig. 17 indicaram que Fe(III)TMPyP apresentou uma maior afinidade por membrana mitocondrial ($K_b = 12,9$) em comparação à Fe(III)TPPS₄ ($K_b = 1,15$), provavelmente devido às interações eletrostáticas

entre a porfirina catiônica e a membrana mitocondrial interna, carregada negativamente (MURPHY, 1997; OLEINICK et al., 2002).

Comprovando experimentalmente esta suposição, foi realizado o mesmo experimento de K_b , porém, com suspensão de mitocôndrias desacopladas com FCCP e observou-se que nessa condição, a Fe(III)TMPyP apresentou um valor de K_b duas vezes menor (5,1), enquanto que nenhum efeito significativo foi encontrado para a Fe(III)TPPS₄. Isto sugere que a associação entre porfirina catiônica e mitocôndrias é influenciada pela diferença de cargas entre o fotossensibilizador e a organela embora não exclua a possibilidade de parte da porfirina catiônica esteja sendo acumulada no interior da mitocôndria energizada.

Além disso, a membrana mitocondrial interna é rica em cardiolipinas, que são candidatos atrativos para a fotoxidação, por serem fosfolipídios carregados negativamente e por conterem quatro ácidos graxos insaturados, facilmente atacados por EROs (WILSON, et al., 1997; MORRIS et al., 2003). Sabe-se também que a associação de fotossensibilizadores carregados negativamente com proteínas favorece a reação do tipo I, como discutido por JUNQUEIRA et al., 2002.

Investigando os efeitos citotóxicos das porfirinas catiônica Fe(III)TMPyP e aniônica Fe(III)TPPS₄ sobre a viabilidade das células tumorais, observou-se que ambas porfirinas diminuíram a viabilidade celular de maneira dose-dependente, apresentando um IC₅₀ de aproximadamente 15 μ M, após 48 h de incubação no escuro (fig. 18).

Tratando-se as células com 10 μ M de porfirinas e um tempo menor de exposição no escuro (1 h), não foi observado um efeito citotóxico importante. Todavia, nessas mesmas condições, a irradiação induziu efeito significativo com ambas porfirinas (fig. 19).

Sabe-se que o tipo de morte celular pode variar de acordo com a célula-alvo, com a fonte luminosa, com a natureza do fotossensibilizador, bem como com a dose e tempo de incubação do mesmo. Nas condições experimentais testadas, a morte celular predominante e induzida pela irradiação de ambas porfirinas foi a necrose. A morte celular

do tipo apoptose ocorreu também após a irradiação das células tumorais na presença de ambos compostos, sendo o efeito da Fe(III)TMPyP duas vezes maior que da Fe(III)TPPS₄ (fig. 20). Este resultado está de acordo com os efeitos observados por este fotossensibilizador sobre as funções das mitocôndrias isoladas. Observou-se ainda que os dois processos de morte celular ocorreram via aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$, uma vez que o quelante intracelular deste íon protegeu significativamente a morte celular (fig. 21 e 22). A relação entre aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$ e morte celular tem sido amplamente estudado (TAJIRI et al., 1998; GRANVILLE et al., 2001; DING et al., 2004). Trabalho recente de DING e al., 2004 comprovou que a ação do quelante de Ca^{2+} citosólico BAPTA/AM pôde inibir a liberação de citocromo c para o citosol, bem como a ativação de caspase-3. Sabe-se que a concentração do íon Ca^{2+} livre no RE é de 3-4 ordens de grandeza maior que a $[Ca^{2+}]_{cit}$. Esse gradiente é gerado pelas SERCAs (“sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases”), localizados na membrana do RE e bombeiam Ca^{2+} citosólico para o RE. A inibição das SERCAs pode elevar a $[Ca^{2+}]_{cit}$ por impedir a captação do Ca^{2+} pelo RE (WU et al., 1995; GRANVILLE et al., 2001; HAJNOCZKY et al., 2003). Isto pode estar ocorrendo nas células LNCaP após a fotoativação de ambas porfirinas. De fato, CASTILHO et al. (1996B) demonstrou que as Ca^{2+} -ATPases são sensíveis a estresse oxidativo.

O aumento na $[Ca^{2+}]_{cit}$ pode ser devido à ação oxidante das EROs geradas no processo fotodinâmico das meso-porfirinas, como observado nos experimentos com mitocôndrias isoladas. Esta ação das EROs geradas poderiam causar danos importantes nos diversos compartimentos intracelulares, destacando-se a mitocôndria, o RE e a membrana plasmática. Conseqüentemente, eventos como a permeabilização das membranas mitocondriais poderiam desencadear os fenômenos de TPM e a PMME, culminando na morte da célula tumoral por apoptose e/ou necrose (LAM et al., 2001). Ao testar o inibidor do PTPM, CsA, observou-se uma inibição significativa das mortes celulares sendo que o efeito foi observado mais fortemente na inibição da apoptose (fig. 23). Na condição em que as células foram irradiadas na presença dos fotossensibilizadores, o efeito da CsA foi maior porém, ainda no escuro e após incubação de 1 h, a CsA também exerceu efeito significativo, exceto na inibição da necrose induzida pela Fe(III)TMPyP no escuro. Isto indica que nesta condição, outros eventos citotóxicos poderão estar ocorrendo, além da permeabilização da membrana mitocondrial interna.

A ativação da calcineurina pode estar sendo responsável pela morte das células LNCaP após a TFD. A calcineurina é uma fosfatase cálcio/calmodulina-dependente, sensível à CsA e que ativa fatores de transcrição nuclear, ativando os processos de morte celular (HOGAN et al., 2003). Sua participação em nossos experimentos será testada futuramente com a utilização do inibidor específico FK506.

6- CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos na primeira parte desse trabalho corroboram com os efeitos fotodinâmicos das meso-porfirinas sobre a viabilidade de células de tumor de próstata e referente à segunda parte do trabalho. Os resultados demonstraram um importante efeito da porfirina catiônica Fe(III)TMPyP sobre as funções mitocondriais e após irradiação na concentração de 1 μ M. Essa porfirina foi capaz de induzir alterações importantes na membrana mitocondrial interna que prejudicaram a fosforilação oxidativa ainda na ausência de Ca^{2+} e induziu transição de permeabilidade mitocondrial na presença do cátion. Esses efeitos foram provavelmente devido à maior associação desta porfirina com as membranas mitocondriais, seja devido às interações eletrostáticas entre a carga positiva deste composto e a membrana mitocondrial interna, carregada negativamente e/ou pela estrutura do composto *per si*, que estaria favorecendo esta maior associação. Ambas alterações podem levar à morte de células tumorais tanto por necrose como por apoptose.

Em relação aos resultados obtidos na segunda parte do projeto, concluímos que 1) de acordo com as condições experimentais testadas neste trabalho, a irradiação das células LNCaP na presença de 10 μ M de Fe(III)TPPS₄ e Fe(III)TMPyP, após incubação no escuro por 1 h, provocou uma maior porcentagem de morte por necrose, quando comparada à apoptose; 2) a porfirina que provocou maior porcentagem de morte celular via apoptose foi a catiônica Fe(III)TMPyP; 3) nas mesmas condições, observamos que a irradiação das células tumorais na presença de ambas porfirinas, aumentou significativamente a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ e este efeito foi possivelmente um dos responsáveis pela inviabilidade celular após irradiação, seja provavelmente via abertura do PTPM ou pela ativação da proteína calcineurina.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.M., CORY, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. **Trends Biochem Sci**, 26: 61-66, 2001.

ALI, S. M. e OLIVO, M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. **Int J Oncol**, 21(3):531 - 40, 2002.

ALMEIDA, R.D., MANADAS, B.J., CARVALHO, A.P., DUARTE, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochim Biophys Acta**, 1704(2): 59-86. Review, 2004.

ARMSTRONG, J.S. Mitochondria: a target for cancer therapy. **Br J Pharmacol** [Epub ahead of print], 2005.

ATHAR, M.; MUKHTAR, H.; ELMETS, C. A.; ZAIM, M. T.; LLOYD, J. R.; BICKERS, D. R. In situ evidence for the involvement of superoxide anions in cutaneous porphyrin photosensitization. **Biochem Biophys Res Commun**, 151: 1054 - 1059, 1988.

ATLANTE, A., MORENO, G., PASSARELLA, S., SALET, C. Hematoporphyrin derivative (Photofrin II) photosensitization of isolated mitochondria: impairment of anion translocation. **Biochim Biophys Res Comm**, 141(2), 584-590, 1986.

BAINES, C.P., KAISER, R.A., PURCELL, N.H., BLAIR, N.S., OSINSKA, H., HAMBLETON, M.A., BRUNSKILL, E.W., SAYEN, M.R., GOTTLIEB, R.A., DORN, G.W., ROBBINS, J., MOLKENTIN, J. D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. **Nature**, 434(7033): 658-62, 2005.

BERG, K., MOAN, J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. **Photochem Photobiol**, 65(3): 403-409. Review, 1997.

BERLETT, B. S. e STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem**, 272: 20313 - 20316, 1997.

BERNARDES, C. F.; MEYER-FERNANDES, J. R.; BASSERES, D. S.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Ca(2+)-dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). **Biochim Biophys Acta**, 1188: 93 - 100, 1994.

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. **J Biol Chem**, 267: 8834-8839, 1992.

BERNS, M. W.; DAHLMAN, A.; JOHNSON, F. M.; BURNS, R.; SPERLING, D.; GUILTINAN, A.; SIEMENS, A.; WALTER, R.; WRIGHT, W.; HAMMER-WILSON, M.; WILE, A. In vitro cellular effects of hematoporphyrin derivative. **Cancer Res**, 42: 2325-2329, 1982.

BORISSEVITCH, I.E.; TOMINAGA, T.T.; IMASATO, H.; TABAK, M. **Anal Chim Acta**, 343: 281-286, 1997.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, 134: 707-716, 1973.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; STOPPANI, A. O. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem J**, 156: 435-444, 1976.

BRECKENRIDGE, D.G. e XUE, D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. **Curr Opin Cell Biol**, 16(6): 647-52. Review, 2004.

BROWN, J. E.; BROWN, S. B.; VERNON, D. I. Photodynamic therapy- new light on cancer treatment. **JSDC**, 115: 249-253, 1999.

BROEKEMEIER, K. M.; DEMPSEY, M. E.; PFEIFFER, D. R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. **J Biol Chem**, 264: 7826-7830, 1989.

BRUSTOVETSKY, N., KLINGENBERG, M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. **Biochemistry**, 35(26):8483-8, 1996.

CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C. I.; STOPPANI, A. O. M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 180: 248-257, 1977.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; MEINECKE, A. R.; VERCESI, A. E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca⁺² effect of coenzyme Q redox state. **Free Rad. Biol. Med.**, 18: 55-59, 1995.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A.E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca²⁺ plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioenerg. Biomembr**, 28: 523-529, 1996A.

CASTILHO, R.F., CARVALHO-ALVES, P.C., VERCESI, A.E., FERREIRA, S.T. Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump induced by Fe2+/H2O2/ascorbate is not mediated by lipid peroxidation or thiol oxidation and leads to protein fragmentation. **Mol Cell Biochem.**, 159(2):105-14, 1996B.

CESAR, M., C., D. e WILSON, J. E. All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain. **Arch Biochem Biophys**, 422: 191 – 196, 2004.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, 59: 527-605, 1979.

CHATTERJEE, S.R.; SRIVASTAVA, T.S.; KAMAT, J.P.; DEVASAGAYAM, T.P.A. Lipid peroxidation induced by a novel porphyrin plus light in isolated mitochondria: possible implications in photodynamic therapy. **Mol Cel Biochem**, 166, 25-33, 1997.

CHATTERJEE, S. R.; POSSEL, H.; SRIVASTAVA, T. S.; KAMAT, J. P.; WOLF, G.; DEVASAGAYAM, T. P. J. Photodynamic effects induced by meso-tetrakis[4-(carboxymethyleneoxy)phenyl] porphyrin on isolated Sarcoma 180 ascites mitochondria. **Photochem Photobiol B**, 50(2-3): 79-87, 1999.

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

COLUSSI, V. C.; NICOLA, E. M. D.; NICOLA, J. H. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. **Rev Ass Med Brasil**, 42(4): 229-236, 1996.

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

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

CROMPTON, M., VIRJI, S., WARD, J.M. Cyclophilin-D binding proteins. **Biochem Soc Trans**, 26(4): S330, 1998.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem J**, 341: 233-249, 1999.

CROMPTON, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. **J Physiol**, 529 Pt 1:11-21. Review, 2000.

CROMPTON, M., BARKSBY, E., JOHNSON, N., CAPANO, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. **Biochimie**, 84(2-3): 143-52. Review, 2002.

CROMPTON, M. On the involvement of mitochondrial intermembrane junctional complexes in apoptosis. **Curr Med Chem**, 10(16): 1473-84. Review, 2003.

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

DA SILVA, A. R. **Análise das propriedades fotossensibilizantes do In(III)-mesotetrafenilporfirina para uso em terapia fotodinâmica** – Campinas. 2003. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).

DELLINGER, M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. **Photochem Photobiol**, 64(1): 182-187, 1996.

DING, X., XU, Q., LIU, F., ZHOU, P., GU, Y., ZENG, J., AN, J., DAI, W., LI, X. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. **Cancer Lett**, 216(1): 43-54, 2004.

- DOONAM, S., BARRA, D. e BOSSA, F. Structural and genetic relationships between cytosolic and mitochondrial isoenzymes. **Int J Biochem**, 16: 1193-1199, 1984.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L., WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, 102: 33-42, 2000.
- ERNSTER, L., FORSMARK, P. e NORDENBRAND, K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. **J Nutr Sci Vitaminol**, 1992: 548 – 551, 1992.
- FAGIAN, M. M., PEREIRA-DA-SILVA, L., MARTINS, I. S. e VERCESI, A. E. Membrane protein thiol cross-link associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{+2} plus prooxidants. **J Biol Chem**, 265: 19955-19960, 1990.
- FESKE, S., OKAMURA, H., HOGAN, P.G., RAO, A. Ca^{2+} /calcineurin signalling in cells of the immune system. **Biochem Biophys Res Commun**, 311(4): 1117-32, 2003.
- FOURNIER, N., DUCET, G., CREVAT, A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. **J Bioenerg Biomembr**, 19(3): 297-303, 1987.
- GANDINI, S.C.M.; YUSHMANOV, V.E.; BORISSEVICH, I.E.; TABAK, M.. Interaction of the tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrin with ionic surfactants: aggregation and location in micelles. **Langmuir**, 14: 6233-6243, 1999.
- GANDINI, S.C.M.; YUSHMANOV, V.E.; TABAK, M. Interaction of Fe(III)- and Zn(II)-tetra(4-sulfonatophenyl) porphyrins with ionic and nonionic surfactants: aggregation and binding. **J Inor Biochem**, 85: 263-277, 2001.
- GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MARI, M.; MORALES, A.; FERNANDEZ-CHECA, J.C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of the mitochondrial glutathione. **J Biol Chem**, 272: 11369-77, 1997.
- GIULIVI, C., PODEROSO, J. J. e BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **J Biol Chem**, 273: 11038 – 11043, 1998.

- GORNALL, A. G.; BARDWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **J Biol Chem**, 177: 751-766, 1949.
- GRANVILLE, D. J., CARTHY, C. M., JIANG, H., SHORE, G. C., MCMANUS, B. M., HUNT, D.W. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. **FEBS Lett** 437(1-2),5-10, 1998.
- GRANVILLE, D.J., RUEHLMANN, D.O., CHOY, J.C., CASSIDY, B.A., HUNT, D.W., VAN BREEMEN, C., MCMANUS, B.M. Bcl-2 increases emptying of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores during photodynamic therapy-induced apoptosis. **Cell Calcium**, 30(5):343-50, 2001.
- GREEN, D. R. e REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281: 1309-1312, 1998.
- GREEN, D.R. Apoptotic pathways: Paper wraps stone blunts scissors. **Cell**, 102: 1-4, 2000.
- GREEN, D. R. e KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, 305: 626-629, 2004.
- GREEN, D. R. e KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **J Clin Inves**, 115(10): 2610–2617, 2005.
- GRIJALBA, M. T.; VERCESI, A. E.; SCHEREIER, S. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, 38: 13279-87, 1999.
- HAJNOCZKY, G., DAVIES, E., MADESH, M. Calcium signaling and apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, 304(3): 445-54. Review, 2003.
- HALESTRAP, A.P., KERR, P.M., JAVADOV, S., WOODFIELD, K.Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim Biophys Acta**, 1366(1-2): 79-94, 1998.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford University Press, 2000.

- HAMPTON, J. A.; SKALKOS, D.; TAYLOR, P. M.; SELMAN, S. H. Iminium salt of copper benzochlorin (CDS1), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: mechanism of cell killing. **Photochem Photobiol**, 58: 100-105, 1993.
- HANSFORD, R. G.; HOGUE, B. A.; MILDAZIENE, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. **J Bioenerg Biomembr**, 29: 89-95, 1997.
- HAYAKAWA, M.; TORII, K.; SUGIYAMA, S.; TANAKA, M.; OZAWA, T. Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. **Biochem Biophys Res Commun**, 179: 1023-9, 1991.
- HAWORTH, R. A. e HUNTER, D. R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II: Nature of Ca²⁺ trigger site. **Arch Biochem Biophys**, 195: 460-467, 1979.
- HE, L. e LEMASTERS, J.J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? **FEBS Lett**, 512(1-3): 1-7, 2002.
- HILMEY, D. G.; ABE, M.; NELEN, M. I.; STILTS, C. E.; BAKER, G. A.; BAKER, S. N.; BRIGHT, F. V.; DAVIES, S. R.; GOLLNICK, S. O.; OSEROFF, A. R.; GIBSON, S. L.; HILF, R. ; DETTY, M. R. Water-soluble, core-modified porphyrins as novel, longer-wavelength-absorbing sensitizers for photodynamic therapy.II. Effects of core heteroatoms and meso-substituents on biological activity. **J Med Chem**, 45: 449-461, 2002.
- HOGAN, P.G., CHEN, L., NARDONE, J., RAO, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. **Genes Dev**, 17(18): 2205-32. Review, 2003.
- HOROSZEWICZ, J. S.; LEONG, S. S.; KAWINSKI, E.; KARR, J. P.; ROSENTHAL, H.; CHU, T. M.; MIRAND, E. A.; MURPHY, G. P. LNCaP model of human prostatic carcinoma. **Cancer Res**, 43(4): 1809-1818, 1983.
- HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I: The protective mechanisms. **Arch Biochem Biophys**, 195: 453-459, 1979.
- INDIG, G.; CAMPA, A.; BECHARA, E. J. H.; CILENTO, G. **Photochem Photobiol**, 48: 719-723, 1988.

JENSEN, B. D.; GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. The efficiencies of the component steps of oxidative phosphorylation. II. Experimental determination of the efficiencies in mitochondria and examination of the equivalence of membrane potential and pH gradient in phosphorylation. **Arch Biochem Biophys**, 248: 305-323, 1986.

JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. **Phys Chem Chem Phys**, 4: 2320-2328, 2002.

KALYANASUNDARAM, K., ed. **Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes**, San Diego, CA: Academic Press Inc., 1992.

KAMO, N.; MURATSUGU, M.; HONGO, R.; KOBATAKE, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. **J Mem Biol**, 49: 105-121, 1979.

KAPLAN, R. S.; PEDERSEN, P. L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochem J**, 212: 279-288, 1983.

KASUGAI, N.; MURASE, T.; OHSE, T.; NAGAOKA, S.; KAWAKAMI, H.; KUBOTA, S. Selective cell death by water-soluble Fe-porphyrins with superoxide dismutase (SOD) activity. **J Inorg Biochem**, 91: 349-355; 2002.

KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 26: 239-257, 1972.

KESSEL, D., LUO, Y., DENG, Y., CHANG, C.K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, 65(3): 422-426, 1997.

KESSEL, D. e LUO, Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death Differ** 6(1), 28-35, 1999.

KESSEL, D., CASTELLI, M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. **Photochem Photobiol**, 74(2): 318-322, 2001.

- KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiag Photodyn Ther**, 1: 3-7, 2004.
- KIM, H.R., LUO, Y., LI, G., KESSEL, D. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. **Cancer Res**, 59(14): 3429-3432, 1999.
- KOKOSZKA, J.E., WAYMIRE, K.G., LEVY, S.E., SLIGH, J.E., CAI, J., JONES, D.P., MACGREGOR, G.R., WALLACE, D.C. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. **Nature**, 427(6973): 461-5, 2004.
- KOWALTOWSKI A. J.; CASTILHO R. F.; GRIJALBA M. T.; BECHARA E.J.; VERCESI A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, 271: 2929-34, 1996A.
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, 378: 150-152, 1996B.
- KOWALTOWSKI, A. J.; NETTO, L. E. S.; VERCESI, A. E. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. **J Biol Chem**, 273: 12766-12769, 1998.
- KOWALTOWSKI, A. J. e VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 26(3-4): 463-471, 1999.
- KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Reactive oxygen generation by mitochondria, In: Lemasters, J. J. e Nieminen A. L. **Mitochondria in Pathogenesis** New York: Kluwer Academic / Penum Publishers, 2001. p. 281-294.
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F e VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS letters**, 495: 12-15, 2001.
- KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., ELLERBY, L.M., WELSH, K., XIE, Z., DEVERAUX, Q.L., SALVESEN, G.S., BREDESEN, D.E., ROSENTHAL, R.E., FISKUM, G., REED, J.C. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96: 5752-5757, 1999.

- KROEMER, G. Introduction: mitochondrial control of apoptosis. **Biochimie**, 84: 103-104, 2002.
- LAM, M., OLEINICK, N.L., NIEMINEN, A.L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. **J Biol Chem**, 276(50): 47379-86, 2001.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, 5: 227-31, 1992.
- LENARTOWICZ, E.; BERNARDI, P.; AZZONE, G. F. Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, 23: 679-688, 1991.
- LEHNINGER, A. L. **The mitochondrion: molecular basis of structure and function**. W. A. Benjamin, Inc. New York, USA, 1964.
- LEHNINGER, A. L.; VERCESI, A. E.; BABABUMNI, E. A. Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc Nat Acad Sci USA**, 75: 1690-1694, 1978.
- LEMASTERS, J. J.; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEM, A.; HERMAN, B.; Blebbing, free Ca⁺² and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. **Nature**, 325: 78-81, 1987.
- LEMASTERS, J. J.; NIEMINEM, A. L.; QIAN, T., TROST, L. C.; ELMORE, S. P.; NISHIMURA, Y. *et al.* The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 1366: 177-196, 1998.
- LEUNG, W. N.; SUN, X.; MAK, N. K.; YOW, C. M. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. **Photochem Photobiol**, 75(4): 406-411, 2002.
- LIU, S. S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. **Biosc Rep**, 17: 259-272, 1997.

- LORENZO, H.K., SUSIN, S.A., PENNINGER, J., KROEMER, G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. **Cell Death Differ**, 6: 516-524, 1999.
- LUTTER, R., SARASTE, M., VANWALRAVEN, H.S., RUNSWICK, M.J., FINEL, M., DEATHERAGE, J.F., WALKER, J.E. F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. **Biochem J**, 295(part 3): 799-806, 1993.
- MACEDO, D. V.; FERRAZ, V. L.; PEREIRA DA SILVA, L.; VERCESI, A. E. Ca²⁺ - dependent NAD(P)⁺-induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. In: **Integration of Mitochondrial Function**, Ed. J. Lemasters, Plenum, New York, 1988, p. 535-542.
- MACHADO, A. E da HORA. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, 23(2): 237-243, 1999.
- MATROULE, J. Y., CARTHY, C. M., GRANVILLE, D.J., JOLOIS, O., HUNT, D.W., PIETTE, J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. **Oncogene**, 20(30): 4070-4084, 2001.
- McGLYNN, S. P.; AZUMI, T.; KINOSHITA, M. **Molecular spectroscopy of the triplet state**. Prentice-Hall, 1st edition, 1969, p. 1 – 32.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, 52: 711-760, 1983.
- MERRYFIELD, M. L.; LARDY, H. A. Ca²⁺-mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe²⁺ from rat liver **J Biol Chem**, 257: 3628-3635, 1982.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, 191: 144-148, 1961.
- MORENO, G. e SALET, C. Citotoxic effects following micro-irradiation of culture cells sensitized with haematoporphyrin derivative. **Int J Radiat Biol relat Stud Phys Chem Med**, 47(4): 383-386, 1985.

- MORRIS, R. L.; AZIZUDDIN, K.; LAM, M.; BERLIN, J.; NIEMINEN, A. L.; KENNEY, M. E.; SAMIA, A. C.; BURDA, C.; OLEINICK, N. L. Fluorescence resonance energy transfer reveals a binding site of a photosensitizer for photodynamic therapy. **Cancer Res**, 63: 5194-5197, 2003.
- MURATSUGU, M.; KAMO, N.; KURIHARA, K.; KOBATAKE, Y.. Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. **Biochim Biophys Acta**, 464: 613-619, 1977.
- MURPHY, G.P., ed. **Models for prostate cancer**. New York: Liss, 115-132, 1980.
- MURPHY, M. P. Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. **Trends Biotechnol**, 15: 326-330, 1997.
- MUSCHTER R. Photodynamic therapy: a new approach to prostate cancer. **Curr Urol Rep**, 4(3): 221-8, 2003.
- NAKAGAWA, T., SHIMIZU, S., WATANABE, T., YAMAGUCHI, O., OTSU, K., YAMAGATA, H., INOHARA, H., KUBO, T., TSUJIMOTO, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. **Nature**, 434(7033): 652-8, 2005.
- NASSAR, P. M.; ALMEIDA, L. E.; TABAK, M. Binding of dipyrindamole to phospholipid vesicles: a fluorescence study. **Biochim Biophys Acta**, 1328(2): 140-150, 1997.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3. ed. Worth Publishers. New York, USA, 2000.
- NEPOMUCENO, M. F.; de OLIVEIRA MAMEDE, M. E.; VAZ DE MACEDO, D.; ALVES, A. A.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; TABAK, M. Antioxidant effect of dipyrindamole and its derivative RA-25 in mitochondria: correlation of activity and location in the membrane. **Biochim Biophys Acta**, 1418: 285 - 294, 1999.
- NEPOMUCENO, M. F.; TABAK, M.; VERCESI, A. E. Opposite effects of Mn(III) and Fe(III) forms of *meso*-tetrakis(4-N-methyl pyridiniumyl) porphyrins on isolated rat liver mitochondria. **J Bioenerg Biomemb**, 34(1): 41- 47, 2002.

- NICHOLLS, D.G.; BRAND, M. D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. **Biochem J**, 188: 113-118, 1980.
- NICHOLLS, D.G.; ÅKERMAN, K. E. O. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**, 683: 57-88, 1982.
- NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. Proton Current and Respiratory Control. In: **Bioenergetics 3**. London, Academic Press Inc., 3th edition, 2002. p. 69-75.
- NICOLLI, A.; BASSO, E.; PETRONILLI, V.; WEGNER, R. M.; BERNARDI, P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. **J Biol Chem**, 271: 2185-2192, 1996.
- NOODT, B. B., BERG, K., STOKKE, T., PENG, Q., NESLAND, J. M. Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. **Br J Cancer**, 79(1): 72-81, 1999.
- OKAMURA, H., ARAMBURU, J., GARCIA-RODRIGUEZ, C., VIOLA, J.P., RAGHAVAN, A., TAHILIANI, M., ZHANG, X., QIN, J., HOGAN, P.G., RAO, A. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. **Mol Cell**, 6(3): 539-50, 2000.
- OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochem Photobiol Sci**, 1: 1-21, 2002.
- ORTEL, B.; SHARLIN, D.; O'DONNELL, D.; SINHA, A. K.; MAYTIN, E. V.; HASAN, T. Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells. **Br J Cancer**, 87(11): 1321-7, 2002.
- OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J Photochem Photobiol B**, 39: 1-18, 1997.
- OZAWA, T. Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. **Biosci Rep**, 17: 237-250. 1997.

- POLO, L.; SEGALLA, A.; BERTOLONI, G.; JORI, G.; SCHAFFNER, K.; REDDI, E. Polylysine-porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens. **J Photochem Photobiol B**, 59(1-3):152-158, 2000.
- POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J. L.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. A model for p53-induced apoptosis. **Nature**, 389: 300-305, 1997.
- RADI, R., CASSINA, A., HODARA, R., QUIJANO, C., CASTRO, L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radic Biol Med**, 33(11):1451-64. Review, 2002.
- RANCAN, F., WIEHE, A., NOBEL, M., SENGE, M. O., OMARI, S. A., BOHM, F., JOHN, M., RODER, B. Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. **J Photochem Photobiol B**, 78(1): 17-28, 2005.
- RAVAGNAN, L., ROUMIER, T., KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **J Cell Physiol**, 192: 131-137, 2002.
- RICCHELLI, F.; BARBATO, P.; MILANI, M.; GOBBO, S.; SALET, C.; MORENO, G. **Biochem. J**, 338: 221-227, 1999.
- RICCHELLI, F., FRANCHI, L., MIOTTO, G., BORSETTO, L., GOBBO, S., NIKOLOV, P., BOMMER, J.C., REDDI, E. Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting. **Int J Biochem Cell Biol**, 37(2): 306-19, 2005.
- ROBINSON, J.; COOPER, J. M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem**, 33: 390-399, 1970.
- ROVALDI, C. R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N. A.; FRIDEN, P. M.; ROTHSTEIN, D. M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother**, 44(12): 3364-3367, 2000.
- ROSSI, C. S.; LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of respiration stimulation, accumulation of Ca²⁺ and phosphate and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, 239: 3971-3980, 1964.

RYTER, S. W. e TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med**, 28: 289-309, 2000.

SCHEFFLER, I.E. Mitochondria make a come back. **Adv Drug Deliv Rev**, 49(1-2): 3-26. Review, 2001.

SCHLAME, M., RUA, D. e GREENBERG, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Prog Lipid Res**, 39: 257-288, 2000.

SCHNEIDER, W. C. e HOGEBROOM, G. H. Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review. **Cancer Res**, 11:1-22; 1951.

SCHULTZ, B. E.; CHAN, S. I. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. **Annu Rev Biophys Struct**, 30: 23-65, 2001.

SEKIYA, S.; KUBOTA, K.; KASAI, T.; IWASAKI, H.; YAMAUCHI, K.; TAKAMIZAWA, H.; TENJIN, Y., Cytocidal effects of hematoporphyrin derivative and argon dye laser on human gynecologic tumor cells in vitro. **J Gynecol Obstet**, 26: 151-158, 1988.

SELMAN, S. H.; HAMPTON, J. A.; MORGAN, A. R.; KECK, R. W.; BALKANY, A. D.; SKALKOS, D. Copper benzochlorin, a novel photosensitizer for photodynamic therapy: effects on a transplantable urothelial tumor. **Photochem Photobiol**, 57: 681-685, 1993.

SHIBASAKI F, PRICE ER, MILAN D, MCKEON F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. **Nature**, 382(6589): 370-3, 1996.

SIES, H e MOSS, K. M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **Eur J Biochem**, 84: 377-383, 1978.

SKULACHEV, V. P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. **FEBS Lett**, 423: 275 – 280, 1998.

STILTS, C. E.; NELEN, M. I.; HILMEY, D. G.; DAVIES, S. R.; GOLLNICK, S. O.; OSEROFF, A. R.; GIBSON, S. L.; HILF, R.; DETTY, M. R. Water-soluble, core-modified porphyrins as novel, longer-wavelength-absorbing sensitizers for photodynamic therapy. **J Med Chem**, 43: 2403-2410, 2000.

STRASSER, A., O'CONNOR, L., DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annu Rev Biochem**, 69: 217-245, 2000.

SPIERINGS, D., MCSTAY, G., SALEH, M., BENDER, C., CHIPUK, J., MAURER, U., GREEN, D.R. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. **Science**, 310(5745): 66-67, 2005.

TAJIRI, H., HAYAKAWA, A., MATSUMOTO, Y., YOKOYAMA, I., YOSHIDA, S. Changes in intracellular Ca²⁺ concentrations related to PDT-induced apoptosis in photosensitized human cancer cells. **Cancer Lett**, 128(2): 205-10, 1998.

THORNBERRY, N.A., LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, 281: 1312-1316, 1998.

TURRENS, J. F. e BOVERIS A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J**, 191: 421-427, 1980.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 237: 408-414, 1985.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep** 17: 3-8, 1997.

VALLE, V. G.; FAGIAN, M. M.; PARENTONI, L. S.; MEINICKE, A. R.; VERCESI, A. E. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Arch Biochem Biophys**, 307: 1-7, 1993.

VAN DER MEULEN, F. W.; IBRAHIM, K.; STERENBORG, H. J.; ALPHEN, L. V.; MAIKOE, A.; DANKERT, J. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. **J Photochem. Photobiol. B**, 40: 204 - 208, 1997.

VAN LOO, G., SCHOTTE, P., VAN GURP, M., DEMOL, H., HOORELBEKE, B., GEVAERT, K., RODRIGUEZ, I., RUIZ-CARRILLO, A., VANDEKERCKHOVE, J., DECLERCQ, W., BEYAERT, R., VANDENABEELE, P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. **Cell Death Differ**, 8: 1136-1142, 2001.

VERCESI, A. E. Dissociation of NAD(P)⁺-stimulated mitochondrial Ca²⁺ efflux from swelling and membrane damage. **Arch Biochem Biophys**, 232: 86 - 91, 1984A.

VERCESI, A. E. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)⁺-stimulated Ca²⁺ efflux from mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, 119: 305 - 310, 1984B.

VERCESI, A. E. e PEREIRA-DA-SILVA, L. NADP redox state and mitochondrial Ca²⁺ efflux: a controversial issue. **Braz J Med Biol Res**, 17: 353 - 356, 1984.

VERCESI, A. E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 252: 171 - 8, 1987.

VERCESI, A. E., e DOCAMPO, R. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized Leishmania donovani. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. **Biochem J**, 284: 463 – 467, 1992.

VERCESI, A. E. e HOFFMANN, M. E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In **Methods in Toxicology "Mitochondrial Dysfunction"**, D.P.Jones, L.H.Lash, eds, 1993, Vol.2, Chapter 21, Academic Press, New York.

VERCESI, A. E.; KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJALBA, M. T.; MEINICKE, A. R.; CASTILHO, R. F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci Rep**, 17(1): 43-52, 1997.

VERHAGEN, A.M., EKERT, P.G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L.M., REID, G.E., MORITZ, R.L., SIMPSON, R.J., VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**, 102: 43-53, 2000.

- VYSSOKIKH, M. Y. e BRDICZKA, D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. **Acta Biochim Pol**, 50: 389 – 404, 2003.
- XUE, L. Y., CHIU, S. M. e OLEINICK, N. L. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. **Oncogene**, 20(26): 3420-3427, 2001.
- WANG, H. e OSTER, G. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. **Nature**, 396(6708):279 – 82, 1998.
- WILSON, B. C.; OLIVO, M.; SINGH, G. Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, 65: 166-176, 1997.
- WOODBURN, K. W.; VARDAXIS, N. J.; HILL, J. S.; KAYE, A. H.; PHILLIPS, D. R. Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. **Photochem Photobiol**, 54: 725-732, 1991.
- WOODFIELD, K., RUCK, A., BRDICZKA, D., HALESTRAP, A.P. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. **Biochem J**, 336 (Pt 2): 287-90, 1998.
- WU, K.D., LEE, W.S., WEY, J., BUNGARD, D., LYTTON, J. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. **Am J Physiol**, 269(3 Pt 1): C775-84, 1995.
- ZAKOWSKI, J. J.; TAPPEL, A. L. Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. **Biochim Biophys Acta**, 526: 65-76, 1978.
- ZAKOWSKI, J. J., ORRENIUS, S., BRUSTUGUN, O. T., DOSKELAND, S. O. Injected cytochrome c induces apoptosis. **Nature**, 391: 449-450, 1998.
- ZAMZAMI, N., HIRSCH, T., DALLAPORTA, B., PETIT, P.X.; KROEMER, G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. **J Bioenerg Biomembr**, 29(2): 185-193, 1997.

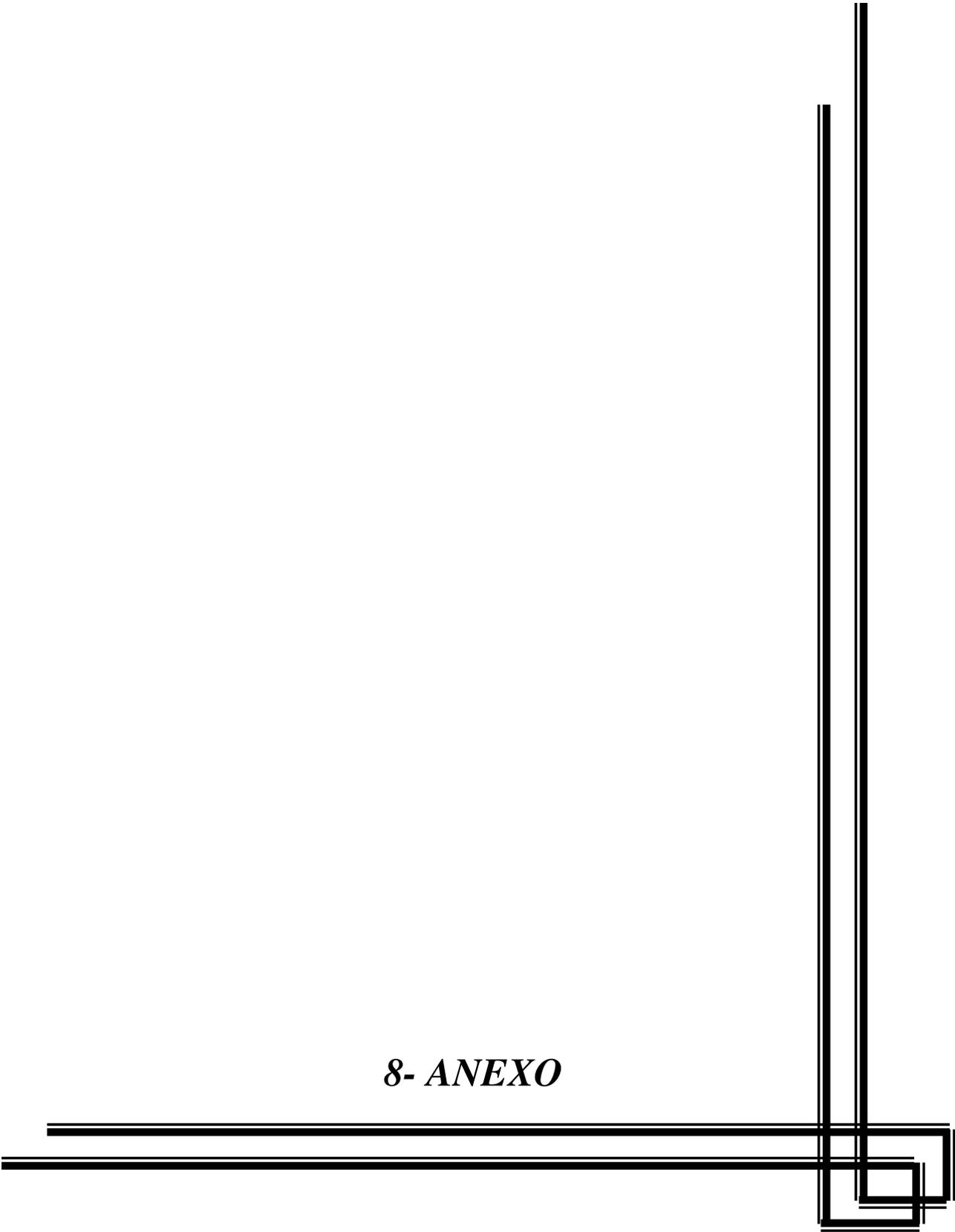
ZHOU, Z., YANG, H., ZHANG, Z. Role of calcium in phototoxicity of 2-butylamino-2-demethoxy-hypocrellin A to human gastric cancer MGC-803 cells. **Biochim Biophys Acta**, 1593(2-3): 191-200, 2003.

ZIMMERMANN, K.C., BONZON, C., GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, 92(1): 57-70. Review, 2001.

ZIMMERMANN , A.; WALT, H.; HALLER, U.; BAAS, P.; KLEIN S. D. Effects of chlorin-mediated photodynamic therapy combined with fluoropyrimidines in vitro and in a patient. **Cancer Chemother Pharmacol**, 51(2):147-54, 2003.

ZORATTI, M e SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, 1241: 139-176, 1995.

8- ANEXO



ANEXO 1

IRRADIATED CATIONIC MESOPORPHYRIN INDUCES LARGER DAMAGE TO ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA THAN THE ANIONIC FORM

Natalia M. Inada¹, André Romero da Silva², Renato Atílio Jorge², Jiri Borecký¹, and Anibal
E. Vercesi¹.

Submetido à revista *Archives of Biochemistry and Biophysics*

IRRADIATED CATIONIC MESOPORPHYRIN INDUCES LARGER DAMAGE TO ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA THAN THE ANIONIC FORM

Natalia M. Inada¹, André Romero da Silva², Renato Atílio Jorge², Jiri Borecký¹, and Anibal E. Vercesi^{1,*}

¹Laboratório de Bioenergética, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.

²Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:**

Anibal Eugênio Vercesi

Depto Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas.

Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Phone/Fax: 55-19-3788-9434

E-mail: anibal@unicamp.br

Running Title: Damaging effect of porphyrin on isolated mitochondria.

Subject area: Membrane Biochemistry and Biophysics

ABSTRACT

The action of irradiated cationic Fe(III)TMPyP and anionic Fe(III)TPPS₄ forms of mesoporphyrins on mitochondrial functions was investigated using experimental conditions that caused minimal effects on mitochondria in the dark. Treatment of mitochondria with 1 μM Fe(III)TMPyP for 2 min decreased the respiratory control by 3% in the dark and 28% after irradiation. Fe(III)TPPS₄ (1 μM) had no significant effect on respiratory control under any of the above conditions. Both porphyrins increased mitochondrial production of reactive oxygen species in the presence of Ca²⁺; however, the effect of Fe(III)TMPyP was significantly stronger. Fe(III)TMPyP but not Fe(III)TPPS₄ promoted cyclosporin A-sensitive mitochondrial permeability transition. It was also observed that the association constant of Fe(III)TMPyP with mitochondria was 11 times higher than Fe(III)TPPS₄. In conclusion, the damage to isolated mitochondria induced by Fe(III)TMPyP under illumination was larger than by Fe(III)TPPS₄, probably because its cationic charge favors association with the mitochondrial membrane.

[146 words]

KEYWORDS: isolated mitochondria, mitochondrial permeability transition, reactive oxygen species, anionic porphyrin, cationic porphyrin, irradiation, photodynamic therapy.

INTRODUCTION

Porphyrins are the most common photosensitizers used in photodynamic therapy (PDT). Mitochondria, lysosomes, and plasma membrane of tumor cells have been evaluated as potential PDT targets [1-3]. Photosensitizer accumulation in mitochondria is enhanced by the positive charge and/or hydrophobicity of the molecules [4-6]. Porphyrins with dominantly cationic side chains localize in mitochondria and may induce apoptosis, whereas those with a more anionic character tend to localize in lysosomes and may kill the cells by necrosis [7, 8]. The early response to light activation of photosensitizers localized in mitochondria indicates that these organelles play important role in photodynamic cell death [6]. Correlations have been found between phototoxic cell death and rapid mitochondrial depolarization, cytochrome *c* release and activation of caspases within minutes after PDT [9, 10].

The mechanism of action of photosensitizers generally involves direct oxidation (Type I reaction) of biological targets (membranes, proteins and DNA), as well as oxidation mediated by singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) that is mainly formed through energy transfer from triplet states to molecular oxygen (Type II reaction) [11, 12]. Fe-porphyrins with superoxide dismutase-like activity have appeared as a new class of anticancer agents, since they are able to convert intracellular superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$) to H_2O_2 and that H_2O_2 by itself or via hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) can cause DNA damage and consequently tumor cell death [13].

Mitochondrial permeability transition (MPT) is a nonselective permeabilization of the inner mitochondrial membrane that may lead to cell death either by apoptosis or by necrosis [14]. MPT is typically promoted by the accumulation of excessive quantities of Ca^{2+} ions and stimulated by a variety of conditions or compounds [15]. MPT can be prevented by the immune suppressor cyclosporin A [16] or by antioxidants [17], indicating that this process can be triggered by mitochondrial oxidative stress [14].

In a previous study, we demonstrated that, in the dark, the *meso*-tetrakis (4-*N*-methyl pyridiniumyl) porphyrin Fe(III)TMPyP promoted MPT, lipid peroxidation, and release of state-4 (nonphosphorylating) respiration in the concentration range of 5-20 μM [18]. In the present study, we evaluated the interactions and toxicity of cationic

(Fe(III)TMPyP) and anionic (Fe(III)TPPS₄) water-soluble *meso*-tetrakis porphyrins to rat liver mitochondria in the dark and upon photostimulation with the aim to find suitable compounds, with more intense and localized responses, for photodynamic therapy.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Mesoporphyrins (Fig. 1) from Mid Century Chemicals (Posen, IL, USA) were a kind gift from Dr. Marcel Tabak. All other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co.

Mitochondria Isolation

Mitochondria were isolated from the livers of adult Wistar rats after an overnight fasting by conventional differential centrifugation in 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, and 5 mM HEPES, pH 7.2 [19]. The mitochondrial suspension was washed twice in the same medium containing 0.1 mM EGTA, and the final pellet was resuspended in 250 mM sucrose resulting in a protein concentration of 80-100 mg/ml. The protein concentration was determined by the modified biuret method with cholate [20].

Standard Experimental Conditions

The experiments were performed at 28°C in standard medium containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.2, 2 mM sodium phosphate and 1 mM MgCl₂. Mitochondria were oxidizing a cocktail of NAD-linked substrates (malate, pyruvate, glutamate, and α -ketoglutarate) at 5 mM concentration. Oxygen consumption experiments were performed in standard medium plus 0.5 mM EGTA [18]. Other additions are indicated in figure legends.

Irradiation Conditions

Irradiation was performed under magnetic stirring at a constant temperature of 28 °C and radiation wavelength of 660 nm using a diode laser (ECCO[®] Fibras e Dispositivos LTDA, Campinas, Brasil). The output power was set to 6 mW and the irradiation time was 2 min and 45 s, resulting in a total dose of 1 J/cm².

Oxygen Uptake Measurements

Oxygen consumption was measured in a 1.7 ml thermostated water-jacketed vessel equipped with a magnetic stirrer, using a Clark-type electrode (Yellow Spring Instruments Company) connected to a recorder [21].

Estimation of Mitochondrial ROS Release

Mitochondrial ROS release was determined spectrofluorometrically by using the membrane-permeable fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCFDA, 1 μM) [22]. Fluorescence was determined at excitation and emission wavelength pair of 488/525 nm with a slit width of 3 nm. Calibration was performed with known concentrations of dichlorofluorescein (DCF), the product of H₂-DCF oxidation.

Mitochondrial Transmembrane Electrical Potential

Mitochondria (1 mg/ml) were incubated in standard reaction medium containing 3 μM tetraphenylphosphonium (TPP⁺). The extramitochondrial concentration of TPP⁺ was continuously monitored with a TPP⁺-selective electrode prepared in our laboratory as described previously [23]. The transmembrane electrical potential ($\Delta\Psi_m$) was calculated assuming that the TPP⁺ distribution between mitochondria and medium follows the Nerst equation [24], and corrected for TPP⁺ binding to the mitochondrial membrane [25].

Determination of Mitochondrial Swelling

Mitochondrial swelling was estimated as initial rate of the decrease in turbidity of the mitochondrial suspension at 520 nm measured in a Hitachi U-3000 spectrophotometer [15].

Determination of Association Constants (K_b)

The K_b values were calculated by applying the law of mass action [26] with some modifications. Briefly, determination of association constants of the Fe(III)TPPS₄ and Fe(III)TMPyP porphyrins with mitochondrial membranes were performed by titration of the porphyrin solution at fixed concentration (10 μM) with variable mitochondrial membrane protein concentrations (0.5 to 3.5 mg protein/ml). The porphyrins were added to the medium containing 250 mM sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.2, immediately after the addition of mitochondrial suspension. Samples were previously incubated for 20 minutes in the dark and centrifuged at 9000 x g in a Sanyo Hawk 15/05 centrifuge for 10 minutes, at 4° C. The optical absorption spectra of free porphyrins in the supernatant were measured in the range of 350-700 nm.

Statistical Analysis

The results shown in Fig. 2 – 4 and 8 are displayed as mean ± SEM (standard error of the mean) of at least three independent experiments performed in triplicate. The Fig. 5–7 are representative of at least three experiments. Comparison was done by Student's paired *t* test and the significance level was set at *p*<0.005. Statistical analyses were done using SYSTAT software 5.03 for Windows (SYSTAT, Inc, Evanston, IL, USA).

RESULTS

Effect of Mesoporphyrins on Mitochondrial Respiration

We investigated the effects of porphyrins with different peripheral substituents (cationic Fe(III)TMPyP and anionic Fe(III)TPPS₄; Fig. 1) on isolated rat liver mitochondria.

Prior to irradiation assays, the effects of porphyrins on mitochondria were evaluated by measuring the changes in the respiratory control ratio (R.C.), *i.e.*, the ratio between the rate of oxygen consumption in state 3 (in presence of 150 μM ADP) and in state 4 (in absence of ADP). Mitochondria were treated with increasing concentrations of porphyrins in the dark for 15 min. A decrease of 50% in the R.C. (EC_{50}) was found at 9.26 μM Fe(III)TMPyP and at 78.84 μM Fe(III)TPPS₄ (Fig. 2). A minimal effect (<5% of control values) was detectable at concentrations of 1 μM for each porphyrin. Thus, a progressive increase of state-4 (nonphosphorylating) respiration was caused by incubation of mitochondria with 5 to 15 μM Fe(III)TMPyP (Fig. 3A) or 50 to 70 μM Fe(III)TPPS₄ (Fig. 3B). The O₂ consumption in state 3 was unchanged at low doses of both porphyrins but started to decrease at higher doses (concentration range from 10 to 20 μM Fe(III)TMPyP and 50 to 100 μM Fe(III)TPPS₄).

Subsequently, irradiation assays were performed using porphyrin concentrations that elicited minimal effects on mitochondria in the dark (1 μM). The irradiation of RLM in the presence of 1 μM Fe(III)TMPyP decreased the R.C. by 28%, while this effect in the non-irradiated assays was only 3% (Fig. 4A). Hence, these data show that irradiation stimulated the action of Fe(III)TMPyP by almost 10 times.

Singlet oxygen (¹O₂) is one of the possible ROS produced by photodynamic action [27]. As the lifetime of ¹O₂ is known to be longer in D₂O [28], experiments were performed using medium containing 90% D₂O (Fig. 4A). Under these conditions, the action of Fe(III)TMPyP on mitochondrial respiratory control was stimulated by 10% when compared to the experiments without D₂O. Irradiation of mitochondria incubated in the presence of 1 μM Fe(III)TPPS₄ had no effect on respiratory control either in the presence or absence of D₂O (Fig. 4B).

Fe(III)TMPyP, but not Fe(III)TPPS₄, Induced Mitochondrial Permeability Transition in the Presence of Ca²⁺

Since Fe(III)TMPyP induced MPT at high doses in the dark [18], the influence of irradiation at lower concentrations of this porphyrin was assessed by monitoring ROS production, $\Delta\psi_m$ changes and mitochondrial swelling. The ROS production by

mitochondrial suspensions was analyzed using the membrane-permeable fluorescent probe dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCFDA). This probe detects ROS with preference for H₂O₂ [22]; therefore, the analysis included superoxide dismutase-like activity of Fe-porphyrins to convert mitochondrial O₂^{•-} to H₂O₂. ROS production by RLM in the dark was negligible either in the absence or presence of porphyrins (Fig. 5). However, both porphyrins under irradiation or in the presence of Ca²⁺ in the dark, increased mitochondrial ROS production (Fig. 5, light or Ca²⁺). The effect of irradiation and Ca²⁺ were additive (Fig. 5, light + Ca²⁺). Cyclosporin A (CsA), a classical inhibitor of mitochondrial permeability transition, strongly decreased ROS production only when the cationic form of the porphyrin was used (Fig. 5A, light + Ca²⁺ + CsA and light or Ca²⁺ + CsA). Since Fe(III)TMPyP showed a higher effect on ROS production by mitochondria, its possible ability to act as a permeability transition “inducer” was analyzed in the □□ experiments of Fig. 6 and 7. Fe(III)TMPyP but not Fe(III)TPPS₄ induced cyclosporin A-sensitive Δψ elimination (Fig. 6, A and B) and mitochondrial swelling (Fig. 7, A and B) after irradiation in the presence of Ca²⁺.

Association of *meso*-tetrakis Porphyrins with Mitochondria

Figure 8 shows that the concentration of free Fe(III)TMPyP in the supernatant was lower than free Fe(III)TPPS₄ when the concentration of mitochondrial protein was increased, indicating that mitochondria have higher preference for the cationic porphyrin than for the anionic form. The association constant of mitochondria with Fe(III)TMPyP (12.9 ± 2.17) was 11-fold higher than with Fe(III)TPPS₄ (1.15 ± 0.4). To determine whether this higher association of mitochondria with Fe(III)TMPyP was due to electrostatic interactions between the cationic porphyrin and the negatively charged inner mitochondrial membrane, another experiment was realized in the presence of an uncoupling (FCCP). The association constant (K_b) of mitochondria with Fe(III)TMPyP (5.14 ± 1.24) was 2.5-fold lower than with mitochondria coupled (12.9 ± 2.17), while no significant effect was observed with Fe(III)TPPS₄ (0.95 ± 0.54).

DISCUSSION

The efficiency of photosensitizers depends on their ability to be activated at low doses after irradiation. In this study, we established experimental conditions in which irradiated porphyrins exerted significant effects on isolated mitochondria at low concentration (1 μM). In the first step, we performed experiments to obtain data of dose-dependent effects of these porphyrins on mitochondrial respiration in the dark. A decrease of R.C. by 50% (EC_{50}) was reached at 9.26 μM of Fe(III)TMPyP and 78.84 μM of Fe(III)TPPS₄ (Fig. 2), indicating that the cationic porphyrin induces much higher toxicity on mitochondria than the anionic form. This decrease in R.C. presents two components. Firstly, a progressive increase of state-4 (nonphosphorylating) respiration rate at concentrations below the EC_{50} for both porphyrins (Fig. 3). The uncoupling effect caused by Fe(III)TMPyP was larger than that caused by Fe(III)TPPS₄. Secondly, the state-3 (phosphorylating) respiration rate was gradually inhibited (Fig. 3) at concentrations of porphyrins above the respective EC_{50} . A similar decrease in state-4 respiration was promoted by other porphyrins in this same range of concentration, and the authors interpreted the results as being the consequence of disarrangement of components of the respiratory chain [2]. Irradiation highly potentiated the action of Fe(III)TMPyP on mitochondrial respiration (about 10 times) at a dose that presented a minimal effect in the dark. No effect of irradiation was obtained with the anionic porphyrin.

With regard to the mechanism of Fe(III)TMPyP, the experiments performed in medium containing 90% D₂O (Fig. 4A) showed a low potentiation (about 10%), suggesting that this porphyrin is not acting preferentially via a ¹O₂ mechanism (type II reaction). Irradiation of mitochondria incubated in the presence of 1 μM Fe(III)TPPS₄ had no effect on R.C. either in the presence or absence of D₂O (Fig. 4B). The low effect of D₂O may be explained by the paramagnetic property of Fe(III) porphyrin, which is characterized by a large radiationless decay of the excited state and consequently, a singlet lifetime in the subpicosecond range [29]. In addition, it has been shown that the negatively charged micelle interfaces induce dimer formation of positively charged sensitizers that practically abolishes ¹O₂ generation [30].

ROS generated by mitochondria can induce MPT probably via thiol oxidation [14]. This event is important for PDT since MPT may trigger apoptosis or necrosis [31, 32]. Mitochondria are considered a main source of intracellular ROS production, which is augmented by Ca^{2+} load and this effect is even increased under MPT [14]. In this work, we show that Fe-porphyrins are able to impair mitochondrial functions through ROS generation and these effects are potentiated either by Ca^{2+} or irradiation; the effects of their combination being additive.

Under the present experimental conditions, mitochondria underwent permeability transition only when Ca^{2+} was added to mitochondria incubated in the presence of Fe(III)TMPyP under irradiation, a condition where ROS production was maximal. Interestingly, CsA that prevents MPT largely decreased ROS production suggesting that the mitochondrial damage associated with MPT is possibly responsible for a significant portion of the ROS generated by mitochondria irradiated in the presence of Fe(III)TMPyP and Ca^{2+} . In contrast, CsA did not significantly decrease ROS production when the anionic porphyrin was used. This suggests that the anionic porphyrin was responsible for almost all ROS production under these conditions.

It is known that Fe(III)TMPyP possesses superoxide dismutase-like activity that can initiate mitochondrial lipid peroxidation [13]. In addition, the mitochondrial redox system may weaken iron binding to the porphyrin nucleus favoring Fenton catalyzed reactions [33]. Both mechanisms must be responsible for the dose-dependent effect of porphyrins on mitochondrial oxygen consumption performed in the dark. On the other hand, under irradiation, the singlet state of the cationic porphyrin may act by transfer of proton or electron directly to a substrate, thereby causing all mitochondrial alterations reported here. The same transfer process of proton or electron has been shown to explain the efficiency of Cu(II)benzochlorin (paramagnetic photosensitizer) to damage AY-27 urothelial tumor cells [34] or transplanted tumors [35] after irradiation.

The predominant charge of porphyrin side chains may influence intracellular localization of the porphyrin: the cationic type shows a tendency for mitochondrial distribution while the anionic type is localized preferentially to lysosomes [7]. Hence, porphyrin structure can favor the association of the photosensitizer with biological

membranes. In order to evaluate if the association capability of the cationic or anionic porphyrin with the mitochondrial membrane was responsible for the different results obtained with these photosensitizers, we determined the binding constant of mitochondria with porphyrins. The results presented in Fig. 8 indicated that Fe(III)TMPyP has higher affinity for mitochondrial membrane than Fe(III)TPPS₄, probably due to electrostatic interactions between the cationic porphyrin and the negatively charged inner mitochondrial membrane [36, 37]. When a uncoupling was used (FCCP), the association constant (K_b) of mitochondria with Fe(III)TMPyP (5.14 ± 1.24) was 2.5-fold lower than with mitochondria coupled (12.9 ± 2.17), indicating that part of this association was due with the charge disagreement between the negative inner mitochondrial membrane and positive photosensitizer. The K_b of mitochondria with Fe(III)TPPS₄ and with this same conditions presented no significant differences (0.95 ± 0.54).

Furthermore, mitochondrial inner membrane is rich in cardiolipins that are attractive candidates for photooxidation, since they are negatively charged phospholipids containing four unsaturated fatty acids, easily attacked by ROS [38, 39]. In addition, it has been shown that the binding of positively charged sensitizers to proteins favors Type I reaction processes as discussed by Junqueira *et al* [30].

In conclusion, these results demonstrate a strong effect of the hydrophilic cationic porphyrin Fe(III)TMPyP on mitochondrial functions after irradiation at a low concentration (1 μ M). This porphyrin was able to induce important alterations in the inner mitochondrial membrane that impaired oxidative phosphorylation even in the absence of Ca²⁺ and induced mitochondrial permeability transition in the presence of the cation. Both alterations may lead to tumor cell death either by necrosis or apoptosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Marcel Tabak for kind supply of the porphyrins, Dr. Mauricio S. Baptista for the critical reading of the manuscript, and Edilene S. Siqueira and Elisângela J. Gomes for technical assistance. This work was supported by grants from Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant No. 03/08514-1 and 03/09536-9) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant No. 474794/2003-2). NMI is supported by a FAPESP fellowship (grant No. 03/08315-9) and JB by CNPq (grant No. 305381/2002-4).

REFERENCES

- [1] Q. Peng, J. Moan, J.M. Nesland, *Ultrastruct. Pathol.* 20 (1996) 109 – 129.
- [2] F. Ricchelli, L. Franchi, G. Miotto, L. Borsetto, S. Gobbo, P. Nikolov, J.C. Bommer, E. Reddi, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 306-319.
- [3] A.Uzdensky, A. Juzeniene, L.W. Ma, J. Moan, *Biochim. Biophys. Acta* 1670 (2004) 1-11.
- [4] A. Atlante, G. Moreno, S. Passarella, C. Salet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141 (1986) 584-590.
- [5] S.R. Chatterjee, T.S. Srivastava, J.P. Kamat, T.P. Devasagayam, *Mol. Cell Biochem.* 166 (1997) 25-33.
- [6] J. Morgan and A.R. Oseroff, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49 (2001) 71-86. Review.
- [7] K.W. Woodburn, N.J. Vardaxis, J.S. Hill, A.H. Kaye, D.R. Phillips, *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 725-732.
- [8] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889-905. Review.
- [9] D.J. Granville, C.M. Carthy, H. Jiang, G.C. Shore, B.M. McManus, D.W. Hunt, *FEBS Lett.* 437 (1998) 5-10.
- [10] D. Kessel and Y. Luo, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 28-35.
- [11] C.S. Foote, *Science* 162 (1968) 963-970.
- [12] M. Lam, N.L. Oleinick, A. Nieminen, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47379-47386.
- [13] N. Kasugai, T. Murase, T. Ohse, S. Nagaoka, H. Kawakami, S. Kubota, *J. Inorg. Biochem.* 91 (2002) 349-355.

- [14] A.J. Kowaltowski, R.F.Castilho, A.E. Vercesi, FEBS Lett. 495 (2001) 12-15.
- [15] T.E. Gunter and D.R. Pfeiffer, Am. J. Physiol. 258 (1990) 755-786.
- [16] M. Crompton, H. Ellinger, A. Costi, Biochem. J. 255 (1988) 357-360.
- [17] V.G. Valle, M.M. Fagian, L.S. Parentoni, A.R. Meinicke, A.E. Vercesi, Arch. Biochem. Biophys. 307 (1993) 1-7.
- [18] M.F. Nepomuceno, M. Tabak, A.E. Vercesi, J.Bioenerg.Biomembr. 34 (2002) 41-47.
- [19] W.C. Schneider and G.H. Hogeboom, Cancer Res. 11 (1951)1-22.
- [20] R.S. Kaplan and P.L. Pedersen, Biochem. J. 212 (1983) 279-288.
- [21] H.C. Oliveira, R.G. Cosso, L.C. Alberici, E.N. Maciel, A.G. Salerno, G.G. Dorighello, J.A. Velho, E.C. de Faria, A.E. Vercesi, FASEB J. 19 (2005) 278-280.
- [22] C. Garcia-Ruiz, A. Colell, M. Mari, A. Morales, J.C. Fernandez-Checa, J. Biol. Chem. 272 (1997) 11369-11377.
- [23] N. Kamo, M. Muratsugu, R. Hongoh, Y. Kobatake, J. Mem. Biol. 49 (1979) 105-121.
- [24] M. Muratsugu, N. Kamo, K. Kurihara, Y. Kobatake, Biochim. Biophys. Acta 464 (1977) 613-619.
- [25] B.D. Jensen, K.K. Gunter, T.E. Gunter, Arch. Biochem. Biophys. 248 (1986) 305-323.
- [26] M.F. Nepomuceno, M.E. de Oliveira Mamede, D. Vaz de Macedo, A.A. Alves, L. Pereira-da-Silva, M. Tabak, Biochim. Biophys. Acta 1418 (1999) 285-294.
- [27] M. Athar, H. Mukhtar, C.A. Elmetts, M.T. Zaim, J.R. Lloyd, D.R. Bickers, Biochem. Biophys. Res. Commun. 151 (1988) 1054-1059.
- [28] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge (Eds.), Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, New York, 1999.
- [29] K. Kalyanasundaram (Ed.), Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes, Academic Press Inc., San Diego, CA, 1992.
- [30] H.C. Junqueira, D. Severino, L.G. Dias, M.S. Gugliotti, M.S. Baptista, Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 2320-2328.

- [31] K. Polyak, Y. Xia, J.L. Zweier, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nature* 389 (1997) 300-305.
- [32] N. Zamzami, T. Hirsch, B. Dallaporta, P.X. Petit, G. Kroemer, *J. Bioenerg. Biomembr.* 29 (1997) 185-193.
- [33] S.W. Ryter and R.M. Tyrrell, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 289-309.
- [34] J.A. Hampton, D. Skalkos, P.M. Taylor, S.H. Selman, *Photochem. Photobiol.* 58 (1993) 100-105.
- [35] S.H. Selman, J.A. Hampton, A.R. Morgan, R.W. Keck, A.D. Balkany, D. Skalkos, *Photochem. Photobiol.* 57 (1993) 681-685.
- [36] M.P. Murphy, *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 326-330.
- [37] N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002) 1-21.
- [38] B.C. Wilson, M. Olivo, G. Singh, *Photochem. Photobiol.* 65 (1997) 166-176.
- [39] R.L. Morris, K. Azizuddin, M. Lam, J. Berlin, A.L. Nieminen, M.E. Kenney, A.C. Samia, C. Burda, N.L. Oleinick, *Cancer Res.* 63 (2003) 5194-5197.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Porphyrin structures: Panel A- cationic *meso*-tetrakis (4-*N*-methyl pyridiniumyl) porphyrin Fe(III)TMPyP; **Panel B-** anionic *meso*-tetrakis (p-sulfonatophenyl) porphyrin Fe(III)TPPS₄.

Fig.2. Dose-response curve of Fe(III)TMPyP (◆) and Fe(III)TPPS₄ (□) on mitochondrial respiratory control (R.C.) in the dark. RLM (1 mg/ml) were preincubated for 15 min in standard medium containing 5 mM substrate cocktail (malate, pyruvate, α -ketoglutarate and glutamate) in the presence of different porphyrin concentrations. State-3 respiration was initiated by the addition of 150 μ M ADP.

Fig. 3. Dose-response curve of Fe(III)TMPyP and Fe(III)TPPS₄ on state-3 (◆) and 4 (□) mitochondrial respiratory rates in the dark. The rates of respiration (natom O/mg/min) were measured under the conditions of Fig. 2. **Panel A:** Fe(III)TMPyP. **Panel B:** Fe(III)TPPS₄.

Fig. 4. Respiratory control (R.C.) of mitochondria irradiated in the presence of Fe(III)TMPyP (A) and Fe(III)TPPS₄ (B). RLM (1 mg/ml) were irradiated in the standard medium under the conditions of Fig. 2. **Panel A:** Fe(III)TMPyP. **Panel B:** Fe(III)TPPS₄.

*RLM treated with porphyrin vs control, $p < 0.005$.

Fig. 5. Mitochondrial ROS generation in the presence or absence of porphyrins.

RLM (0.5 mg/ml) were incubated in the presence or absence of 1 μ M Fe(III)TMPyP (A) or 1 μ M Fe(III)TPPS₄ (B) plus 50 μ M Ca²⁺, 1 μ M CsA, and were irradiated (“light”) as indicated in the figure. Representative of $n=3$. **Panel A:** the rates of DCF production (in nmol/mg/min; at 10 min incubation) are as follows: 0.083 ± 0.005 (control), 0.204 ± 0.021 (Ca²⁺), 0.126 ± 0.002 (Ca²⁺ + CsA), 0.302 ± 0.021 (light), 0.144 ± 0.01 (light + CsA), 0.487 ± 0.023 (light + Ca²⁺), 0.164 ± 0.01 (light + Ca²⁺ + CsA). * “light + Ca²⁺” vs “light + Ca²⁺ + CsA”, $p < 0.005$. **Panel B:** the rates of DCF production (in nmol/mg/min; at 10 min

incubation) are as follows: 0.080 ± 0.020 (control), 0.143 ± 0.004 (Ca^{2+} or $\text{Ca}^{2+} + \text{CsA}$), 0.235 ± 0.01 (light or light + CsA), 0.330 ± 0.003 (light + Ca^{2+}), 0.290 ± 0.002 (light + $\text{Ca}^{2+} + \text{CsA}$). * “light + Ca^{2+} ” vs “light + $\text{Ca}^{2+} + \text{CsA}$ ”, $p > 0.05$.

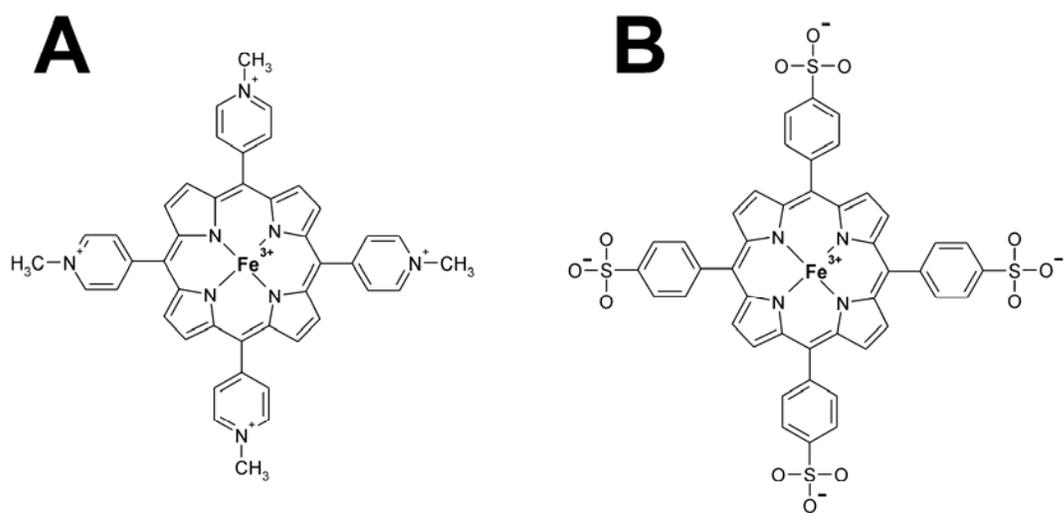
Fig. 6. Fe(III)TMPyP, but not Fe(III)TPPS₄, promoted cyclosporin A sensitive $\Delta\Psi_m$ decrease. RLM (1 mg/ml) were irradiated in the standard medium under the conditions of Fig. 5 and in the presence of 1 μM TPP⁺. The $\Delta\Psi_m$ was collapsed by 0.06 $\mu\text{g/ml}$ valinomycin. (a) RLM irradiated; (b) 1 μM Fe(III)TMPyP; (c) 1 μM Fe(III)TMPyP irradiated; (d) 1 μM Fe(III)TMPyP irradiated plus 1 μM CsA; (e) 1 μM Fe(III)TPPS₄; (f) 1 μM Fe(III)TPPS₄ irradiated. Representative data ($n=3$).

Fig. 7. Irradiation in the presence of Fe(III)TMPyP, but not Fe(III)TPPS₄, promoted mitochondrial swelling sensitive to cyclosporin A. Mitochondrial swelling were measured under the conditions of Fig. 5. **Panel A:** Fe(III)TMPyP. **Panel B:** Fe(III)TPPS₄. Representative data ($n=3$). Control lines represent experiments performed under conditions containing porphyrins \pm light or \pm Ca^{2+} , without the combination of light + Ca^{2+} .

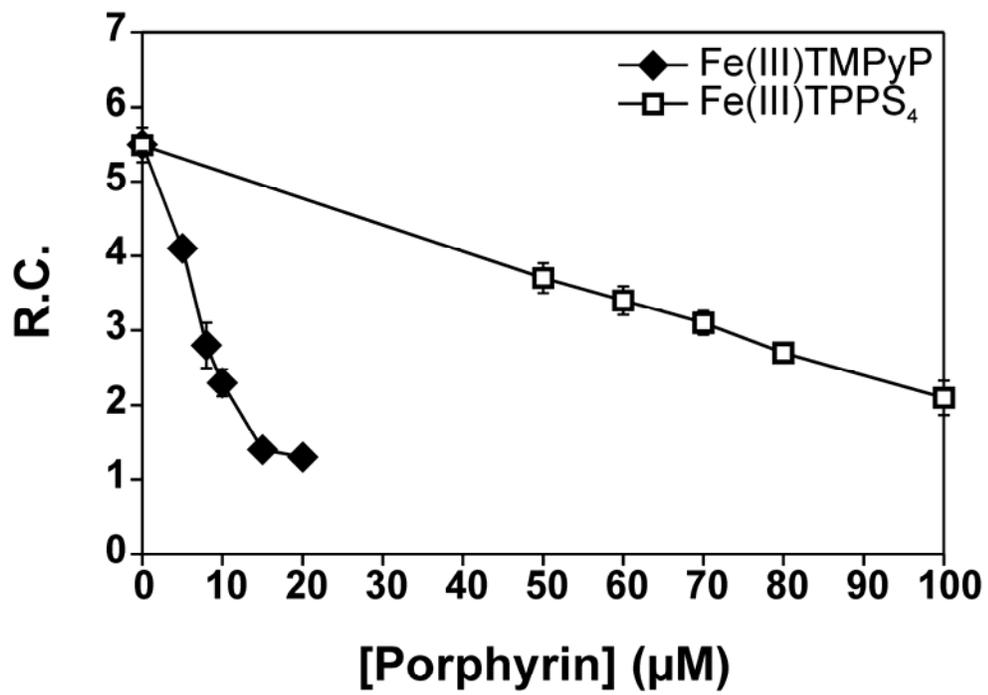
Fig. 8. Determination of Association Constants (K_b) of Fe(III)TPPS₄ (●) and Fe(III)TMPyP (■) with mitochondria. RLM (0.5 to 3.5 mg protein/ml) were incubated in the presence of porphyrins (10 μM) and the optical absorption spectra of the supernatants (free porphyrins) were measured in the range of 350-700 nm. The K_b values was found at 9.5 ± 1.3 for Fe(III)TMPyP and at 0.9 ± 0.1 for Fe(III)TPPS₄.

FOOTNOTE

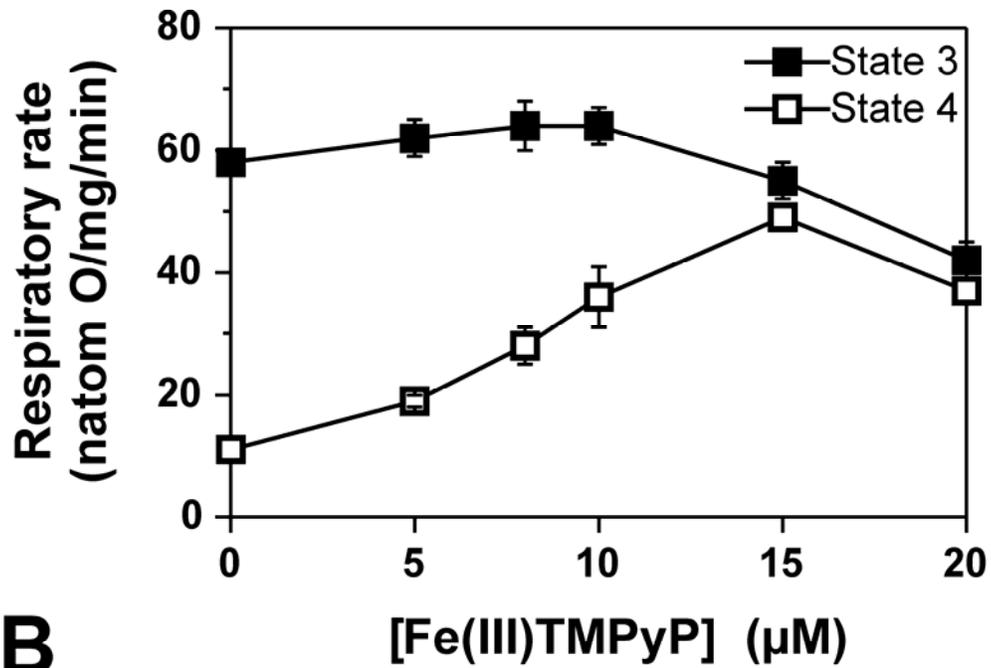
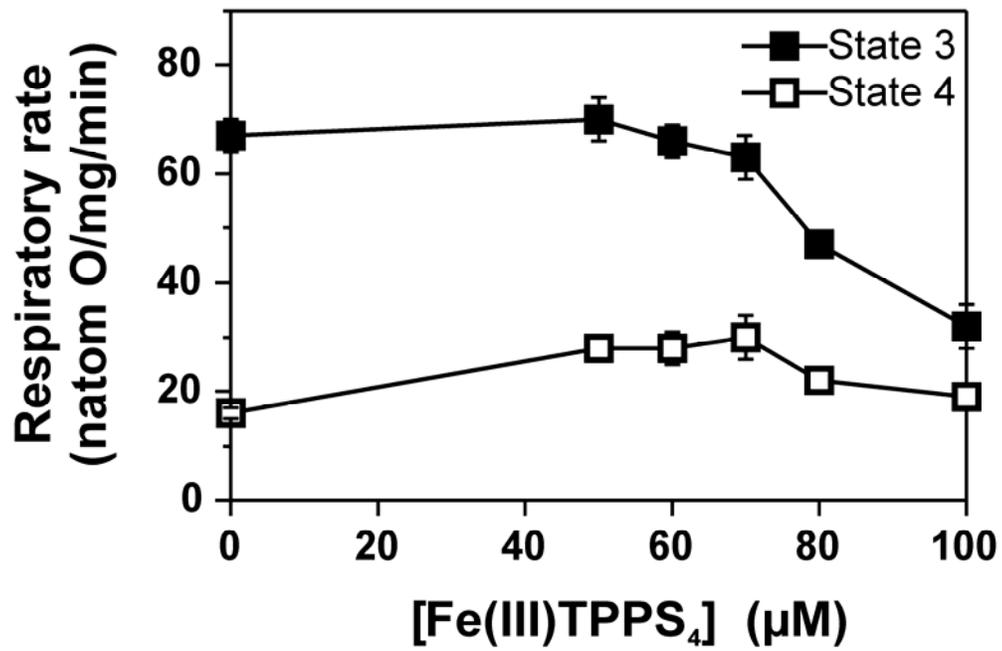
¹*Abbreviations used:* Fe(III)TPPS₄, Fe(III) *meso*-tetrakis (p-sulfonatophenyl)-porphyrin; Fe(III)TMPyP, Fe(III) *meso*-tetrakis (4-*N*-methyl pyridiniumyl) porphyrin; D₂O, deuterium oxide; CsA, cyclosporin A; H₂-DCFDA, dichlorodihydrofluorescein diacetate; VAL, valinomycin; TPP⁺, tetraphenylphosphonium; EGTA, ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether) *N,N,N',N'*-tetracetic acid; HEPES, 2-hydroxyethyl-1-piperazinethanesulfonic acid; RLM, rat liver mitochondria; MPT, mitochondrial permeability transition; Δψ_m, mitochondrial transmembrane potential.



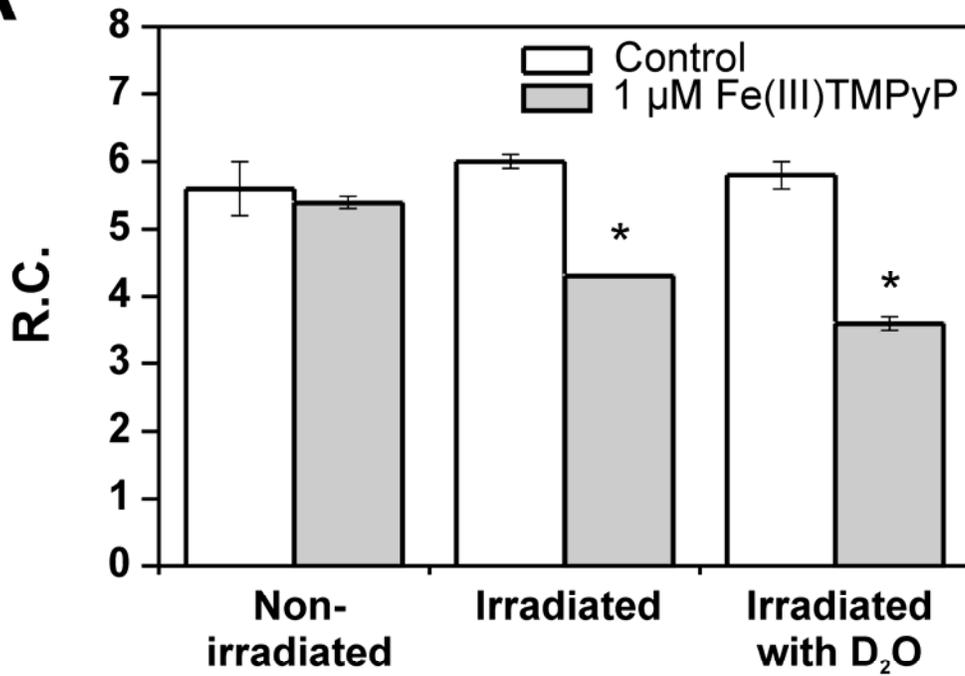
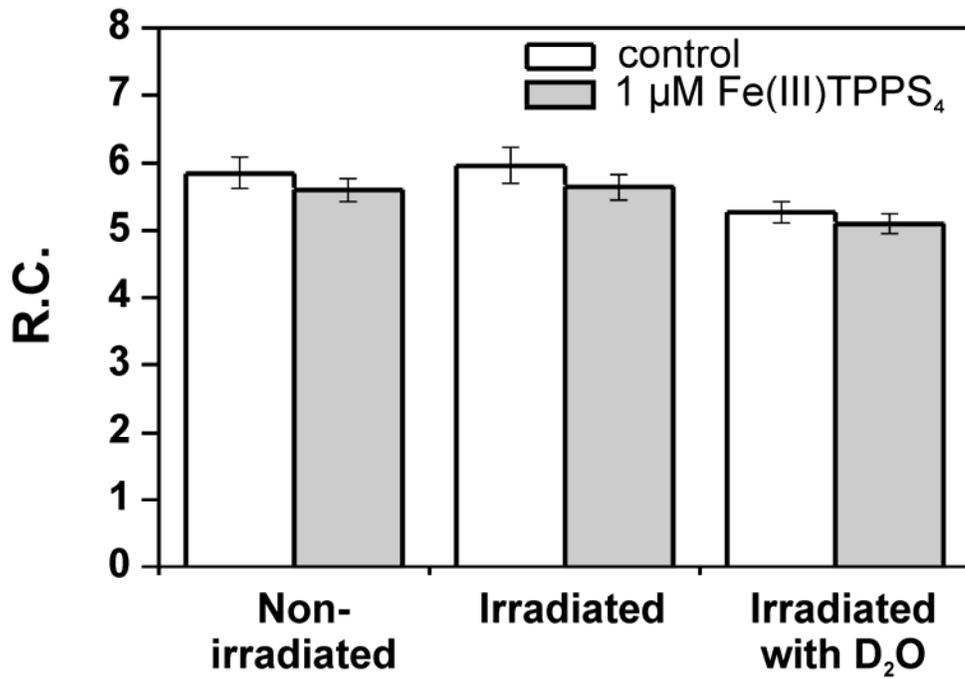
Inada Figure 1



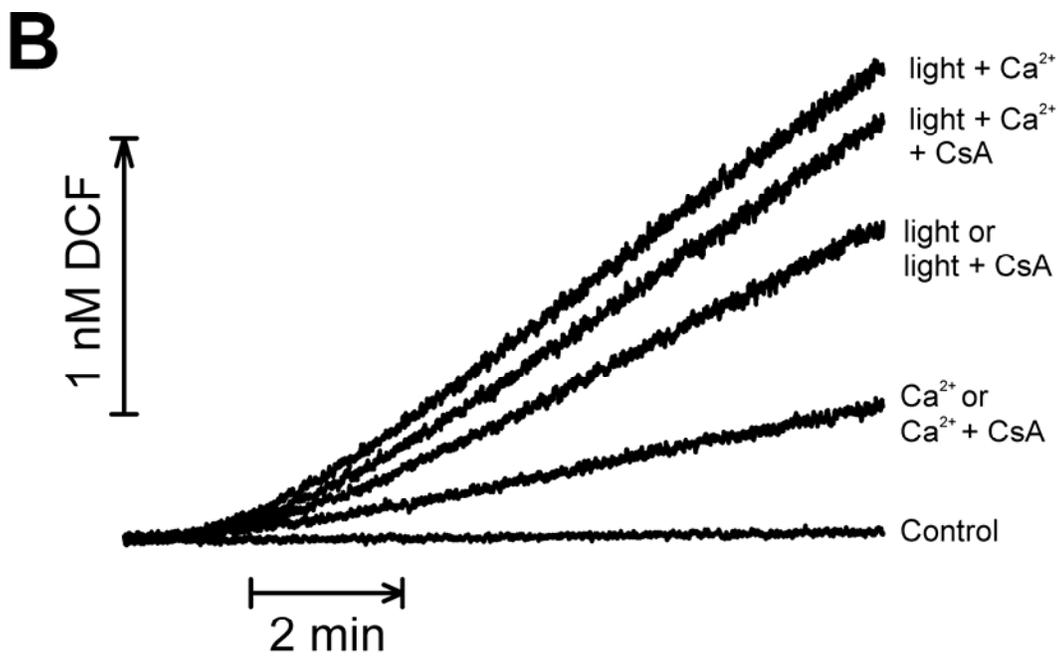
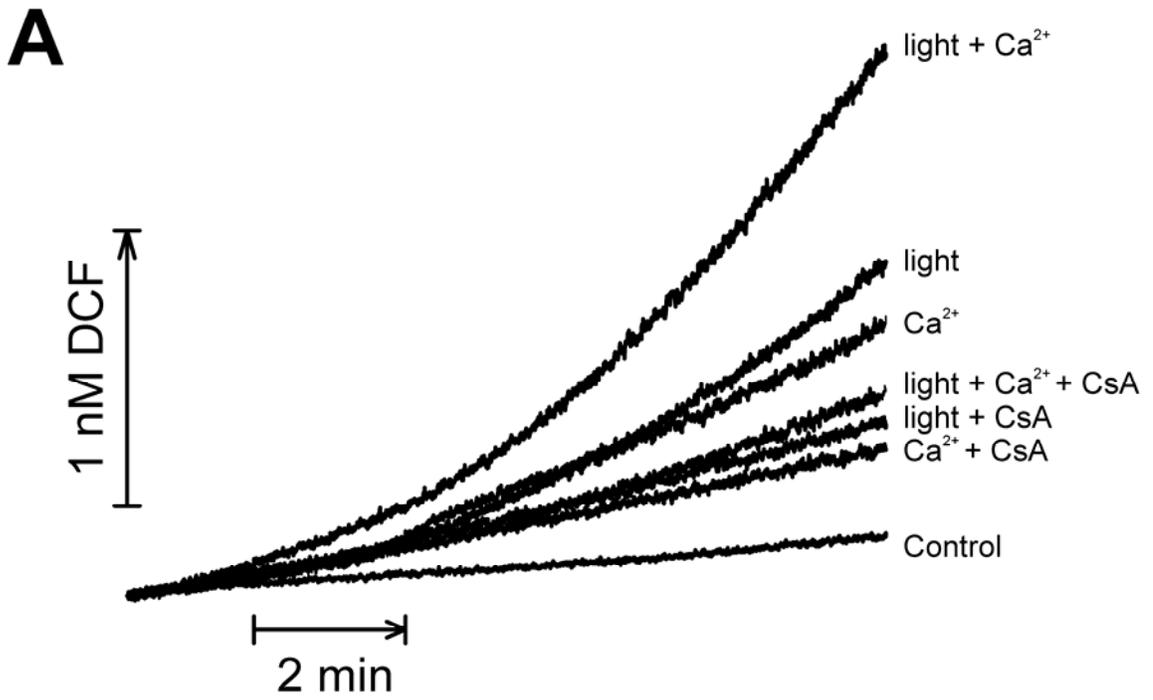
Inada Figure 2

A**B**

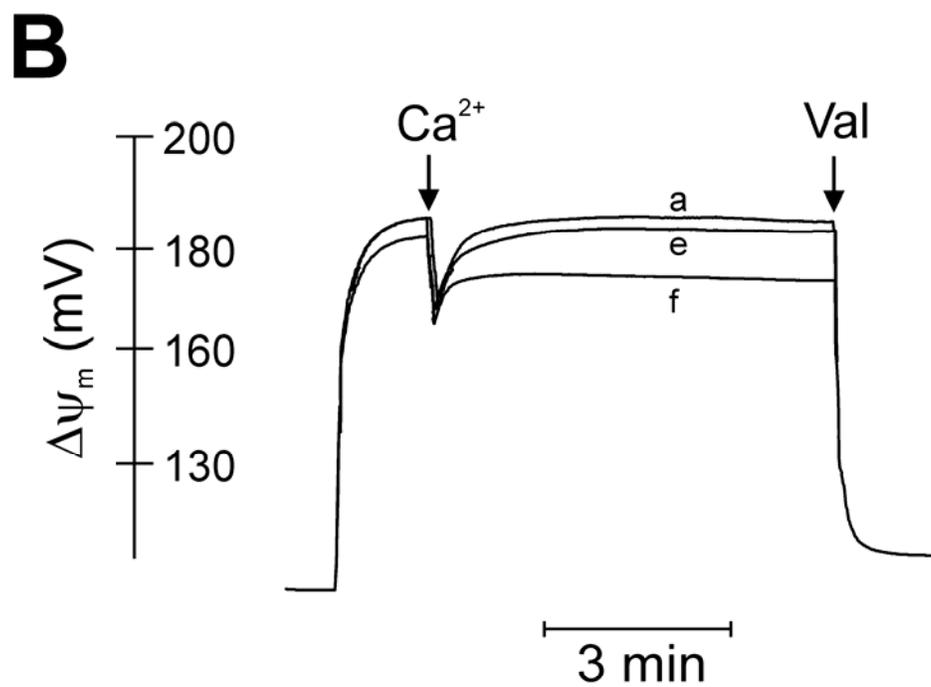
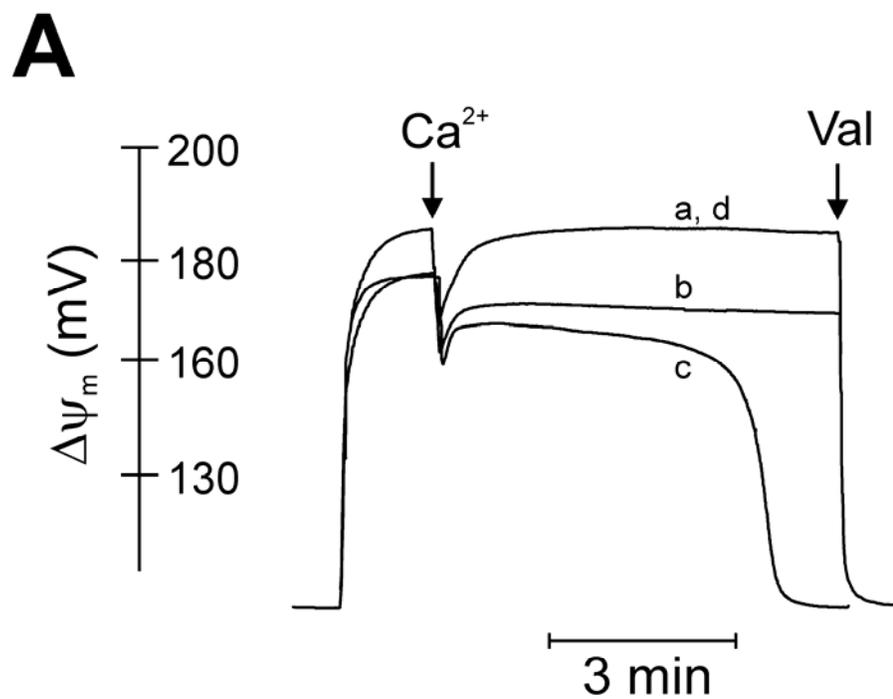
Inada Figure 3

A**B**

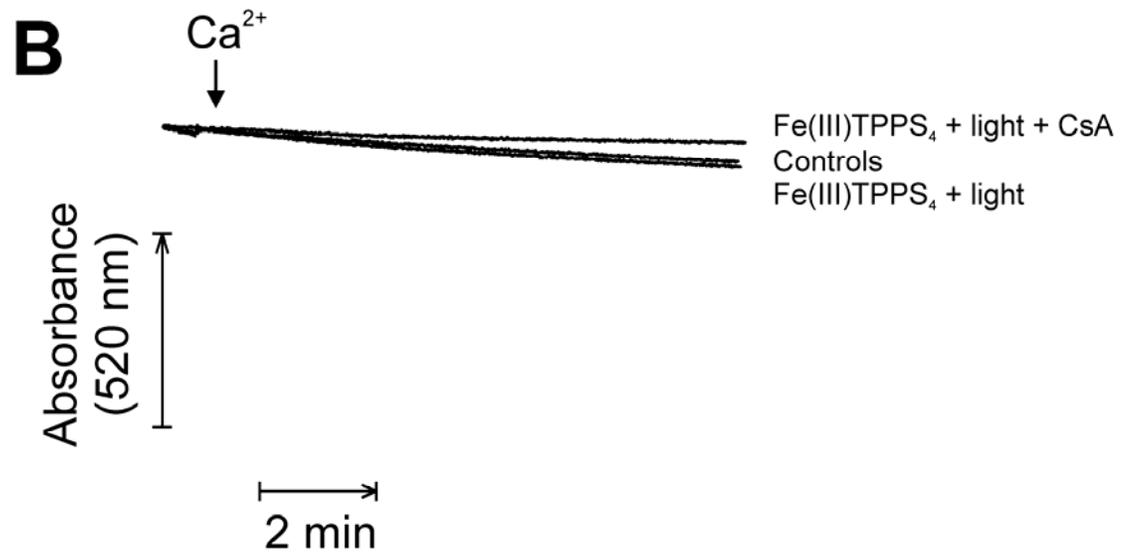
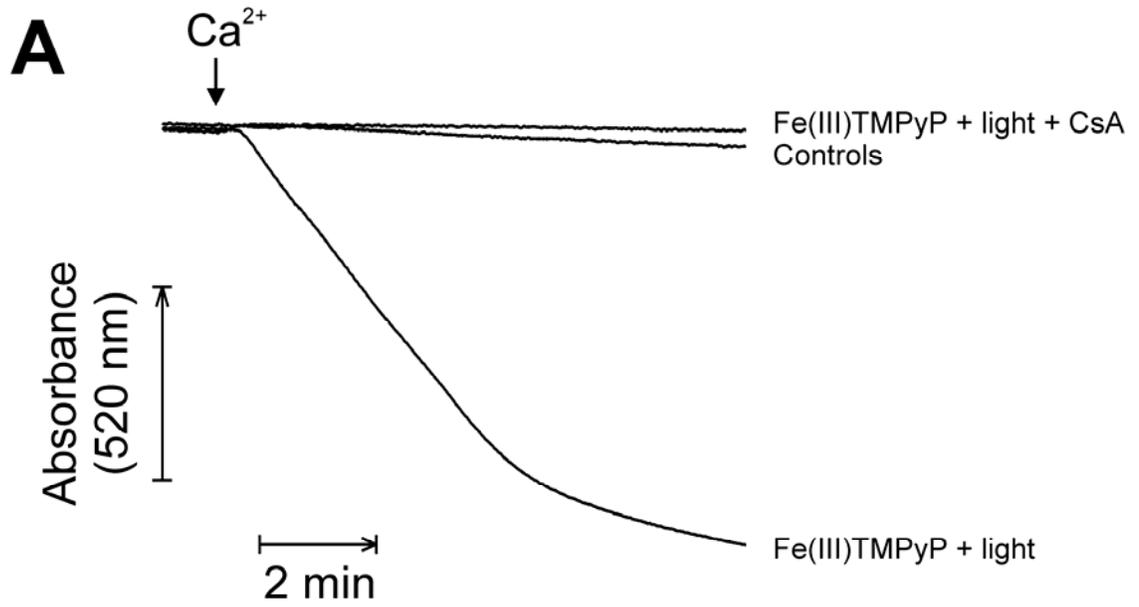
Inada Figure 4



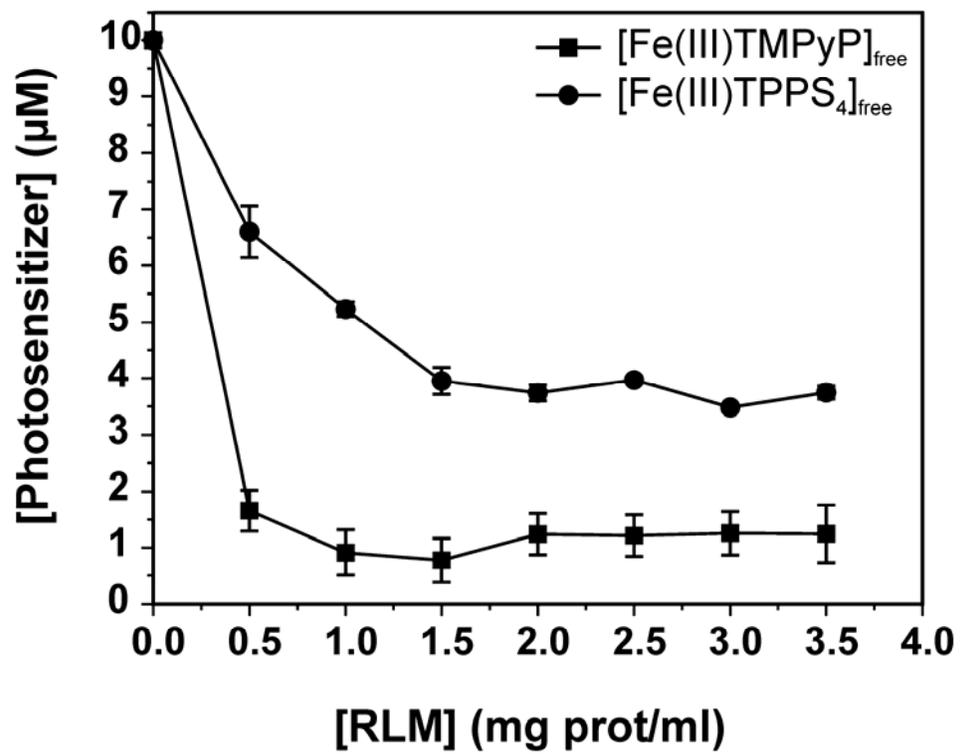
Inada Figure 5



Inada Figure 6



Inada Figure 7



Inada Figure 8