



VINÍCIUS VERCESI ALMADA NOGUEIRA FERREIRA

**INIBIÇÃO DA TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE
MITOCONDRIAL POR cPTIO, UM SEQUESTRADOR DE
ÓXIDO NÍTRICO**

CAMPINAS

2013

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

VINÍCIUS VERCESI ALMADA NOGUEIRA FERREIRA

**INIBIÇÃO DA TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE
MITOCONDRIAL POR cPTIO, UM SEQUESTRADOR DE
ÓXIDO NÍTRICO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi

Dissertação de mestrado apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual De Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica. Área de concentração em Biologia Estrutural, Celular Molecular e do desenvolvimento.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO VINÍCIUS VERCESI ALMADA NOGUEIRA FERREIRA
E ORIENTADO PELO PROF. DR. ANÍBAL EUGÊNIO VERCESI**

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Anibal E. Vercesi", is written over a horizontal line.

CAMPINAS

2013

III

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F413i Ferreira, Vinícius Vercesi Almada Nogueira, 1986-
Inibição da transição de permeabilidade mitocondrial
por cPTIO, um sequestrador de óxido nítrico / Vinícius
Vercesi Almada Nogueira Ferreira. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2013.

Orientador : Aníbal Eugênio Vercesi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mitocôndrias. 2. Óxido nítrico. 3. Sequestrador.
4. Transição de permeabilidade mitocondrial. I. Vercesi,
Anibal Eugenio, 1946-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Inhibition of mitochondrial permeability transition by cPTIO, a nitric oxide scavenger.

Palavras-chave em inglês:

Mitochondria

Nitric oxide

Scavenger

Mitochondrial permeability transition

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

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Aníbal Eugênio Vercesi [Orientador]

Eliana Cotta de Faria

Giovanna Rosa Degasperi

Data da defesa: 29-01-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

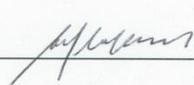
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

VINICIUS VERCESI ALMADA NOGUEIRA FERREIRA

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

MEMBROS:

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



2. PROF(A). DR(A). ELIANA COTTA DE FARIA



3. PROF(A). DR(A). GIOVANNA ROSA DEGASPERI



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

Data: 29 de janeiro de 2013

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 a orientação do Prof. Dr. Aníbal Eugenio Vercesi, na vigência dos auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX, UNICAMP).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Aníbal Vercesi por ter me recebido em seu laboratório e me dado a oportunidade de trabalhar em um grupo de pesquisa de alto nível.

Ao Professor Roger Castilho, por seus ensinamentos. Suas críticas sempre corretas. Sempre disposto a ajudar todos e colaborar com a ciência. Em meus momentos de incertezas o Sr sempre me deu luz. Obrigado por tudo.

Aos meus pais Valter e Hariclêe por todo o apoio, amor e por terem me dado uma das coisas mais importantes na vida, honestidade, respeito e principalmente educação.

Aos meus irmãos Ju e Amanda pelo apoio, incentivo e principalmente pela parceria, amo muito vocês.

A minha noiva Carla Barbosa, por me ajudar muito e sempre estar ao meu lado e me apoiar independente de tudo. Por ser paciente, dedicada, companheira e sempre me orientando a fazer a coisa certa.

Carlos e Cirlene por todo o apoio que me deram desde o início até o fim do meu mestrado.

Agradeço por ter participado das reuniões de laboratório e principalmente ao Mitomeeting, que me deram muita segurança em minhas apresentações fazendo com que eu evoluísse como pessoa.

A todos os meus familiares por todo o apoio e orientação.

Mary Aranda, sempre firme nas correções da tese.

Ao Tiago Figueira, pelos seus ensinamentos e críticas que sempre me fizeram olhar tudo com mais clareza.

Ao meu Querido e amigo Roberto Stahl, pelos conselhos, dicas e amizade.

Aos amigos Carlão e Carina que sempre me ajudaram dentro do laboratório.

A todos os amigos e colegas de laboratório, Franco, Arthur, Rute, Guilherme, Audrey, Carol, Ivan, Luciana, Paolo, Edilene, Fábio, Juliana Ruas, Silvinha, Daniela, Rafaela, Camila, Hanan, Ana Catarina, Felipe, Márcia.

"Ninguém baterá tão forte quanto à vida. Porém, não se trata de quão forte pode bater, se trata de quão forte pode ser atingido e continuar seguindo em frente. É assim que a vitória é conquistada."

Rocky Balboa

Além de essencial na respiração celular, a mitocôndria é considerada uma organela de papel fundamental em processos de sinalização e morte celular. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) pela mitocôndria podem ser consequência destes processos de sinalização tanto em condições fisiológicas quanto em patologias, tais como a dislipidemia e câncer. A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é um tipo de permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna que permite a passagem de moléculas de até 1,5 KDa, causando dissipação do potencial eletroquímico de H^+ e inchamento da organela. O termo transição é usado porque a permeabilização pode ser parcialmente revertida, logo após o início do processo, pela adição de quelantes de Ca^{2+} como o EGTA, por exemplo, ou redutores tiólicos. A oxidação de grupamentos tiólicos promove a TPM. Os experimentos apresentados nesta tese indicam o composto 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) caracteriza-se como um inibidor da TPM. As pequenas alterações observadas em relação a respiração e fosforilação oxidativa não se correlacionam com a abertura do PTP, pelo menos com base na literatura corrente. Em outras palavras, a presença de cPTIO diminuiu os níveis de NO^* mitocondrial e desviou a reação deste composto com o ânion superóxido diminuindo a produção de peroxinitrito, provável indutor de abertura do PTP nestas condições experimentais.

In addition to be the site of cellular respiration, the mitochondrion has important role in cell signaling for cell physiology and death. The generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) by the mitochondrion can participate in cellular signaling both in physiological and pathological conditions, such as dyslipidemia and cancer. The Mitochondrial Permeability Transition (MPT) is a non-selective inner membrane permeabilization that enables free passage of molecules up to 1.5 kDa, dissipating the H⁺ electrochemical gradient and the organelle's swelling. The term transition is applied because the permeabilization can be partially reverted, right after the beginning of the process, by chelating extramitochondrial Ca²⁺ with EGTA, for example, or by using thiol reducers. The oxidation of membrane protein thiols leads to MPT. The experiments shown in this thesis indicate that the compound 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) has proven to be a strong inhibitor agent of the MPT. The small changes observed in relation to respiration and oxidative phosphorylation did not correlate with the opening of PTP, at least on the basis of the current literature. In other words, the presence of cPTIO decreased levels of NO[•] and mitochondrial diverted reaction of this compound with superoxide anion decreasing production of peroxynitrite, likely inducing PTP opening under these experimental conditions.

LISTA DE FIGURAS

	PÁG
Figura 1	Cadeia respiratória e teoria quimiosmótica 23
Figura 2	Modelo proposto para explicar a formação do poro de TPM 27
Figura 3	Formação de ONOO ⁻ em sistemas biológicos 29
Figura 4	Reação de formação de NO [•] 31
Figura 5	Reação de cPTIO com NO [•] 34
Figura 6	Efeito de cPTIO sobre a respiração mitocondrial 46
Figura 7	Efeito de cPTIO sobre o potencial de membrana mitocondrial interna 48
Figura 8A	cPTIO retarda a dissipação do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$) induzida por íons Ca ²⁺ 50
Figura 8B	cPTIO retarda a dissipação do potencial de membrana interna ($\Delta\Psi$) induzida em mitocôndrias de coração por íons de Ca ²⁺ 51
Figura 9A	cPTIO retarda a dissipação do potencial de membrana interna ($\Delta\Psi$) induzida por íons de Ca ²⁺ em mitocôndrias de fígado energizadas por substratos ligados a NADPH 52
Figura 9B	cPTIO retarda a dissipação do potencial de membrana interna ($\Delta\Psi$) em mitocôndria de fígado induzida por íons de Ca ²⁺ 53
Figura 10	Curva dose resposta de cPTIO sobre eliminação do potencial elétrico de mitocôndrias de coração 54
Figura 11	Produção de H ₂ O ₂ por mitocôndrias de coração na presença ou não de cPTIO 58

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP = Adenosina Difosfato
ANT = Translocador de Nucleotídeos de adenina
ATP = Adenosina Trifosfato
BH₄ = Tetrahidrobiopterina
Ca²⁺ = Cálcio
CPTIO = 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
CR = Controle respiratório
CsA = Ciclosporina A
DIDS = 4,4'-diisotiocianatostilbene-2,2'-dissulfônico
EGTA = ácido etileno glicol tetracético
ERNS = Espécies reativas de nitrogênio
EROS = Espécies reativas de oxigênio
ETF = flavoproteína transferidora de elétrons
FAD = Flavina adenina
FMN = Flavinamononucleotideo reduzido
GP_x = Glutaciona peroxidase
GR = Glutaciona redutase
GSH = Glutaciona
H₂O = água
H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio
MMI = Membrana mitocondrial interna
MnSOD = Manganês superóxido dismutase
NEM = N-etilmaleimida
NO[•] = Oxido nítrico
NOS = oxido nítrico sintase
O₂ = Oxigênio molecular
O₂⁻ = Radical anion superóxido
OH[•] = Radical Hidroxil
ONOO⁻ = Peroxinitrito
Pi = Fosfato inorgânico
PR_x = Peroxirredoxina redutase
PTIO = 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide
PTP = Poro de transição de permeabilidade

-SH = Grupos tiólicos

SNO = S-nitrosotiois

SOD = Superóxido dismutase

TH = Transidrogenase

TPM = Transição de permeabilidade mitocondrial

TP_x = Tio redoxina redutase

TR = Tio redoxina

VDAC = canal aniônico voltagem dependente

$\Delta\Psi$ = Potencia de membrana

RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. REAGENTES	38
3.2. ANIMAIS	38
3.3. ISOLAMENTO DE MITOCONDRIA DE FÍGADO	38
3.4. ISOLAMENTO DE MITOCONDRIA DE CORAÇÃO	39
3.5. DOSAGEM DE PROTEÍNA	39
3.6. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	39
3.7. MEDIDA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO	40
3.8. ADP/O	40
3.9. POTENCIAL DE MEMBRANA	41
3.10. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	41
3.11. ANALISE ESTATÍSTICA	42
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	43
5. CONCLUSÃO	59
6. REFERÊNCIA	61

Bioenergética mitocondrial

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucarióticas vegetais e animais. São organelas intracelulares responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução em energia eletroquímica necessária para os processos celulares (Nicholls e Ferguson, 2002). Este processo de conversão de energia de óxido-redução em energia química na forma de ATP é denominado de fosforilação oxidativa e envolve uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintetase localizados na membrana mitocondrial interna (MMI).

Cadeia Respiratória

Com base nos estudos realizados por (Mitchell, 1961) sabe-se que a redução de oxigênio (O_2) a água (H_2O) pela cadeia respiratória gera potencial eletroquímico de prótons entre o meio interno (matriz mitocondrial) e o espaço intermembranas, que fornece a energia necessária para a fosforilação do ADP. A mitocôndria além de ser uma fonte geradora de ATP, também tem um controle importante sobre a morte celular, com a liberação de fatores indutores de apoptose e citocromo c, que podem desencadear apoptose (Skulachev, 1998).

Quando os elétrons passam através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória, ocorre uma ejeção de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração. Durante este processo é gerado um gradiente de H^+ ou gradiente eletroquímico, entre a matriz e o espaço intermembranas. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico é o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a geração de energia química. O componente elétrico ($\Delta\Psi$) deste potencial atinge valores de aproximadamente -180 mV no estado de repouso, e pelo componente químico (ΔpH) oscilando de 0 até 1 unidade de pH. A ATP sintetase é constituída de duas regiões distintas denominadas F1, solúvel e localizada na matriz mitocondrial e região FO, hidrofóbica e inserida na

membrana mitocondrial interna. O fluxo de H^+ do espaço intermembranas de volta à matriz através das subunidades FOF1 da ATP sintetase, desta vez a favor do gradiente, permite a reação de fosforilação do ADP.

A cadeia respiratória contém quatro complexos proteicos (Complexo I, II, III e IV) localizados na crista interna da mitocôndria que faz a transferência de elétrons entre a transferência de elétrons das coenzimas NADH e $FADH_2$, para o oxigênio que é o aceptor final. Neste processo os elétrons são transferidos bombeados através dos complexos I, III e IV, gerando então um gradiente eletroquímico de prótons que é usado na síntese de ATP.

Elétrons provenientes das coenzimas NADH e $FADH_2$, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à NADH desidrogenase (componente do complexo I). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH_2). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Outros substratos passam elétrons para a cadeia respiratória diretamente no nível da ubiquinona. O primeiro passo na oxidação do acil-CoA graxo é catalisado pela flavoproteína acil-CoA desidrogenase, e envolve a transferência de elétrons do substrato para a FAD desidrogenase, e em seguida para a flavoproteína transferidora de elétrons (ETF), e finalmente para ETF ubiquinona oxidoreductase. Essa enzima transfere elétrons para dentro da cadeia respiratória pela ubiquinona reduzida. No músculo esquelético e no cérebro, o glicerol 3-fosfato formado a partir do glicerol liberado de triacilglicerol ou da diidroxicetona fosfato, é oxidado pela glicerol fosfato desidrogenase. Essa enzima é localizada na face externa da membrana mitocondrial interna, sendo mais um canal de elétrons para a cadeia respiratória por reduzir a ubiquinona. O UQH_2 é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona ($UQH\cdot$), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos de $UQH\cdot$, um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, que quando oxidadas regeneram UQ e doam elétrons para o citocromo c. Esse transfere elétrons à citocromo c oxidase (complexo IV), responsável pela transferência final de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água (Nicholls e Ferguson, 2002).

A geração do gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente, este mecanismo é fundamental, sendo usado 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 desse 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+} (transportando duas cargas positivas para o interior da mitocôndria) (Nicholls e Ferguson, 2002).

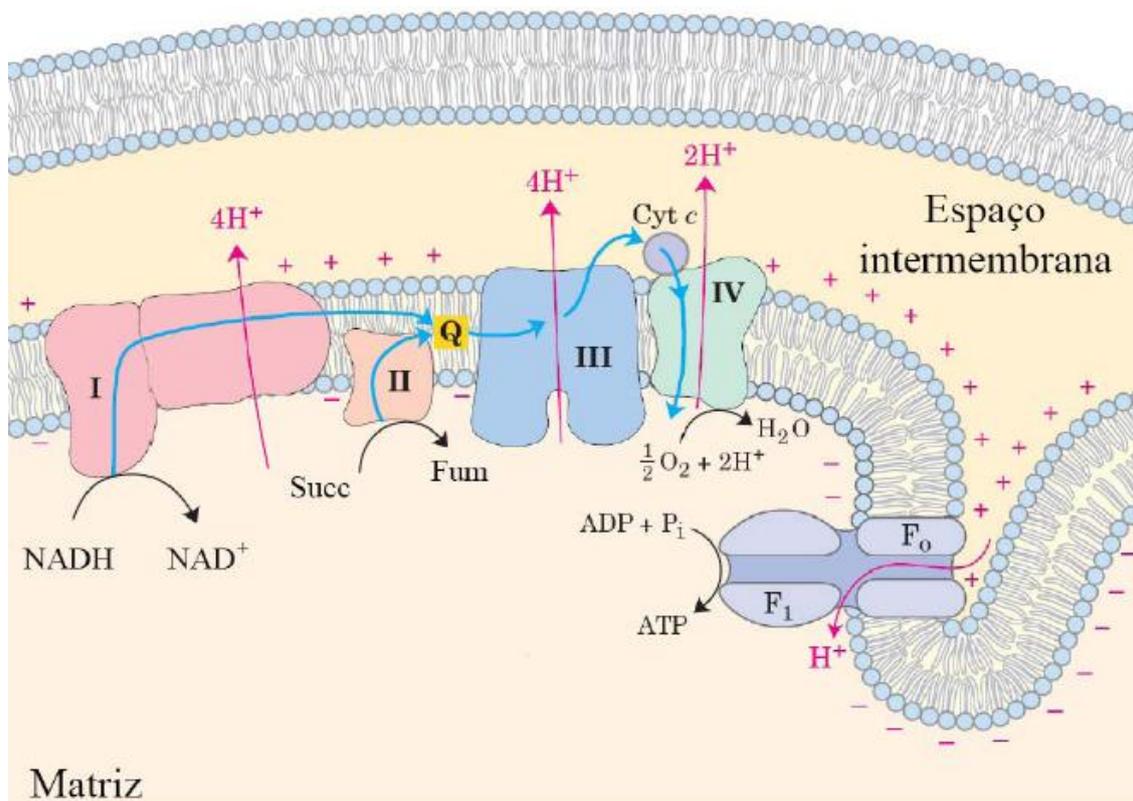


Figura 1: Cadeia respiratória e teoria quimiosmótica. Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto elétrico ($\Delta\Psi$). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem reentrar na matriz através de canais específicos de prótons (F_0). A força próton-motora que impulsiona os prótons de volta para a matriz fornece a energia para a síntese do ATP, catalisada pelo complexo F_1 associado com F_0 . Modificado de **Lehninger (2004)**.

Geração de Oxigênio reativo pela mitocôndria, sistema antioxidante e transição de permeabilidade mitocondrial.

A mitocôndria continuamente gera EROs pela cadeia respiratória mitocondrial (Boveris e Chance, 1973; Turrens, 1997; Kowaltowski et al., 1999) ou produzidas através do metabolismo de compostos endógenos, como o ácido 5-aminolevulínico, um precursor heme, ou xenobiótico (Hermes-Lima et al., 1995).

A mitocôndria por gerar $O_2^{\cdot-}$ em um processo contínuo e fisiológico, porém possui um sistema antioxidante, composto por enzimas tiólicas, superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), Catalase, peroxirredoxina e glutathione, NADPH, e antioxidante não enzimático como as vitaminas E e C (Sutton e Winterbourn, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1997; Netto et al., 2002) (Figura 2).

Íons de Ca^{2+} parecem ser uns dos principais estimuladores da geração de EROs em mitocôndrias (Kowaltowski et al., 1999). Íons de Ca^{2+} provavelmente se ligam a cardiolipina na face interna da MMI causando alterações em proteínas da cadeia respiratória que facilita a produção de radical anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que é conseqüentemente dismutado pela superóxido dismutase gerando H_2O_2 (Grijalba et al., 1999). Simultaneamente, o Ca^{2+} mobiliza Fe^{2+} na matriz mitocondrial que estimula a reação de Fenton e a produção do radical Hidroxil (OH^{\cdot}) (Ferreiro-Barros, 2008) atacando conseqüentemente tióis de proteínas, lipídios e DNA mitocondrial (Merryfield e Lardy, 1982; Castilho et al., 1995; Vercesi et al., 1997).

Algumas fisiopatologias como câncer, envelhecimento, morte celular por apoptose e necrose e inflamação estão associadas a um aumento de EROs principalmente pelas mitocôndrias (Halliwell e Gutteridge, 1997; Green e Reed, 1998; Kowaltowski et al., 1999; Lemasters, 1999).

Devido ao aumento da geração de EROs, como a exposição da mitocôndria à agentes pró-oxidantes ou altas concentrações de Ca^{2+} , pode levar a uma permeabilização progressiva da MMI, que permitindo a passagem de prótons, íons, suporte osmótico e até mesmo de pequenas proteínas (Vercesi et al., 1997). Este processo é denominado de transição de

permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM é um tipo de permeabilização não-seletiva da MMI tipicamente promovida por estresse oxidativo e acúmulo excessivo de íons de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, num processo que pode ser estimulado ou inibido por uma variedade de compostos ou condições (Zoratti e Szabo, 1995; Lemasters, 1998; Crompton, 1999; Kowaltowski et al., 2001; Gunter et al., 2004; Vercesi et al., 2006; Saito e Castilho, 2010). O processo de TPM, a permeabilização da MMI resulta em perda de componentes da matriz mitocondrial, comprometimento da função mitocondrial e inchamento da organela, com consequente ruptura da membrana mitocondrial externa e liberação de proteínas para o espaço intermembranas (Zoratti e Szabo, 1995; Lemasters, 1998; Crompton, 1999; Kowaltowski et al., 2001; Green e Kroemer, 2004). Dados da literatura indicam que a abertura do poro pode sinalizar para dois processos de morte celular, tanto para necrose, por falta de ATP, quanto por apoptose, através da liberação de fatores pró-apoptóticos para o citosol (Skulachev, 1998; Kowaltowski et al., 1999). O termo transição é usado porque a permeabilização pode ser parcialmente revertida, logo após o início do processo, pela adição de quelantes de Ca^{2+} (Hunter e Haworth, 1979) como o EGTA, por exemplo, ou redutores tiólicos (Fagian et al., 1990).

A identidade das reais proteínas formadoras do poro de PTP é ainda bem discutida na literatura, uma vez que elas parecem ser chave importante na sua formação (Halestrap, 2009; Ramachandran et al., 2010), mas pode envolver VDAC (Canal aniônico voltagem dependente) através da (MME) membrana mitocondrial externa, e ANT (Translocador de Nucleotídeos de adenina) através do MMI. Em contraste, a prolil isomerase CypD da matriz mitocondrial é essencial na regulação da abertura do poro de PTP, e é a única geneticamente comprovada indispensável componente do PTP (Crompton et al., 1988; Kroemer et al., 2007; Eliseev, 2007).

Lehninger et al., (1978) demonstraram que a oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais (NAD(P)H) causavam abertura do poro de TPM e que sua redução causava seu fechamento. Como o estado redox do (NAD(P)H) está intimamente relacionado com o estado redox da glutathiona (GSH) e de grupos tiólicos mitocondriais, aventou-se a hipótese de que a TPM estaria associada também ao estado redox de grupos da membrana mitocondrial

interna; fato comprovado por (Fagian et al., 1990). Assim, redutores tiólicos como ditiotreitól protegem contra a TPM (Valle et al., 1993), enquanto que oxidantes tiólicos como a diamida, DIDS (4,4'-diisotiocianatostilbene-2,2'-dissulfônico) e o oxido de fernilasina promovem a TPM (Fagian et al., 1990; Bernardes et al., 1994; Kowaltowski et al., 1996). Os oxidantes e redutores tiólicos podem regular a TPM pelo controle do estado redox da glutathiona mitocondrial ou pelas mudanças diretas no estado redox dos tióis das proteínas que formam o poro de TPM (Kowaltowski et al., 2001).

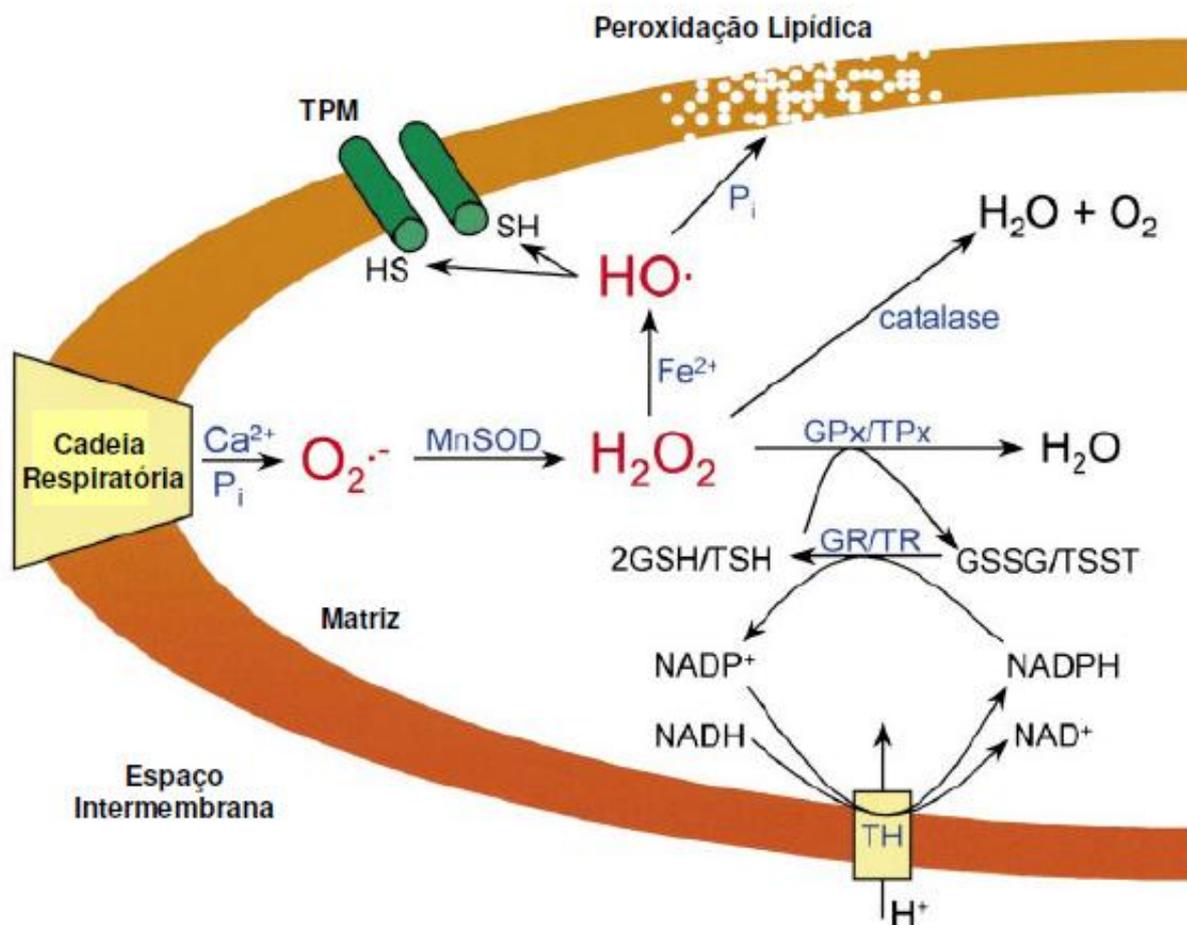


Figura 2: Este modelo foi proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzida por íons de Ca^{2+} e EROs. Acúmulo de EROs mitocondrial causa TPM. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Estes radicais são normalmente removidos por uma SOD dependente de Manganês (MnSOD), que promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é então reduzido à H_2O pela glutatona peroxidase (GP_x), peroxirredoxina (Prx) ou catalase (em mitocôndria de coração). Glutaciona (GSH), oxidado pela (GP_x), e (TSH), oxidado pela (TP_x), são recuperados pelo sistema enzimático glutaciona e tioredoxina redutase (GR e TR), que utilizam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então NADP^+ usando NAD(P) transidrogenase (TH). Quando a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão inativados, o H_2O_2 acumula-se na presença de Fe^{2+} , gerando radical $\text{OH}\cdot$ que é altamente reativo. $\text{OH}\cdot$ oxida grupos tiólicos (-SH) da membrana mitocondrial interna, levando à formação e abertura do Poro. Alternativamente, $\text{OH}\cdot$ pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i (Kowaltowski et al., 2001).

A TPM pode ser induzida pela geração de ERNs

O peroxinitrito é uma ERN de meia-vida curta (cerca de 10 ms), que promove nitração da tirosina e S-nitrosilação, reagindo com transferidores de elétrons e glutatona (Radi et al. et al., 2002).

O anion peroxinitrito é formado pelo controle da difusão da reação de radical superóxido e óxido nítrico ($k_{ca} \approx 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) (Ferrer-Sueta e Radi, 2009) juntamente com um ácido conjugado (ONOO^-) ($\text{Pka} = 6.8$), representa uma potente oxidação e nitração de espécies formadas *in vivo*. Peroxinitrito é tipicamente formado próximo aos sítios de geração de O_2^- , e, portanto, as mitocôndrias foram reconhecidas por serem as principais fontes constitutivas intracelulares (Radi et al., 2002). De fato, a formação e ação do peroxinitrito na mitocôndria é favorecida pelas principais características dessa organela no metabolismo redox e bioenergético (reviewed in (Castro et al., 2011; Valez et al., 2012). Primeiro, a cadeia transportadora de elétrons (principalmente pelos complexos I e III) representa a principal fontes de O_2^- , especialmente durante alterações na homeostase e função mitocondrial, e também pela chegada de óxido nítrico a partir de compartimentos por difusão (Cassina e Radi, 1996) ou pela geração dentro da mitocôndria (Giulivi et al., 1998) facilitando a combinação da reação com superóxido no interior da membrana para produzir peroxinitrito *in situ*.

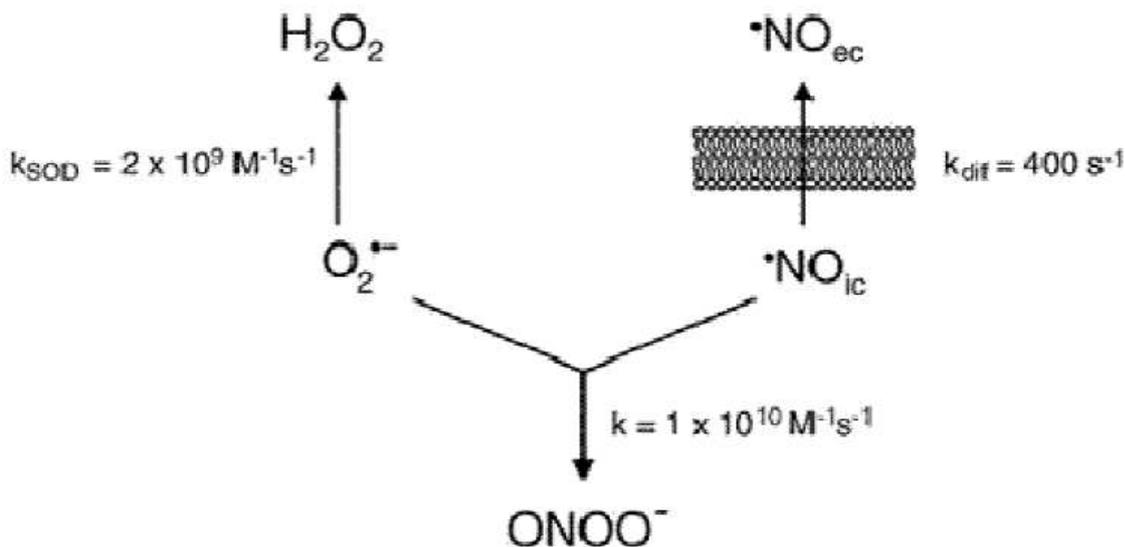


Figura 3: Formação de ONOO^- em sistemas biológicos. Nos sistemas biológicos a difusão de NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ pelas vias de dismutação competem com a formação do peroxinitrito e previne o acúmulo dos radicais quando seus fluxos relativos são diferentes (Quijano e Romero, 2005).

Mesmo sob a condição fisiológica basal, as mitocôndrias contêm o maior rendimento de proteína nitradas, ressaltando sua contribuição intracelular de fontes de peroxinitrito e espécies nitradas (Sacksteder et al., 2006).

A interação de peroxinitrito com proteínas mitocondriais e lipídios, em níveis elevados causam dano oxidativo (Radi et al. 2002; Valez et al. 2012). Em particular, a interação de peroxinitrito com compostos no interior da membrana mitocondrial, produz forte inibição do consumo de oxigênio dependente dos complexos I e II (Cassina e Radi. 1996; Radi et al. 1994).

A inativação do complexo I está associada com a oxidação de tióis, S-nitrosilação e nitração de resíduos específicos de tirosina (Murray et al., 2003; Clementi et al., 1998). A inativação do complexo II pode também envolver a oxidação de tióis críticos na subunidade A da Cisteína (Cys^{252}) (Quijano et al., 2006). O peroxinitrito também afeta a ATP sintase (Cassina e Radi, 1996; Radi et al., 1994) possivelmente via modificações oxidativa dos resíduos da (subunidade β F1 da Tyr^{368}) e tióis que estão envolvidos na interação com FOF1 (Kagawa, 1984).

O peroxinitrito pode também reagir com CO₂, presente em grandes quantidades no meio intracelular, gerando o radical carbonato, que é também muito reativo (Bonini et al. et al., 1999). Em condições experimentais o peroxinitrito causa lesões estruturais e funcionais na mitocôndria por um mecanismo independente de íons de Ca²⁺, através da peroxidação lipídica e oxidação de grupos tiólicos (Gadelha et al., 1997; Ghafourifar et al., 1999; Castro et al., 2011).

A interação de peroxinitrito com a cadeia transportadora de elétrons resulta em alteração do fluxo do transporte de elétrons, inibição do consumo de oxigênio e da ATPsintase e aumento da geração de O₂⁻ (Radi et al., 1994; Quijano, 2006).

Óxido Nítrico

Recente dados *in vivo* indicaram que o NO[•] desempenha um papel na regulação do fenótipo metabólico celular (Nisoli et al., 2003; Lira et al., 2010) e transdução de energia na mitocôndria (Palacios-Callender et al., 2004; Nisoli et al., 2004).

O NO[•] é um radical livre gasoso, produto da enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir da oxidação do nitrogênio da guanidina terminal da L-arginina formando NO[•] e L-citrulina (Figura 4). Exceto a iNOS, sendo sua reação dependente de Ca²⁺ e requer FAD, FMN, BH₄, Heme e Calmodulina (Alderton et al., 2001; Brookes, 2004; Venkatakrisnan et al., 2009; Venkatakrisnan et al., 2010).

Admite-se a existência da eNOS (endotelial), da nNOS (neuronal) e da iNOS (indutível), com estruturas genômicas semelhantes. As duas primeiras possuem atividade constitutiva, enquanto a NO sintase indutível pode ser estimulada por citocinas e endotoxinas (Naseem, 2005). As enzimas destas famílias se associam em dímeros ativos, envolvendo uma grande interface de sítios de ligação com outras moléculas, como tetrabiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), NADPH, entre outros co-fatores (Alderton et al., 2001).

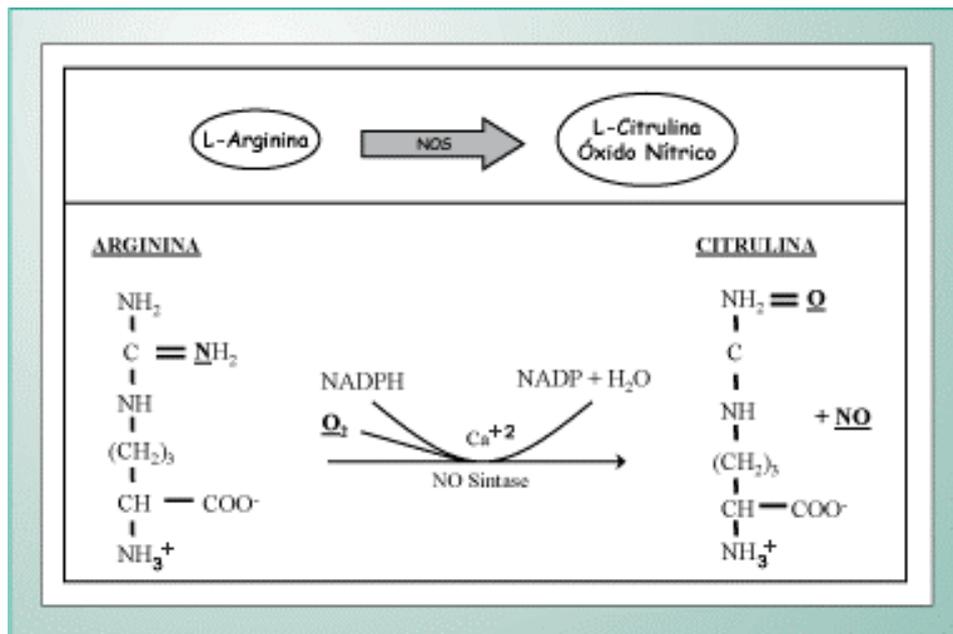


Figura 4: Reação de formação de NO[•]. Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da Arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase (adaptado por Lehninger, 2002).

Nos últimos anos alguns trabalhos (Alderton et al., 2001; Giulivi et al., 1998; Navarro e Boveris, 2008) indicaram a existência de uma quarta NOS, a mtNOS (Óxido nítrico sintase mitocondrial), com base em evidências citoquímicas e imunocitoquímicas que mostram associações de anticorpos para NOS com a membrana mitocondrial interna. Mais recentemente foram mostrados indícios de síntese de NO[•] na mitocôndria de fígado de rato, e de efeitos funcionais desta síntese na respiração (Giulivi et al., 1998). Estes achados, no entanto, tem sido questionados por (Lacza et al., 2006; Brookes, 2004), que criticam a metodologia utilizada. Discute-se ainda a possibilidade da reação imunocitoquímica evidenciar uma ligação da iNOS com a membrana interna, contrariando a possível existência de uma mtNOS (Eissa et al., 1996).

O NO[•] é considerado um mensageiro intra e intercelular ubíquo envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos tais como neurotransmissão, resposta imune e ciclo celular (Ignarro, 1999; Moncada e Bolanos, 2006). Com relação à homeostase vascular, este radical tem ações pleiotrópicas, como por exemplo, controle do tônus vascular e pressão sanguínea (vasodilatação e antagonismo de vasoconstritores), repressão de resposta inflamatória (inibição de adesão de leucócitos), inibição de coagulação

(inibição da agregação plaquetária), inibição de proliferação de células musculares lisas (Schulman et al., 2005; Duvall, 2005). Um exemplo bem caracterizado da função do NO[•] produzido na célula endotelial é a ativação da guanilato ciclase na célula muscular lisa do vaso através de sua ligação no grupamento heme desta enzima, promovendo relaxamento vascular (Stamler et al., 1992)

O NO[•] tem ações relacionadas à homeostase vascular dependente do endotélio, como controle do tônus vascular e pressão sanguínea (vasodilatação e antagonista de vasoconstritores), repressão da resposta inflamatória (inibe a adesão de leucócitos), inibição da coagulação (por inibir a agregação plaquetária) e inibição da proliferação de células lisas (Schulman et al., 2005; Duvall, 2005). A mitocôndria é considerada um verdadeiro “dreno” intracelular de NO[•], principalmente devido ao seu elevado teor de tióis, alvo da ação de oxidante do NO[•].

O NO[•] pode diminuir a respiração mitocondrial e a síntese de ATP em uma variedade de sistemas biológicos experimentais (Brown e Cooper, 1994; Cleeter et al., 1994; Giulivi, 1998; Sarti et al., 2000; Brown, 2007) por inibição competitiva da citocromo oxidase (complexo IV), que catalisa a transferência de elétrons do citocromo c reduzido para oxigênio molecular (Stiburek et al., 2006).

O efeito pró- ou anti- apoptótico do NO[•] na mitocôndria depende de sua concentração. Sabe-se que altas concentrações de NO[•] e seus derivados podem promover a TPM, através de um mecanismo Ca²⁺ dependente, provavelmente pela nitração ou nitrosilação de proteínas mitocondriais (Borutaite et al., 2000). Por outro lado, baixas concentrações de NO[•] (considerando a quantidade fisiológica produzida), protegem contra a abertura do PTP (Brookes et al., 2000).

Trabalho de Leite et al., (2010) demonstrou a participação do óxido nítrico na função mitocondrial. Inibidores da (NOS) administrados *in vitro* ou *in vivo*, induzem TPM em mitocôndrias de rato controle, via mecanismo independente do estado energético dessa organela. A TPM induzida por L-NAME, além de ser sensível à ciclosporina A, também foi sensível ao Mg²⁺, ATP, EGTA, e em menor grau, à catalase e ao ditiotritol. A indução da TPM por

L-NAME foi associada a uma significativa diminuição em ambos, na geração de NO[•] e no conteúdo de S-nitrosotióis de proteínas das mitocôndrias. O tratamento *in vivo* com L-NAME também promoveu a TPM e diminuiu a quantidade de S-nitrosotióis de proteínas mitocondriais. SNAP (um doador de NO[•]) preveniu a TPM induzida pelo L-NAME e reverteu a diminuição da geração de NO[•] e do conteúdo de S-nitrosotióis de proteínas de membrana. Este trabalho sugere que a S-nitrosação de tióis críticos de membrana pelo NO[•] protege as mitocôndrias contra a TPM, e conseqüentemente contra morte celular.

Outros metabólitos do NO[•] são os S-nitrosotióis (SNO), encontrados extra e intracelularmente, formados a partir da incorporação do NO[•] no grupo tiol de uma cisteína. Esta reação denominada S-nitrosação (ou S-nitrosilação, segundo (Stamler et al., 1992) geralmente causa modificações fisiológicas na atividade de diversas proteínas. Nas últimas décadas, o número de trabalhos sobre S-nitrosação de proteínas cresceu muito, revelando a relevância dos sítios tiólicos regulatório em diversas classes de proteínas (para revisão ver (Hess et al., 2005). Trabalhos recentes demonstraram que a S-nitrosação participa diretamente da regulação de numerosas vias de sinalização nos sistemas celulares intactos (Jaffrey et al., 2001; De Jesus-Berrios et al., 2003; Liu et al., 2004. Em geral, as fontes de NO[•] para a geração de nitrotióis (SNO) podem ser o próprio NO[•], o nitrito, outras espécies derivadas de NO[•], NO[•] complexado a metais, ou outros SNO (Foster et al., 2003). Entretanto, um mecanismo enzimático específico para S-nitrosação das proteínas ainda não foi descrito, embora várias enzimas sejam conhecidas por promover reações de S-nitrosação e transnitrosação, incluindo a SOD, ceruloplasmina, e S-nitrosoglutationa redutase, além da própria NOS (auto S-nitrosação) (Hess et al., 2005). Metais de transição ligados a proteínas, em particular o Cu²⁺ ou o Fe²⁺, nas proximidades de um tiol alvo, podem catalisar a reação de transnitrosação, (Stubauer et al., 1999; Romeo et al., 2002). A denitrosação de diversos substratos pode ser mediada pela glutathione e tiorredoxinaóxidoreductase (TR_x) (Patel et al., 1996; Ravi et al., 2004).

Devido à dificuldade de caracterização da atividade da NOS e do NO[•], a maioria dos estudos para avaliar a biologia do NO[•] é feita utilizando-se

inibidores da NOS (Griffith e Kilbourn, 1996) ou doadores e sequestradores de NO^\bullet (Brookes, 2004).

Como exemplo, o sequestro de NO^\bullet pelos PTIOs (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide) promove inibição do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) em ensaios *in vitro* (Akaike et al., 1993), causando alterações no ciclo celular, estresse oxidativo e apoptose em células pulmonares (Janssen et al., 1998).

Diante das evidências aqui expostas, neste trabalho, propomos estudar os mecanismos pelos quais o sequestrador de NO^\bullet cPTIO atua sobre a integridade mitocondrial, visto que a proteção da transição de permeabilidade mitocondrial causada por tais sequestradores pode inibir a morte celular (Skulachev, 1998). Tais estudos foram realizados em mitocôndrias de coração e fígado, a fim de evidenciar diferentes respostas mitocondriais ao sequestro de NO^\bullet .

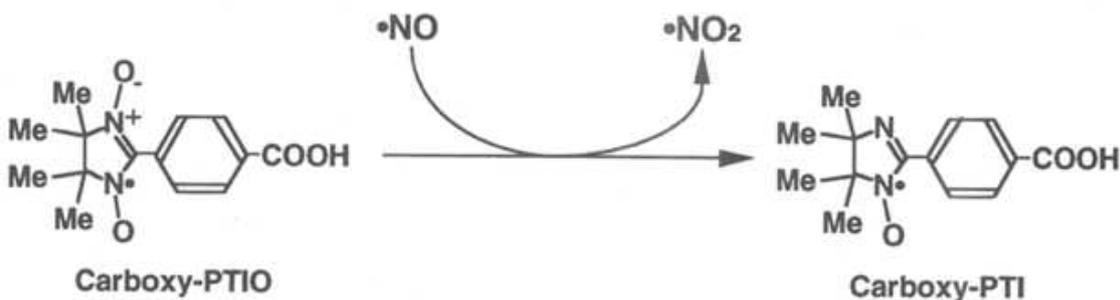


Figura 5: Reação de cPTIO com NO^\bullet .

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi analisar a participação de um sequestrador de óxido nítrico (cPTIO) sobre a transição de permeabilidade de membrana mitocondrial.

Objetivos Específicos:

Estudar o efeito de cPTIO sobre: Potencial de membrana mitocondrial interna na presença e ausência de íons de cálcio, respiração em mitocôndrias isoladas de coração e fígado, produção de espécies reativas de oxigênio por mitocôndrias isoladas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Os reagentes empregados nos experimentos com mitocôndrias isoladas foram adquiridos da Sigma Chemical Company, EUA.

A solução estoque (0,5 M) de coquetel de substratos para complexo I continha malato 0,68 M, α -cetoglutarato 0,34 M, piruvato 0,34 M e glutamato 0,34 M.

Animais

Para os experimentos com mitocôndrias isoladas, utilizamos fígado e coração de ratos machos, adultos com 60 a 90 dias, da linhagem *Wistar*, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da UNICAMP.

Isolamento de mitocôndria de fígado de rato

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo (Schneider, 1950). O Fígado foi retirado após a morte por deslocamento cervical, lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão HEPES 10 mM pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador do tipo dounce. O material obtido foi centrifugado a 800xg por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 7750xg sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em meio contendo sacarose 250 mM, HEPES 5 mM pH 7,2 e EGTA 0,3 mM e novamente centrifugado a 7750xg. A fração mitocondrial (sedimento) foi ressuspensa na mesma solução, porém isenta de EGTA, para uma concentração de proteína aproximada de 50 mg de proteína por mL.

Isolamento de mitocôndria de coração de rato

Mitocôndrias de coração de rato foram isoladas utilizando-se da técnica de centrifugação diferencial. O coração foi colocado em meio de isolamento contendo manitol 200 mM, sacarose 75 mM e tampão HEPES 10 mM pH 7,2 EGTA 1 mM e BSA 0,1%, onde será lavado e picado com tesoura e após homogeneizado manualmente em Potter-elvehjem. O homogenato foi centrifugado a 800xg por 10 minutos. O sobrenadante resultante será centrifugado a 6000xg por 10 minutos. O pellet formado foi ressuspensão no mesmo meio e centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução, isenta de EGTA numa concentração de aproximadamente 40 mg de proteína por ml (Kowaltowski et al., 2001).

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 de absorvância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

Condições experimentais

Os experimentos de respiração, potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, produção de NO[•] foram realizados a 30 °C em meio de reação padrão contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, KCL 65 mM, KH₂PO₄ 2 mM e MgCL₂ 1 mM. Como substratos respiratórios foram utilizados 5 mM malato, α-cetoglutarato, piruvato e glutamato. Nos experimentos de consumo de oxigênio mitocondrial foi utilizado

o meio de reação padrão contendo 0,2 mM de EGTA. Outros reagentes adicionados estão indicados nas figuras.

Medida do Consumo de oxigênio

O consumo de O₂ por suspensões mitocondriais isoladas de coração e fígado foi monitorado utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.). Considerou-se que a solubilidade do O₂ em água é de 235 μmol x L⁻¹30 °C e 1 atm (Reynafarje et al., 1985). As suspensões foram adicionadas ao meio de reação contendo KCl 130 mM, HEPES-K⁺ 20 mM, K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM e EGTA 200 μM (pH 7,2) e mantidas em câmara fechada e (1,4 mL), termostaticada 30°C, sob agitação constante, na presença ou ausência de cPTIO 100 μM. A qualidade das mitocôndrias foi avaliada pela determinação do controle respiratório (CR), calculado pela razão entre as velocidades do consumo de O₂ nos estados de fosforilação oxidativa (estado 3) e repouso (estado 4). A suspensão mitocondrial foi considerada adequada para o uso quando a razão em mitocôndria isolada de fígado foi superior a 6,0 e coração 9,0, utilizando substrato para complexo I.

Razão ADP/O

A razão ADP/O indica o número de moléculas de ADP fosforiladas para ATP quando dois elétrons são transferidos de um substrato através da cadeia respiratória para a redução de ½ O₂. Esse valor foi calculado a partir da adição de 300 μM de ADP em suspensões mitocondriais (0,3 mg/mL) em meio de reação contendo KCl 130 mM, HEPES-K⁺ 20 mM, K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM e EGTA 200 μM (pH 7,2) e mantidas em câmara fechada (1,4 mL), termostaticada a 30°C, sob agitação constante, na presença ou ausência de cPTIO 100 μM.

Avaliação do Potencial elétrico de membrana mitocondrial pelo método da safranina O ($\Delta\Psi$).

A medida do potencial de membrana mitocondrial foi feita utilizando-se o indicador fluorescente safranina (Figueira et al., 2012). A safranina é um corante lipofílico catiônico que sofre alterações ópticas em resposta a sua distribuição entre o meio externo e o compartimento intramitocondrial e também em resposta ao seu stacking à membrana mitocondrial interna os quais são dependentes do potencial de membrana. A relação entre as alterações de fluorescência da safranina com o potencial de membrana permite que valores desconhecidos de potencial de membrana sejam calculados (Colnna et al., 1973). Os experimentos com mitocôndrias de coração (0,3 mg/L) e fígado (0,5 mg/mL) foram realizados em fluorímetro Shimadzu (RF-5301 PC) utilizando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 586 nm respectivamente, slit de 5 nm, sob agitação e temperatura constante.

Espécies reativas de oxigênio

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas mitocôndrias isoladas foi determinada fluorimetricamente através da conversão de Amplex Red[®] 10 μ M na presença de peroxidase de raiz forte (HRP) 1 U/mL, a um composto altamente fluorescente, resorufina (Zhou et al., 1997). A fluorescência foi monitorada ao longo do tempo em um espectrofluorímetro Shimadzu (RF-5301 PC) usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 nm e 587 nm, respectivamente, com slit de 5 nm. Sob estas condições, um aumento linear da fluorescência indica um aumento na taxa de produção do H_2O_2 pelas mitocôndrias. Uma curva de calibração foi feita através da adição de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram determinadas utilizando-se o software Graphpad Prism 5 (San Diego, USA). Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores \pm erro padrão da média (média \pm e.p.m), submetidos ao teste *t* de Student quando apenas um parâmetro foi comparado entre dois grupos.

Primeiramente, para avaliar se a qualidade da preparação mitocondrial a ser utilizada nos experimentos estava dentro dos padrões de qualidade, foram realizadas medidas de controle respiratório (CR). Os valores obtidos foram em média, acima de 6 para mitocôndrias de fígado e acima de 9 para mitocôndrias de coração. O controle respiratório (Fig. 6A) foi calculado utilizando-se a razão entre a velocidade de consumo de oxigênio estimulada por ADP ou respiração de fosforilação (V3) e a velocidade de consumo de oxigênio no estado de repouso (V4), onde todo o ADP foi consumido pela ATP sintase. Este parâmetro pode ser alterado de várias formas: *a*) aumento da velocidade de respiração de repouso por aumento de atividade de proteínas desacopladoras (UCPs) (Jarmuszkiewicz et al., 2004); *b*) por aumento de atividade do canal de potássio sensível a ATP (Alberici et al., 2009); *c*) por aumento inespecífico de permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons ou pela presença de protonóforos, compostos químicos (ácidos ou bases fracas) hidrofóbicos, que promovem o transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna e equilibram o pH em ambos os lados da membrana (ex. FCCP, CCCP, 2,4-dinitrofenol, salicilatos, etc), e *d*) por diminuição da velocidade da respiração de fosforilação.

A diminuição do controle respiratório por aumento não específico da permeabilidade a prótons pode indicar que o método de isolamento mitocondrial não foi adequado e que a preparação mitocondrial deve ser desprezada, uma vez que deve existir uma grande subpopulação mitocondrial com alterações estruturais da membrana mitocondrial interna. Estas mitocôndrias não conseguem gerar um potencial protônico suficiente para fosforilação oxidativa e consomem oxigênio em altas velocidades diminuindo o controle respiratório. Os motivos mais prováveis de aumento inespecífico de permeabilidade da membrana mitocondrial causado pelo procedimento de isolamento das mitocôndrias são: excesso de pressão durante o processo de homogeneização do tecido, contaminações do tampão de isolamento por detergentes, metais pesados ou outros compostos que alteram a estabilidade de membranas biológicas e especialmente a membrana mitocondrial interna, soluções hipotônicas.

Nos dois primeiros casos (*a* e *b*), o diagnóstico pode ser feito por adição de inibidores específicos das UCPs (nucleotídeos de purina ou soro albumina bovina - quelante de ácidos graxos livres que ativam as UCPs por mecanismos não totalmente esclarecidos (Jarmuszkiewicz et al., 2004). Estas duas situações indicam processos fisiológicos adaptativos à situações de estresse e devem ser analisados como parâmetros bioenergéticos. No caso de alteração inespecífica da permeabilização a prótons não há possibilidades de reversão por processos considerados fisiológicos.

A diminuição da velocidade de respiração de fosforilação pode indicar diminuição de várias atividades envolvidas no processo de fosforilação oxidativa, entre elas, do transporte de elétrons na cadeia respiratória ou dos translocadores de fosfato e nucleotídeos de adenina (ADP e ATP). Todas estas alterações podem indicar presença de processos fisiopatológicos mitocondriais ou presença de inibidores químicos (Lehninger, 2004).

Efeito de cPTIO sobre a respiração mitocondrial

A (figura 6A) mostra um experimento representativo de consumo de oxigênio por mitocôndrias de coração na presença ou ausência de cPTIO. Os valores do controle respiratório obtidos foram de 12,95 para mitocôndrias controle e de 10,60 para mitocôndrias na presença de cPTIO. A (figura 6C) representa a razão ADP/O. A redução do controle respiratório em mitocôndrias de coração na presença de cPTIO ocorreu principalmente as custas de uma pequena inibição do consumo de oxigênio no estado de fosforilação oxidativa, como mostrado na (figura 6B). Como mencionado acima, esta inibição pode ser resultante da interação de cPTIO com algum dos componentes mitocondriais que compõem a maquinaria do processo de fosforilação oxidativa.

De acordo com (Brown e Cooper, 1994; Cleeter et al., 1994; Sarti et al., 2000; Giulivi et al., 1998) o NO^{*} pode diminuir a respiração mitocondrial e a síntese de ATP em uma variedade de sistemas biológicos e experimentais por inibição competitiva com a citocromo oxidase (complexo IV), que catalisa a

transferência de elétrons do citocromo c reduzido para oxigênio molecular (Moncada e Bolanos, 2006). Como o cPTIO atua como sequestrador de NO[•], ele não deve estar envolvido neste mecanismo de inibição.

A Fig. 6C mostra o efeito do cPTIO sobre a razão ADP/O, parâmetro que avalia o rendimento da fosforilação oxidativa e que em mitocôndrias oxidando substratos ligados a NADP deve ter valores entre 2 e 3, ou seja fosforilação de 2 a 3 nanomoles de ADP para cada nanomol de O₂ consumido. No caso da (figura 6C) houve um ligeiro aumento da razão ADP/O por mecanismo a esclarecer.

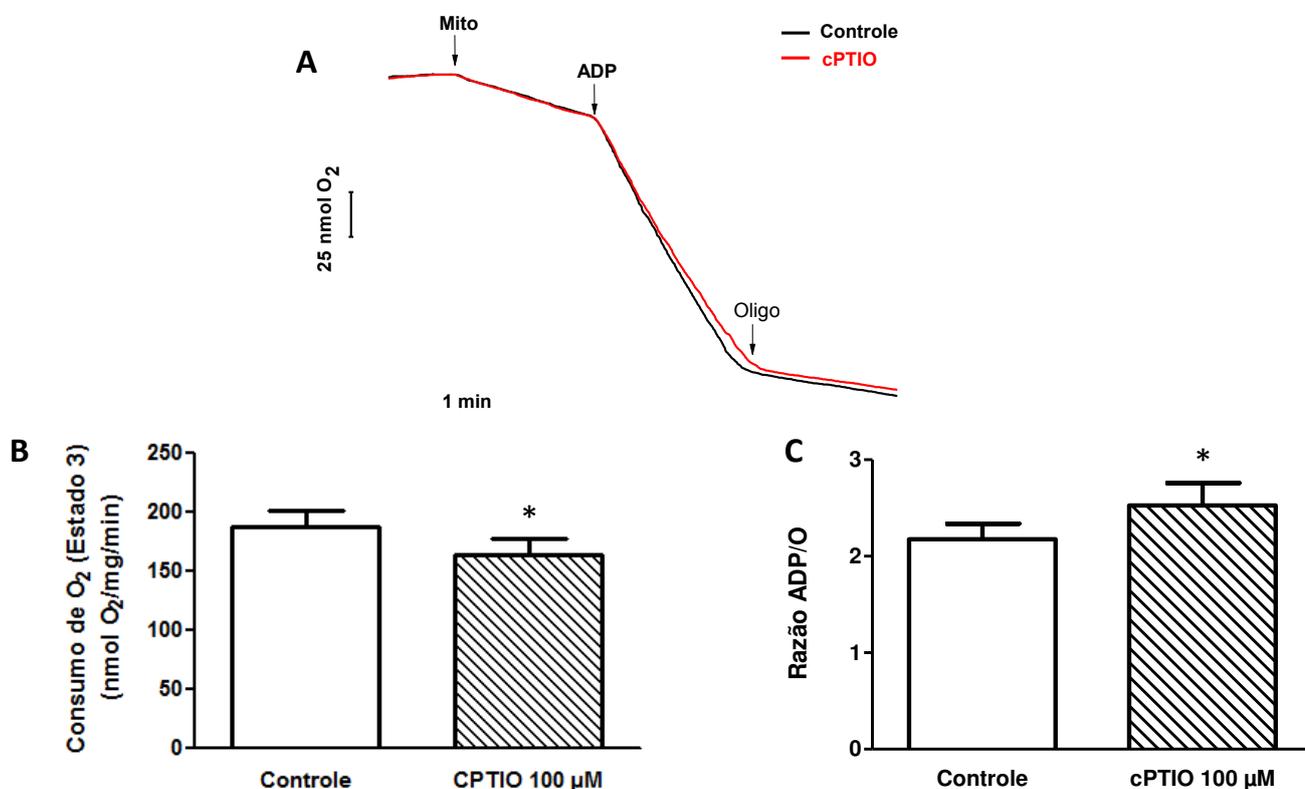


Figura 6 – Efeito de cPTIO sobre a respiração mitocondrial. Mitocôndrias de coração de rato (0,3 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 30°C (pH 7,2) contendo substratos para complexo I 5 mM, EGTA 200 μM, ADP 800 μM e oligomicina 1 μg/mL. **Painel A:** Figura representativa da média de cinco experimentos independentes. **Painel B:** Consumo de oxigênio estimulado por ADP. **Painel C:** Razão ADP/O. Os dados representam a média ± D.P. de 5 preparações mitocondriais: *p<0,05, *Test t Student*.

Estes efeitos do cPTIO sobre a respiração de fosforilação e sobre a razão ADP/O conduziram nos a uma avaliação das alterações do potencial elétrico de membrana interna de mitocôndrias incubadas na presença ou não de cPTIO. Usou-se o método da safranina O (Figueira et al., 2012), pigmento fluorescente que se liga na membrana mitocondrial em quantidades proporcionais ao valor do potencial elétrico. Esta ligação diminui a fluorescência da safranina e pode ser empregada para estimar o valor do potencial elétrico de membrana mitocondrial como mostrado na (figura 7). Este experimento é representativo de duas duplicatas (linha preta, controle) e (linha vermelha, cPTIO). Após a adição de mitocôndrias ocorreu a captação de safranina, evidenciada pela deflexão dos traçados para baixo. A adição de ADP, após um período de estabilização da queda de fluorescência mostrou uma redução transitória do potencial de membrana indicando gasto de potencial protônico durante o processo de fosforilação oxidativa do ADP adicionado. No final do experimento induzimos a dissipação total do potencial de membrana pela adição do desacoplador FCCP (carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona). Nas mitocôndrias controle, a maior redução do potencial induzida por ADP indica maior velocidade de fosforilação oxidativa que aquela observada na presença de cPTIO. Este resultado corrobora os experimentos de respiração, na presença ou na ausência de cPTIO, e indica que este composto promove uma inibição parcial da fosforilação oxidativa nesta concentração.

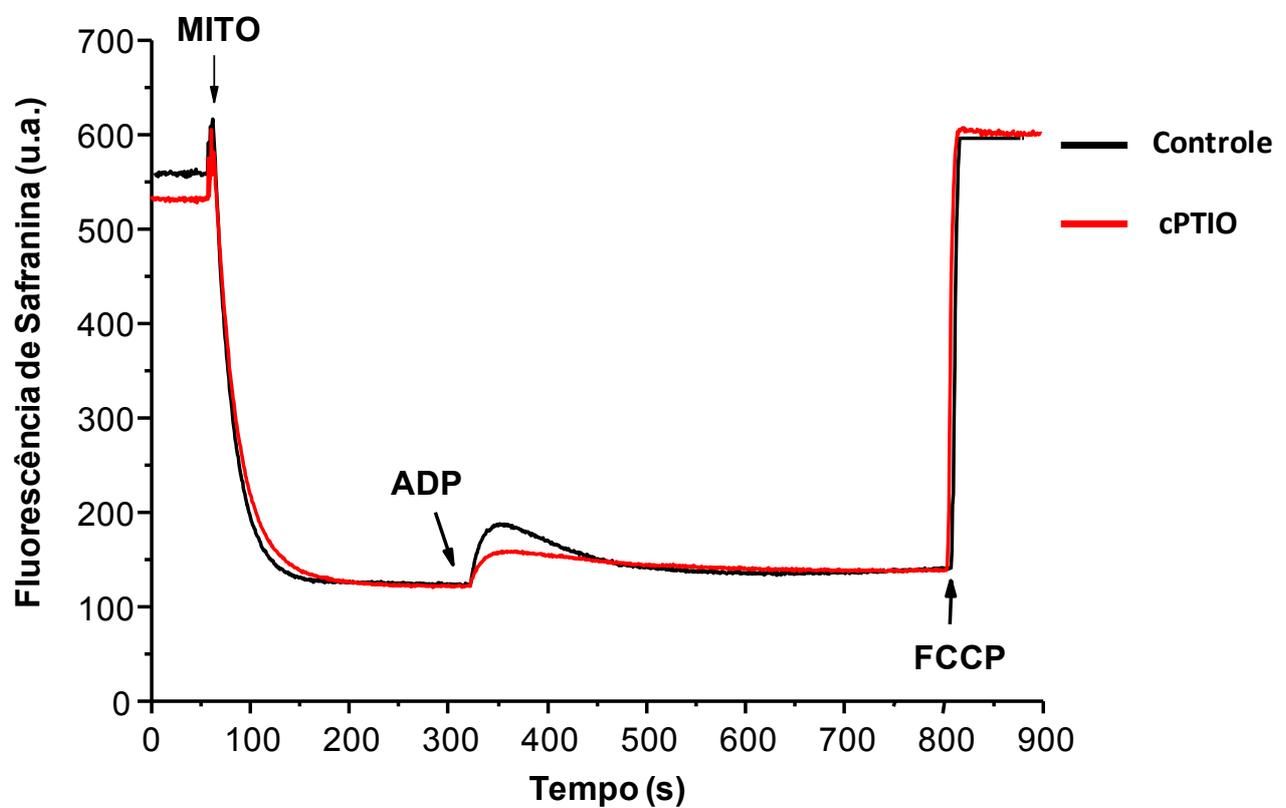


Figura 7 – Efeito de cPTIO sobre o potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$). Mitocôndrias de coração de rato (0,3 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 30°C (pH 7,2) contendo EGTA 200 μ M, safranina 5 μ M, substratos de complexo I 5 mM. Foram adicionados ADP 100 μ M e FCCCP 1 μ M. A Figura é representativa de 2 experimentos independentes. MITO = Mitocôndria.

Efeito de cPTIO sobre a transição de permeabilidade em mitocôndria de coração e fígado de ratos

Sabe-se que o NO[•] pode ter duplo efeito sobre a abertura do poro de TPM (Whiteman et al., 2006; Dedkova e Blatter, 2009) e morte celular (Tripathi et al., 2009). Altas concentrações de NO[•] podem gerar formação de ONOO⁻ que oxida grupamentos tiólicos de proteínas mitocondriais envolvidas na formação do PTP (Dahm et al., 2006; Quijano et al., 2006). Em concentrações consideradas fisiológicas o NO[•] tem ação antiapoptótica e protetora contra abertura do poro de transição possivelmente por gerar nitrosotiois com grupamentos –SH de proteínas da membrana mitocondrial interna e proteger contra o ataque destes grupamentos por oxidantes como H₂O₂, OH[•] ou ONOO⁻ (Brookes et al., 2000; Leite et al., 2010). Na ausência ou em concentrações muito baixas de NO[•] há maior susceptibilidade à abertura do PTP, certamente devido a diminuição de nitrosotiois na membrana mitocondrial (Leite et al., 2010). De fato, Leite e colaboradores (2010) observaram que L-NAME, inibidor da NOS, estimula a abertura do PTP induzido por íons de cálcio, por mecanismo dependente de concentração e antagonizado por SNAP, conhecido doador de NO[•]. Enquanto outros trabalhos indicam que doadores de NO[•] (Pestana et al., 2012) ou de ONOO⁻ (Gadelha et al., 1997) geram abertura do PTP.

Considerando-se os efeitos de NO[•] sobre o PTP (Lehninger et al., 1978) o principal objetivo deste trabalho foi avaliar se o sequestrador de NO[•], cPTIO tem efeito sobre a TPM. Utilizou-se o critério de monitoramento do potencial de membrana sensível a ciclosporina A (Friberg et al., 1998; Uchino et al., 1998; Buki et al., 1999; Eliseev et al., 2007; Mewton et al., 2010) para esta análise. Nossos dados (Fg. 8A-B e 9A-B) demonstram que tanto em mitocôndrias de coração como de fígado, o cPTIO na concentração 100 µM retarda por volta de 50% o tempo de dissipação do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$) induzida por íons de Ca²⁺. Estes resultados indicam similaridade de ação tanto no potencial gerado por substratos de complexo I (Figuras 8A e 9A) como por succinato (Figuras 8B e 9B). A inibição da dissipação do potencial de

membrana pela ciclosporina A (CsA) confirma que a perda do potencial é causada pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

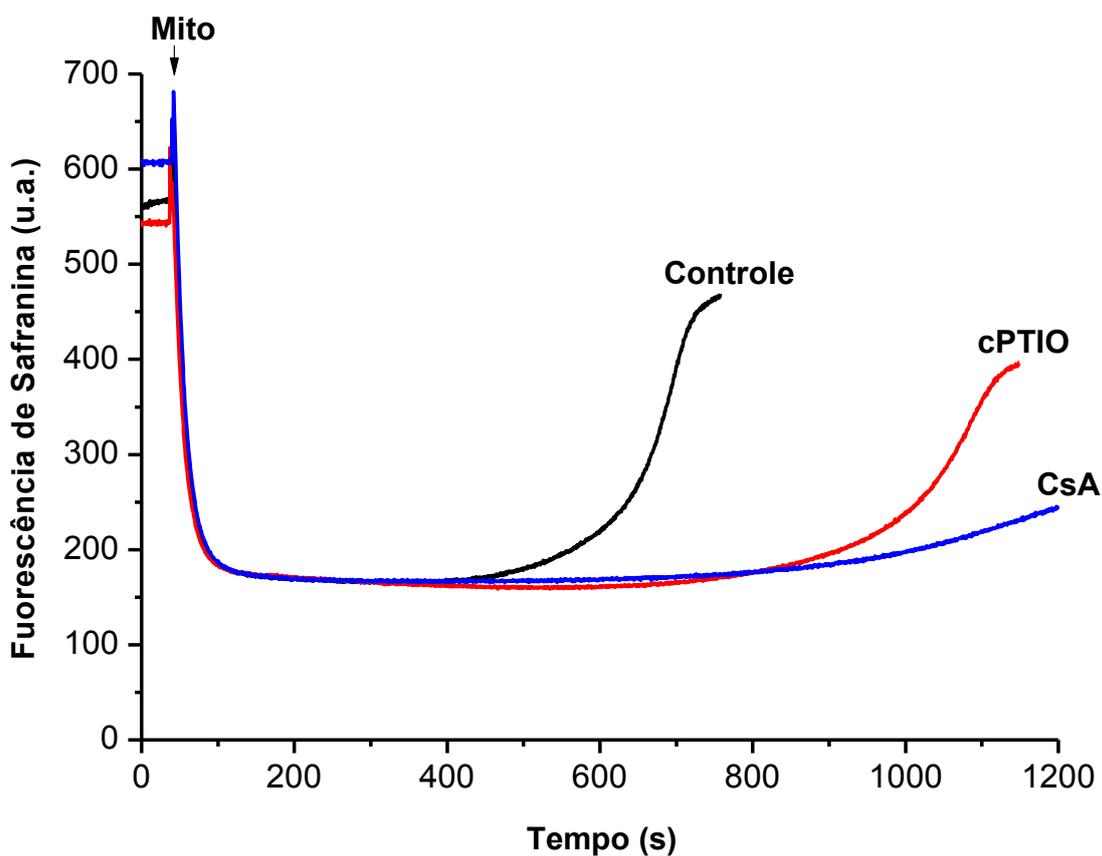


Figura 8A – cPTIO retarda a dissipação do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$) induzida por íons de Ca^{2+} . Mitocôndrias de coração de rato (0,3 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 30°C (pH 7,2) contendo safranina 5 μM , substratos de complexo I 5 mM e Ca^{2+} 50 μM . cPTIO 100 μM retarda a dissipação do potencial em 54,8%. A Figura é representativa de 23 experimentos independentes. Mito = Mitocôndria.

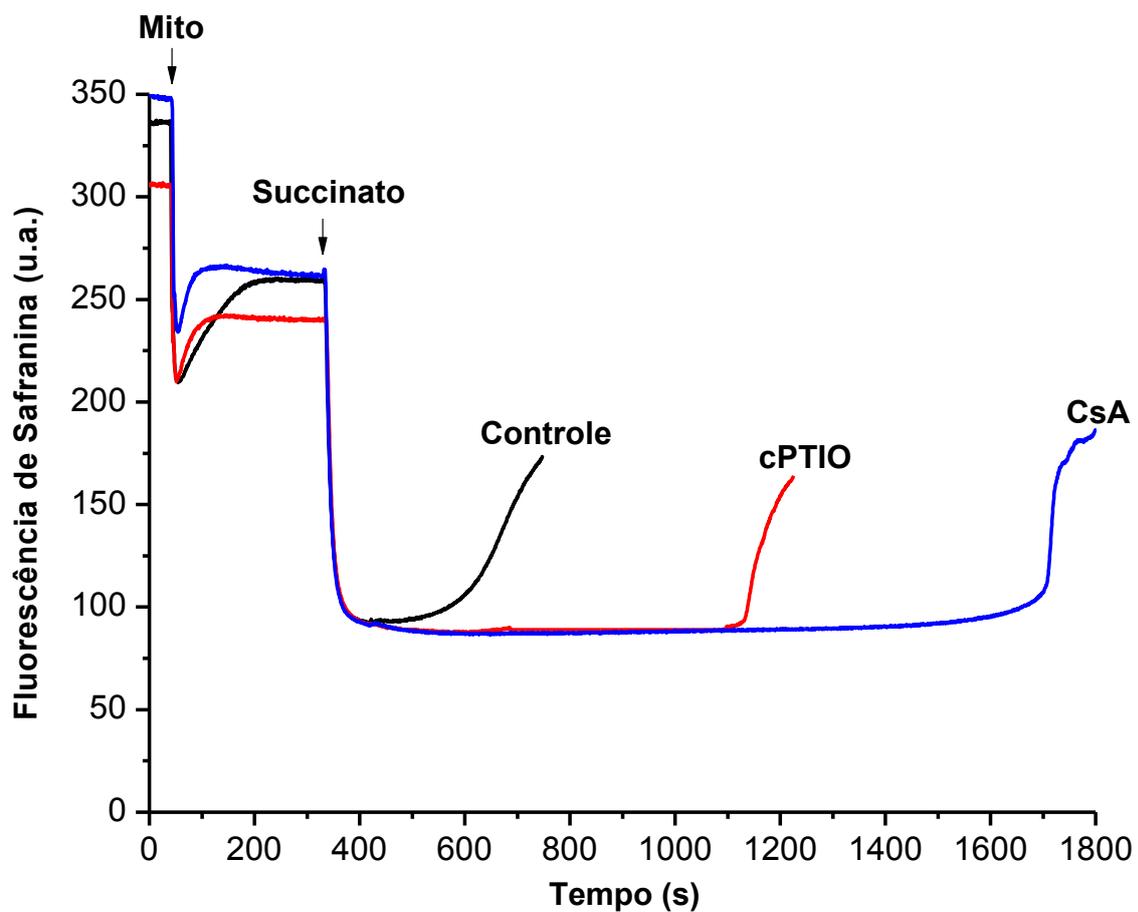


Figura 8B – cPTIO retarda a dissipação do potencial de membrana interna ($\Delta\Psi$) induzida em mitocôndrias de coração por íons de Ca^{2+} . Mitocôndrias de coração de rato (0,3 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 30°C (pH 7,2) contendo safranina 5 μM , Ca^{2+} 17 μM , rotenona 2 μM , CsA 1 μM e succinato 5 mM foi adicionado em seguida ou cPTIO foram adicionados. cPTIO 100 μM retarda a dissipação do potencial em 56,86%. A Figura é representativa de 5 experimentos independentes. Mito = Mitocôndria.

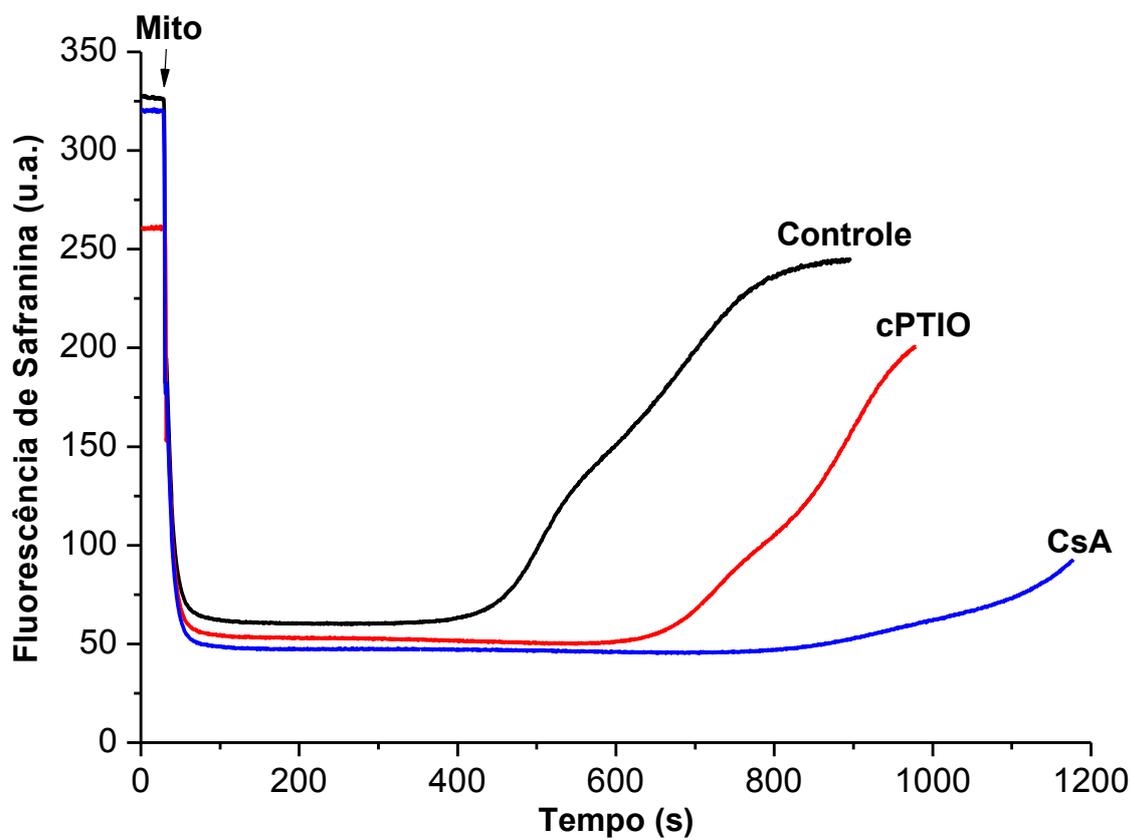


Figura 9A – cPTIO retarda a dissipação do potencial de membrana interna ($\Delta\Psi$) induzida por íons de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado energizadas por substratos ligados a NADPH. Mitocôndrias de fígado de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 30°C (pH 7,2) contendo safranina 5 μM , substratos de complexo I 5 mM e Ca^{2+} 10 μM , CsA 1 μM ou cPTIO foram adicionados. cPTIO 100 μM retarda a dissipação do potencial em 48%. A Figura é representativa de 10 experimentos independentes. Mito = Mitocôndria.

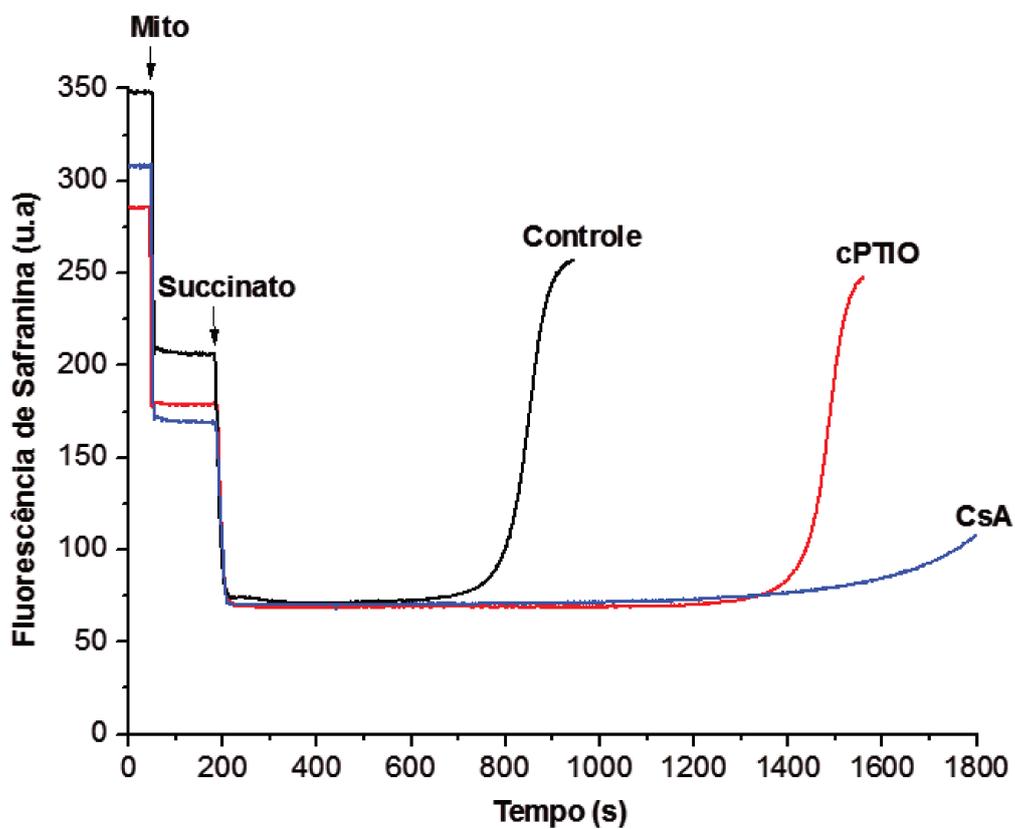


Figura 9B – cPTIO retarda a dissipação do potencial de membrana interna ($\Delta\Psi$) em mitocôndria de fígado induzida por íons de Ca^{2+} . Mitocôndrias de fígado de rato (0,3 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 30°C (pH 7,2) contendo safranina 5 μM , Succinato 5 mM, Ca^{2+} 17 μM , rotenona 2 μM e CsA 1 μM . cPTIO 100 μM retarda a liberação do potencial em 70,8%. A Figura é representativa de 5 experimentos independentes. Mito = Mitocôndria.

Considerando-se esse efeito do cPTIO sobre a TPM, realizamos uma curva dose resposta com concentrações crescentes de cPTIO (Figura 10). Na faixa de concentrações de 50 até 500 μM , observou-se que o cPTIO atua de modo dose dependente, aumentando progressivamente o tempo de retenção do potencial de membrana mitocondrial em função do aumento da dose. Verificou-se também que o efeito do cPTIO é aditivo em relação ao conhecido efeito de ciclosporina A.

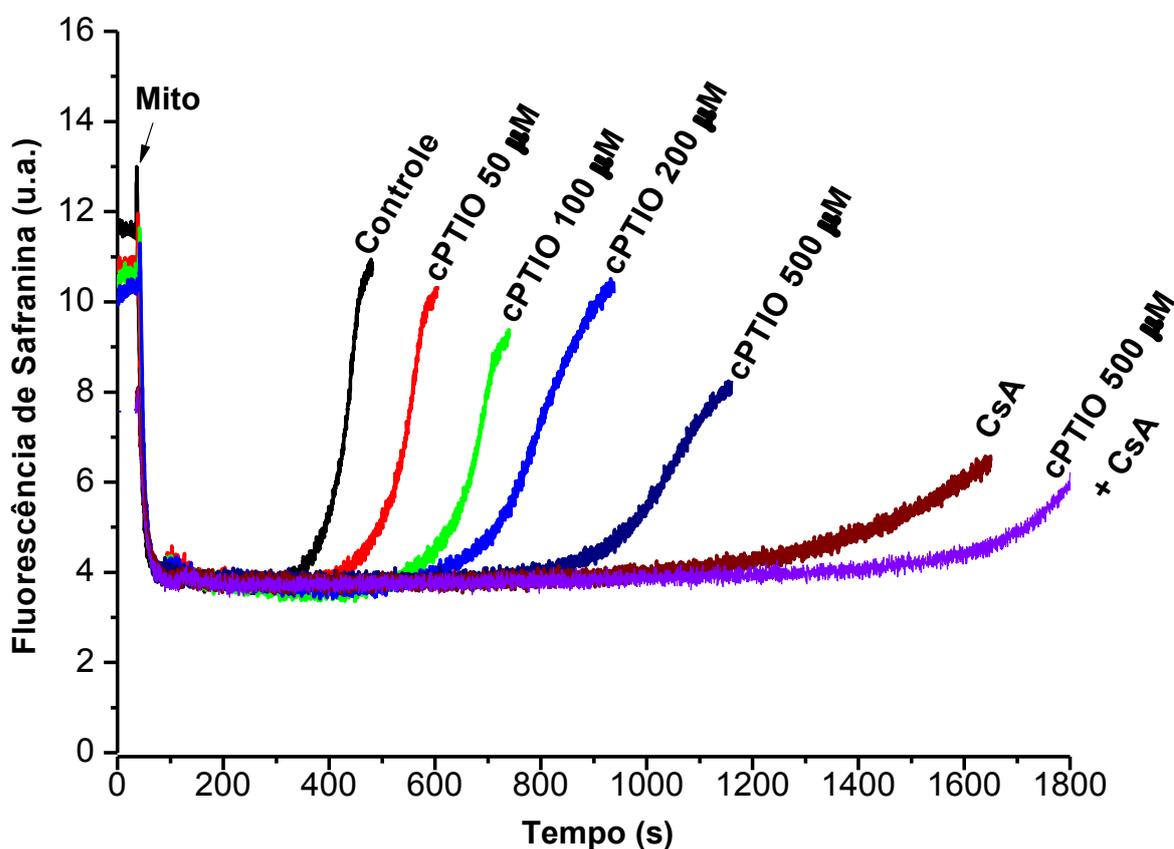


Figura 10 – Curva dose resposta de cPTIO sobre eliminação do potencial elétrico de mitocôndrias de coração. Mitocôndrias de coração de rato (0,3 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 30°C (pH 7,2) contendo safranina 5 μM , Substratos de complexo I 5 mM e Ca^{2+} 50 μM , CsA 1 μM ou cPTIO 50 até 500 μM . A Figura é representativa de 2 experimentos independentes. Mito = Mitocôndria.

Uma grande variedade de antioxidantes tem a capacidade de proteger contra a TPM sugerindo que este processo seria resultado de estresse oxidativo mitocondrial levando a oxidação de tióis de proteínas da membrana mitocondrial interna por OH^\cdot ou ONOO^- (Fagian et al., 1990; Kowaltowski et al., 2009). Assim, este mecanismo pode ser mediado tanto por ROS quanto por ERN (Cadenas et al., 2000; Bindoli et al., 1988; Kowaltowski et al., 2009). Além disso, o NO^\cdot pode estimular a geração mitocondrial de ROS através da inibição da respiração mitocondrial que aumenta a probabilidade de oxidação monoelétrica de oxigênio molecular em passos intermediários da cadeia respiratória, formando o anion superóxido que pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio. Este pode ser convertido em água pelos sistemas enzimáticos catalase, glutatona redutase/peroxidase e ferredoxina redutase/peroxidase (Sutton e Winterbourn, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1997; Netto et al., 2002). Em situações de estresse oxidativo por deficiência de NADPH, ou excesso de Fe^{2+} , o peróxido de hidrogênio pode ser convertido no radical de maior poder destrutivo e menor vida média que se conhece, o radical hidroxil (OH^\cdot), pela reação de Fenton (Ferreiro-barros et al., 2008). Todavia esta reação tem cinética lenta tornando pouco provável a produção do radical OH^\cdot em condições de estresse oxidativo brando.

A inibição da respiração pode ser causada diretamente por NO^\cdot , através da inibição direta da citocromo oxidase (Sarti et al., 2000; Stiburek et al., 2006), ou através da inibição dos complexos I e II da cadeia respiratória, por peroxinitrito (Cassina e Radi, 1996; Radi et al., 1994) formado pela reação entre o NO^\cdot e o superóxido de origem mitocondrial (Whiteman et al. 2006). Nas duas condições de inibição da respiração a produção de superóxido é

favorecida por dois fatores: maior facilidade de escape de elétrons dos complexos respiratórios reduzidos e maior tensão de oxigênio molecular no ambiente mitocondrial.

Com relação às interações mitocondriais entre ROS e ERN na geração de TPM, Pestana et al., 2012 demonstraram que o cPTIO protegeu contra a abertura do PTP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato incubadas na presença do doador de NO[•] nitrosyl ruthenium complex [Ru(NO₂)(b-py)₂(4-pic)]⁺. Neste caso, a abertura do poro era mediada pela formação de peroxinitrito a partir de NO[•], gerado pelo doador acima, e o superóxido gerado pela cadeia respiratória. Como mostrado em nossos experimentos, o cPTIO também protegeu contra a abertura do poro de TPM, nas nossas condições experimentais, ou seja, mesmo na ausência de um doador de NO[•]. Isto sugere que mesmo em condições basais há formação de NO[•] no interior das mitocôndrias ou migração de NO[•] formado no meio extramitocondrial para o interior da organela. Com base nestes dados levantamos a hipótese de que, nas nossas condições experimentais, há NO[•] e superóxido mitocondrial em quantidades suficientes para formação de peroxinitrito e abertura do poro de transição, na presença de Ca²⁺. Assim, analisamos o efeito deste sequestrador de NO[•] sobre a produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em mitocôndrias isoladas de coração oxidando substratos ligados a NADH na presença de íons de cálcio. Nossos dados demonstraram que, de fato, o cPTIO aumentou em 66% a velocidade de produção de H₂O₂ pelas mitocôndrias (Figura 11). Isto sugere que a ausência de NO[•] mitocondrial devido à presença de cPTIO, aumenta a disponibilidade do radical ânion superóxido que é dismutado pela enzima superóxido dismutase aumentando a produção de

H_2O_2 . Como este processo protege contra abertura do PTP propomos que o peroxinitrito tem maior capacidade de gerar MPT que o H_2O_2 .

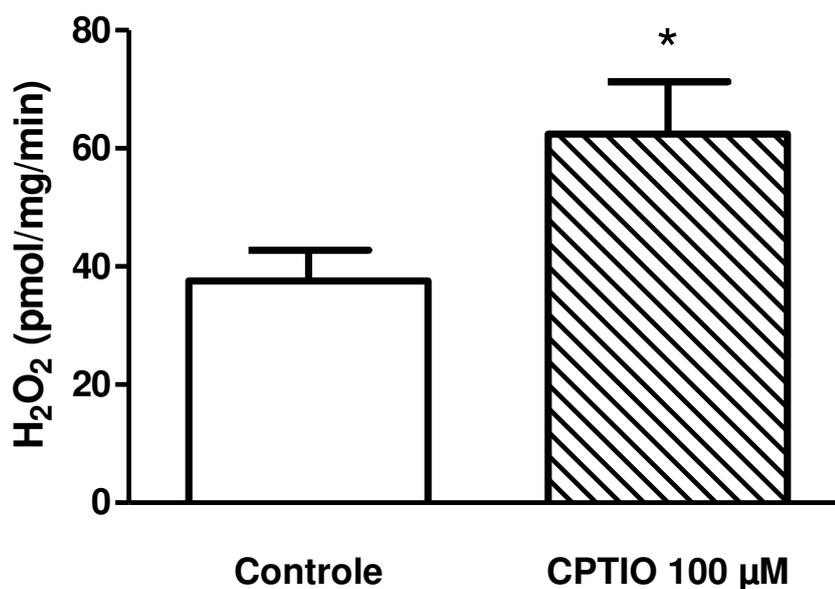
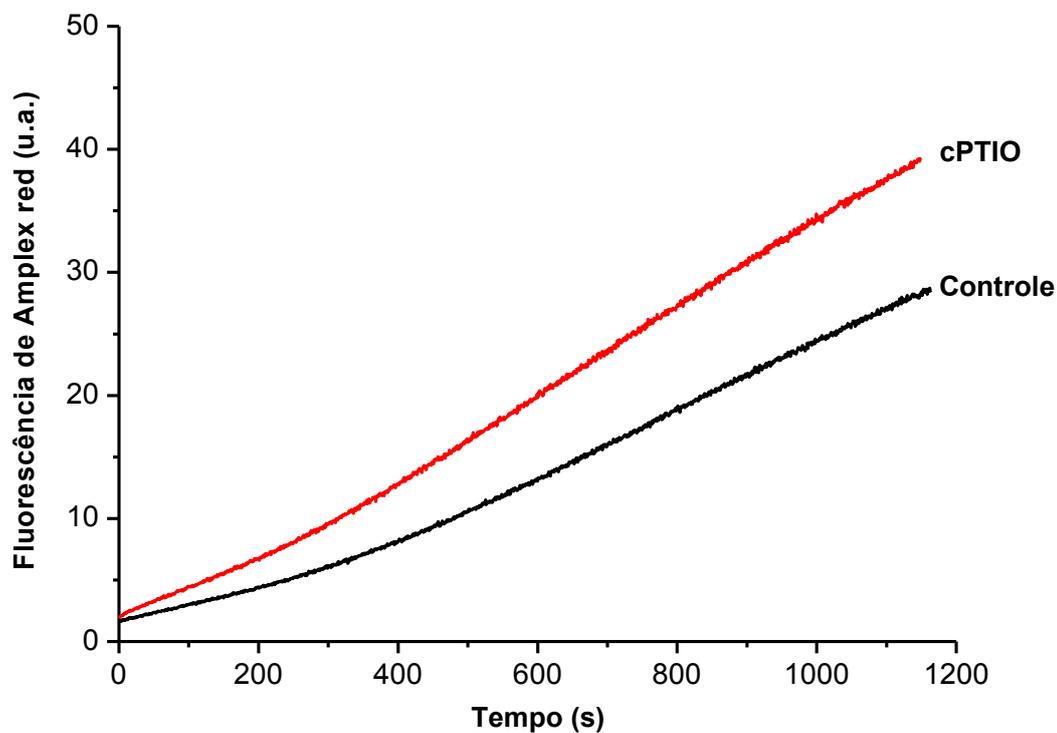


Figura 11: Produção de H₂O₂ por mitocôndrias de coração na presença ou não de cPTIO. Mitocôndrias de coração de rato (0,3 mg/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 30°C (pH 7,2) contendo substratos de complexo I 5 mM, Amplex Red® 10 µM e HRP 1 U/mL. **Painel A:** Traçado representativo da média de 7 experimentos independentes na presença ou ausência de cPTIO. **Painel B:** Produção de H₂O₂ na presença e ausência de cPTIO. *p<0,05, *Test t Student*.

Os resultados apresentados nesta Tese sugerem que o efeito do cPTIO na proteção contra abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial é mediado pela diminuição de NO[•] no interior desta organela e não devido a outros efeitos diretos deste composto sobre os componentes deste poro e nem sobre componentes estruturais da mitocôndria. As pequenas alterações observadas sobre a respiração e fosforilação oxidativa não se correlacionam com o efeito sobre a abertura do PTP, pelo menos com base na literatura corrente. Em outras palavras, a presença de cPTIO baixou os níveis de NO[•] mitocondrial e desviou a reação deste composto com o ânion superóxido diminuindo a produção de peroxinitrito, provável indutor de abertura do PTP nestas condições experimentais.

Estes resultados parecem relevantes para o maior entendimento dos mecanismos moleculares de abertura e fechamento deste PORO que, no momento, representa um dos mais importantes alvos terapêuticos contra um grande número de doenças degenerativas e patologias derivadas do “stroke” bem como outras patologias vasculares associadas ao estresse oxidativo e nitrosativo (Vaseva et al., 2012).

REFERÊNCIAS

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

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

Alberici, L. C., H. C. Oliveira, *et al.* Mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels as redox signals to liver mitochondria in response to hypertriglyceridemia. *Free Radic Biol Med*, v.47, n.10, Nov 15, p.1432-9. 2009.

Bernardes, C. F., J. R. Meyer-Fernandes, et al. Ca(2+)-dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). *Biochim Biophys Acta*, v.1188, n.1-2, Nov 1, p.93-100. 1994.

Bindoli, A. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, v.5, n.4, p.247-61. 1988.

Bonini, M. G., R. Radi, et al. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J Biol Chem*, v.274, n.16, Apr 16, p.10802-6. 1999.

Borutaite, V., R. Morkuniene, et al. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms. *FEBS Lett*, v.467, n.2-3, Feb 11, p.155-9. 2000.

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

Brookes, P. S. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion*, v.3, n.4, Mar, p.187-204. 2004.

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

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

Brown, G. C. Nitric oxide and mitochondria. *Front Biosci*, v.12, p.1024-33. 2007.

Cadenas, E. e K. J. Davies. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, v.29, n.3-4, Aug, p.222-30. 2000.

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

Castilho, R. F., A. J. Kowaltowski, et al. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic Biol Med*, v.18, n.3, Mar, p.479-86. 1995.

Castro, L., V. Demicheli, et al. Mitochondrial protein tyrosine nitration. *Free Radic Res*, v.45, n.1, Jan, p.37-52. 2011.

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

Clementi, E., G. C. Brown, et al. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective

action of glutathione. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.13, Jun 23, p.7631-6. 1998.

Colnna, R., S. Massari, et al. The problem of cation-binding sites in the energized membrane of intact mitochondria. Eur J Biochem, v.34, n.3, May 2, p.577-85. 1973.

Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J, v.341 (Pt 2), Jul 15, p.233-49. 1999.

Crompton, M., H. Ellinger, et al. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. Biochem J, v.255, n.1, Oct 1, p.357-60. 1988.

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

De Jesus-Berrios, M., L. Liu, et al. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. Curr Biol, v.13, n.22, Nov 11, p.1963-8. 2003.

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

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

Eissa, N. T., A. J. Strauss, et al. Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. tissue-specific regulation and induction by cytokines. J Biol Chem, v.271, n.43, Oct 25, p.27184-7. 1996.

Eliseev, R. A., G. Filippov, *et al.* Role of cyclophilin D in the resistance of brain mitochondria to the permeability transition. *Neurobiol Aging*, v.28, n.10, Oct, p.1532-42. 2007.

Fagian, M. M., L. Pereira-Da-Silva, *et al.* Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants. *J Biol Chem*, v.265, n.32, Nov 15, p.19955-60. 1990.

Ferrer-Sueta, G. e R. Radi. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol*, v.4, n.3, Mar 20, p.161-77. 2009.

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

Foster, M. W., T. J. McMahon, *et al.* S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med*, v.9, n.4, Apr, p.160-8. 2003.

Friberg, H., M. Ferrand-Drake, *et al.* Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci*, v.18, n.14, Jul 15, p.5151-9. 1998.

Ferreiro-Barros, C. C., C. H. Tengan, *et al.* Neonatal mitochondrial encephalomyopathy due to a defect of mitochondrial protein synthesis. *J Neurol Sci*, v.275, n.1-2, Dec 15, p.128-32. 2008.

Gadelha, F. R., L. Thomson, *et al.* Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, v.345, n.2, Sep 15, p.243-50. 1997.

Ghafourifar, P., U. Schenk, *et al.* Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem*, v.274, n.44, Oct 29, p.31185-8. 1999.

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

Gornall, A. G., C. J. Bardawill, et al. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*, v.177, n.2, Feb, p.751-66. 1949.

Green, D. R. e G. Kroemer. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, v.305, n.5684, Jul 30, p.626-9. 2004.

Green, D. R. e J. C. Reed. Mitochondria and apoptosis. *Science*, v.281, n.5381, Aug 28, p.1309-12. 1998.

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

Grijalba, M. T., A. E. Vercesi, et al. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry*, v.38, n.40, Oct 5, p.13279-87. 1999.

Gunter, T. E., D. I. Yule, et al. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, v.567, n.1, Jun 1, p.96-102. 2004.

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

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

Hermes-Lima, M., R. F. Castilho, et al. Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. *Mol Cell Biochem*, v.145, n.1, Apr 12, p.53-60. 1995.

Hess, D. T., A. Matsumoto, et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.6, n.2, Feb, p.150-66. 2005.

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

Jaffrey, S. R., H. Erdjument-Bromage, et al. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol*, v.3, n.2, Feb, p.193-7. 2001.

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

Jaburek, M., M. Varecha, *et al.* Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem*, v.274, n.37, Sep 10, p.26003-7. 1999.

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

Kagawa, J. Proton motive ATP synthesis. Elsevier Science B.V. 1984.

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

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

Kowaltowski, A. J., N. C. De Souza-Pinto, et al. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, v.47, n.4, Aug 15, p.333-43. 2009.

Kowaltowski, A. J. E. A. 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* Jan 8, p.150-2. 1996

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

Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, v.87, n.1, Jan, p.99-163. 2007.

Lacza, Z. Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist? *Nitric Oxide*, v.14, n.2, Mar, p.162-8. 2006.

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

Lehninger, A. L. *Princípios da bioquímica*. 3^a ed. São Paulo: sarvier; 2002.

Lehninger, A. L. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Fourth Edition, p.690-750. 2004

Leite, A. C., H. C. Oliveira, et al. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*, v.1797, n.6-7, Jun-Jul, p.1210-6. 2010.

Lemasters, J. J. The mitochondrial permeability transition: from biochemical curiosity to pathophysiological mechanism. *Gastroenterology*, v.115, n.3, Sep, p.783-6. 1998.

Lemasters, J. J. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*, v.276, n.1 Pt 1, Jan, p.G1-6. 1999.

Lira, V. A., D. L. Brown, et al. Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 in skeletal muscle cells. *J Physiol*, v.588, n.Pt 18, Sep 15, p.3551-66. 2010.

Liu, L., Y. Yan, et al. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*, v.116, n.4, Feb 20, p.617-28. 2004.

Merryfield, M. L. e H. A. Lardy. Ca²⁺-mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe²⁺ from rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, v.257, n.7, Apr 10, p.3628-35. 1982.

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

Mewton, N., P. Croisille, *et al.* Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, v.55, n.12, Mar 23, p.1200-5. 2010.

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

Murray, J., S. W. Taylor, et al. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem*, v.278, n.39, Sep 26, p.37223-30. 2003.

Naseem, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*, v.26, n.1-2, Feb-Apr, p.33-65. 2005.

Navarro, A. e A. Boveris. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv Drug Deliv Rev*, v.60, n.13-14, Oct-Nov, p.1534-44. 2008.

Netto, L. E., A. J. Kowaltowski, et al. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol*, v.348, p.260-70. 2002.

Nicholls, D. G. A. F., S.J Proton current and respiratory control. *Bioenergetics*, p.69-75. 2002.

Nisoli, E. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, v.299, n.5608, Feb 7, p.896-9. 2003.

Nisoli, E., S. Falcone, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.47, Nov 23, p.16507-12. 2004.

Palacios-Callender, M., M. Quintero, et al. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.20, May 18, p.7630-5. 2004.

Patel, J. M., J. Zhang, et al. Nitric oxide-induced inhibition of lung endothelial cell nitric oxide synthase via interaction with allosteric thiols: role of thioredoxin in regulation of catalytic activity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.15, n.3, Sep, p.410-9. 1996.

Quijano, C., N. Romero, et al. Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Radic Biol Med*, v.39, n.6, Sep 15, p.728-41. 2005.

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

Radi, R., A. Cassina, et al. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. Free Radic Biol Med, v.33, n.11, Dec 1, p.1451-64. 2002.

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

Ravi, K., L. A. Brennan, et al. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.8, Feb 24, p.2619-24. 2004.

Ramachandran, A., M. Lebofsky, *et al.* Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. Free Radic Res, v.45, n.2, Feb, p.156-64. 2010.

Reynafarje, B., L. E. Costa, et al. O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method. Anal Biochem, v.145, n.2, Mar, p.406-18. 1985.

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

Romeo, A. A., J. A. Capobianco, et al. Heme nitrosylation of deoxyhemoglobin by s-nitrosoglutathione requires copper. J Biol Chem, v.277, n.27, Jul 5, p.24135-41. 2002.

Sacksteder, C. A., W. J. Qian, et al. Endogenously nitrated proteins in mouse brain: links to neurodegenerative disease. Biochemistry, v.45, n.26, Jul 4, p.8009-22. 2006.

Saito, A. e R. F. Castilho. Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition. *Neurochem Res*, v.35, n.11, Nov, p.1667-74. 2010.

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

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

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

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

Stamler, J. S., D. I. Simon, et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, n.1, Jan 1, p.444-8. 1992.

Stiburek, L., H. Hansikova, et al. Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res*, v.55 Suppl 2, p.S27-41. 2006.

Stubauer, G., A. Giuffre, et al. Mechanism of S-nitrosothiol formation and degradation mediated by copper ions. *J Biol Chem*, v.274, n.40, Oct 1, p.28128-33. 1999.

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

Tripathi, A., S. Khatun, et al. Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. *Free Radic Res*, v.43, n.3, Mar, p.287-94. 2009.

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

Uchino, H., E. Elmer, *et al.* Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res*, v.812, n.1-2, Nov 23, p.216-26. 1998.

Valez.V., A., Aicardo., a, Cassina., a, Quijano., R, Radi Oxidative stress in Mitochondria. *Principles os Free Radical Biomedicine*, Nova science Publishers, 2012, p.283-302. 2012.

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

Venkatakrishnan, P. Absence of nitric-oxide synthase in sequentially purified rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, v.284, n.30, Jul 24, p.19843-55. 2009.

Venkatakrishnan, P., E. S. Nakayasu, et al. Arginase activity in mitochondria-- An interfering factor in nitric oxide synthase activity assays. *Biochem Biophys Res Commun*, v.394, n.3, Apr 9, p.448-52. 2010.

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

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

Vercesi, A. E. Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front Biosci*, v.11, p.2554-64. 2006.

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

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

Zoratti, M. e I. Szabo. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, v.1241, n.2, Jul 17, p.139-76. 1995.