

UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

INFLUÊNCIA DE GRUPOS AMÍNICOS NA
ACTIVIDADE DOS COMPLEXOS
RESPIRATÓRIOS MITOCONDRIAIS

MARIA DE JESUS REPAS SALVADOR

COIMBRA, 2003

Maria de Jesus Repas Salvador

*INFLUÊNCIA DE GRUPOS AMÍNICOS NA
ACTIVIDADE DOS COMPLEXOS
RESPIRATÓRIOS MITOCONDRIAIS*

Universidade de Coimbra

2003

Maria de Jesus Repas Salvador

**INFLUÊNCIA DE GRUPOS AMÍNICOS NA
ACTIVIDADE DOS COMPLEXOS
RESPIRATÓRIOS MITOCONDRIAIS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra para prestação de provas de

Mestrado em Biologia Animal

Este trabalho insere-se no âmbito do
currículo do Ensino Secundário,
relativamente ao tema *Sistemas Vivos e
Energia.*

Universidade de Coimbra

2003

Derrotas são só aquelas que se aceitam.

Bento de Jesus Caraça

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO	2
Locais de formação de ATP.....	3
1.1 – Conhecer a mitocôndria.....	5
Localização e morfologia.....	6
Estrutura mitocondrial.....	8
Função da mitocôndria.....	10
1.2 - Cadeia respiratória.....	12
Caracterização dos complexos da cadeia respiratória.....	14
1.3 - A fosforilação oxidativa.....	16
ATP sintase, complexo V ou F_0F_1 ATPase.....	17
A força protomotriz.....	20
Como é efectuado o controlo da síntese de ATP na célula.....	22
1.4 - Inibidores da fosforilação oxidativa.....	24
1.5 - Desacopladores da fosforilação oxidativa.....	25
1.6 - Outros compostos que interferem com a fosforilação oxidativa.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 – Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	30
2.1.1 - Ratos de laboratório.....	30
2.1.2 - Preparação de soluções para obtenção da fracção mitocondrial	30
2.1.3 - Técnica de isolamento da fracção mitocondria.....	31
2.1.4 - Quantificação da proteína na fracção mitocondrial.....	34
2.2 – Actividade bioenergética.....	38
2.2.1 - Análise da respiração mitocondrial através da medição do consumo de oxigénio.....	38
O eléctrodo de Clark.....	38

Princípios básicos de funcionamento do eléctrodo de Clark.....	38
Calibração do eléctrodo de Clark.....	41
Meio de reacção.....	41
Ensaio da actividade mitocondrial pelo consumo de oxigénio...	42
Cálculo de parâmetros representativos da actividade bioenergética mitocondrial.....	44
2.2.2 – Desenvolvimento de potencial eléctrico através da membrana interna da mitocôndria.....	45
Eléctrodo de TPP ⁺	46
Princípios básicos de funcionamento do eléctrodo de TPP ⁺	46
Calibração do eléctrodo de TPP ⁺	48
Determinação do potencial eléctrico ($\Delta\Psi$).....	52
2.3 – Estabilidade temporal do aminoreagente fluorodinitrobenzeno em solução.....	53
Análise de alterações por espectrofotometria de absorção óptica.....	54
3. RESULTADOS.....	56
3.1 – Efeito do fluorodinitrobenzeno na actividade bioenergética mitocondrial.....	56
3.1.1 - Alteração na actividade respiratória.....	56
3.1.1.1 - Sensibilidade do complexo I ao FDNB.....	56
3.1.1.2 - Sensibilidade do complexo II ao FDNB.....	60
3.1.1.3 - Sensibilidade do complexo II ao FDNB.....	65
3.1.1.4 - Efeito do FDNB na actividade sequencial dos complexos respiratórios I, II e IV.....	68
3.1.1.5 - Interferência do ADP na acção inibitória do FDNB na respiração de mitocôndrias de fígado de rato.....	70
3.1.2 – Alteração no potencial de membrana induzida por FDNB	72
3.2 - Alteração temporal da estabilidade da solução de FDNB.....	74
3.2.1 – Alteração na actividade respiratória mitocondrial por DNB utilizado longos períodos após a sua dissolução em dimetilsulfóxido.....	74

3.2.2 – Alteração no potencial de membrana mitocondrial por soluções de FDNB utilizado longos períodos após a sua dissolução. em dimetilsulfóxido.....	78
3.2.3 – Conversão química do FDNB em dinitrofenol em função do tempo após dissolução em dimetilsulfóxido.....	79
3.2.4.3 – Modificação gradual do espectro de absorção óptica.....	79
3.2.4.4 – Identificação do composto resultante da reacção de conversão.....	79
4. DISCUSSÃO.....	83
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	89
6 REFERÊNCIAS.....	91

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus agradecimentos à Professora Doutora Maria da Graça Pratas Vale, orientadora da tese apresentada, pela sua excelente orientação pedagógica e científica. O seu incansável apoio prestado quer a nível do trabalho desenvolvido, quer a nível do incentivo e ânimo que concedeu, foram decisivos para a realização do trabalho agora apresentado. Tem sido um privilégio poder partilhar do seu saber, capacidade metodológica e formação ética e pessoal. A sua revisão crítica desta dissertação contribuiu decisivamente para a melhoria da sua apresentação final.

Ao professor Doutor Joaquim António Moreno expresse o meu agradecimento pelo apoio laboratorial concedido e pelos seus preciosos conhecimentos científicos que prontamente me transmitiu.

À minha colega e amiga Natália, a minha gratidão pela sua preciosa ajuda nos trabalhos de laboratório, pelo empenhamento e capacidade de trabalho, pelo seu apoio e boa disposição que animou as longas horas de trabalho experimental.

Reconheço o apoio dos meus colegas e amigos que permitiu ultrapassar situações mais desencorajadoras, e a compreensão dos momentos de fadiga e apatia. Um agradecimento especial ao Carlos Santos, pelo apoio incondicional que prestou no tratamento informático deste trabalho.

À minha família que me ajudou a vencer os momentos mais difíceis, sofreu com a minha “ausência” e que colaborou, cada qual à sua maneira, para que este projecto fosse levado a bom termo, todo o espaço é pouco para lhes agradecer.

ABREVIATURAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Nome completo</u>
ADP	adenosina 5'-difosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
CCCP	m-clorocarbonilcianidafenil-hidrazona
CoQ	coenzima Q
CoQH ₂	coenzima Q reduzida
DCCD	dicicloexil-carbodiámina
DMSO	dimetilsulfóxido
DNP	dinitrofenol
EGTA	ácido etilenoglicol-bis-(aminoéter-etílico)N, N'-tetracético
FAD	flavina-adenina dinucleótido
FADH ₂	flavina-adenina dinucleótido (forma reduzida)
FCCP	biscianocarbonil-p-trifluoro-metoxifenil-hidrazona
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno
FMN	flavina mononucleótido
<i>g</i>	aceleração da gravidade
HEPES	ácido N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-2-etanossulfónico
ICR	índice de controlo respiratório
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
min	minuto
NAD	nicotinamida-adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	nicotinamida-adenina dinucleótido (forma reduzida)

PMS	fenazinametasulfato
Q	ubiquinona
QH ₂	ubiquinol
r.p.m.	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
TMPD	tetrametil- <i>p</i> -fenileno diamina
TPP ⁺	catião tetrafenilfosfónio
$\Delta\mu\text{H}^+$	gradiente electroquímico de protões
$\Delta\Psi_{\text{mit}}$	potencial eléctrico da membrana mitocondrial
Δp	força protomotriz
ΔpH	gradiente de pH

RESUMO

As mitocôndrias produzem energia celular na forma de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa. A síntese de ATP é inibida por tóxicos que actuam a nível da cadeia respiratória, ou da ATP sintase, bem como por desacopladores da fosforilação oxidativa.

O fluorodinitrobenzeno (FDNB) é um composto largamente utilizado como sonda para estudar a influência de certos resíduos de aminoácidos na actividade de enzimas pertencentes a vários sistemas biológicos. Como reage com grupos amínicos, pode interferir com a bioenergética mitocondrial se os referidos grupos influenciarem a actividade catalítica dos complexos respiratórios.

Para testar esta hipótese, isolaram-se mitocôndrias de fígado de rato que foram postas a reagir com o FDNB. A actividade dos complexos respiratórios mitocondriais foi diferenciada mediante a utilização de substratos respiratórios e inibidores específicos, de modo a seleccionar o envolvimento dos vários complexos no transporte de electrões do substrato para o oxigénio. Foi estudada a acção do FDNB na actividade da mitocôndria a respirar no estado 3 e no estado 4.

Os resultados mostram que os complexos I, II e III foram sensíveis ao FDNB, observando-se uma diminuição na velocidade de consumo de oxigénio de maneira dependente da concentração de FDNB. No entanto, a magnitude de resposta ao FDNB diferiu consoante o complexo que inicia o transporte de electrões através da cadeia respiratória. Assim, o complexo I foi sensível para baixas concentrações de FDNB (~ 0,25 mM), enquanto que o complexo II só foi afectado a partir de 0,5 mM de FDNB. Além disso, no primeiro caso, o consumo de oxigénio foi completamente inibido a partir de 0,75 mM de FDNB enquanto que, no segundo, ainda se obteve resposta na presença de 1 mM FDNB. O complexo IV foi insensível ao aminoreagente mesmo para altas concentrações (1,5 mM). A inibição dos complexos respiratórios pelo FDNB foi confirmada observando a actividade respiratória na presença do desacoplador FCCP. O complexo V, ATP sintase, também revelou sensibilidade à sonda para concentrações desta a partir de

aproximadamente 0,2 mM, uma vez que se observou inibição do estado 3 em condições de insensibilidade respiratória (complexo IV).

A inibição respiratória reflectiu-se no potencial transmembranar, em que o efeito do FDNB se traduziu num decréscimo do potencial eléctrico em função da concentração do aminoreagente.

Foi também observado que uma solução de FDNB utilizada alguns dias após a sua preparação em dimetilsulfóxido (DMSO) tinha efeitos diferentes dos acima referidos, tendo-se verificado uma acção desacopladora da fosforilação oxidativa, em que o consumo de oxigénio foi estimulado para baixas concentrações (20 μ M) da solução de FDNB (armazenada), atingindo um máximo a 60 μ M. Para concentrações mais elevadas, verificou-se uma diminuição na taxa respiratória, continuando contudo a observar-se o efeito desacoplador nas mitocôndrias. A medição do potencial eléctrico transmembranar corroborou esta conclusão, verificando-se uma queda brusca nos valores deste parâmetro, indicadora de desacoplamento oxidação/fosforilação.

Através da análise dos espectros de absorção óptica de soluções de FDNB utilizadas em vários períodos de tempo após a sua solubilização em dimetilsulfóxido, verificámos que, de facto, o FDNB é alterado gradualmente (\sim 8 dias) até se converter inteiramente no desacoplador dinitrofenol.

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os organismos realizam várias actividades fisiológicas, como a síntese e organização de moléculas complexas, mobilidade, manutenção da temperatura do corpo, etc., inerentes à sua condição de seres vivos. Para estas e outras funções é necessária energia que deriva obrigatoriamente do mundo exterior aos organismos.

A vida existe na terra porque é possível captar energia solar e transformá-la em energia química. Esta transformação é efectuada pelos seres vivos fotossintéticos. Por sua vez, a energia química pode ser transferida de um organismo para outro, de modo que os organismos não fotossintéticos utilizam a energia química produzida pelos fotossintéticos para as suas funções biológicas. Essa energia química, encontra-se na forma de compostos orgânicos (hidratos de carbono, lípidos, prótidos) que ingerimos nos alimentos e que são transformados pela digestão em moléculas mais simples (glicose, ácidos gordos, aminoácidos). Estas moléculas são depois degradadas nas células, durante as reacções do catabolismo, obtendo-se moléculas reduzidas (moléculas ricas em energia como NADH e FADH₂). É o que acontece, por exemplo, na degradação da glicose através da glicólise e do ciclo do ácido cítrico, em que a maior parte da energia libertada da oxidação da glicose a CO₂ é retida nessas coenzimas reduzidas (NAD⁺ é reduzido a NADH e FAD a FADH₂). Portanto, a partir das moléculas orgânicas simples, as células vivas têm de realizar reacções exergónicas (catabólicas) para obter energia para as reacções endergónicas (não só reacções anabólicas como também reacções de activação) (Campos, 1999). Mas a transferência de energia das reacções exergónicas para as reacções endergónicas não é, em geral, directa, isto é, a energia armazenada naquelas moléculas reduzidas não está na forma utilizável!

Então como resolver o problema?

A partir dessa energia armazenada sintetizamos uma supermolécula energética – o ATP – que constitui o processo universal de transferência de energia nos organismos vivos. Funciona como um composto intermediário formado a expensas da energia libertada pelas reacções exergónicas que, sempre que seja necessário, se hidrolisa de modo a fornecer a energia às reacções endergónicas. Constitui então uma reserva que disponibiliza energia

através da ruptura de uma ligação entre dois grupos fosforilo, num número suficiente de moléculas de ATP (Campos, 1999).

E como a sintetizamos?

Usamos a capacidade de oxidar moléculas orgânicas para obter a força que conduz a síntese de ATP!

O oxigénio é o elemento oxidante por excelência. Como 23% da composição da atmosfera é oxigénio, o nosso meio é assim altamente oxidante. Isto significa que as reacções de oxidação da maioria dos compostos orgânicos são favoráveis e podem portanto, servir como fonte de energia. Por isso, as moléculas NADH e FADH₂ podem ser oxidadas pelo oxigénio molecular, fornecendo a energia necessária à síntese de ATP.

Note-se que, mesmo a energia que as plantas obtêm por absorção da luz, é usada principalmente para formar moléculas orgânicas reduzidas e, é a oxidação destas que produz a energia necessária para conduzir a bioquímica das plantas (Harris, 1995).

Onde ocorre a oxidação pelo oxigénio molecular e a formação de ATP?

Locais de formação de ATP

Os estádios iniciais da degradação da glicose (glicólise) ocorrem no citosol, onde a glicose é convertida para piruvato, sendo produzidas duas moléculas de ATP (apenas uma pequena parte do total de energia potencialmente disponível na glicose). Mas o metabolismo da glicose só se conclui nas mitocôndrias, para onde o piruvato é importado para ser oxidado a acetil coenzima A e depois degradado a CO₂ através das reacções do ciclo do ácido cítrico. É nestas reacções, na matriz mitocondrial, que se formam as moléculas NADH e FADH₂, fornecedoras de electrões à cadeia respiratória da mitocôndria, de modo a reduzir o oxigénio a água. Esta fase do metabolismo permite a obtenção de 15 vezes mais ATP do que o produzido apenas pela glicólise (Alberts *et al.*, 2002). A oxidação dos ácidos gordos também leva à formação de acetil CoA, que é igualmente metabolizada no ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória mitocondrial (Cooper, 2000).

De salientar que os mecanismos de formação de ATP na glicólise e no ciclo do ácido cítrico são diferentes dos que se observam ao nível da cadeia respiratória da mitocôndria: no primeiro caso, é transferido directamente um fosfato de alta energia de um

composto para o ADP, enquanto que no segundo, é a transferência de electrões entre complexos enzimáticos (cadeia respiratória) que fornece a energia necessária à fosforilação do ADP (Cooper, 2000), como veremos seguidamente.

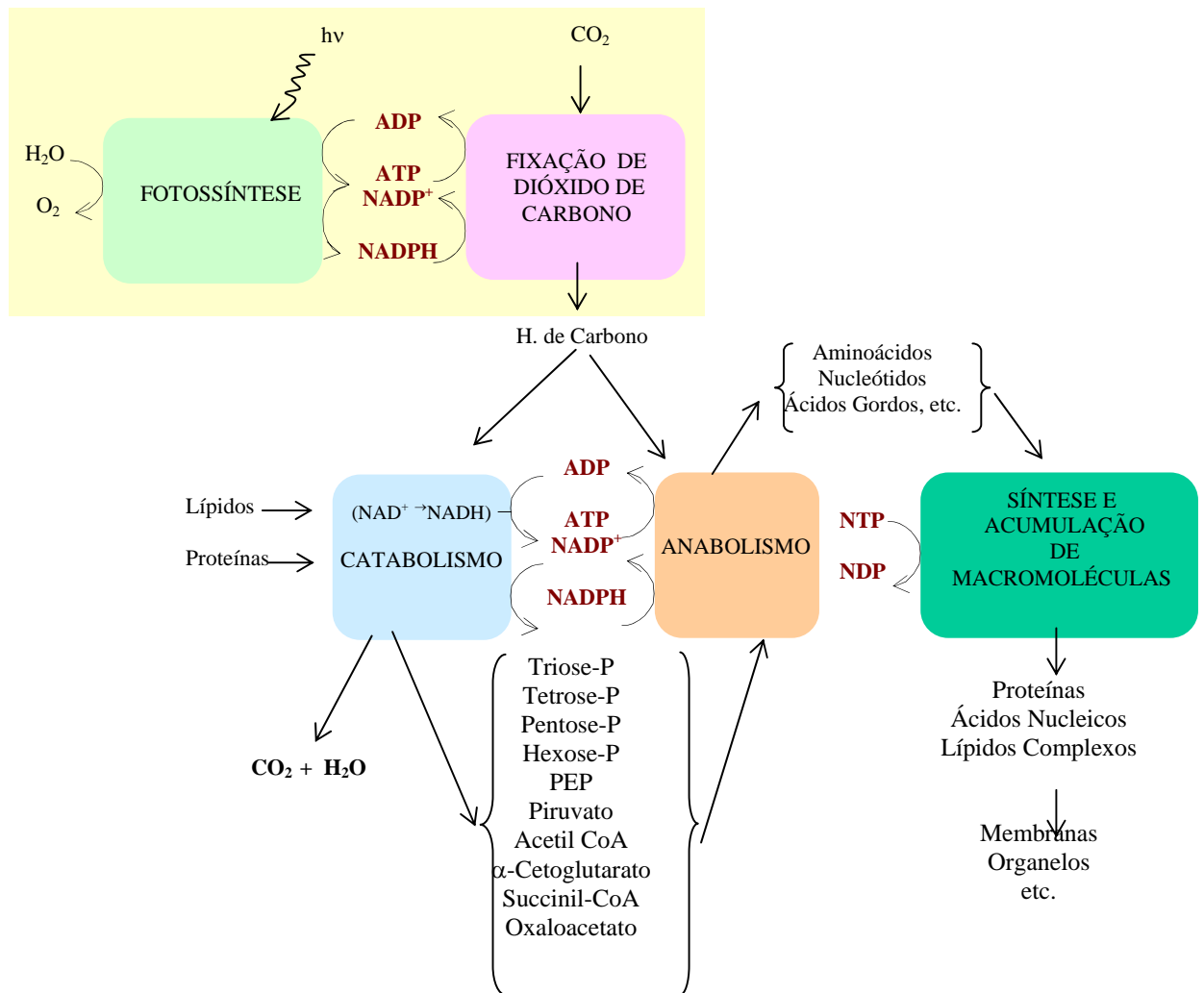


Figura 1.1 – Diagrama representativo do metabolismo intermediário (adaptado de Garrett e Grisham, 1995).

Assim, nas células eucarióticas, a mitocôndria é o organelo responsável pela produção da maior parte do ATP, essencialmente a partir da degradação de lípidos e hidratos de carbono.

A oxidação do NADH e FADH₂ pelo oxigénio molecular é um processo altamente exergónico, mas não ocorre directamente, isto é, os electrões são transferidos para o oxigénio através de uma série de reacções de oxidação/redução, catalisadas pelos complexos da cadeia respiratória (Lodish *et al.*, 1999). A energia libertada na transferência de electrões através dos complexos é então aproveitada para a síntese de ATP, levada a cabo noutro complexo enzimático mitocondrial. Todos os complexos se localizam na membrana mitocondrial interna. Mas porquê vários complexos transportadores de electrões e não apenas um?

Para perceber estes processos temos, em primeiro lugar, de conhecer a “central” onde eles se desencadeiam – a mitocôndria. Que estrutura possui então este organito que lhe confere a característica de principal produtora de ATP na célula viva?

1.1 – Conhecer a mitocôndria

Há mais de 50 anos que as mitocôndrias captaram, pela primeira vez, a atenção dos fisiologistas da célula. A sua abundância, a facilidade de purificação e a sua riqueza em enzimas vitais tornou-as organelos essenciais nas investigações que definiram os princípios fundamentais do metabolismo energético celular. Actualmente, as mitocôndrias continuam na vanguarda da investigação científica, agora em campos tão diversos como a morte celular, a biologia evolutiva, a medicina molecular e até mesmo a ciência forense (Kiberstis, 1999).

Uma vez que é nas mitocôndrias que a maior parte do ATP é produzido, estes organelos têm sido essenciais no processo evolutivo dos animais complexos (Alberts *et al.*, 2002), cujas necessidades de ATP não poderiam depender apenas da glicólise anaeróbica.

Localização e morfologia

As mitocôndrias localizam-se no citoplasma das células ocupando, na maioria dos casos, mais de 25% do seu volume (Figura 1.2-A). Encontram-se entre os organelos de maior tamanho (com um diâmetro de 0,5-1 μm) (Figura 1.2-B), apenas ultrapassadas pelo núcleo e, pelos vacúolos e cloroplastos nas células vegetais (Lodish *et al.*, 1999).

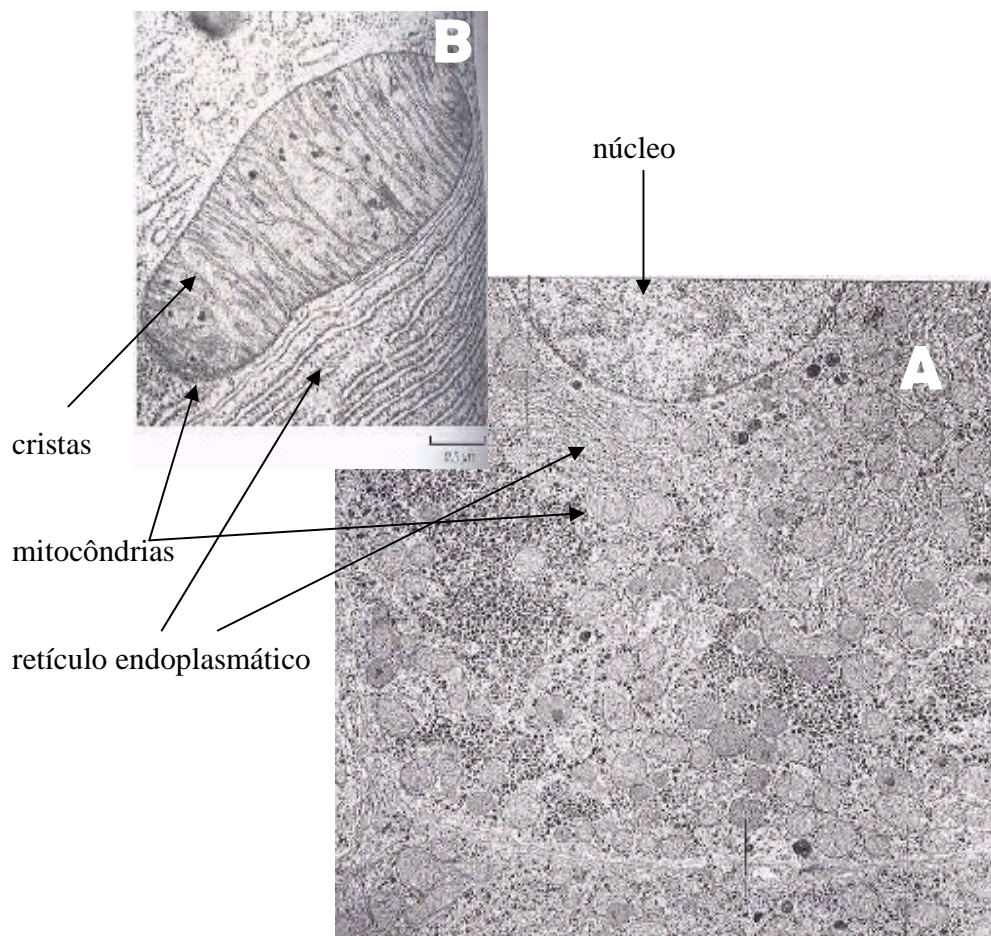


Figura 1.2- Localização (A) e morfologia de mitocôndrias (B). A – Microfotografia eletrônica de mitocôndrias em hepatócito de fígado de rato (39600x) (In Devlin, 1997). B – Mitocôndria de fígado de rato (In Cooper, 2000).

São normalmente representadas como cilindros alongados e rígidos embora sejam extraordinariamente móveis e plásticas (Figura 1.2-B). Nas células vivas, observam-se alterações na forma das mitocôndrias, o que está relacionado com a sua função: quando se encontram a respirar activamente, as cristas mitocondriais estão mais condensadas relativamente ao estado de repouso (Figura 1.3) (Voet e Voet, 1995). Como as mitocôndrias se movem no citoplasma, elas estão associadas aos microtúbulos que, por sua vez, podem determinar a sua orientação e distribuição nos diferentes tipos de células. Por isso, as mitocôndrias podem formar longos filamentos móveis ou cadeias, ou permanecerem fixas onde é necessário fornecer ATP directamente a um local onde o consumo deste é mais elevado. É o que acontece nas células do músculo cardíaco, onde elas se encontram enfiadas entre miofibrilhas adjacentes, ou no caso do esperma, onde estão enroladas à volta do axonema flagelar (Figura 1.4) (Alberts *et al.*, 2002).

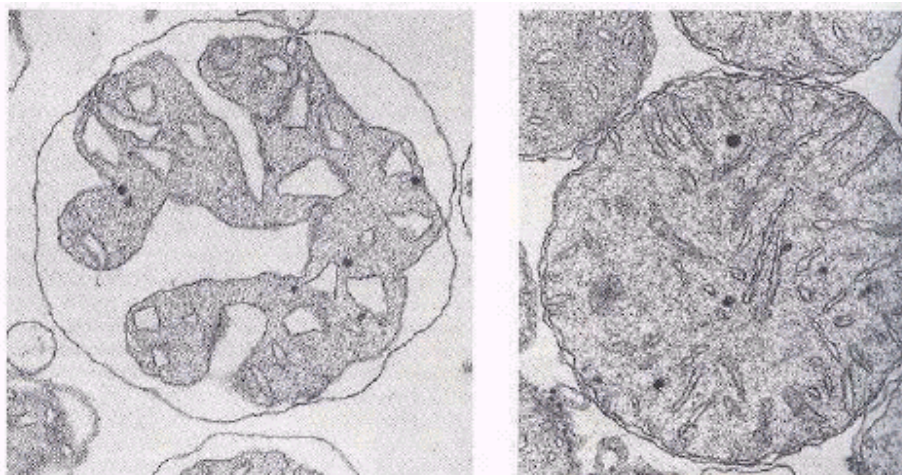


Figura 1.3 – Microfotografia electrónica de mitocôndrias de fígado de rato: à esquerda, mitocôndria em respiração activa e à direita, mitocôndria em estado de repouso (*in* Voet e Voet, 1995).

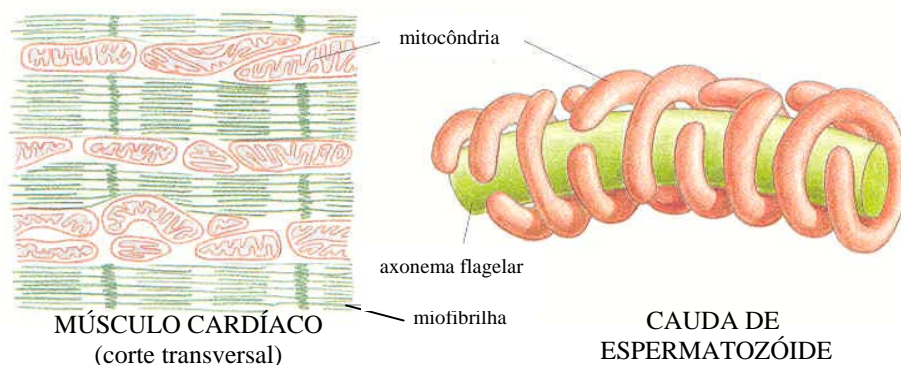


Figura 1.4 – Localização das mitocôndrias junto de locais de elevado consumo de ATP, no músculo cardíaco e na cauda dos espermatozóides (*In Alberts et al., 2002*).

Ao longo do desenvolvimento, estão programadas algumas alterações na forma e distribuição mitocondrial, que ocorrem na forma de migrações ou alterações morfológicas características, em estádios importantes da diferenciação celular. Para além destas alterações programadas, se ocorrerem outras, elas estarão associadas a uma variedade de condições patológicas como distúrbio do fígado, distrofia muscular, cardiomiopatia e cancro (Yaffe, 1999; Wallace, 1999), o que revela a importância destes organelos na regulação de funções celulares.

Estrutura mitocondrial

Apesar da forma externa das mitocôndrias ser variável, a sua organização estrutural interna mantém-se constante (Yaffe, 1999).

Cada mitocôndria está rodeada por um sistema de membranas duplas, altamente especializadas e com diferentes funções. A membrana interna e a membrana externa delimitam um espaço intermembranar, enquanto que o espaço interno da mitocôndria se designa matriz (Figura 1.5). Cada um destes componentes tem um papel funcional distinto,

sendo a matriz mitocondrial e a membrana interna os principais locais da actividade das mitocôndrias.

A membrana externa é constituída por cerca de 50% de lípidos e 50% de proteínas (Lodish *et al.*, 1999). Certas proteínas (porinas) formam canais que tornam a membrana permeável a moléculas de peso molecular até 6000 daltons (Cooper, 2000). Por sua vez, a membrana interna é constituída por 20% de lípidos e 80% de proteínas, responsáveis pelas principais funções fisiológicas da mitocôndria. Entre os 60 tipos diferentes de proteínas, aqui se encontram as enzimas da cadeia respiratória, as que estão envolvidas na síntese de ATP (ATP sintase), desidrogenases várias e outras proteínas envolvidas no transporte de substâncias (piruvato e ácidos gordos) para o interior da mitocôndria (Alberts *et al.*, 2002). Esta membrana forma numerosas dobras ou cristas, que aumentam bastante a sua área superficial (Figura 1.5); o número de cristas pode variar, sendo maior nas mitocôndrias das células do músculo cardíaco do que nas do fígado. Sendo a membrana interna o local de síntese de ATP, o elevado número de dobras nas mitocôndrias cardíacas deve-se provavelmente à grande necessidade de energia deste músculo (Alberts *et al.*, 2002). A membrana interna é muito menos permeável do que a membrana externa, sendo impermeável à maior parte dos iões, incluindo protões, e a moléculas pequenas. Esta característica de impermeabilidade da membrana interna, que lhe confere uma função de barreira, é fundamental para o desempenho da principal actividade das mitocôndrias - a produção de ATP - como veremos seguidamente.

A matriz da mitocôndria contém um sistema genético e enzimas mitocondriais relacionadas principalmente com o ciclo de Krebs e responsáveis pelo metabolismo oxidativo (Figura 1.5) (Cooper, 2000).

As propriedades, no que respeita à permeabilidade, das membranas externa e interna permitem que a composição do espaço intermembranar seja semelhante à do citosol, no que respeita a iões e moléculas pequenas (Cooper, 2000).

Em última análise, a membrana mitocondrial interna constitui a principal central de produção da maior parte do ATP celular em que os complexos da cadeia respiratória oxidam os substratos (NADH e FADH₂) e um outro complexo, acoplado às reacções de oxidação, fosforila o ADP, formando ATP.

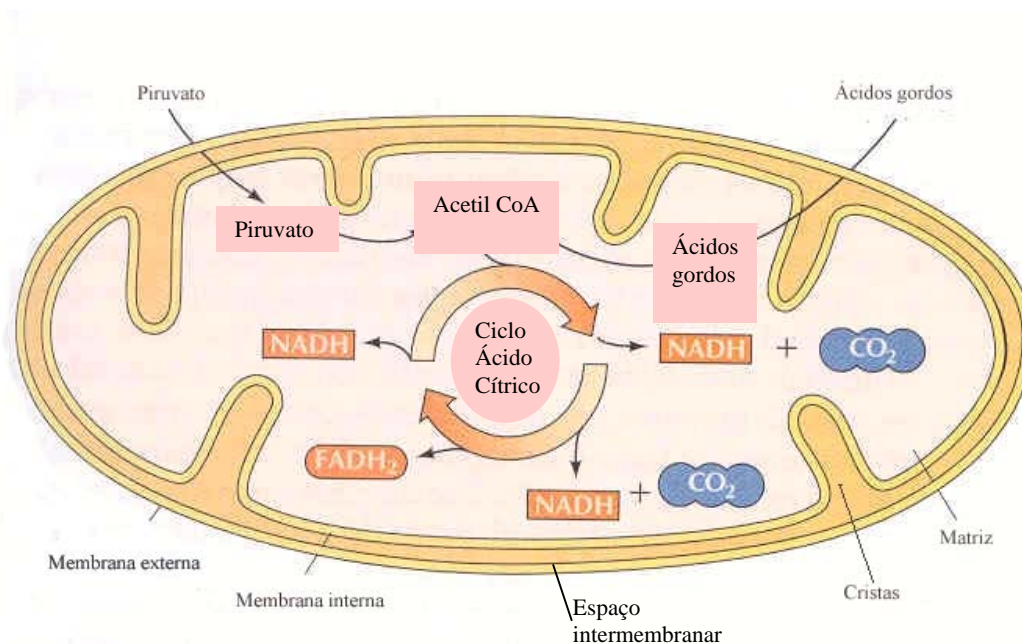


Figura 1.5 – Estrutura da mitocôndria. A mitocôndria está rodeada pelas membranas externa e interna. A membrana interna delimita a matriz e forma dobras ou cristas que se projectam para o seu interior, é na matriz que ocorre o metabolismo mitocondrial; o espaço intermembranar está situado entre as duas membranas (*In Cooper, 2000*).

Mas para além de produzir ATP, as mitocôndrias desempenharão outras funções?

Função da mitocôndria

Apesar das mitocôndrias serem relativamente grandes e por isso terem sido identificadas ainda no século XIX, só a partir de 1948 se começou a conhecer a sua função, graças ao desenvolvimento de metodologias para o isolamento de mitocôndrias intactas a partir de vários tecidos animais e vegetais (*Alberts et al., 2002*).

A principal função da mitocôndria é a síntese de ATP, mas actualmente são-lhe atribuídas outras funções que se interligam, directa ou indirectamente, com aquela: a

modulação da sinalização pelo cálcio e a sua participação na morte celular programada (apoptose).

A mitocôndria interage em estreita conexão com o retículo endoplasmático (RE) (reservatório de cálcio), sendo sensível às alterações na concentração daquele ião no citosol, desencadeadas por libertação de Ca^{2+} do RE nas proximidades da mitocôndria (Rizzuto, 1998; Csordás *et al.*, 1999). Neste caso, a mitocôndria capta cálcio que, por sua vez, vai modular a síntese de ATP (Pozzan e Rizzuto, 2000). Esta captação de cálcio pela mitocôndria permite-lhe modular a actividade dos canais libertadores de cálcio do RE, induzidos por inositol trifosfato (IP_3) (Jouaville *et al.*, 1995). Ao controlar a actividade deste canais, a mitocôndria intervém na dinâmica das oscilações e ondas de cálcio citosólico (Landolfi *et al.*, 1998), influenciando indirectamente os processos regulados por sinais de cálcio, como a motilidade, secreção, expressão de genes, etc. (Hajnóczky *et al.*, 1999).

Por outro lado, a mitocôndria tem um papel activo no processo de morte celular programada (apoptose), quer através da libertação de factores apoptóticos, quer através da produção do ATP necessário aos acontecimentos apoptóticos dependentes de energia (activação das caspases e dismantelamento da célula) (Green e Reed, 1998; Joza *et al.*, 2001). O inadequado fornecimento de ATP provoca alteração de morte apoptótica para morte necrótica (Szalai *et al.*, 1999). Enquanto a primeira é útil e necessária no controlo do desenvolvimento dos organismos e também em caso de doença, a segunda é sempre nociva para o organismo, uma vez que pode provocar destruição das células vizinhas (Kroemer *et al.*, 1998). Ora, a mitocôndria é pouco sensível aos aumentos fisiológicos na concentração de cálcio no citosol mas, como vimos, é sensível ao cálcio libertado do RE induzido por IP_3 . Este cálcio provoca a abertura de poros nas membranas mitocondriais e estas aumentam a sua permeabilidade (transição de permeabilidade mitocondrial), permitindo a libertação dos referidos factores apoptóticos (Hajnóczky *et al.*, 2000). Enquanto isto acontece, a síntese de ATP baixa, mas é recuperada após a diminuição da concentração do cálcio na mitocôndria, que provoca novamente o fecho dos poros (Hajnóczky *et al.*, 1999). Esta recuperação da síntese de ATP é então essencial para a fase apoptótica dependente de energia, sem a qual a decisão celular será de morte necrótica (Kroemer *et al.*, 1998). A necessidade de produtos mitocondriais para a indução de apoptose no núcleo de células de

mamíferos, mostrou o envolvimento incontestável da mitocôndria neste processo de morte celular programada (Crompton, 1999). É na mitocôndria que actuam proteínas da família Bcl-2, reguladoras da apoptose, e que incluem proteínas que inibem (ex. Bcl-2) e proteínas que promovem apoptose (ex. Bax). Elas podem actuar através de vários mecanismos como, por exemplo, interagindo com outros tipos de proteínas ou formando poros ou canais na membrana mitocondrial externa. Por estes poros é libertado o citocromo c (activador de caspases) e a proteína (ex. Bax) acede ao espaço intermembranar (Hengartner, 2000) onde é aumentado o seu poder citotóxico. Consequentemente, a proteína destrói a estrutura da membrana interna, induzindo assim, numa fase tardia da apoptose, o colapso da força que conduz à síntese de ATP (Wood e Newcombe, 2000).

Mas vamo-nos restringir à função bioenergética da mitocôndria que constitui a síntese de ATP, tentando perceber como está organizada a cadeia respiratória e qual a origem da força que determina o processo de fosforilação oxidativa.

1.2 - A cadeia respiratória

Na oxidação das moléculas NADH e FADH₂, o movimento dos electrões destas moléculas para o oxigénio, é feito através de transportadores que constituem a cadeia respiratória da mitocôndria. Esta está localizada na membrana interna e consiste de quatro complexos: três “bombas” protónicas e uma ligação física ao ciclo do ácido cítrico (Berg *et al.*, 2002). Estes complexos respiratórios enzimáticos estão dispostos numa orientação específica (Figura 1.6), sequenciados em função do seu potencial redox. É este potencial que determina o movimento dos electrões ao longo dos complexos até ao oxigénio (Lodish *et al.*, 1999). Assim, a transferência de electrões entre os complexos é feita no sentido de um potencial redox baixo (menos positivo) para um potencial de redução mais elevado (mais positivo), em que os electrões do NADH são transferidos ao primeiro complexo da cadeia respiratória (complexo I) e depois à coenzima Q (CoQ); os electrões do succinato (ciclo do ácido cítrico) são transferidos ao complexo II e depois à CoQ; da CoQ, os

electrões são transportados para o complexo seguinte (complexo III), depois para o complexo IV e finalmente para o oxigénio, para formar água (Wallace, 1999). A passagem dos electrões entre esses complexos liberta energia que é armazenada na forma de um gradiente de protões através da membrana e depois é usada por outro complexo, ATP sintase, para a síntese de ATP (acoplamento oxidação/fosforilação, ou seja, fosforilação oxidativa) (Figura 1.6).

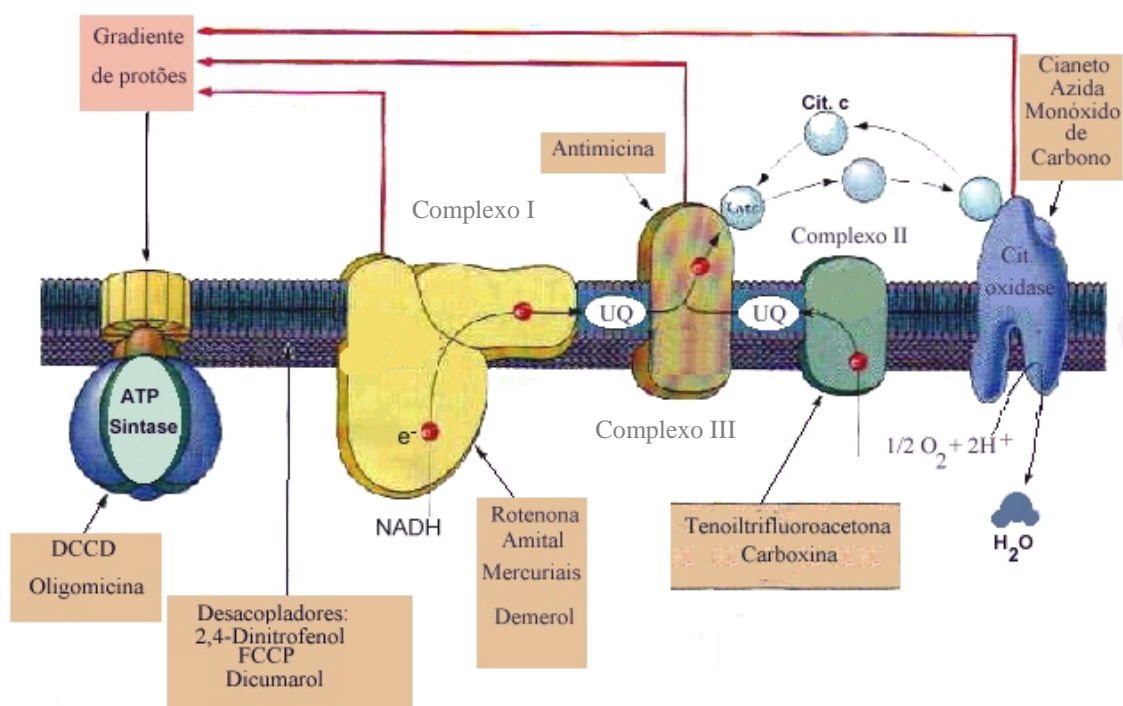


Figura 1.6 – Complexos da cadeia respiratória mitocondrial e síntese de ATP. Locais de acção de vários inibidores do transporte de electrões e/ou da fosforilação oxidativa.

Os complexos que participam na transferência de electrões do NADH para o oxigénio (cadeia respiratória) consistem de uma proteína em combinação com um grupo prostético fortemente ligado que representa o veículo transportador de electrões. Estes

componentes são estruturas quinóides (FMN, FAD, CoQ) e complexos metálicos de transição (centros FeS, hemos, proteínas ligadoras de Cu) (Moreno, 1992).

A coenzima Q (ubiquinona) é uma molécula pequena, de natureza lipídica, que transporta electrões do primeiro complexo (complexo I), através da membrana, para o complexo seguinte da sequência. Esta coenzima também recolhe equivalentes redutores de outros substratos (succinato) directamente ligados à cadeia respiratória por flavoproteínas desidrogenases (complexo II) (Mayes, 2000). A CoQ aceita um electrão e forma a semiquinona (uma forma semi-reduzida), depois aceita outro electrão e dois protões para formar a forma totalmente reduzida – o ubiquinol (CoQH₂). Tanto a forma oxidada como a reduzida são solúveis em fosfolípidos e difundem-se livremente na membrana mitocondrial interna (Lodish *et al.*, 1999).

O citocromo *c* (o único citocromo solúvel) é também um componente móvel da cadeia respiratória. Transfere electrões do penúltimo complexo (complexo III) para o último (complexo IV) da sequência, conectando assim os complexos fixos, juntamente com a CoQ (Lodish *et al.*, 1999).

Caracterização dos complexos da cadeia respiratória

NADH-ubiquinona oxirreductase, NADH-desidrogenase ou complexo I (Figura 1.6) é o maior de todos os complexos, possui perto de 40 subunidades diferentes, um mononucleótido de flavina (FMN), sete ou oito centros de FeS, lípidos ligados covalentemente e pelo menos três ligações de moléculas CoQ (Saraste, 1999). Este complexo transporta electrões do NADH para a ubiquinona (CoQ). Os electrões fluem primeiro do NADH para o FMN e depois para uma proteína FeS. FMN, tal como FAD, aceitam dois electrões, mas só um de cada vez (Lodish *et al.*, 1999).

Cada electrão transportado, na oxidação do NADH, sofre uma queda de potencial de cerca de 360 mV, equivalente a uma ΔG° de $-16,6$ kcal/mol por dois electrões transportados. Muita dessa energia libertada é usada para transportar quatro protões através da membrana interna para o espaço intermembranar por molécula de NADH oxidada pelo complexo (Lodish *et al.*, 1999).

CoQH₂ - *citocromo c reductase* ou *complexo III* consiste de cerca de dez polipeptídeos (Cooper, 2000). A *CoQH₂* “entrega” electrões ao citocromo *c*, regenerando a *CoQ* oxidada. Neste complexo os electrões libertados são transferidos para uma proteína de Fe-S e para dois citocromos tipo *b*, depois para o citocromo *c*₁. Por fim os dois electrões são transferidos para duas moléculas da forma oxidada de citocromo *c*, uma hemoproteína do espaço intermembranar, solúvel em água, formando o citocromo *c* reduzido (Lodish *et al.*, 1999).

Por cada par de electrões transferidos, há libertação de energia suficiente para translocar também 4 protões da matriz mitocondrial através da membrana interna. O acoplamento da reacção redox ao gradiente de protões através da membrana é feito por um mecanismo designado de ciclo Q em que a *CoQ* desempenha um papel importante neste processo de translocação.

O *complexo citocromo c oxidase, complexo IV*, contém 13 subunidades diferentes, mas o centro catalítico da enzima consiste de apenas 3 subunidades: I, II e III (Lodish *et al.*, 1999). A subunidade I contém o local activo, constituído por Fe-heme e cobre; a subunidade II tem um centro cúprico que é o primeiro local a receber electrões do citocromo *c* (Saraste, 1999). Assim, é transferido um electrão do heme do citocromo *c* reduzido através do ião cobre e do heme *a* para o centro de redução do oxigénio. Os quatro electrões libertados de quatro moléculas de citocromo *c* reduzido, em conjunto com quatro protões da matriz, combinam-se com um O₂ para formar duas moléculas de água. Adicionalmente, por cada electrão transferido do citocromo *c* ao oxigénio, é transportado um protão da matriz para o espaço intermembranar, ou seja, um total de quatro protões por cada molécula de O₂ reduzido a duas moléculas de água (Lodish *et al.*, 1999).

Todos os protões são tomados do lado da matriz mitocondrial, através de dois canais hidrofílicos que conectam o local activo à fase aquosa da matriz mitocondrial (Saraste, 1999).

O complexo *succinato-ubiquinona reductase ou complexo II* não é normalmente considerado como parte integrante da sequência, uma vez que este complexo enzimático

funciona em convergência como componente auxiliar da cadeia (Moreno, 1992). Mas de facto, a enzima que oxida o succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico, está localizada na membrana mitocondrial interna, sendo um componente integral deste complexo (Lodish *et al.*, 1999). O complexo II consiste de quatro polipeptídeos; contém, como grupo prostético, FAD (dinucleótido de adenina-flavina), vários centros de Fe-S e está ancorado à membrana por um citocromo tipo *b* (Saraste, 1999). Recebe electrões de um intermediário do ciclo do ácido cítrico: o succinato (Cooper, 2000). Os dois electrões libertados na conversão do succinato a fumarato são transferidos primeiro ao FAD, depois a um transportador Fe-S e finalmente à CoQ, formando a CoQH₂. Os electrões são depois transferidos para o oxigénio através dos complexos III e IV (Cooper, 2000).

A energia libertada na transferência de electrões através deste complexo não é suficiente para bombear protões para o espaço intermembranar (Lodish *et al.*, 1999). Portanto, apenas os complexos I, III e IV funcionam como bombas protónicas, contribuindo para o gradiente electroquímico.

Após esta análise da bioenergética mitocondrial, já podemos compreender o porquê da existência de vários complexos que, em conjunto, proporcionam o transporte de mais protões para o espaço intermembranar contribuindo assim para a formação de um gradiente de protões mais elevado que permitirá a síntese de maior quantidade de ATP.

Mas como é que o gradiente de protões está implicado no processo de fosforilação do ADP?

1.3 - A fosforilação oxidativa

Na glicólise e no ciclo do ácido cítrico são produzidas quatro moléculas de ATP, dez moléculas de NADH e duas moléculas de FADH₂. Quando os electrões do NADH e do FADH₂ são transferidos para o oxigénio molecular, a energia libertada nesta transferência é aproveitada para fosforilar ADP (fosforilação oxidativa), sintetizando-se assim a maior parte (90%) do ATP total resultante do catabolismo da glicose (Berg *et al.*, 2002).

O NADH, formado pela glicólise no citosol, também fornece electrões aos complexos respiratórios, mas como não atravessa a membrana mitocondrial interna, os seus electrões são transferidos para a mitocôndria através de um dos vários sistemas “shuttle”. A transferência faz-se na forma de um composto reduzido que, quando oxidado, volta novamente para o citosol onde é de novo reduzido pelo NADH. No caso do “shuttle” do glicerol 3-fosfato, os electrões transportados para a mitocôndria são transferidos ao grupo prostético FAD para formar FADH₂ e, neste caso, o rendimento energético é menor do que quando os electrões são transferidos para o NAD⁺ (Berg *et al.*, 2002), como veremos posteriormente.

Ao movimento de electrões através dos complexos I, III e IV está associada uma libertação de energia que é então aproveitada para bombear H⁺ da matriz para o espaço intermembranar. Este bombeamento de protões produz um gradiente de concentração através da membrana mitocondrial interna. Os protões tendem a entrar de novo para a matriz, a favor do gradiente de concentração, mas como a membrana interna é impermeável, eles só entram através de outro complexo também localizado na membrana interna – a ATP sintase. Esta enzima aproveita a energia proporcionada pela dissipação do gradiente (difusão dos protões para o interior) para sintetizar ATP. É que este fluxo de H⁺ provoca alterações conformacionais na enzima necessárias para que esta ligue ADP e Pi, e seguidamente liberte ATP, repetindo ciclos de três estados conformacionais (Lodish *et al.*, 1999). Mas analisemos com mais detalhe o funcionamento da ATP sintase.

ATP sintase, complexo V ou F₁F₀ATPase

A ATP sintase é formada por várias subunidades proteicas, com uma massa de mais de 500000 daltons (Alberts *et al.*, 2002). Está organizada em duas componentes principais, estruturalmente distintas, F₀ e F₁, ligadas por uma haste (Fig. 1.7). A componente F₀ localiza-se dentro da membrana e contém três tipos de subunidades: a, b e c. A subunidade c, com 9-12 cópias, encontra-se arranjada em forma de um anel e cada cópia contém 2 α-hélices transmembranares (Lodish *et al.*, 1999). Forma um canal que se liga na interface entre a subunidade a e o anel de subunidades c e que pode transportar protões do local de

alta concentração destes, em direcção a F_1 , isto é, do espaço intermembranar para a matriz, sendo por isso energeticamente favorável (Cooper, 2000). Por sua vez, F_1 encontra-se, na sua maior parte, na matriz mitocondrial, sendo a porção extramembranar da ATP sintase (Lodish et al., 1999). Contém 3 cópias de cada subunidade α e β que se intercalam formando um hexâmero. No topo deste está a subunidade γ inserida no anel c de F_0 . A subunidade ϵ está ligada à subunidade γ e provavelmente também contacta com as subunidades c , e a subunidade δ liga o complexo F_1 à subunidade b de F_0 formando uma parte rígida que impede a rotação do anel de F_0 . A subunidade γ actua como veio rotacional dentro de F_1 cujo movimento provoca alterações conformacionais cíclicas nas subunidades β , o que faz com que os locais de ligação dos nucleótidos nestas subunidades ciclizem através dos três estados conformacionais, permitindo a ligação de ADP e P_i , a síntese do ATP e a posterior libertação deste (Lodish et al., 1999). Em suma, o mecanismo de acção da ATP sintase envolve o acoplamento mecânico entre as subunidades F_0 e F_1 , em que o fluxo de protões através de F_0 fornece a força para a rotação de F_1 , que actua como motor rotatório para conduzir à síntese de ATP (Cooper, 2000).

A ATP sintase é uma enzima que funciona reversivelmente, isto é, pode sintetizar ATP, mas também pode hidrolizá-lo para bombear protões contra o gradiente electroquímico (Saraste, 1999).

As evidências sugerem que são transportados da matriz, através da membrana mitocondrial interna, um total de dez protões por cada par de electrões que é transferido do NADH para o oxigénio. Quando os electrões são transferidos do $FADH_2$ para o O_2 apenas seis protões são transportados através da membrana por cada par de electrões, uma vez que, neste caso, o complexo I não participa no transporte de electrões (Lodish et al., 1999).

É necessário o fluxo de quatro protões do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial através do componente F_0 da ATP sintase, para que haja síntese de uma molécula de ATP pela componente F_1 . Esta ideia é consistente com a transferência de protões ao nível dos complexos I, III e IV, que contribuem no seu conjunto com energia do gradiente de protões suficiente para conduzir a síntese de 2,5 moléculas de ATP. A oxidação de uma molécula de NADH leva assim à síntese de 2,5 moléculas de ATP,

enquanto que a oxidação do FADH_2 , cuja transferência de electrões apenas contribui para o gradiente de protões ao nível dos complexos III e IV, forma apenas 1,5 moléculas de ATP (Berg *et al.*, 2002).

Que género de força é que o gradiente de protões produz para conduzir a síntese de ATP?

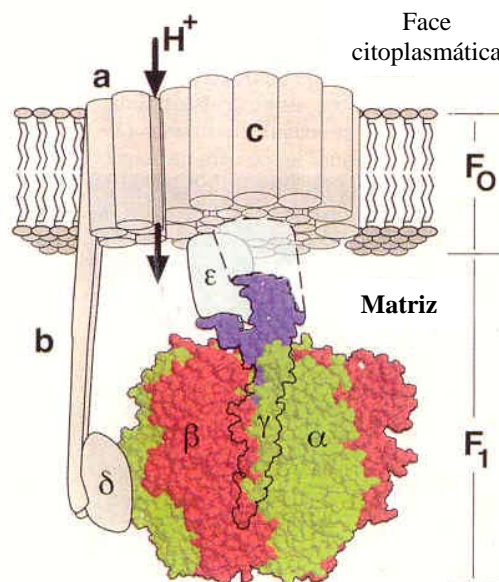


Figura 1.7 – Características estruturais essenciais da ATP sintase (complexo V) (*in* Saraste, 1999).

A força protomotriz

Como vimos, ao longo do transporte de electrões do NADH para o O₂, os protões são transportados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, formando-se um gradiente de concentração de protões (gradiente químico). Uma vez que a membrana externa é permeável a protões, a concentração destes é sempre mais baixa na matriz do que no espaço intermembranar, conseqüentemente, o pH na matriz é mais elevado do que no espaço intermembranar e no citosol. Forma-se também um potencial eléctrico devido ao bombeamento de cargas positivas dos protões para fora da matriz, que se torna negativa relativamente ao espaço intermembranar. Assim, a energia livre libertada durante a oxidação do NADH ou do FADH₂ é armazenada sob a forma de um gradiente electroquímico constituído por duas componentes, uma eléctrica (potencial de membrana) e uma química (gradiente de concentração de protões através da membrana (Fig. 1.8). São estas componentes que, em conjunto, constituem a força protomotriz necessária à síntese de ATP (Lodish *et al.*, 1999).

Sendo a principal função da mitocôndria sintetizar ATP a partir da oxidação de compostos ricos em energia (substratos respiratórios) que são captados do exterior pelos organismos, ela interliga a oxidação com a fosforilação do ADP através do referido gradiente electroquímico de protões (μ_{H^+}) que se forma através da membrana mitocondrial interna, como postulado pela teoria quimiosmótica, proposta por Peter Mitchel em 1961 (Cooper, 2000).

Os componentes deste gradiente electroquímico, ΔpH (alcalino na matriz mitocondrial) e $\Delta\Psi$ (negativo no interior da mitocôndria), relacionam-se pela seguinte expressão (Kamo *et al.*, 1979):

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = F\Delta\Psi - 2,3 RT \Delta\text{pH} \quad (1)$$

em que:

F – constante de Faraday

R – constante dos gases

T – temperatura (em graus Kelvin)

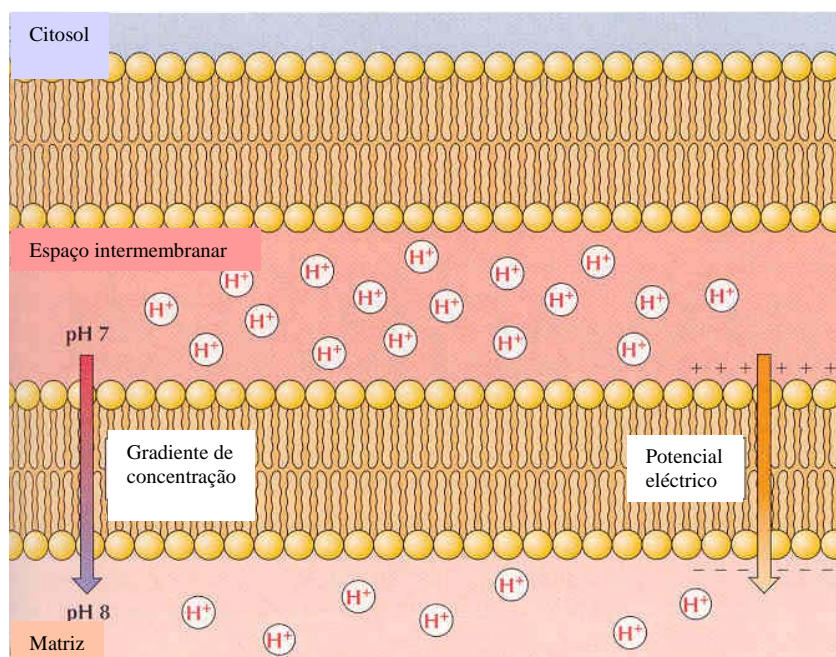


Figura 1.8 – A natureza electroquímica do gradiente de prótons. Devido à carga positiva dos prótons (que são translocados da matriz para o espaço intermembranar), o gradiente formado através da membrana mitocondrial interna é composto por uma componente química e uma componente eléctrica. Além da concentração dos prótons, que é cerca de dez vezes maior no lado citosólico da membrana interna, há um potencial eléctrico através da membrana, resultante do aumento das cargas positivas do lado citosólico (*In* Cooper, 2000).

$\Delta\mu_{\text{H}^+}$ é expresso em kilojoules (ou kilocalorias) por mole, e representa a variação da energia livre que ocorre quando uma mole de H^+ é translocada para o interior da mitocôndria a favor do gradiente electroquímico de H^+ (Santos, 2002).

Assim, quando H^+ é translocado para a matriz mitocondrial, a energia livre libertada, que em células tem um valor entre -17 e -21 kJ/mol (entre -4 e -5 kcal/mol)

(Cooper, 2000), pode ser utilizada para sintetizar compostos ricos em energia, como por exemplo, ATP, através da reacção:



A reacção de síntese de ATP tem uma energia livre de 60 kJoules/mol (14 kcal/mol), o que significa que será necessário haver a translocação de 3-4 moles de protões para a matriz mitocondrial para se obter a energia livre para sintetizar 1 mole de ATP.

A expressão (1) pode ser convertida em:

$$\Delta\mu_{\text{H}^+}/F = \Delta\Psi - 2,3RT/F\Delta\text{pH} \quad (2)$$

Em que $\Delta\mu_{\text{H}^+}/F$ representa a força denominada “protomotriz” por Peter Mitchell, expressa vulgarmente por Δp :

$$\Delta p = \Delta\mu_{\text{H}^+}/F = \Delta\Psi - 2,3RT/F\Delta\text{pH} \quad (3)$$

Quando normalizados os termos que compõem a Δp , esta pode expressar-se em mV. O valor de Δp em mitocôndrias a respirar é de cerca de 220-230 mV (Alberts *et al.*, 2002).

De acordo com a teoria quimiosmótica, a Δp fornece a energia necessária à síntese mitocondrial de ATP. Por isso, a medição quantitativa dos dois componentes de Δp é fundamental para o estudo dos processos de transdução energética membranar e também de outros processos mitocondriais, nomeadamente o transporte de substâncias através da membrana mitocondrial interna. De facto, tem-se verificado que o transporte de proteínas, nucleótidos de adenina e Ca^{2+} dependem de $\Delta\Psi$, enquanto que o transporte de fosfato e glutamato (no fígado) dependem do ΔpH (Santos, 2002).

Como é efectuado o controlo da síntese de ATP na célula?

In vitro, mitocôndrias isoladas intactas aceleram a oxidação de FADH₂, NADH ou succinato enquanto houver ADP e fosfato inorgânico (Pi) para sintetizar ATP. Este fenómeno é chamado controlo respiratório (mostra como um reagente pode limitar um conjunto de reacções interrelacionadas) (Lodish *et al.*, 1999). A velocidade a que a mitocôndria oxida os substratos na ausência de um aceitador de fosfato, tal como o ADP, é

designado por **estado 4** da respiração. Se a mitocôndria tiver um bom acoplamento de fosforilação oxidativa, as velocidades respiratórias no estado 4 são baixas. Na presença de ADP, o aumento do fluxo de electrões leva a um maior consumo de oxigénio, cuja velocidade é designada por **estado 3** da respiração (Devlin, 1997). Este estado respiratório persiste até que todo o ADP tenha sido fosforilado para ATP. A razão **estado 3/estado 4** é referida como a razão de controlo respiratório (P:O ou ADP/O) (Estabrook, 1967). Este controlo também existe em células intactas e tecidos. Por exemplo, a estimulação da contracção muscular, que exige ATP, resulta num aumento do nível de ADP nas células, o que aumenta a velocidade de degradação da glicose na via glicolítica e no ciclo do ácido cítrico e a subsequente oxidação dos produtos metabólicos na mitocôndria, com consequente formação de ATP (Lodish *et al.*, 1999).

O controlo respiratório constitui o principal modo de regulação da oxidação em células intactas, mas não é único. De facto, o aumento do Ca^{2+} citosólico, que ocorre nos músculos durante a contracção, também desencadeia um aumento da oxidação mitocondrial e da produção de ATP porque, como já vimos, a mitocôndria capta cálcio que vai estimular a actividade metabólica.

O organismo não armazena moléculas de ATP. Este é produzido consoante as necessidades fisiológicas. Por isso se verifica uma acção repentina de envenenamento por certos tóxicos como o cianeto, o que mostra uma constante e imediata necessidade do organismo pela energia. Uma vez que o ATP é formado em consequência da energia libertada da transferência de electrões na cadeia respiratória, esta será um possível local de actuação de venenos. De facto, existem vários tóxicos que actuam em diferentes pontos da cadeia respiratória. Foi aliás, com base nesses tóxicos (inibidores) que se conheceu a constituição da cadeia.

1.4 - Inibidores da fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é susceptível de ser inibida em vários estádios do processo, tanto ao nível dos complexos da cadeia transportadora de electrões como ao nível da ATP sintase (Figura 1.6) (Berg *et al.*, 2002).

Como a oxidação está acoplada à fosforilação, quando os complexos são inibidos, não há transferência de electrões e conseqüentemente também não haverá fosforilação do ADP, dado que não é gerada a força protomotriz necessária.

Ao nível do complexo I, pode-se bloquear a transferência de electrões usando os antibióticos **rotenona** e **amital**, que impedem a utilização do NADH como substrato (Campos, 1999). No entanto, o fluxo de electrões resultante da oxidação do succinato não é afectado, porque esses electrões entram na cadeia através da CoQH_2 , depois do bloqueamento, ocorrendo síntese de ATP.

A **Antimicina A** interfere com o fluxo de electrões no complexo III (Slater, 1967), mas a síntese de ATP pode ocorrer se fornecermos o substrato respiratório específico do complexo IV.

O **cianeto** e o **monóxido de carbono** (CO) bloqueiam o fluxo de electrões no complexo IV, citocromo oxidase (Berg *et al.*, 2002), impedindo a oxidação de qualquer substrato e, conseqüentemente, a redução do oxigénio. Como os electrões não são transferidos para o aceitador final, a cadeia fica bloqueada e não é gerada força protomotriz para a síntese de ATP.

A inibição do complexo II não inibe a fosforilação oxidativa, uma vez que os electrões vindos do NADH são transferidos à CoQ e podem prosseguir até ao oxigénio. Apenas é bloqueada a transferência de electrões provenientes do FADH_2 .

Mas a fosforilação oxidativa pode ainda ser inibida por inibidores da ATP sintase. Estes pertencem a duas categorias: os inibidores de F_1 , que se ligam directamente a este componente da ATP sintase, impedindo o ligar/desligar da membrana, podem ser iões simples como azida, moléculas orgânicas complexas ou mesmo peptídeos; ou os inibidores

da transferência de energia, como a oligomicina e o dicicloexil carbodiamida (DCCD), que se ligam a F_0 , bloqueando a transferência de prótons e inibindo assim a síntese de ATP (Harris, 1995). Nestes casos, não há síntese de ATP, não havendo também transferência de electrões, uma vez que o transporte de electrões e a síntese de ATP estão acoplados (Lehninger *et al.*, 1993).

Existirão substâncias que dissociem a oxidação da fosforilação, isto é, que anulem o controlo respiratório?

1.5 - Desacopladores da fosforilação oxidativa

Como já vimos, a oxidação dos substratos respiratórios pelos complexos enzimáticos e a redução do oxigénio é aumentada se houver ADP que funciona assim como controlador respiratório. Mas se dissociarmos a oxidação da fosforilação permitindo a entrada de prótons na matriz sem ser através da ATP sintase, dissipando deste modo o gradiente, o controlo deixa de se efectuar. Existem certos tóxicos que tornam a membrana mitocondrial permeável a prótons. Por isso, eles permitem a oxidação de NADH e a redução de O_2 em níveis elevados, mas não permitem a síntese de ATP, porque dissipam o gradiente de concentração de prótons. São, por isso, designados desacopladores. São exemplos o dinitrofenol, o dicumarol e o fluoro carbonil cianida fenilhidrazona (FCCP) (Berg *et al.*, 2002).

O 2,4-dinitrofenol (DNP) (Fig.1.9) é um desacoplador cujas formas neutra ou carregada negativamente são solúveis em membranas fosfolipídicas e em soluções aquosas, o que lhe permite actuar como transportador de prótons (Lodish *et al.*, 1999). Dado que transporta os prótons através da membrana interna para a matriz, o DNP quebra o gradiente transmembranar de concentração de prótons e o potencial eléctrico, dissipando assim a força protomotriz, tal como os desacopladores acima referidos. Desacopladores como estes, inibem assim a síntese de ATP e eliminam o controlo respiratório, permitindo a oxidação

de NADH independentemente do nível de ADP. A energia libertada nesta situação é convertida em calor.

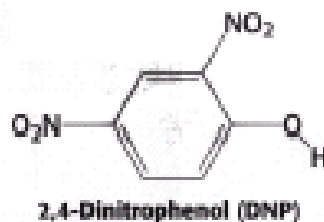


Figura. 1.9 – Desacoplador da fosforilação oxidativa: 2,4-dinitrofenol (DNP), uma substância solúvel em lípidos, que pode transportar prótons através da membrana mitocondrial interna. O próton dissociável está representado (*In Berg et al., 2002*).

Nestes casos, o desacoplamento foi provocado por substâncias estranhas ao organismo, mas ele também ocorrerá naturalmente?

De facto, no tecido adiposo castanho, as mitocôndrias possuem na sua membrana interna um desacoplador natural, a termogenina - uma proteína que forma um canal que é activado por ácidos gordos, e que transporta prótons para a matriz (Berg *et al.*, 2002). Assim, esta proteína desacopla a fosforilação do transporte de electrões e a energia é convertida em calor (Lodish *et al.*, 1999). A utilidade biológica desta dissociação é evidente no caso dos animais hibernantes, nos animais recém-nascidos de algumas espécies (incluindo o homem) e nos mamíferos adaptados ao frio (Campos, 1999).

1.6 - Outros compostos que interferem com a fosforilação oxidativa

Os compostos 2,4,6-trinitrobenzeno sulfonado (TNBS) e 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB) reagem com os grupos amínicos de fosfolípidos ou de proteínas (Vale, 1977; Thorley-Lawson, 1980; Rodwell, 2000) (Figura 1.10). Devido a esta sua característica, têm sido utilizados em diversos estudos como sondas químicas para determinar a localização dos fosfolípidos amínicos em membranas de eritrócitos (Gordesky *et al.* 1975), e de retículo sarcoplasmático (Vale, 1977). Além disso, têm sido utilizados para estudar o efeito de catiões inorgânicos nas membranas de eritrócitos humanos (Godin e Garnett, 1976) e de retículo sarcoplasmático (Vale, 1981) assim como para investigar o envolvimento dos grupos amínicos na actividade de sistemas bombeadores de Ca^{2+} (Vale, 1976) e na abertura de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (Hadad *et al.*, 1999).

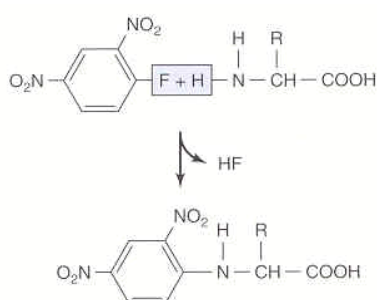


Fig. 1.10 – Reacção de um aminoácido com o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (ou reagente de Sanger, como também é conhecido devido ao bioquímico, laureado com prémio Nobel em 1958, Frederick Sanger, que o usou para determinar a estrutura primária da insulina). A molécula de FDNB incorpora-se na molécula proteica ou lipídica, pela saída do átomo de flúor, que reage com um átomo de hidrogénio do grupo amínico, formando fluoreto de hidrogénio (HF) (In Rodwell, 2000).

Frederick Sanger desenvolveu o uso do FDNB para sequenciar um polipeptídeo (insulina) (Sanger, 1988).

O FDNB penetra rapidamente as membranas biológicas, mesmo a baixas concentrações, enquanto que o TNBS o faz apenas em concentrações elevadas (> 1 mM) (Vale, 1977).

No presente estudo, pretendeu-se observar o efeito do FDNB nos complexos respiratórios mitocondriais e assim investigar a importância dos grupos amínicos na actividade catalítica destas enzimas e, conseqüentemente, na bioenergética mitocondrial.

Para encetar esta investigação, recorreremos ao isolamento do material biológico em estudo, as mitocôndrias, para posteriormente observarmos as alterações na actividade respiratória na ausência e na presença do referido aminoreagente.

No cumprimento dos requisitos pedagógico-científicos subjacentes à elaboração de uma Tese de Mestrado em Biologia Animal, os principais objectivos deste trabalho, para um nível de ensino secundário, consistem em mostrar o desenvolvimento do **Método Científico**, bem como a importância do **rigor técnico** na obtenção de conclusões correctas baseadas em resultados fidedignos.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O objectivo deste trabalho consistiu em estudar os efeitos do aminoreagente, fluorodinitrobenzeno (FDNB) na actividade dos complexos respiratórios “in vitro”, isto é, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Mas, como isolar mitocôndrias de fígado de rato?

2.1 – Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

2.1.1 – Ratos de laboratório

As experiências foram realizadas usando ratos de laboratório da raça Sprague-Dawley, machos ou fêmeas, pesando 200-300g. Foram mantidos em jejum, com água *ad libitum*, durante as 12 horas que antecederam o seu sacrifício para que todas as reservas de gordura acumuladas no fígado fossem esgotadas, o que contribui para uma melhor preservação das mitocôndrias. A utilização dos animais após o jejum evita a contaminação da fracção mitocondrial com grãos de glicogénio.

2.1.2 – Preparação de soluções para obtenção da fracção mitocondrial

O isolamento da fracção mitocondrial envolveu a preparação de dois tipos de soluções: o meio de isolamento (ou de homogeneização) e o meio de lavagem.

Meio de isolamento:

Foram preparados 500 ml de meio de isolamento contendo:

250 mM sacarose; 10 mM tampão HEPES; 1mM complexante de iões Ca^{2+} (EGTA) – para impedir a clivagem das enzimas mitocondriais por proteases

dependentes de Ca^{2+} ; 0,1% albumina de soro de bovino (BSA) deslipídada, (1grama/litro) - para remoção dos ácidos gordos, causadores de desintegração da membrana. Água mili-Q foi adicionada até perfazer 500 ml e o pH foi ajustado a 7,4.

Meio de lavagem:

O meio de lavagem continha:

250 mM sacarose; 10 mM Hepes. Água mili-Q foi adicionada até perfazer 250 ml e o pH deste meio foi ajustado a 7,2.

A concentração de sacarose utilizada (250 mM) é a adequada para manter o meio isosmótico, evitando assim o rebotamento das mitocôndrias. O pH do meio encontra-se na gama requerida para o funcionamento das enzimas mitocondriais e o tampão mantém-no constante, evitando a desnaturação das mitocôndrias.

Soluções para reserva (Hepes 100 mM - 1 litro; EGTA 50 mM - 100 ml e BSA 8% - 20 ml) foram feitas a fim de facilitar a preparação de novos meios para posteriores experiências.

Após utilização, as soluções foram conservadas a -20°C para evitar contaminações durante o período de armazenamento.

2.1.3 – Técnica de isolamento da fracção mitocondrial

O rebotamento das células hepáticas produz uma mistura de componentes celulares em suspensão, o homogeneizado. Nesta mistura encontram-se os organitos celulares que, como têm diferentes tamanhos e densidades, podem ser separados e purificados por centrifugação diferencial (Lodish *et al.*, 1999), como se descreve seguidamente.

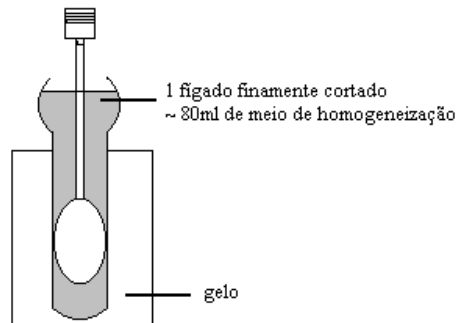
A fracção mitocondrial foi isolada segundo o método geral descrito por Moreno, 1992 (Figura 2.1).

O animal, depois de morto por deslocalização cervical, foi imediatamente decapitado para sangrar rapidamente. Extraíu-se imediatamente o fígado que, após remoção das gorduras e tecido conjuntivo aderente, foi colocado em meio de homogeneização frio (0-2 °C). Todas as operações foram efectuadas mantendo o material sobre gelo granulado, de forma a assegurar uma temperatura entre 0-2 °C. O fígado foi cortado em pequenos pedaços e lavado várias vezes em meio de homogeneização, a fim de remover o excesso de sangue. O tecido foi depois mergulhado em cerca de 10 volumes de meio de homogeneização contido num homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Elvehjem” munido de um pistão de teflon. O homogeneizado de fígado foi obtido após aplicação de cerca de 4 cursos do pistão, rodando a 250 rotações por minuto, até se obter uma suspensão homogénea. Nesta operação, o tecido foi desintegrado e as células rompidas, obtendo-se uma suspensão constituída por células fragmentadas e intactas, organitos intracelulares (núcleos, mitocôndrias, lisossomas, peroxissomas, fragmentos de tecido endoplasmático) e alguns eritrócitos.

O homogeneizado foi centrifugado a 800 x g, durante 10 minutos, à temperatura de 2 °C, num rotor SS-34 colocado numa centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B. O sedimento obtido contendo núcleos, células fragmentadas e intactas, eritrócitos e outros componentes densos das células foi eliminado. O sobrenadante contendo as mitocôndrias, pode apresentar, na parte superior, uma fase esbranquiçada correspondente a matéria lipídica. Esta película, assim como a matéria lipídica aderente à parte superior dos tubos de centrífuga, foi devidamente aspirada com a ajuda de uma pipeta Pasteur adaptada a um aparelho de aspiração por vácuo. O sobrenadante foi então centrifugado a 10000 x g, durante 10 minutos, para sedimentar a fracção mitocondrial, de cor acastanhada, apresentando uma camada superficial móvel mais esbranquiçada. O sobrenadante foi eliminado, assim como a camada superficial do sedimento que contém mitocôndrias fragmentadas e proteínas desnaturadas. O sedimento contendo as mitocôndrias, foi ressuspenso num pequeno volume de meio de lavagem tendo havido o cuidado de deixar no fundo do tubo, o pequeno ponto central vermelho, onde se acumulam restos de eritrócitos. As ressusensões foram diluídas em 40 ml de meio de lavagem, seguidamente colocadas em novos tubos de centrífuga e novamente centrifugadas a 10000 x g, durante 10 min. O

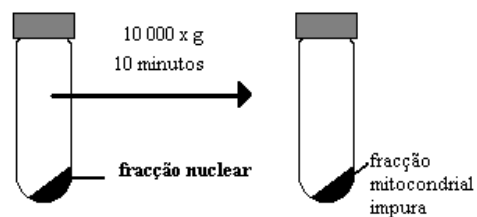
sobrenadante obtido foi eliminado e a fracção mitocondrial purificada foi ressuspensa cuidadosamente em meio de lavagem, num pequeno homogeneizador, com um pistão de

1. HOMOGENEIZAÇÃO



2. CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL

800 x g
10 minutos



3. LAVAGEM E PURIFICAÇÃO

ressuspender o sedimento em meio de lavagem

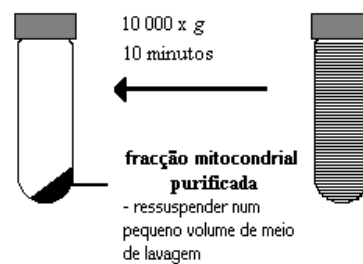


Figura 2.1 – Representação esquemática do processo de isolamento da fracção mitocondrial por centrifugação diferencial (adaptado de Moreno, 1992).

ajuste frouxo, previamente arrefecido e imerso em gelo granulado. A fracção mitocondrial foi mantida em gelo no decurso das experiências, tendo sido utilizada exclusivamente durante as 5-6 horas após o isolamento.

2.1.4 – Quantificação de proteína na fracção mitocondrial

A concentração proteica da preparação mitocondrial foi determinada pelo método colorimétrico do biureto, usando-se albumina sérica bovina como padrão. Neste método, a concentração de proteína determina-se a partir da densidade óptica da solução (isto é, da sua absorvância) a um comprimento de onda específico. A reacção do biureto é uma reacção muito usada para a determinação da concentração de proteína em matérias biológicas pois, apesar das proteínas não absorverem significativamente na região visível do espectro, formam um complexo corado quando se fazem reagir com o reagente de biureto, o que permite quantificar facilmente as proteínas presentes utilizando um espectrofotómetro vulgar (Spectronic 20). A reacção do biureto constitui um indicador das ligações peptídicas existentes e só ocorre quando existirem pelo menos duas destas ligações, ou seja, quando a cadeia peptídica tiver pelo menos três aminoácidos. A cadeia peptídica reage com o cobre num meio bastante alcalino (na presença de NaOH) e forma um complexo de cor violeta. O nome da reacção deriva da substância biureto ($\text{CONH}_2\text{NHCONH}_2$) que é o composto mais simples capaz de formar a cor violeta com o CuSO_4 .

A quantificação de proteína envolve a técnica de espectrofotometria de absorção óptica que se fundamenta no facto de todas as substâncias absorverem energia radiante (i. é. radiação electromagnética desde as ondas de rádio até às ondas gama). Mesmo substâncias consideradas transparentes têm geralmente um espectro de absorção nas zonas ultravioleta e infra-vermelhos. O diferente comportamento das substâncias em relação à luz depende da estrutura de distribuição espacial dos electrões.

A absorção da luz por uma substância pode ser usada para determinar a concentração dessa substância, uma vez que existe uma certa relação entre a concentração desta e a quantidade de luz absorvida. Pela teoria dos quanta, cada substância absorve luz de comprimento de onda específicos. Assim, para cada substância há uma absorção característica a cada comprimento de onda, que representa o espectro de absorção. A cor duma substância é determinada pela luz que não está a ser absorvida.

A absorção de luz pode ser detectada por espectrofotómetros cujo funcionamento se resume no seguinte:

1° - A luz branca emitida por uma lâmpada passa através de um prisma de difracção e é separada nos vários comprimentos de onda (λ) do espectro visível.

2° - O λ desejado é seleccionado através de um botão que roda o monocromador de maneira que um estreito feixe de luz passa através de uma pequena abertura e vá atingir a amostra.

3° - Alguns dos raios luminosos que incidem sobre a amostra são absorvidos sendo a restante luz transmitida. A luz transmitida vai impressionar um fototubo (detector) que a transforma num sinal eléctrico muito pequeno.

4° - O sinal eléctrico gerado no detector é transmitido para um amplificador onde é amplificado.

5° - O sinal amplificado vai ser recebido por um voltímetro que dá a leitura da quantidade de luz que foi transmitida pela amostra. A escala do voltímetro pode ser lida directamente em unidades de transmitância ou de absorvância (= densidade óptica).

A reacção de biureto foi efectuada segundo um protocolo em que as amostras de suspensão mitocondrial (50 μ l) foram dissolvidas em 50 μ l de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10%. Adicionou-se 0,5 ml de água desmineralizada, de seguida adicionaram-se 2 ml de reagente alcalino de cobre (reagente de “biureto”) que consistia de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,15%, tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,6%, NaOH 3% e KI 0,1%. Prepararam-se padrões de albumina de soro bovino 0,4% (0,25, 0,5 e 1 mg) em condições idênticas às das amostras, contendo 50 μ l de meio de lavagem (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Padrões de albumina sérica (BSA) para determinação da quantidade de proteína na preparação mitocondrial. Nos tubos 2, 3 e 4 encontram-se os padrões de albumina, os tubos 5 e 6 contêm a amostra e a composição do tubo 1 serve de controlo. O reagente de biureto foi o último componente a ser adicionado.

Tubos	H₂O (ml)	BSA (0,4%) (ml)	Tampão (meio de lavagem) (µl)	SDS (µl)	Amostra (mitoc.) (µl)	Biureto (10%) (ml)
1	0,5	_____	50	50	_____	2
2	0,437	0,063	50	50	_____	2
3	0,375	0,125	50	50	_____	2
4	0,250	0,250	50	50	_____	2
5	0,5	_____	_____	50	50	2
6	0,5	_____	_____	50	50	2

Após a adição do reagente de biureto, deixou-se decorrer 10 minutos para que ocorresse a reacção. Ao fim deste tempo, as soluções dos tubos foram vertidas para cuvetes apropriadas para a leitura das absorvâncias num espectrofotómetro Bausch & Lomb, Spectronic 21. O espectrofotómetro foi calibrado com a solução do tubo 1, para zero de absorvância a 540 nm. Posteriormente foram feitas as leituras dos restantes tubos.

A determinação da concentração de proteína mitocondrial foi efectuada a partir da curva padrão de albumina, que relaciona os valores de absorvância com as respectivas concentrações (Figura 2.2).

A quantidade de proteína mitocondrial que existe nos 50 µl da amostra (correspondente à média dos tubos 5 e 6) é tirado da curva padrão, mediante o valor de absorvância medido. A partir do resultado obtido, calculou-se a concentração da amostra em mg/ml.

Foi seguido este procedimento em todos os isolamentos mitocondriais efectuados para a realização deste trabalho.

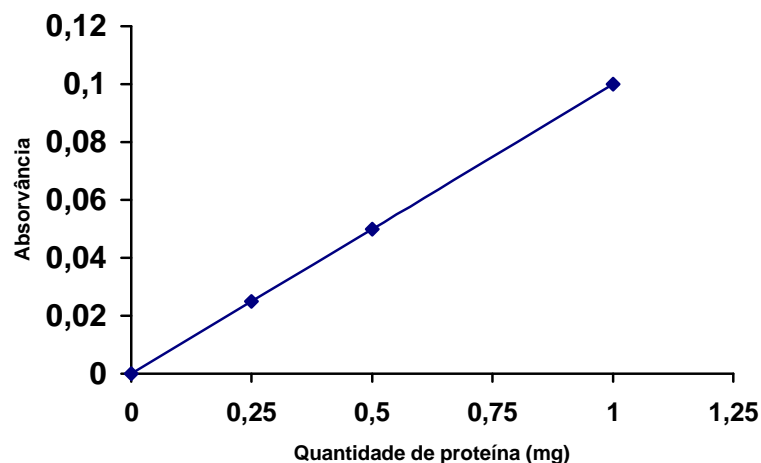


Figura 2.2 – Curva padrão da albumina: absorvância da proteína em função da sua concentração, a um comprimento de onda de 540 nm.

Uma vez obtido o material biológico (fracção mitocondrial), procedeu-se ao estudo da sua actividade bioenergética reflectida na sua capacidade de respiração e de desenvolvimento de potencial eléctrico membranar. Mas, como medir a respiração e o potencial eléctrico nas mitocôndrias?

2.2 - Actividade bioenergética

2.2.1 – Análise da respiração mitocondrial através da medição do consumo de O₂

Para observar a actividade respiratória das mitocôndrias isoladas monitorizou-se o consumo de oxigénio mediante a utilização do eléctrodo de Clark.

O eléctrodo de Clark

O consumo de O₂ foi determinado polarograficamente com um eléctrodo de O₂ tipo Clark (Estabrook, 1967) obtido comercialmente da empresa Yellow Springs Instruments Co. O eléctrodo foi ligado a um registador através de uma unidade de comando fabricada no laboratório (Fig. 2.3). Uma medição que envolva a redução por electrões de substâncias em solução (neste caso o oxigénio) constitui uma medição polarográfica. O método consiste na aplicação de uma determinada voltagem entre dois eléctrodos que leva à geração de uma corrente de baixa intensidade. Para determinados valores de voltagem, a substância em solução é reduzida rapidamente quando chega ao eléctrodo e a corrente gerada fica apenas limitada pela velocidade de difusão do composto em solução para o eléctrodo. Esta corrente é directamente proporcional à concentração do composto em solução.

Para a medição da concentração de oxigénio em solução aquosa, o eléctrodo de Clark tem-se revelado o mais eficiente e o de maior sucesso em diversos estudos de natureza biológica.

Princípios básicos de funcionamento do eléctrodo de O₂ de Clark

O sistema consiste de um eléctrodo de Pt (platina - cátodo) e de um eléctrodo de referência de Ag (prata - ânodo) imersos numa solução de KCl (cloreto de potássio - electrólito) contidos num tubo de vidro ou plástico. A extremidade inferior do tubo é

revestida por uma fina membrana isolante de teflon ou polietileno permeável ao oxigénio. Esta membrana isola electricamente a solução a analisar e impede a deposição de substâncias susceptíveis de alterar a resposta dos elementos activos do sistema. A membrana é segura à extremidade inferior do tubo por um pequeno anel de borracha de modo a ficar perfeitamente aderente e em estreito contacto com o eléctrodo de Pt.

Quando se polariza negativamente o eléctrodo de Pt em relação ao eléctrodo de referência, o O₂ dissolvido em solução sofre uma redução electrolítica ao nível do cátodo, gerando-se uma corrente eléctrica de baixa intensidade. Numa dada gama de voltagens de polarização, a intensidade de corrente varia linearmente com a concentração de O₂ em solução. Portanto, o O₂ é reduzido pelos electrões gerados no cátodo (polarizado negativamente). A velocidade de redução do O₂, isto é, a corrente eléctrica gerada, é proporcional à quantidade de O₂ que se difunde através da membrana. Por sua vez, a quantidade de O₂ que se difunde através da membrana depende da concentração de O₂ dissolvido na solução onde o eléctrodo está imerso.

O método de medição de O₂ em solução aquosa baseia-se assim nesta observação empírica que relaciona linearmente a corrente gerada pelo eléctrodo com a concentração (actividade) de O₂ presente.

As medições com o eléctrodo de Clark realizam-se em câmaras de reacção que permitem o isolamento do meio, impedindo a difusão de gases para fora ou para dentro do sistema (Fig. 2.3). A agitação constante facilita o equilíbrio de O₂ através da membrana. A manutenção da temperatura do meio é também importante, uma vez que a velocidade de difusão de O₂ através da membrana varia entre 3-5%/°C. O eléctrodo de O₂ é utilizado em associação com um registador potenciométrico e uma unidade de controlo. A unidade de controlo é utilizada como fonte de voltagem para polarizar o eléctrodo e como meio auxiliar de calibração. O registador permite o registo contínuo do consumo de O₂.

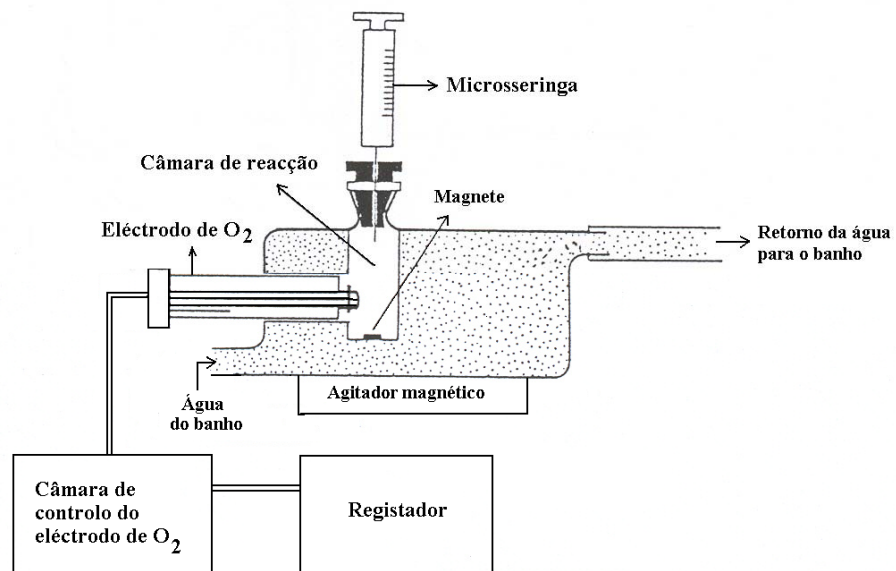
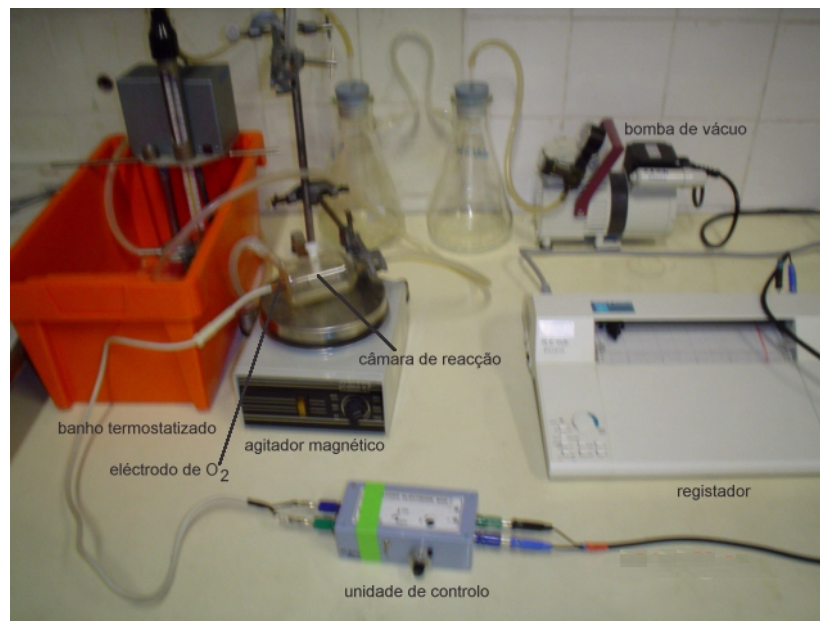


Figura 2.3 –Medição do consumo de oxigénio por mitocôndrias. Em cima: montagem do sistema de medição (eléctrodo de O_2); em baixo: esquema do dispositivo utilizado. O meio de reacção está isolado da atmosfera evitando a difusão de oxigénio entre o meio e o ar. As adições efectuam-se através de um fino orifício existente na tampa da câmara.

Calibração do eléctrodo de O₂

Em primeiro lugar foi montado o sistema polarográfico de medição de O₂ que consiste do eléctrodo de Clark, da unidade de controlo, do registador, da câmara de reacção e de um agitador magnético provido de magnete (Figura 2.3).

Colocou-se de seguida 1,5 ml de água desmineralizada na câmara de reacção, recolocando com cuidado a respectiva tampa, evitando a presença de bolhas de ar.

Colocou-se o atenuador de unidade de controlo a zero (saída em curto circuito). Ajustou-se a agulha do registador a zero, usando o botão de ajustamento “zero” do registador. Assim fixámos o zero eléctrico do sistema.

Deixou-se agitar durante algum tempo para saturar a membrana. Ajustou-se a agulha do registador a 100% (escala total) com o atenuador da unidade de controlo. Após a calibração, a posição dos botões de ajustamento não deve ser alterada. A corrente que fluiu através do eléctrodo resultou do O₂ presente na água.

Meio de reacção

Procedemos então à observação das mitocôndrias na sua actividade respiratória, através do consumo de oxigénio registado pelo eléctrodo de Clark. Para isso, foi necessária a preparação do meio de reacção com os seguintes componentes, necessários para a actividade das mitocôndrias *in vitro*:

130 mM sacarose; 60 mM KCl – que mantém a força iónica; 2 mM KH₂PO₄; 2 mM MgCl₂ – activador de enzimas; 10 mM HEPES.

Os componentes do meio foram dissolvidos em água mili-Q suficiente, sendo o volume final ajustado para 250 ml ao pH de 7,2.

Para facilitar a preparação posterior de novo meio de reacção, fizeram-se soluções de reserva de alguns componentes do meio: KCl (1 M), KH₂PO₄ (100 mM), MgCl₂ (100 mM) e congelaram-se até à sua utilização.

As experiências foram conduzidas numa câmara de reacção fechada, termostatizada (25 °C).

Durante as sessões experimentais, todos os componentes necessários às experiências foram mantidos no gelo. No decurso das experiências, a suspensão mitocondrial foi sujeita a uma agitação magnética contínua e suave, através de um pequeno magnete movido por indução de um campo magnético giratório.

As reacções iniciaram-se por adição da suspensão mitocondrial (1 mg) ao meio de reacção (1420 µl).

Uma vez que se pretendia observar o efeito do aminoreagente, FDNB, nos diferentes complexos respiratórios, usaram-se os substratos dadores de electrões ao nível de cada complexo: glutamato/malato (10 mM), NADH (2 mM) para o complexo I; succinato (5 mM) para o complexo II; ascorbato (5 mM) mais TMPD (0,25 mM) (mediador artificial de electrões) para o complexo IV. Os complexos respiratórios foram diferenciados através de inibidores específicos: rotenona (5 µM) para inibir a passagem de electrões do complexo I para a ubiquinona, devido a alguma respiração por NADH endógeno, e assim assegurar a transferência de electrões apenas a partir do complexo II; antimicina A (0,1 µg) para inibir o complexo III e, juntamente com a rotenona, garantir a transferência de electrões apenas do complexo IV para o oxigénio. Foi também usada fenazinametassulfato (1 mM), para avaliar a actividade do complexo II separadamente dos outros complexos (esta substância aceita os electrões ao nível do complexo II e transfere-os directamente para o oxigénio). Neste caso foram utilizados os inibidores, cianeto e antimicina A para evitar que algum fluxo de electrões chegasse ao oxigénio através dos complexos III e IV da cadeia respiratória e, portanto, garantindo que todo o consumo de oxigénio observado era devido à actividade do complexo II.

Ensaio da actividade mitocondrial pelo consumo de O₂

Depois de seleccionar a velocidade do papel para 20 mm/min, deu-se início à reacção colocando na câmara, 1420 µl de meio de reacção e mergulhando nele o eléctrodo. Adicionou-se a proteína mitocondrial e o substrato respiratório. Em todas as sessões

experimentais foi feito um controlo com ADP para avaliar a sua acção estimulatória na respiração da mitocôndria (estado 3), o que reflecte o grau de integridade estrutural e funcional das fracções mitocondriais utilizadas (Figura 2.4).

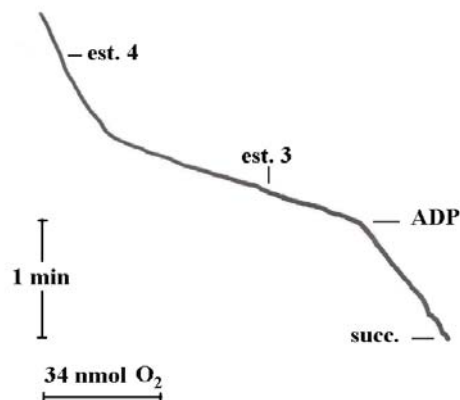


Figura 2.4 – Registo polarográfico típico obtido com o eléctrodo de oxigénio. O consumo de O₂ resultou da oxidação do succinato (succ.) por uma preparação mitocondrial (1 mg). A reacção decorreu na presença de 1420 µl de meio de reacção suplementado com succinato (5 mM), na presença de rotenona (5 µM). O estado respiratório 3 (est. 3) foi desencadeado pela adição de 1,5 mM de ADP; o estado respiratório 4 (est. 4) teve lugar após o consumo do ADP, como indicado na figura.

Nas reacções em que o substrato usado foi o succinato (Fig 2.4), adicionou-se sempre rotenona, de modo a garantir que electrões provenientes da oxidação do NADH endógeno, não fluíssem na cadeia respiratória devido à inibição do complexo I.

Foram realizadas experiências na presença de várias concentrações de FDNB, utilizado imediatamente após a sua dissolução em dimetilsulfóxido (DMSO) ou utilizado uma semana depois.

Como controlo fizeram-se ensaios na presença das mesmas concentrações de dimetilsulfóxido na ausência da sonda.

Cálculo de parâmetros representativos da actividade bioenergética mitocondrial

O estado das preparações mitocondriais foi avaliado através dos parâmetros ADP/O (fosforilação oxidativa) e ICR (índice de controlo respiratório). A conjugação destes dois parâmetros serve para determinar a funcionalidade de uma preparação mitocondrial, mais propriamente para demonstrar o estado de acoplamento entre a oxidação e a fosforilação.

Nas condições de temperatura e pressão a que se realizaram as experiências (25°C e uma atmosfera), um litro de água destilada contém 17,08 ml de ar. Como o ar dissolvido nesta água contém 33,82% de O₂, o volume de O₂ em 1000 ml de água é de 5,78 ml, ou seja, 5,78 µl O₂/ml H₂O.

Nas condições normais de pressão e à temperatura de 25°C, 1 mole de O₂ está contida em 24467 ml. Portanto, 5,78 µl de oxigénio contém 236 nmol O₂. Assim, os 1420 µl de água utilizados contém 335 nmol de O₂.

Uma vez calibrado o registador, sabemos que a escala total (0-100) (Fig. 2.4) equivale a 335 nmol O₂, pelo que cada divisão do papel valerá 3,4 nmol O₂. Durante as experiências também foi utilizada a escala (0-150) e, neste caso, cada divisão do papel correspondeu a 2,23 nmol O₂. Conhecendo a velocidade do papel (20 mm/min), e assim o tempo que a agulha do registador demora a percorrer um determinado número de divisões, poderemos calcular a velocidade de consumo de oxigénio (nmoles de O₂ consumido por minuto). No registo da Figura 2.4, a velocidade de consumo de oxigénio (calculada a partir da escala da figura) no estado 3 é de 99,8 nmol O₂/min; no estado 4 é de 18,1 nmol O₂/min.

Razão ADP/O:

A razão ADP/O constitui a razão entre a quantidade de ADP adicionado (nmoles) e o oxigénio consumido na fosforilação de todo o ADP (síntese de ATP), ou seja, o oxigénio (nano átomos - nAtm) consumido desde que se adiciona ADP (estado 3) até ao momento em que o registo apresenta uma inclinação idêntica à inclinação anterior a essa adição (independentemente do tempo decorrido). A relação ADP/O corresponde ao número de moléculas de ATP sintetizadas por cada átomo de oxigénio consumido (Estabrook, 1967). Quando fornecemos electrões à cadeia respiratória através do succinato (ao nível do complexo II), a razão ADP/O deverá ser inferior a 2.

Tomando como exemplo típico das nossas experiências o registo da Figura 2.4 (presença de succinato), a razão **ADP/O** calculada apresentou o valor de **1,4** (200 nmol ADP/144,5 nAtm O), o que indica então o nível de acoplamento bioenergético.

Índice de Controlo Respiratório (I.C.R.):

O I.C.R. calculou-se dividindo a velocidade respiratória (em nmol O₂/min) na presença de ADP (estado respiratório 3) pela velocidade respiratória obtida após o consumo de todo o ADP (estado respiratório 4) (Estabrook, 1967). O I.C.R. corresponde assim à estimulação respiratória provocada por ADP exógeno adicionado em excesso (não limitante). Quando o valor calculado é igual ou superior a 3, estamos na presença de mitocôndrias perfeitamente funcionais, isto é, em bom estado bioenergético.

Na Figura 2.4 , o **ICR** é **5,5** (99.8 nmol O₂/min/18,1 nmol O₂/min).

2.2.2 – Desenvolvimento de potencial eléctrico através da membrana interna da mitocôndria ($\Delta\psi$)

O potencial eléctrico ($\Delta\psi$) que, juntamente com o gradiente químico (ΔpH) constituem o potencial electroquímico (Δp) desenvolvido através da membrana interna da mitocôndria, foi determinado mediante utilização do eléctrodo de TPP⁺.

O $\Delta\psi$, em condições fisiológicas normais, constitui a componente dominante, contribuindo com cerca de 150-180 mV dos 220-230 mV do Δp total (Santos, 2002). A avaliação deste parâmetro revela-se assim de fundamental importância para a compreensão dos processos mitocondriais, sendo a bioenergética mitocondrial abordada segundo a vertente do estudo das variações do potencial membranar.

O eléctrodo de TPP^+ permite seguir a variação do potencial eléctrico através da membrana mitocondrial interna.

Eléctrodo de TPP^+

No presente estudo, o potencial membranar mitocondrial foi determinado através da monitorização da acumulação e libertação pela mitocôndria, do catião lipofílico tetrafenilfosfónico (TPP^+), utilizando-se um eléctrodo sensível a TPP^+ previamente preparado no nosso laboratório, de acordo com o descrito por Kamo e colaboradores (Kamo *et al.*, 1979). Foi construído um minieléctrodo com um tubo de cloreto de polivinilo (PVC) selado numa das extremidades com uma membrana constituída por cloreto de polivinilo e pelo ião tetrafenilboro (TPB⁻), usado como trocador. O tubo foi então preenchido com uma solução de 10 mM TPP^+ , tendo-se utilizado como eléctrodo de referência um eléctrodo de Ag/AgCl (Tacussel, Model MI 402). Ambos os eléctrodos, de TPP^+ e de referência, foram mergulhados na solução experimental onde se colocam as mitocôndrias (meio de reacção). Os dois eléctrodos foram ligados a um electrómetro de alta impedância que mede continuamente a força electromotriz entre eles. Por sua vez, o electrómetro é ligado a um registador que permite o registo contínuo da distribuição de TPP^+ entre as mitocôndrias e o meio (Fig. 2.5). Entre o electrómetro e o registador inseriu-se um dispositivo compensador de potencial para possibilitar a calibração e a expansão da escala normal do registador.

Princípios básicos de funcionamento do eléctrodo de TPP^+

Certos iões lipossolúveis difundem-se passivamente através das membranas biológicas. Estes iões têm uma característica comum: possuem a carga fortemente deslocada e “encoberta” por substituintes hidrofóbicos. Deste modo, os iões podem atravessar facilmente as bicamadas apesar da carga transportada.

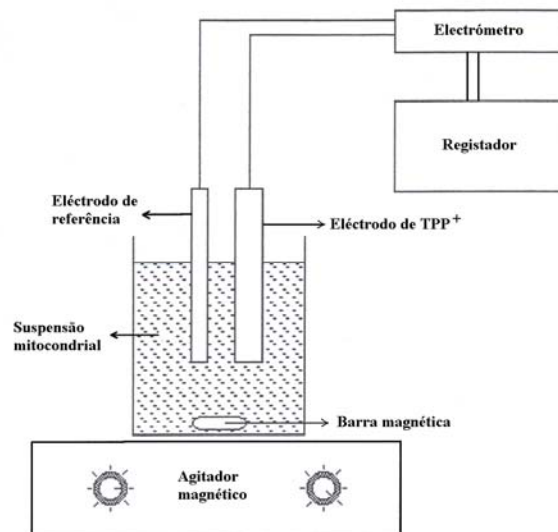
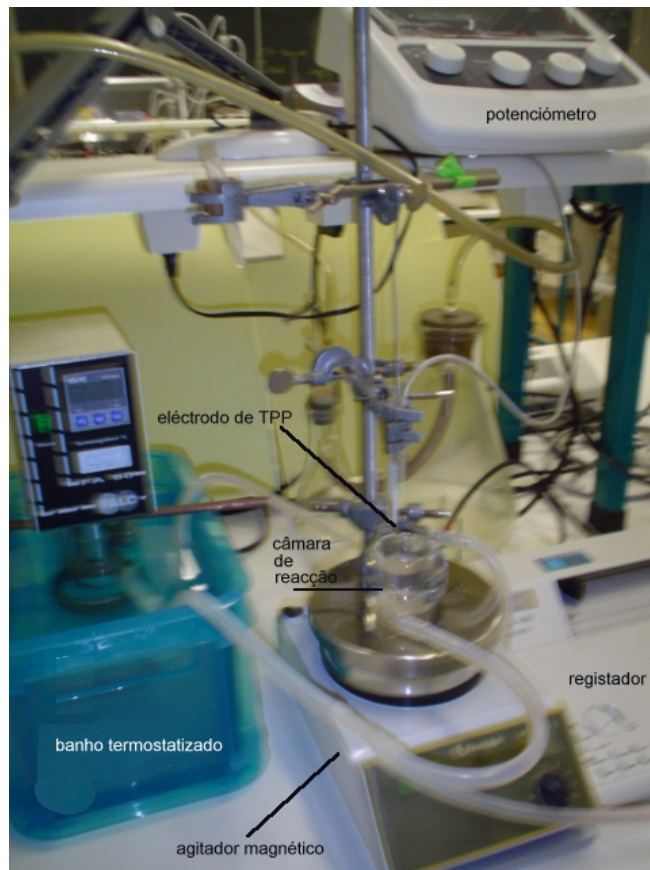


Figura 2.5 – Sistema de medição do potencial transmembranar mitocondrial. Em cima: montagem do sistema para medição do potencial membranar pelo eléctrodo de TPP⁺. Em baixo: esquema do sistema de montagem do eléctrodo de TPP⁺. Como eléctrodo de referência foi usado o eléctrodo de Ag/AgCl.

Então, catiões lipossolúveis como o TPP⁺ podem utilizar-se como indicadores do potencial transmembranar das mitocôndrias. Este catião não é tóxico nas condições experimentais utilizadas, não é metabolizado e a sua presença não influencia o $\Delta\Psi$ (Santos, 2002).

Durante a energização mitocondrial em soluções contendo TPP⁺, este ião é transferido electrofóreticamente para o interior do organito em virtude da hiperpolarização da membrana interna. Assim, o TPP⁺ difunde-se passivamente através da membrana (Figura 2.6) e, em equilíbrio, distribui-se de acordo com a equação de Nernst:

$$\Delta\Psi \text{ (mV)} = 2.3 \text{ RT/ZF} \log (C_{\text{ext}}/C_{\text{int}})$$

Considerando que $2.3 \text{ RT/ZF} = 60$, para $T = 25^\circ\text{C}$; e em que Z é a valência do ião ($Z = 1$ no caso do TPP⁺) temos:

$$\Delta\Psi = 60 \log (C_{\text{ext}}/C_{\text{int}}) \quad (\mathbf{a})$$

C_{int} é a concentração de TPP⁺ no interior da mitocôndria e C_{ext} é a concentração de TPP⁺ no meio.

Com a equação de Nernst calculamos $\Delta\Psi$, sabendo C_{ext} e C_{int} . Para o cálculo de C_{ext} necessitamos do volume do meio de reacção e da concentração de TPP⁺ que nele colocámos e que não foi tomado pelas mitocôndrias; para C_{int} é necessário saber a quantidade de TPP⁺ acumulado pelas mitocôndrias e o volume intramitocondrial que foi considerado 1,1 $\mu\text{l/mg}$ de proteína mitocondrial (Kamo *et al.*, 1979). A quantidade de TPP⁺ transferido electrofóreticamente para o interior da mitocôndria pode, portanto, determinar-se através do eléctrodo de TPP⁺.

Calibração do eléctrodo de TPP⁺

1. Colocámos na câmara 1 ml de meio de reacção;
2. Adicionámos 1 μl de solução de TPPCl 1 mM (equivalente a adicionar 1 nmoles de TPP⁺);

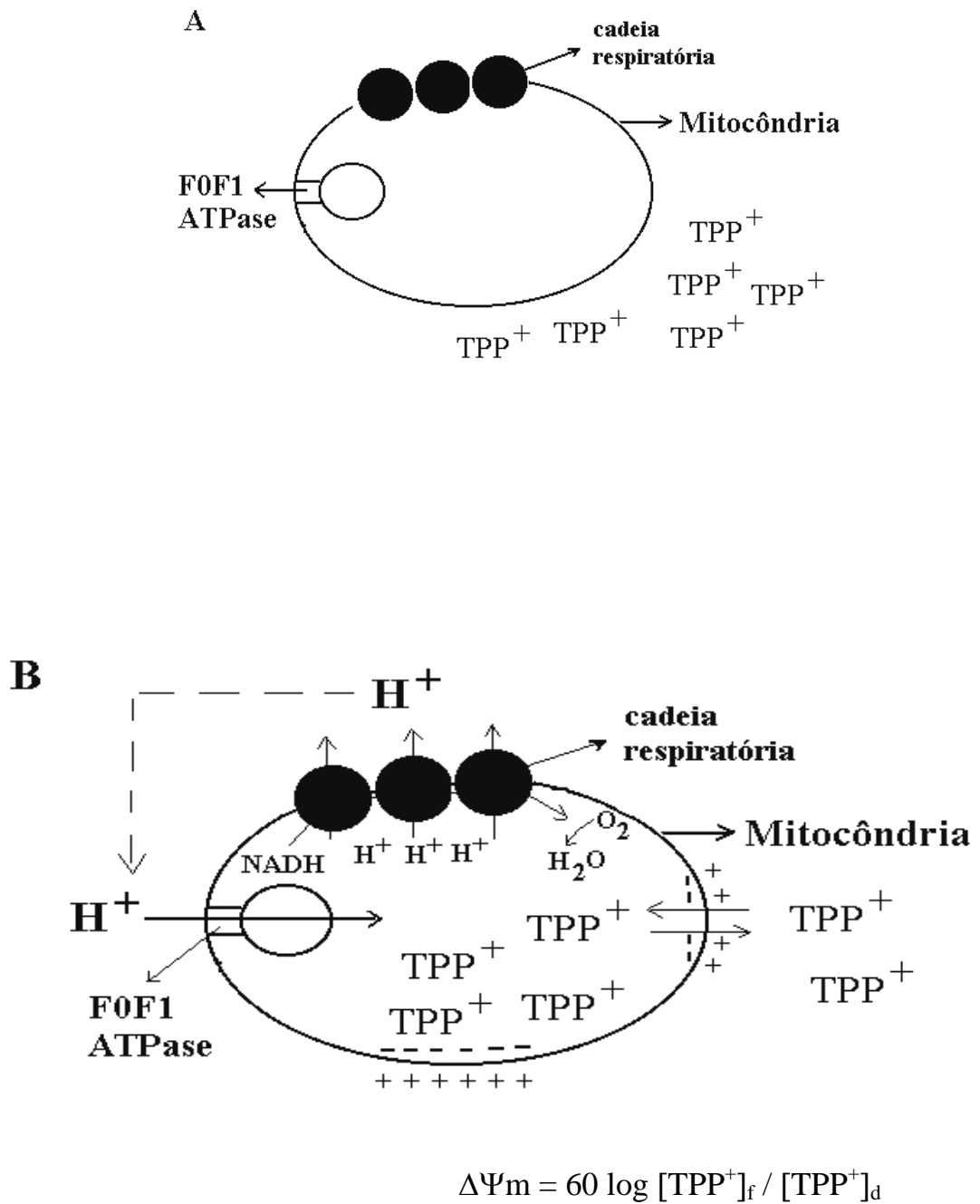


Figura 2.6 – Esquema ilustrativo do princípio em que se baseia a determinação do $\Delta\Psi$ mitocondrial, por utilização do ião TPP^+ (Baseado em Moreno, 1992).

3. Ajustámos a pena do registador numa das extremidades do papel, utilizando a caixa compensadora de potencial ou o zero do registador (a velocidade do papel foi de 20 mm/minuto);

4. Adicionámos 1 μ l de solução de TPP⁺;

5. Repetiu-se a adição de TPP⁺ anterior até se atingir o outro extremo da escala do papel (Figura 2.7), ficando assim o eléctrodo calibrado.

Nas sessões experimentais em que se efectuou a medição do potencial transmembranar, desencadeou-se a reacção adicionando ao meio: 5 μ M rotenona; 1 mg de suspensão mitocondrial; 5 mM substrato respiratório (succinato); 1,5 mM ADP; várias concentrações de FDNB (reagente para grupos amínicos) utilizado imediatamente após a sua dissolução em DMSO ou utilizado uma semana depois.

Obtiveram-se registos do tipo do representado na Figura 2.7 e calculou-se então a quantidade de TPP⁺ acumulado utilizando a escala de calibração, enquanto que a quantidade não acumulada foi calculada por diferença, como veremos a seguir.

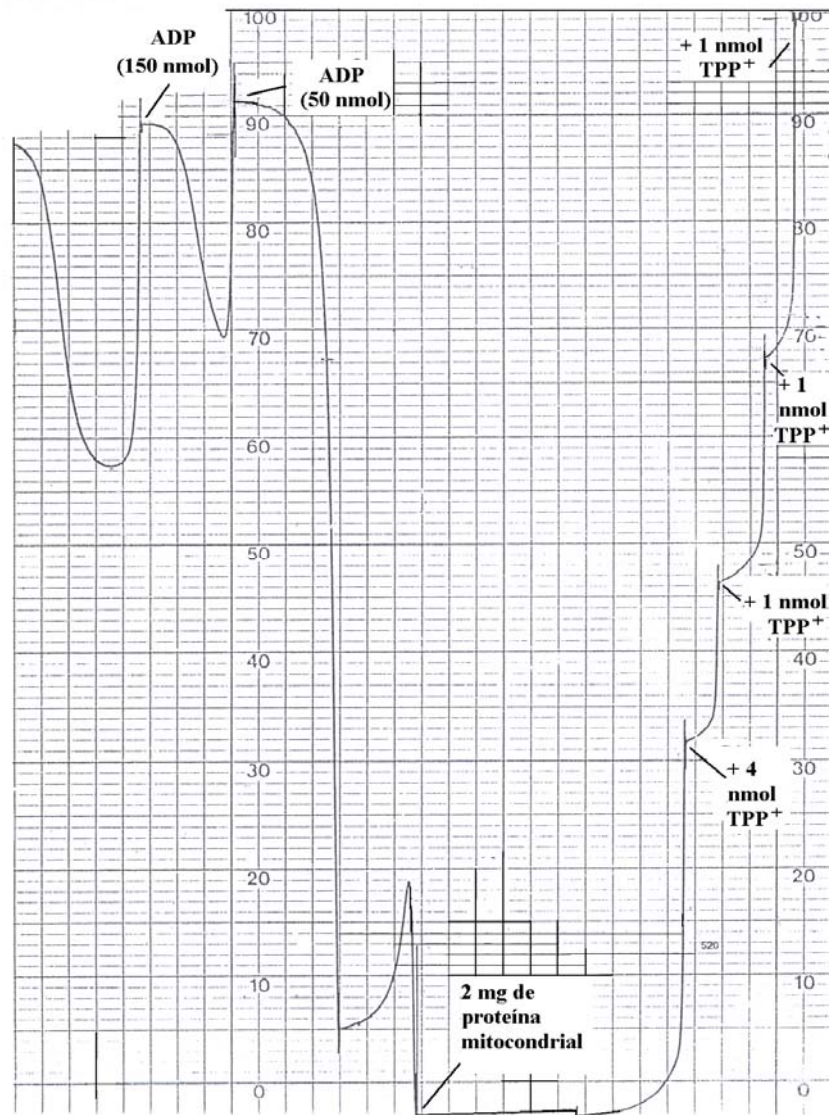


Figura 2.7 – Registo polarográfico típico obtido com o eléctrodo de TPP+. As mitocôndrias (2 mg) foram incubadas em 1 ml de meio de reacção, adicionou-se rotenona (5 μ M) e o substrato succinato (5 mM); foi feita uma primeira adição de ADP (50 mM) que despolarizou as mitocôndrias e após a repolarização fez-se uma segunda adição de ADP (150 mM).

Determinação do potencial eléctrico ($\Delta\Psi$)

1. Cálculo da concentração de TPP^+ no interior da mitocôndria ($[\text{TPP}^+]_{\text{int.}}$) (tendo em conta os volumes utilizados) (Figura 2.7):

33 divisões do papel \longrightarrow 1 nmol TPP^+ (adicionado)
 24 divisões do papel \longrightarrow X \longrightarrow 0,73 nmol TPP^+
 (correspondente ao TPP^+ que entrou numa adição de 1 nmol)

6 nmol + 0,73 nmol = 6,73 nmol de TPP^+ no interior

1 mg proteína mitocondrial corresponde a 1,1 μl (volume intramitocondrial)

6,73 nmol de TPP^+ em 2,2 μl de volume intramitocondrial

3,06 nmol de TPP^+ em 1 μl de volume intramitocondrial

Então temos:

3,06 mmol por litro, ou seja, $[\text{TPP}^+]_{\text{(int)}} = 3060 \mu\text{M}$

2. Cálculo da concentração de TPP^+ no exterior da mitocôndria:

A 8 nmol de TPP^+ (total adicionado) subtraem-se 6,73 nmol (TPP^+ no interior) e obtém-se 1,27 nmol (TPP^+ no exterior)

Então temos:

1,27 $\mu\text{mol}/1$ litro, ou seja, $[\text{TPP}^+] = 1,27 \mu\text{M}$

3. Aplicando a equação de Nernst (a) calculou-se o potencial desenvolvido pelas mitocôndrias que no caso do registo da Figura 2.7 é o seguinte:

$\Delta\psi = 60 \log 1,27 \mu\text{M} / 3060 \mu\text{M}$, ou seja, $\Delta\psi = -203 \text{ mV}$

Através deste processo pudemos calcular o potencial de membrana em qualquer ponto dos nossos registos. No registo da Figura 2.7 determinou-se, por exemplo, o potencial atingido por fosforilação oxidativa quando se adicionou ADP (50 nmol) ou ADP (150 nmol), em que os valores obtidos foram de -189 mV e -180 mV, respectivamente.

Na rotina, o potencial eléctrico transmembranar foi determinado a partir da seguinte equação (a 25 °C), assumindo que a distribuição do TPP⁺ entre a mitocôndria e o meio respeita a equação de Nernst, como anteriormente descrito (Kamo *et al.*, 1979):

$$\Delta\Psi \text{ (mV)} = 59\log(v/V) - 59\log(10^{\Delta E/59} - 1)$$

em que v , V e ΔE significam volume mitocondrial, volume do meio de incubação e a deflexão do potencial do eléctrodo a partir da linha de base, respectivamente (Santos, 2002). A escala utilizada foi de 28 mV (20 mm no papel correspondem a 28 mV).

Não foram realizadas correcções relativas à contribuição da ligação “passiva” do TPP⁺ às membranas mitocondriais porque o propósito do nosso estudo foi o de avaliar as alterações relativas do potencial e não os seus valores absolutos. Os cálculos do potencial transmembranar basearam-se num volume da matriz de 1,1 µl/mg proteína (Kamo *et al.*, 1979).

2.3 – Estabilidade temporal do aminoreagente fluorodinitrobenzeno em solução

O efeito do FDNB na fosforilação oxidativa foi observado tanto ao nível da sua acção sobre o consumo de oxigénio, como ao nível da sua acção na alteração do potencial membranar.

Para dissolver o FDNB utilizou-se dimetil sulfóxido (DMSO) a 99,9%. Foram preparadas soluções na concentração de 200 mM de FDNB, as quais foram utilizadas nos

ensaios mitocondriais após vários intervalos de tempo: 1 minuto, 2 horas, 19 horas, 2 dias, 6 dias e 8 dias. Este fármaco foi adquirido de Sigma.

Como os efeitos do FDNB na bioenergética mitocondrial diferiam na sua essência conforme o tempo decorrido após a sua preparação, procurámos verificar se o composto, dissolvido em DMSO, se mantinha estável ou se sofria alteração química ao longo do tempo.

Análise de alterações por espectrofotometria de absorção óptica

A detecção duma gradual alteração química do FDNB em solução de dimetilsulfóxido foi efectuada mediante a análise dos espectros de absorção óptica obtidos em vários intervalos de tempo após a sua preparação. A identificação do produto de alteração, como sendo dinitrofenol (DNP), foi confirmada por comparação com o espectro do composto dinitrofenol dissolvido em DMSO. Os espectros foram obtidos de soluções com a concentração de 100 mM tanto para o FDNB como para o DNP. O espectro do DMSO foi obtido para uma solução a 100% do referido composto. Foi utilizado um espectrofotómetro JASCO V-560, tendo-se vertido cada solução para cuvetes de quartzo. Os espectros de absorção foram obtidos na gama de comprimentos de onda de 380 a 520 nm.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 - Efeito do fluorodinitrobenzeno na actividade bioenergética mitocondrial

3.1.1 – Alteração na actividade respiratória

Neste estudo investigámos a acção do FDNB ao nível da actividade respiratória mitocondrial, reflectida na alteração do consumo de oxigénio em presença de vários substratos metabólicos.

3.1.1.1 – Sensibilidade do complexo I ao FDNB

O registo polarográfico do consumo de oxigénio da Figura 3.1-A ilustra o efeito de diferentes concentrações de FDNB no consumo de oxigénio, resultante do transporte de electrões fornecidos pelo substrato glutamato/malato ao nível do complexo I. O forte estímulo no consumo de oxigénio provocado pela adição de ADP (estado 3), revelou bom acoplamento oxidação/fosforilação. Na presença de FDNB, posto a reagir com as mitocôndrias durante um minuto, verificou-se uma inibição significativa do estado respiratório 3 induzido por ADP. De facto, o consumo de oxigénio diminuiu segundo um processo dependente da concentração de FDNB, isto é, o efeito do fármaco, visível a 0,05 mM, foi crescendo até uma inibição completa a cerca de 0,75 mM. De modo semelhante, o estado 4, que consiste na respiração da mitocôndria após a síntese de ATP, foi também inibido para concentrações de FDNB superiores a 0,05 mM. No sentido de verificar se o transporte de electrões ao longo da cadeia respiratória mitocondrial é realmente afectado pela sonda FDNB, adicionou-se o desacoplador FCCP que liberta o processo oxidativo na cadeia respiratória mitocondrial do controlo restritivo do processo fosforilativo. Nestas condições, o efeito inibitório, provocado pelo FDNB no consumo de oxigénio pela

mitocôndria, foi visível para a concentração de 0,05 mM de FDNB, tornando-se drástico (inibição total) para concentrações da sonda superiores a 0,75 mM. Estes resultados indicam que a cadeia respiratória mitocondrial é directamente afectada pelo aminoreagente FDNB, visto que, mesmo em desacoplamento, o consumo de oxigénio foi inibido. No entanto, esta experiência não revela o local de acção do FDNB na cadeia respiratória, uma vez que estamos a observar o efeito da sonda reflectido na última etapa do transporte de electrões (redução do oxigénio com conseqüente formação de água).

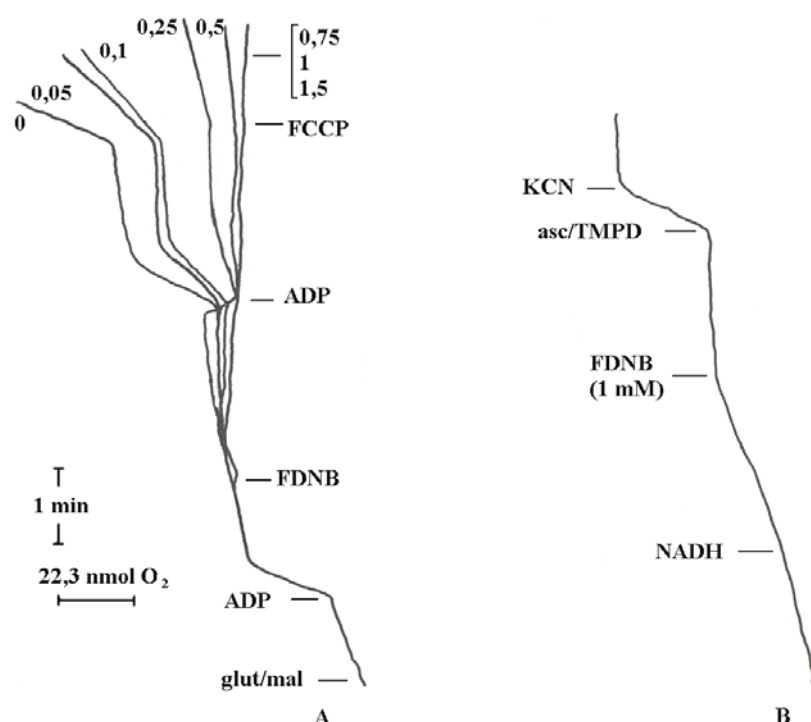


Figura 3.1 – Acção do FDNB no consumo de oxigénio por mitocôndrias de fígado de rato postas a respirar na presença de substratos respiratórios fornecedores de electrões ao complexo I. As mitocôndrias (1 mg) foram incubadas na presença e na ausência do FDNB em 1420 ul de meio constituído por sacarose 130 mM, KCl 60 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, a 25 °C. Os substratos adicionados à cadeia respiratória foram glutamato mais malato (10 mM) (A) e NADH (2 mM) (B). Em A, a fosforilação oxidativa foi estimulada por ADP em excesso (1,5 mM) e em cada experiência, foi adicionado FDNB (utilizado imediatamente após a sua dissolução em DMSO) nas concentrações indicadas junto aos registos respiratórios. No final cada experiência foi adicionado FCCP (1,5 μM). Em B, as mitocôndrias foram incubadas em Triton X-100 (0,02%) ou foram sujeitas a choque osmótico a fim de romper a membrana mitocondrial de modo a permitir a entrada do substrato NADH; foi utilizado cianeto (2 mM) para inibir o

complexo IV após a sua estimulação com ascorbato (5 mM) mais TMPD (0,25 mM). Os registos representam resultados típicos de 2 a 3 ensaios.

Foram também realizadas experiências em que NADH exógeno foi utilizado como fornecedor de electrões ao nível do complexo I (Figura 3.1 – B). A adição de FDNB (1 mM) provocou inibição no consumo de oxigénio em aproximadamente 99% relativamente ao consumo observado na ausência da sonda. O restabelecimento respiratório (consumo de oxigénio) foi observado mediante a adição de substrato respiratório, ascorbato, fornecedor de electrões ao nível do complexo IV, cuja actividade foi inibida posteriormente pela adição de cianeto de potássio (KCN). Os resultados indicam que os possíveis locais de actuação do FDNB na cadeia respiratória se encontram situados anteriormente ao complexo IV, uma vez que este se revelou insensível ao aminoreagente FDNB.

A quantificação dos efeitos inibitórios observados na figura 3.1-A está expressa na Tabela 3.1 e representada na Figura 3.2.

Podemos observar que a velocidade de consumo de oxigénio na situação de ocorrência de fosforilação oxidativa (estado 3) é significativamente inibida (aproximadamente 47%) para baixas concentrações (0,05 mM) de FDNB, atingindo 100% de inibição para concentrações superiores a 0,5 mM. Por outro lado, em condições de desacoplamento mitocondrial (presença de FCCP) em que o processo oxidativo não é condicionado pelo processo fosforilativo, a velocidade de consumo de oxigénio é também drasticamente inibida a partir de concentrações de FDNB superiores a 0,05 mM, o que indica que a cadeia respiratória está a ser directamente afectada pelo aminoreagente; no entanto, para 0,25 e 0,5 mM de FDNB, é visível uma maior inibição da velocidade de consumo de oxigénio no estado 3 relativamente à observada em condições de desacoplamento (presença de FCCP), sugerindo que, além da cadeia respiratória, também a ATP sintase parece ser inibida pelo FDNB utilizado em concentrações superiores a 0,25 mM. A fraca visibilidade do efeito da sonda na ATP sintase deve-se à grande sensibilidade da cadeia respiratória ao FDNB.

O discernimento da sensibilidade do complexo I ao FDNB foi possível após o estudo do comportamento dos outros complexos respiratórios relativamente à sonda, como se descreve seguidamente.

Na tentativa de identificar a sensibilidade dos vários complexos respiratórios ao FDNB, fizeram-se experiências utilizando substratos respiratórios fornecedores de electrões ao nível dos complexos II e IV.

Tabela 3.1 – Efeito do FDNB na actividade bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato postas a respirar na presença de substratos dadores de electrões ao complexo I. Os dados constantes na tabela referem-se aos resultados obtidos nas experiências da Figura 3.1-A. Os valores indicados representam a percentagem de inibição no consumo de oxigénio relativamente ao controlo.

[FDNB] (mM)	Estado 3 (% de inibição)	Presença de FCCP (% de inibição)
0 (controlo)	0	0
0,05	47	47
0,1	56	56
0,25	87	84
0,5	100	93
0,75	100	100
1	100	100
1,5	100	100

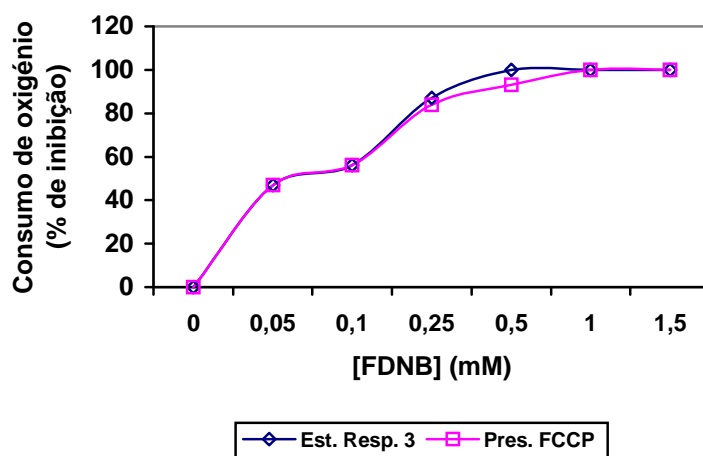


Figura 3.2 – Efeito de diferentes concentrações de FDNB no consumo de oxigénio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato, respirando em condições de acoplamento e desacoplamento (presença de FCCP). Os valores utilizados na elaboração do gráfico foram obtidos das experiências cujos resultados estão expressos na Tabela 3.1.

3.1.1.2 – Sensibilidade do complexo II ao FDNB

A Figura 3.3 mostra a respiração mitocondrial suportada pelo substrato succinato, dador de electrões ao nível do complexo II. A quantificação dos efeitos do FDNB na actividade respiratória observada nestas condições está expressa na Tabela 3.2 e representada na Figura 3.4. A estimulação da respiração, obtida com a adição de ADP após incubação com FDNB, foi reduzida relativamente ao controlo, numa percentagem dependente da concentração da sonda. A inibição foi mais forte na presença de FDNB em concentrações superiores a 0,5 mM. Além da sensibilidade respiratória no estado 3, foi também observado que a sonda inibiu significativamente o estado 4.

Como a adição de FCCP não levantou a inibição provocada pela presença de FDNB (1 e 1,5 mM), podemos concluir que a maquinaria oxidativa é sensível a FDNB, embora alguma sensibilidade da maquinaria fosforilativa também pareça visível para as concentrações de 0,2 e 0,5 mM de FDNB. De facto, nestas condições, o estado 3 é mais fortemente inibido pela sonda relativamente ao estado 4 (Tabela 3.2).

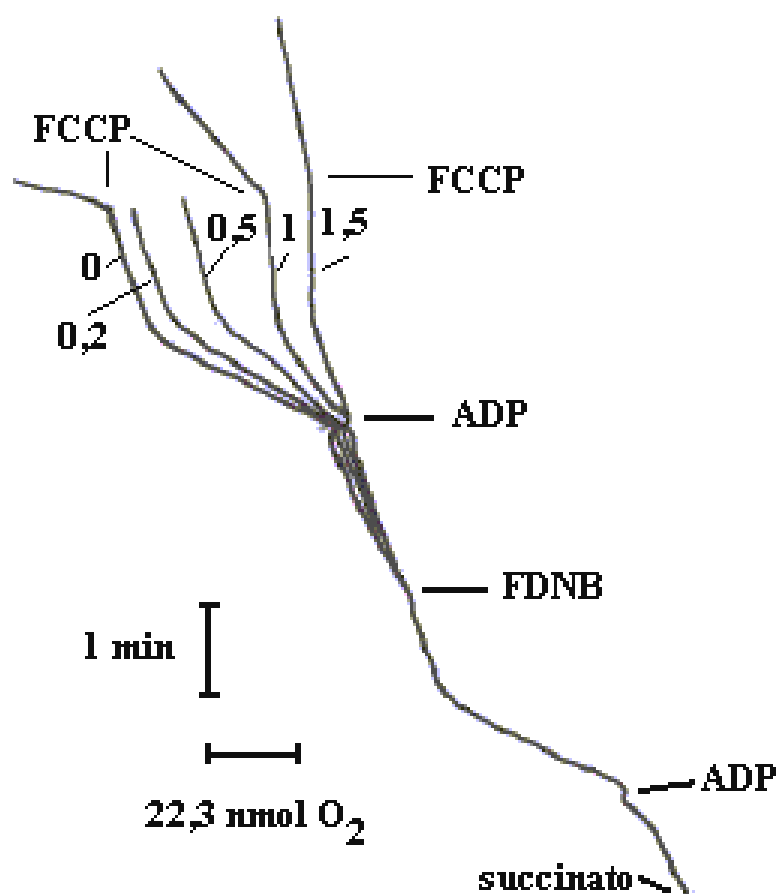


Figura 3.3 – Ação de várias concentrações de FDNB no consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato. As mitocôndrias (1 mg) foram incubadas na presença e na ausência de FDNB em 1420 μl de meio constituído por sacarose 130 mM, KCl 60 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 2 mM, a 25 °C. O complexo I foi inibido com rotenona (5 μM). Adicionou-se succinato (5 mM), ADP em excesso (1,5 mM), FDNB nas concentrações indicadas junto aos registos. FCCP (1,5 mM) foi adicionado em alguns ensaios como se indica. Os registos representam uma experiência típica ensaiada 4 vezes.

Tabela 3.2 – Efeito do FDNB na respiração de mitocôndrias de fígado de rato suportada por succinato. Os valores expressos na tabela referem-se aos resultados obtidos nas experiências da Fig. 3.3, e representam a percentagem de inibição no consumo de oxigénio relativamente ao controlo.

FDNB (mM)	Estado 3 (% de inibição)	Estado 4 (% de inibição)	Presença de FCCP (% de inibição)
0 (controlo)	0	0	0
0,2	12	0	_____
0,5	46	29	_____
1	75	80	75
1,5	88	100	90

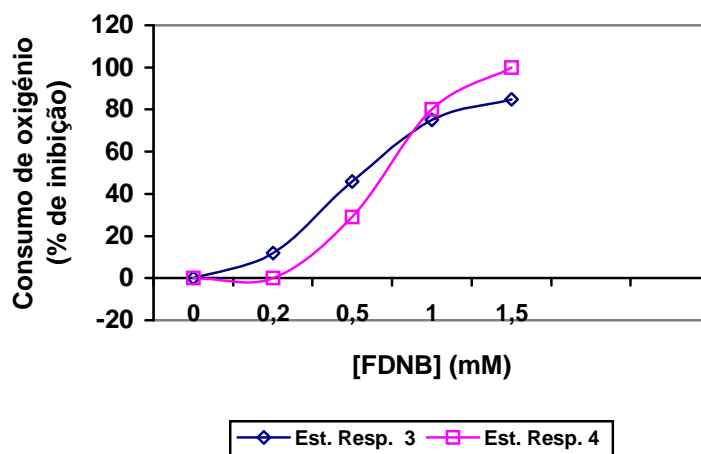


Figura 3.4 – Efeito do FDNB na respiração de mitocôndrias de fígado de rato, suportada por succinato. O FDNB foi adicionado em várias concentrações a mitocôndrias isoladas de fígado de rato postas a respirar nos estados 3 e 4, nas condições referidas na legenda da Figura 3.3. Os valores utilizados na elaboração do gráfico são os expressos na Tabela 3.2.

A fim de discernir o local de acção do FDNB, ao nível do complexo II, utilizámos fenazinametassulfato (Figura 3.5) que recebe os electrões do complexo II, transferindo-os directamente para o oxigénio, isto é, os electrões são desviados do seu percurso normal através do complexo III, citocromo *c* e complexo IV, ficando assim a actividade do complexo II isolada dos restantes componentes da cadeia respiratória. Nestas condições, verificou-se inibição do consumo de oxigénio após a adição de FDNB nas várias concentrações utilizadas (0,5-2 mM). As percentagens de inibição estão expressas na Tabela 3.3.

Estes resultados mostram que o FDNB actua directamente no complexo II, embora a sensibilidade à sonda (> 0,5 mM) seja menor do que a observada (> 0,05 mM) nas experiências em que os electrões são fornecidos ao nível do complexo I.

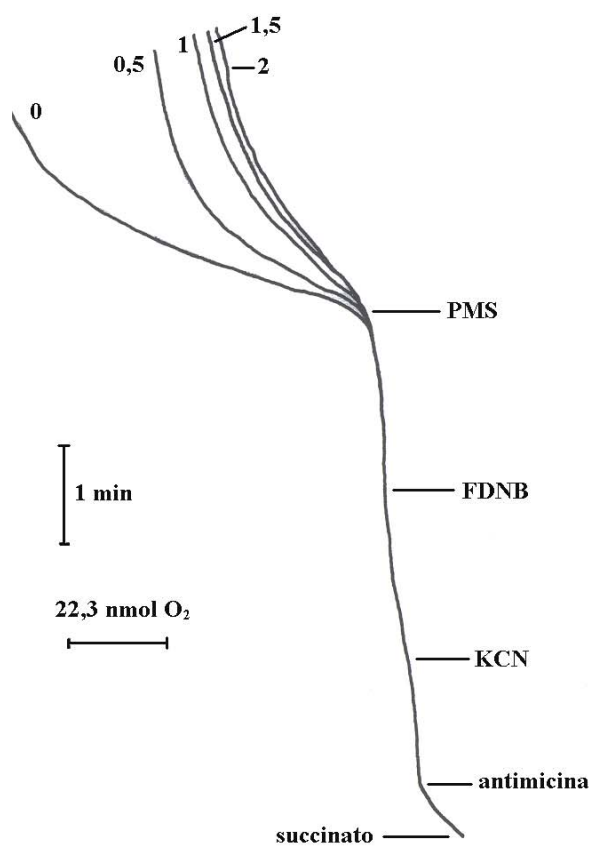


Figura 3.5 - Ação de várias concentrações de FDNB no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (1 mg) foram incubadas na presença e na ausência de FDNB em 1420 μ l de meio constituído por sacarose 130 mM, KCl 60 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, a 25 °C. A actividade do complexo II foi isolada mediante a utilização de fenazinametasulfato (PMS) na presença de rotenona (5 μ M), antimicina A (0,1 μ g) e cianeto – KCN (2 mM). Estimulou-se o complexo II com succinato (5 mM), adicionou-se 1 mM de PMS e FDNB nas concentrações indicadas junto aos registos. A figura representa registos típicos repetidos em 2 a 3 ensaios.

Tabela 3.3 – Efeito de várias concentrações de FDNB na respiração de mitocôndrias de fígado de rato, suportada por succinato. A actividade do complexo II foi isolada da actividade dos restantes complexos conforme descrito na legenda da Figura 3.5. Os valores indicados na segunda coluna, representam a inibição no consumo de oxigénio relativamente ao controlo.

FDNB (mM)	Presença de PMS (% inibição)
0 (controlo)	0
0,5	40
1	67
1,5	72
2	73

3.1.1.3 – Sensibilidade do complexo IV ao FDNB

Quando a respiração das mitocôndrias envolve apenas o complexo IV, o gradiente electroquímico é pequeno, uma vez que a transferência de electrões só neste nível implica uma reduzida passagem de prótons para o espaço intermembranar. Por isso, a estimulação do consumo de oxigénio verificada com a adição de ADP (Figura 3.6), foi baixa relativamente à observada quando o fluxo de electrões envolve toda a extensão da cadeia respiratória.

Na respiração mitocondrial envolvendo apenas o complexo IV, a incubação das mitocôndrias com FDNB (0,5 mM) não alterou a velocidade respiratória no estado 4, enquanto que no estado 3 (adição de ADP) a respiração foi inibida cerca de 60%, (Tabela 3.4). Na presença de FDNB em concentrações de 1 e 1,5 mM, o estado 3 foi 100% inibido, enquanto que o estado respiratório 4, não sofreu inibição (Figura 3.7, Tabela 3.4). A adição de um inibidor do complexo IV, cianeto, provocou a inibição total do consumo de oxigénio

Tabela 3.4 – Efeito do FDNB na respiração mitocondrial suportada por ascorbato. Os valores indicados representam a inibição por FDNB no consumo de oxigênio relativamente ao consumo verificado na ausência da sonda. As condições experimentais são as indicadas na legenda da figura 3.6.

FDNB (mM)	Estado 3 (% de inibição)	Estado 4 (% de inibição)
0,5	60	0
1	100	0
1,5	100	0

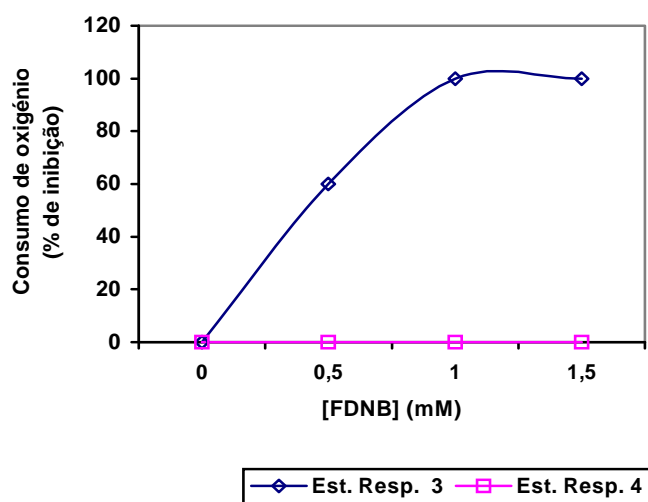


Figura 3.7 – Efeito de diferentes concentrações de FDNB na respiração de mitocôndrias de fígado de rato suportada por ascorbato/TMPD. O gráfico expressa a inibição no consumo de oxigênio na presença de FDNB relativamente aos valores obtidos na ausência de FDNB. As condições experimentais são as referidas na legenda da Figura 3.6.

(Figura 3.6), indicando que este estava funcional na presença de qualquer das concentrações de FDNB utilizadas. Podemos assim concluir que o complexo IV é insensível ao aminoreagente FDNB.

Como o complexo IV não foi afectado pela sonda, a falta de estimulação da respiração pelo ADP dever-se-á provavelmente a um efeito inibitório do FDNB na ATP sintase, impedindo assim a fosforilação oxidativa. No entanto, a inibição total do estado 3 para 1,5 mM de FDNB parece ser essencialmente devida a um certo desacoplamento da mitocôndria uma vez que, para altas concentrações de FDNB, o consumo de oxigénio já é elevado mesmo na ausência de ADP.

3.1.1.4 - Efeito do FDNB na actividade sequencial dos complexos respiratórios I, II e IV

A Figura 3.8 mostra o efeito do FDNB na respiração mitocondrial suportada sucessivamente por glutamato/malato, succinato e ascorbato.

O FDNB (0,25 mM) provocou uma inibição no consumo de oxigénio de 42%, relativamente ao verificado após a estimulação com glutamato/malato. A posterior adição de ADP estimulou ligeiramente, mas logo ao fim de 45 segundos verificou-se um forte decréscimo no consumo de oxigénio. A adição de FCCP não inverteu esta tendência, indicando que o complexo I foi bastante inibido por aquela concentração de FDNB. No entanto, ao fornecermos succinato à reacção, houve estimulação do consumo de oxigénio, o que indica que o complexo II ainda estava funcional. Mas uma nova adição de FDNB (1 mM) diminuiu este consumo em cerca de 60%, mostrando que, relativamente ao complexo I, o complexo II necessita de uma maior concentração da sonda para ser inibido. Ao adicionarmos ascorbato/TMPD, o estímulo no consumo de oxigénio foi elevado, sendo depois inibido por cianeto, o que mostra que o complexo IV não estava afectado pela sonda, apesar de já se encontrar no meio, somadas as duas adições, uma concentração de 1,25 mM de FDNB. Deste modo, para a concentração de FDNB (0,25 mM) o complexo I

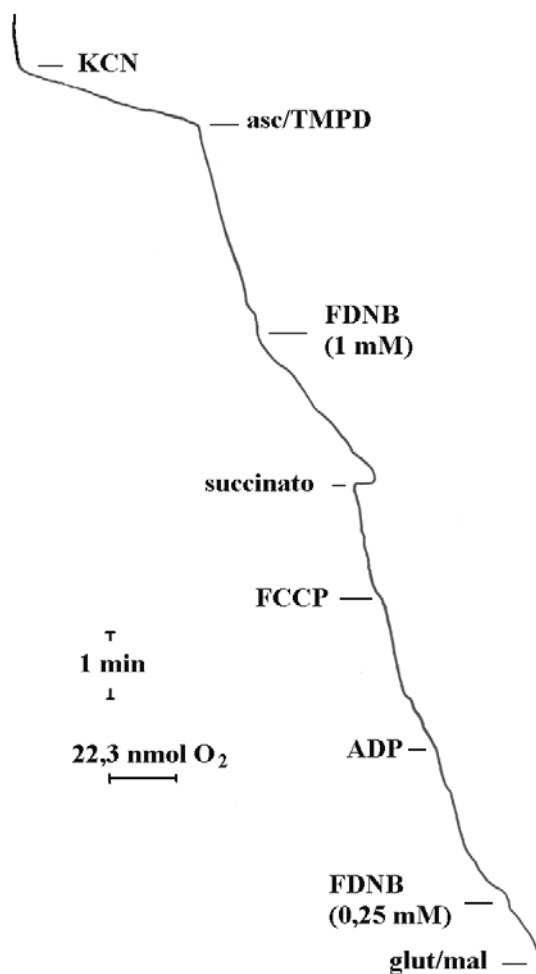


Figura 3.8 — Efeito do FDNB na actividade sequencial dos complexos respiratórios I, II e IV. As mitocôndrias (1 mg) foram incubadas em 1420 μ l de meio constituído por sacarose 130 mM, KCl 60 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, a 25 °C. Adicionou-se glutamato/malato (10 mM), FDNB (0,25 mM), ADP (1,5 mM), FCCP (1,5 mM), succinato (5 mM), uma nova adição de FDNB (1mM), ascorbato (5 mM) mais TMPD (0,25 mM) e cianeto (2 mM), como indicado pelas setas. Os registos representam uma experiência típica repetida duas vezes.

foi o mais sensível à acção do FDNB, enquanto que o complexo II mostrou menor sensibilidade ao FDNB (inibição para 1 mM), e o complexo IV se mostrou insensível, tal como já tínhamos observado na experiência da Figura 3.1 –B.

3.1.1.5 - Interferência do ADP na acção inibitória do FDNB na respiração de mitocôndrias de fígado de rato

No decurso dos trabalhos experimentais, alguns resultados foram sugerindo que o ADP, *per se*, influencia a acção do FDNB. Para verificar esta constatação, procedemos a experiências cujos resultados se observam na Figura 3.9. Neste caso, a acção da sonda foi estudada em mitocôndrias desacopladas pela adição de FCCP, de modo a eliminar o processo fosforilativo. Sem limite de controlo respiratório, o consumo de oxigénio por mitocôndrias respirando na presença de succinato foi de 96 nmol de O₂ por minuto (controlo).

Noutra experiência adicionámos também FDNB (1 mM) e, 1,5 minutos depois, o consumo de oxigénio foi inibido em 58% relativamente ao controlo.

Repetindo a experiência, mas desta vez adicionando ADP, verificámos que, passados também 1,5 minutos após a adição de FDNB, o consumo de oxigénio foi inibido em 79% relativamente ao controlo (Figura 3.9). Estes resultados sugerem que o efeito inibitório do FDNB, na cadeia respiratória, aumentou na presença de ADP, indicando que este nucleótido, *per se*, facilita a interacção da sonda com os componentes amínicos da membrana.

3.1.2 – Alteração no potencial da membrana induzida por FDNB

Os resultados obtidos pela medição do consumo de oxigénio, foram confirmados pela medição do potencial membranar. A Figura 3.10 mostra o desenvolvimento do $\Delta\psi$ após energização por succinato que atingiu -189 mV. Com a adição de ADP, o potencial desceu para -158.8 mV (a entrada de prótons na matriz mitocondrial em simultâneo com o ADP dissipou o gradiente) e ao fim de cerca de 1 minuto, voltou a ser recuperado (a fosforilação do ADP estimulou a cadeia respiratória, repondo-se o potencial). Fez-se um controlo com DMSO, assegurando-se assim que este solvente do FDNB não interfere nas alterações do potencial.

Utilizaram-se soluções de FDNB preparadas no momento da utilização e em diferentes concentrações (0,25mM, 0,5 mM e 1,5 mM). Em todos os casos se verificou um declínio no potencial após a adição da sonda (Figura 3.10); ao fim de 1 minuto observou-se que essa descida atingiu valores diferentes consoante a concentração de FDNB: -184 mV para 0,25 mM, -166 para 0,5 mM e -119 mV para 1,5 mM de FDNB, isto é, a descida no potencial foi-se acentuando com o aumento da concentração da sonda. O potencial não foi repostado em qualquer das três experiências em que foi adicionada a solução de FDNB preparada no momento da utilização, o que sugere que o efeito da sonda foi irreversível mostrando, nestas condições (presença de succinato), uma sensibilidade à sonda que requer concentrações superiores a 0,25 mM. Na presença de FDNB 0,25 mM, apesar do $\Delta\psi$ ter descido, o seu valor foi relativamente alto, mostrando que aquela concentração não foi suficiente para provocar uma grande inibição. Na presença de FDNB 1,5 mM, a descida do potencial foi drástica, mostrando que, para esta concentração, o sistema bioenergético foi muito sensível. Os resultados mostram que o FDNB teve um efeito inibitório no desenvolvimento do potencial mais rápido e drástico para concentrações altas (0,5 e 1,5 mM).

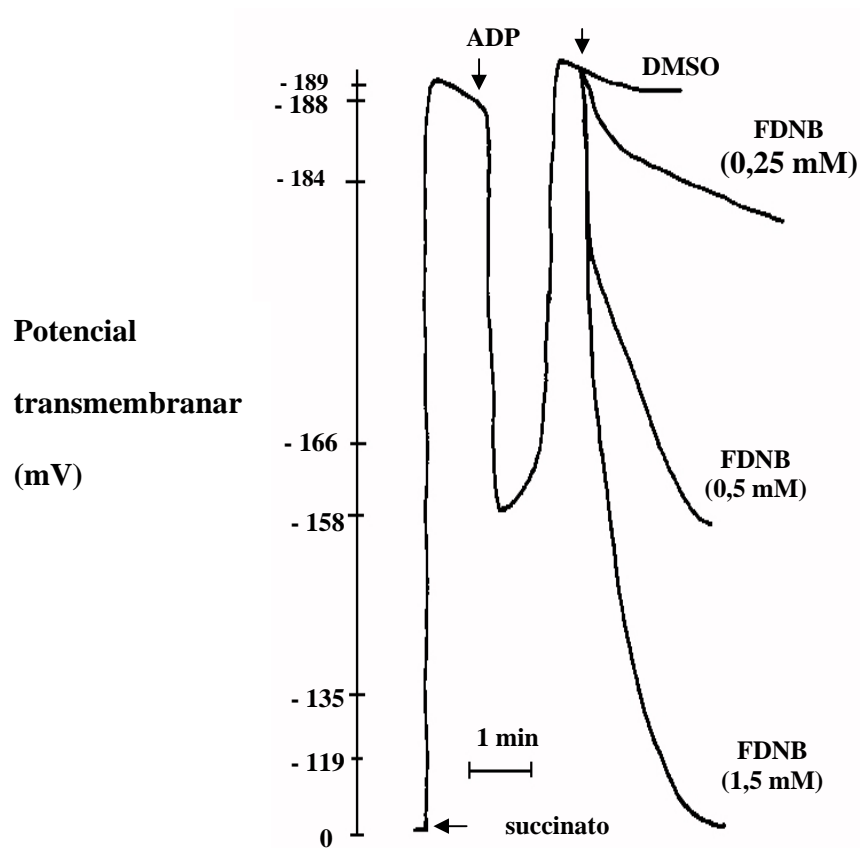


Figura 3.10 – Efeito de FDNB no potencial transmembranar mitocondrial. As soluções de FDNB foram preparadas no momento da sua utilização experimental. O solvente DMSO foi adicionado no estado puro.

3.2 – Alteração temporal da estabilidade da solução de FDNB

3.2.1 – Alteração na actividade respiratória mitocondrial por FDNB utilizado longos períodos após a sua dissolução em dimetilsulfóxido

Em certas experiências, verificámos que o FDNB, quando utilizado longos períodos após a sua dissolução em DMSO, tinha efeitos estimulatórios em vez de efeitos inibitórios no consumo de oxigénio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

A Figura 3.11–A mostra que, a adição de FDNB, cuja solução foi preparada com uma semana de antecedência, em concentrações baixas (5 μM -500 μM), estimulou imediatamente o estado respiratório 4. Na presença de solução de FDNB (5 μM), ainda se observou resposta respiratória à adição de ADP (estado respiratório 3), indicando a existência de acoplamento fosforilação-oxidação. Contudo, na presença de soluções com concentrações superiores a 5 μM de FDNB e até 500 μM , o estímulo no consumo de oxigénio foi imediato e tão elevado que a adição de ADP não alterou a velocidade respiratória anterior. Estes resultados mostram que a actividade da cadeia respiratória foi desacoplada do processo fosforilativo na presença da sonda.

Com a adição de soluções de FDNB, preparadas alguns dias antes da sua utilização, em concentrações de 0,75 a 1,5 mM (Fig. 3.11-B), observou-se um decréscimo na estimulação respiratória relativamente à observada para as baixas concentrações da solução armazenada de FDNB, enquanto que, na presença de soluções armazenadas de FDNB (2 mM), já não houve estimulação respiratória no estado 4. Além disso, a posterior adição de ADP não provocou alteração significativa no consumo de oxigénio, sugerindo que, nestas condições, ambos os sistemas, fosforilação e oxidação não estão funcionais.

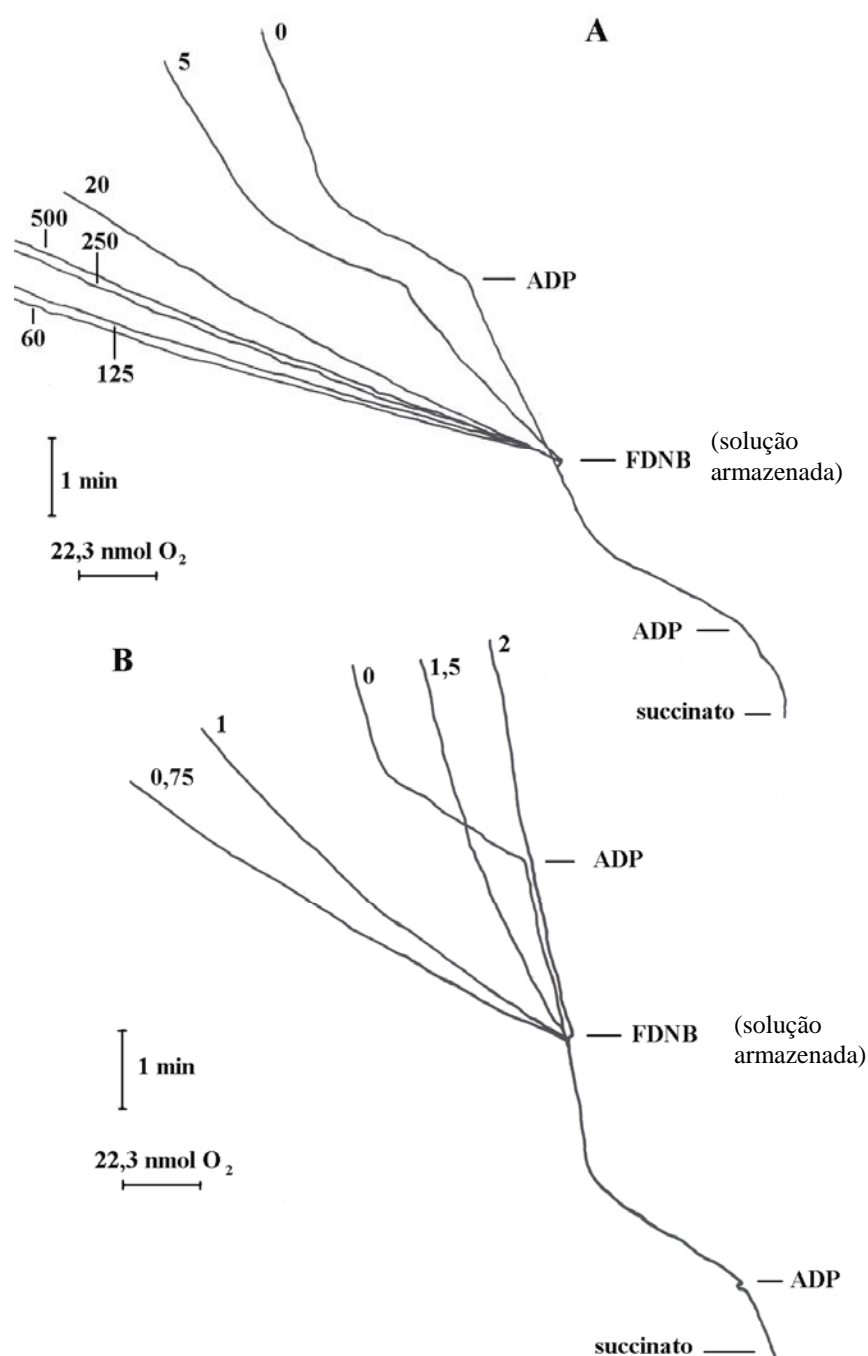


Figura 3.11 – Efeito do FDNB na actividade respiratória mitocondrial suportada por succinato. As mitocôndrias (1 mg) foram incubadas em soluções preparadas com FDNB oito dias antes da sua utilização. As concentrações em FDNB indicadas junto aos registos estão em μM (A) e em mM (B). A segunda adição de ADP foi efectuada em todas as experiências representadas. Os registos são representativos de 3-4 experiências diferentes.

Estes resultados mostram que soluções de FDNB, preparadas alguns dias antes da sua utilização, têm um efeito desacoplador na actividade respiratória mitocondrial que atinge um máximo para concentrações de aproximadamente 60 μM , acima das quais a estimulação do consumo de oxigénio diminui, provavelmente devido a uma acção na cadeia respiratória que se sobrepõe à sua acção desacopladora (Figura 3.12).

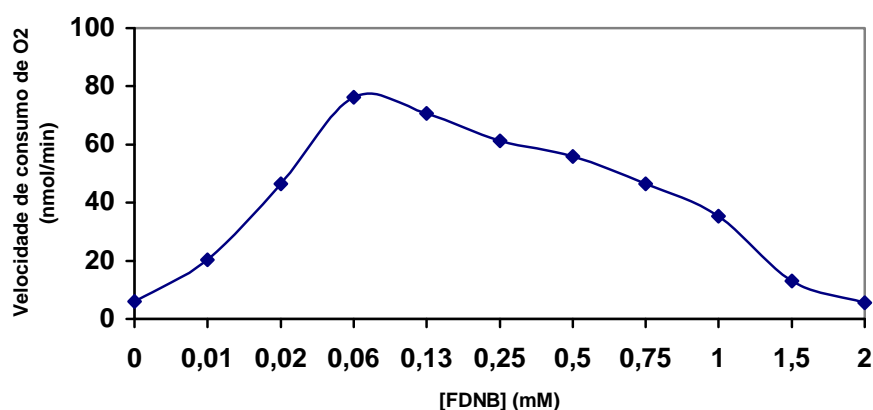


Figura 3.12 – Efeito de solução de FDNB utilizada oito dias após a sua preparação em DMSO na respiração mitocondrial suportada por succinato. Os valores indicam a velocidade de consumo de oxigénio em função da concentração da solução e referem-se aos resultados obtidos nos registos da Figura 3.11.

Para confirmar o efeito de soluções de FDNB preparadas alguns dias antes da sua utilização, nos complexos da cadeia respiratória, provocou-se o desacoplamento entre a oxidação e a fosforilação com FCCP (Fig. 3.13). Depois adicionou-se a solução de FDNB (1,5 mM), preparada há oito dias, a qual inibiu completamente o consumo de oxigénio, suportado pelo substrato glutamato/malato. Na presença de succinato, houve novamente consumo de oxigénio, de acordo com o já verificado no registo da Figura 3.11-B, mas não

foi atingida a velocidade registada anteriormente, aquando da adição de FCCP (Figura 3.13). Estes resultados mostram que a solução de FDNB armazenada, em concentração elevada (1,5 mM), tem uma acção que se reflecte na inibição da actividade dos complexos respiratórios, em que o complexo I se revelou particularmente sensível.

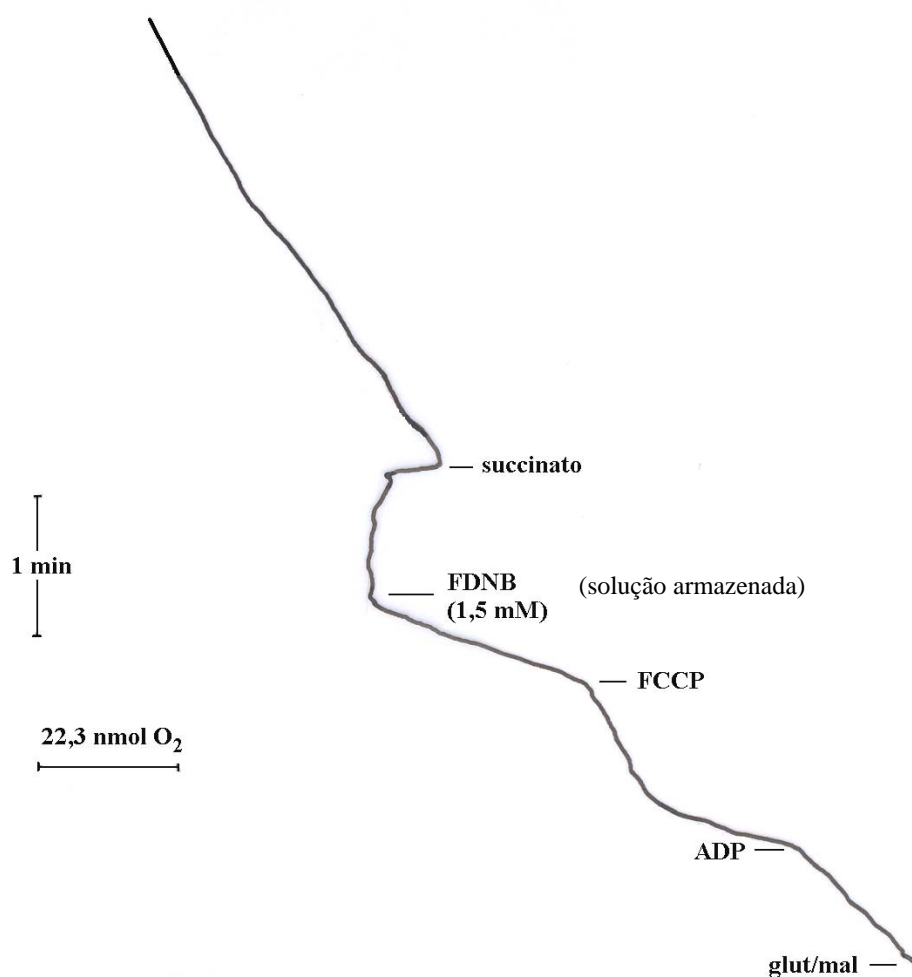


Figura 3.13 – Efeito de soluções de FDNB, preparadas alguns dias antes da sua utilização, na actividade respiratória mitocondrial. As mitocôndrias (1 mg) foram incubadas em 1420 μ l de meio constituído por sacarose 130 mM, KCl 60 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, a 25 °C. Foi activado o complexo I com glutamato mais malato (10 mM) e o complexo II com succinato (5 mM). Adicionou-se ADP (1,5 mM), FDNB (1,5 mM) preparado oito dias antes da utilização experimental e FCCP (1,5 μ M), como indicado pelas setas. Os registos representam uma experiência típica ensaiada 3 vezes.

3.2.2 - Alteração no potencial de membrana mitocondrial por soluções de FDNB utilizadas longos períodos após a sua dissolução em dimetilsulfóxido

Nas mesmas condições, procedemos à adição de soluções de FDNB preparadas oito dias antes da sua utilização. A presença de FDNB (30 μM) provocou uma diminuição de potencial brusca (Figura 3.14), o que mostra que a droga teve uma acção desacopladora na cadeia respiratória. No entanto, esta descida foi inferior à verificada na presença de FDNB (1,5 mM) (nas condições de utilização imediata da solução de FDNB), indicando que o complexo funcionou tentando repor o gradiente. Estes resultados sugerem que a acção do FDNB, nestas condições, se situou ao nível da membrana e não no complexo respiratório, reflectindo-se no desacoplamento e conseqüentemente numa queda brusca do potencial.

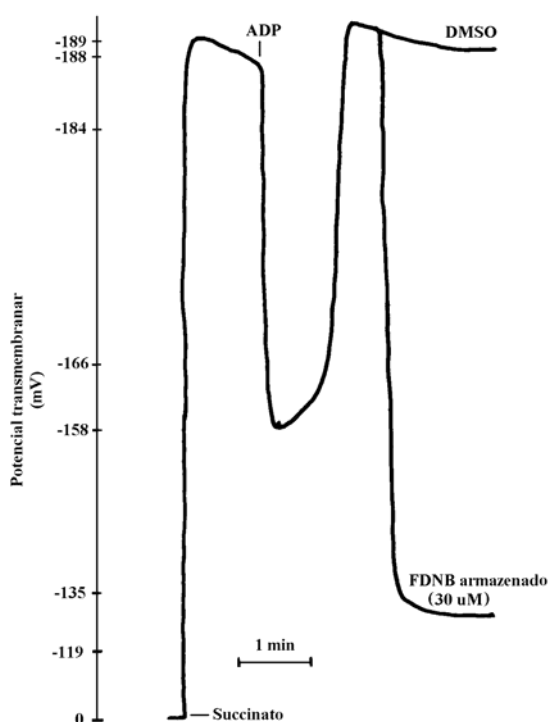


Figura 3.14 – Efeito de FDNB (solução armazenada) no potencial transmembranar mitocondrial. A solução de FDNB (30 μM) foi utilizada oito dias após a sua preparação em DMSO. O registo com adição de DMSO, para controlo, foi obtido com o solvente no estado puro.

3.2.3 – Conversão química do FDNB em dinitrofenol em função do tempo após dissolução em dimetilsulfóxido

3.2.3.1. - Modificação gradual do espectro de absorção óptica

Dado observarmos que o FDNB apresentava efeitos diferentes em função do tempo decorrido desde a preparação da solução até à utilização da mesma, procedemos à análise dos espectros de absorção óptica obtidos de soluções preparadas em diferentes momentos.

Verificou-se que os espectros das várias soluções de FDNB utilizadas apresentaram curvas diferentes (Figura 3.15), atingindo uma absorção máxima de aproximadamente 3 na gama de comprimentos de onda até 475 nm para a solução preparada há mais tempo (8 dias). As soluções preparadas desde há seis dias até há 1 minuto, apresentaram a mesma absorção, mas para comprimentos de onda cada vez menores, respectivamente desde cerca de 450 nm até cerca de 410 nm. Este resultado é sugestivo de possíveis alterações químicas do composto uma vez em solução, que aqui se traduziram em diferentes espectros de absorção. O solvente DMSO apresentou zero de absorvância (Fig. 3.15) para qualquer comprimento de onda, indicando não interferir no espectro do composto em estudo (FDNB).

3.2.3.2. - Identificação do composto resultante da reacção de conversão

O FDNB, em concentrações baixas e passado algum tempo depois de solubilizado, exerceu um efeito semelhante a um desacoplador vulgar. Por isso, comparámos o espectro de absorção óptica obtido da solução preparada com oito dias de antecedência com o espectro de absorção óptica do desacoplador DNP (Fig. 3.16). Os valores da absorvância foram os mesmos, para os mesmos comprimentos de onda (aproximadamente 3 a um comprimento de onda de 475 nm), tanto para a solução preparada há oito dias como para o DNP também preparado em DMSO. Os resultados mostram uma identidade entre as

soluções, sugerindo que a solução de FDNB se converteu, com o tempo, numa solução de DNP, de acordo com o efeito desacoplador observado.

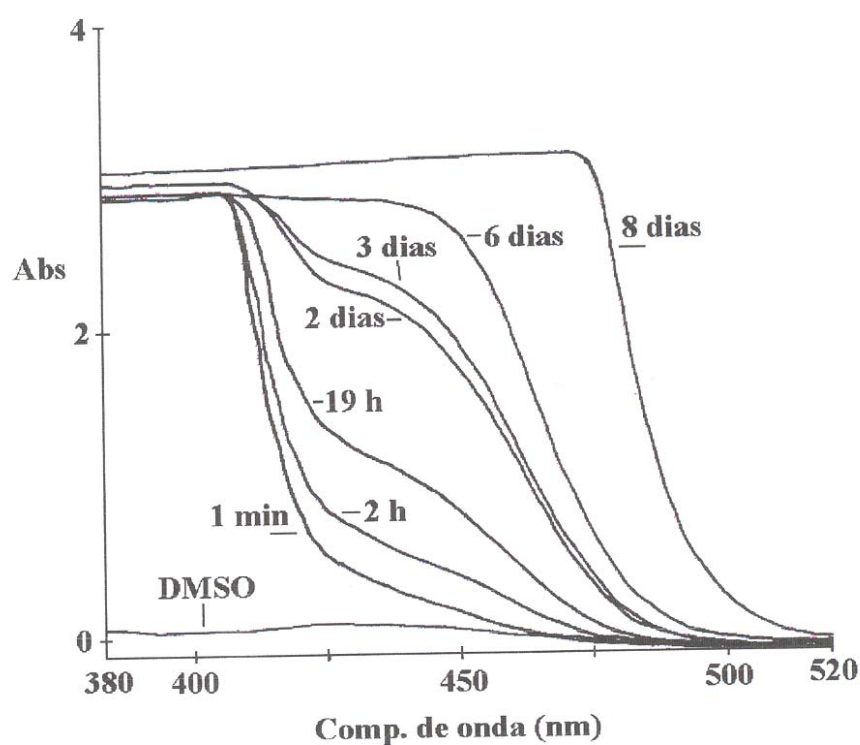


Figura 3.15 – Espectros de absorção óptica de soluções de FDNB (100 mM) preparadas em diferentes intervalos de tempo antes da sua utilização. A concentração de FDNB nas soluções foi de 100 mM. O espectro do DMSO foi obtido com a substância no seu estado puro (100%).

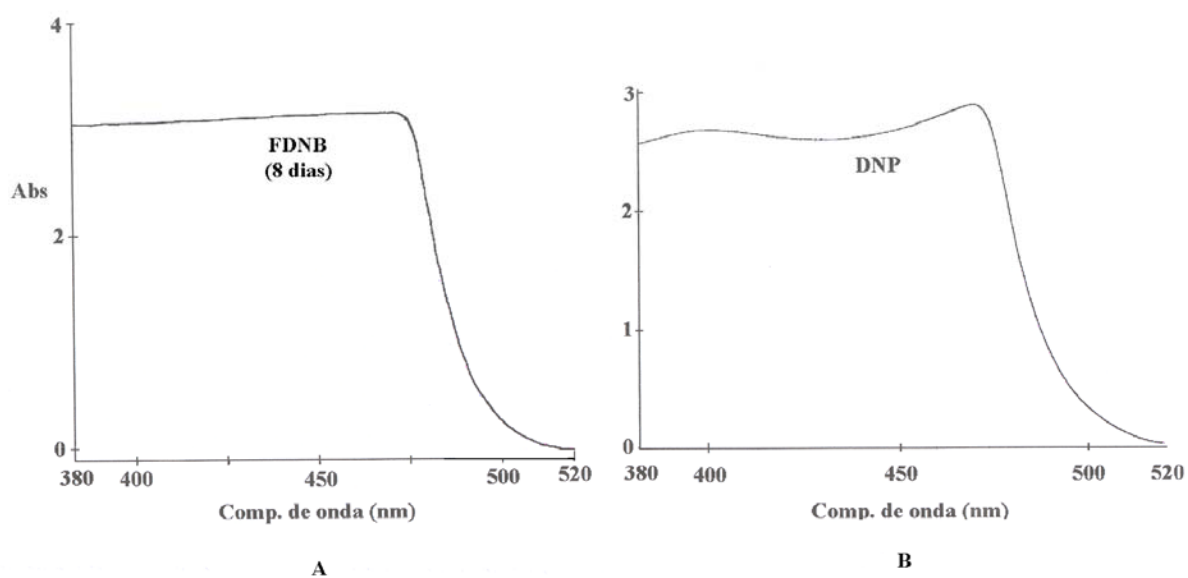


Figura 3.16 – Espectros de absorção óptica de uma solução de FDNB preparada oito dias antes da obtenção do espectro (A) e de uma solução de dinitrofenol (DNP) (B). As soluções foram preparadas com DMSO como solvente e a concentração dos compostos em solução foi de 100 mM.

4 - DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A modificação química de proteínas por várias sondas que a elas se ligam covalentemente tem sido largamente utilizada para estabelecer a importância funcional de certos resíduos de aminoácidos na actividade de enzimas pertencentes a vários sistemas biológicos (Vale, 1976; Hadad *et al.*, 1999). Neste trabalho utilizámos o aminoreagente fluorodinitrobenzeno (FDNB) como sonda para investigar a influência de grupos amínicos na actividade dos complexos respiratórios mitocondriais.

A actividade respiratória mitocondrial suportada pelos substratos glutamato/malato revelou ser fortemente inibida por baixas concentrações de FDNB (~0,05 mM) (Figura 3.1). Para esta concentração, o estado 3 foi inibido 47%, sendo a inibição total a partir de 0,5 mM de FDNB (Tabela 3.1). Como, na presença do desacoplador, FCCP, a inibição respiratória se manteve sensivelmente com a mesma magnitude, concluímos que os principais elementos afectados estão na cadeia respiratória. Contudo, um pequeno acréscimo de inibição do estado 3 para 0,25 e 0,5 mM de FDNB, relativamente à inibição observada na presença de FCCP (Tabela 3.1), leva-nos a concluir que, no sistema acoplado, uma inibição da ATP sintase pode também contribuir para o efeito global no estado 3.

Como, nestas experiências, os substratos respiratórios utilizados (glutamato/malato ou NADH) implicam que toda a cadeia respiratória seja activada, no sentido de transportar os electrões desde o complexo I até ao oxigénio, não podemos distinguir os locais afectados pela sonda. Apenas constatamos uma alta sensibilidade ao FDNB (Figura 3.1).

A nível do estado 4, não foi possível obter, nestas condições, efeitos do FDNB no consumo de oxigénio, uma vez que a velocidade respiratória é, *per se*, já bastante reduzida. De facto, a quantidade de nucleótido (ATP) presente no meio no estado 4 pode fechar canais libertadores de protões, de modo que a mitocôndria fica mais acoplada, isto é, há menor dissipação de gradiente e, portanto, uma reduzida velocidade de consumo de oxigénio que deixa de poder reflectir um posterior efeito inibitório do FDNB.

Fazendo experiências na presença do substrato respiratório succinato (Figura 3.3) que implica fornecimento de electrões ao nível do complexo II, verificámos que o FDNB só

provoca fortes efeitos inibitórios na actividade respiratória mitocondrial quando utilizado em concentrações superiores a 0,5 mM. Neste caso, para 0,2 e 0,5 mM de FDNB, a inibição no estado 3 também se mostrou ligeiramente superior à inibição no estado 4 (Tabela 3.2), tal como aconteceu com o substrato glutamato/malato. Isto confirma a hipótese de que, no sistema acoplado, a ATP sintase também está afectada pelo FDNB, de modo a contribuir para uma maior redução da velocidade de consumo de oxigénio.

Por outro lado, a adição de FCCP em certos ensaios (1 e 1,5 mM de FDNB) não levantou a inibição do FDNB na actividade respiratória (Figura 3.3) sugerindo que os componentes da cadeia respiratória, posteriores ao complexo I são afectados pela sonda, embora com uma sensibilidade menor (~0,5 mM de FDNB) do que a observada (~0,05 mM de FDNB) quando o complexo I estava incluído no transporte de electrões.

Utilizando fenazinametasulfato para promover o desvio dos electrões vindos do complexo II directamente para o oxigénio (Figura 3.5), verificámos que o consumo de oxigénio foi significativamente inibido para concentrações de FDNB superiores a 0,5 mM, embora, neste caso, a inibição seja um pouco menor do que a observada quando os electrões fornecidos pelo succinato são transportados para o oxigénio através dos componentes da cadeia respiratória, complexo III e complexo IV (Tabela 3.3). Isto sugere que qualquer destes complexos também pode ser afectado pela sonda, com sensibilidade idêntica à do complexo II.

Ao investigar o efeito do FDNB ao nível do complexo IV, o que foi possível graças à utilização do substrato ascorbato na presença de TMPD, verificámos que a actividade respiratória no estado 4 não foi inibida para qualquer concentração de FDNB testada (0,5, 1 e 1,5 mM). Por sua vez, no estado acoplado (estado 3), a respiração mostrou-se fortemente inibida para a concentração de 0,5 mM de FDNB devido, provavelmente, à acção da sonda na ATP sintase.

Para concentrações elevadas de FDNB (1,5 mM), o consumo de oxigénio foi acelerado (Figura 3.6) devido à ausência de inibição do complexo IV numa situação de desacoplamento, em que a inibição da ATP sintase é invisível devido ao facto da sua função fosforilativa não se exercer nestas condições. Neste caso, a ausência do estado 3

(Tabela 3.4), deve-se ao desacoplamento induzido por alguma conversão do FDNB em dinitrofenol, identificado na Figura 3.16.

Nestas experiências podemos concluir claramente que a forte inibição do estado 3 em condições de perfeito acoplamento (0,5 mM) e insensibilidade do complexo IV à sonda, se deve a uma acção do FDNB na ATP sintase, de acordo com os resultados sugeridos nas experiências descritas anteriormente (Tabela 3.1 e Tabela 3.4). Estes resultados apoiam a acção inibitória de FDNB na subunidade β da F_1 -ATP sintase, observada anteriormente por Andrews e Allison (1981) e Matsuno-Yagi e Hatefi (1984).

Considerando a diferente magnitude do efeito inibitório do FDNB no complexo II [analisado de forma dependente (Figura 3.3) ou independentemente (Figura 3.5) da cadeia respiratória], bem como a insensibilidade do complexo IV (Figura 3.6), podemos concluir que o complexo III também é afectado pela sonda com sensibilidade idêntica ou pouco menor que a do complexo II.

Por sua vez, como em condições de operatividade exclusiva dos complexos II, III e IV não encontramos sensibilidade elevada à sonda, podemos assumir que o complexo I é o responsável pela alta sensibilidade ao FDNB observada quando o transporte de electrões envolve toda a cadeia respiratória.

A diferente sensibilidade dos complexos respiratórios mitocondriais ao aminoreagente FDNB foi confirmada por adição sequencial de diferentes substratos e diferentes concentrações de FDNB (Figura 3.8). Na presença de glutamato/malato, a inibição da actividade respiratória por 0,25 mM de FDNB, não levantada por FCCP, foi superada por adição de succinato, confirmando que a alta sensibilidade à sonda está no complexo I. Por sua vez, a actividade respiratória suportada por succinato necessitou de uma concentração maior de FDNB (1 mM) para ser inibida, sendo seguidamente levantada por ascorbato.

Estes resultados indicam que a nível dos complexos II e III, se verifica uma menor sensibilidade à sonda, enquanto que o complexo IV se mostra completamente insensível a ela. A resposta ao inibidor cianeto mostrou que o complexo IV estava operativo na presença de 1,25 mM de FDNB.

Em experiências realizadas na presença do desacoplador FCCP, verificamos que a acção do FDNB na actividade da cadeia respiratória é potenciada na presença de ADP. Provavelmente, este nucleótido facilita o acesso da sonda aos grupos amínicos reactivos nos complexos respiratórios, de acordo com resultados anteriores obtidos a nível de membranas de retículo sarcoplasmático (Vale, 1981) reagindo com FDNB na presença do nucleótido ATP. Nestas condições, poder-se-ia pensar que a maior inibição da actividade respiratória no estado 3 relativamente ao estado 4, poderia reflectir uma maior inibição da cadeia respiratória na presença dos nucleótidos em vez de uma acção a nível da ATP sintase. Contudo, a acção inibitória do FDNB no estado 3 de mitocôndrias a respirar em condições de insensibilidade da cadeia respiratória (operatividade exclusiva do complexo IV) leva-nos a concluir que a ATP sintase (complexo V) é, de facto, afectada por FDNB. Contudo, resultados obtidos por Ting e Wang (1980) mostram que os nucleótidos ADP e ATP protegem a F_1 -ATPase da inactivação por FDNB, o que implica que na mitocôndria intacta, a sua sensibilidade (estado 3) ao FDNB será menor do que a que se observaria na ausência dos nucleótidos (Ting e Wang, 1980).

Relativamente ao potencial eléctrico desenvolvido através da membrana interna da mitocôndria durante o transporte de electrões ao longo da cadeia respiratória, verificámos que este foi reduzido na presença de FDNB. A redução do potencial foi gradual e mais ou menos lenta conforme a concentração da sonda de acordo com os efeitos do FDNB na actividade respiratória. De facto, uma diminuição no transporte de electrões implica uma diminuição no efluxo de protões e, conseqüentemente uma diminuição no potencial de membrana.

Estas experiências mostram que grupos amínicos, provavelmente os grupos amínicos ϵ de resíduos de lisina, são importantes a nível dos locais activos das enzimas componentes dos complexos respiratórios mitocondriais. A diferente sensibilidade à sonda deve reflectir uma diferente acessibilidade dos grupos amínicos ao aminoreagente FDNB.

No decurso deste trabalho verificámos que a utilização de FDNB longos períodos após a sua dissolução em dimetilsulfóxido produzia efeitos opostos relativamente aos que descrevemos, isto é, a actividade respiratória era estimulada em vez de ser inibida. Este efeito estimulatório observou-se para concentrações muito baixas ($\sim 20\mu\text{M}$), tendo-se

verificado ser devido ao desacoplamento entre o processo oxidativo e fosforilativo. De facto, nestas condições não havia resposta do consumo de oxigénio relativamente à adição de ADP (estado 3).

Esta acção desacopladora aumentou com a concentração da sonda até cerca de 60 μM . Para além desta concentração, observou-se um efeito inibitório (Figura 3.12), mas sempre em mitocôndrias desacopladas (Figura 3.11).

Estes resultados indicam que uma solução de FDNB armazenada implica uma conversão do composto aminoreagente num composto desacoplador. De facto, neste caso, o potencial foi drasticamente reduzido pela sonda (Figura 3.14) e, além disso, tal como outros desacopladores, altas concentrações induzem inibição do sistema, provavelmente devido, não a uma reacção da sonda com grupos amínicos, tal como vimos anteriormente, mas, devido a perturbações estruturais a nível da membrana mitocondrial.

A hipótese de alteração do composto FDNB num composto desacoplador foi confirmada através da análise dos espectros de absorção óptica (Figura 3.15) que variaram gradualmente ao longo do tempo até atingir uma forma única, com espectro idêntico ao do dinitrofenol.

Esta observação revelou-se de grande utilidade pedagógica para mostrar que o rigor do método científico implica um procedimento experimental cuidadoso para evitar o aparecimento de resultados artificiais que não reflectem a realidade dos factos em estudo.

5 - CONCLUSÕES

GERAIS

5. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho estudámos as alterações na bioenergética mitocondrial associadas à presença do aminoreagente FDNB.

* Os complexos respiratórios enzimáticos I, II e III são afectados pelo FDNB, sendo o complexo I aquele que revela maior sensibilidade ao aminoreagente.

* O complexo respiratório IV é insensível ao FDNB nas concentrações testadas.

* A presença de ADP potencia a acção do FDNB na cadeia respiratória, provocando uma diminuição mais rápida na taxa de consumo de oxigénio.

* O complexo V, ATP sintase, também revelou sensibilidade à sonda, sendo inibido para concentrações superiores a 0,2 mM.

* A solução de FDNB preparada em dimetilsulfóxido sofre alteração química com o tempo, sendo convertida em dinitrofenol que actua como desacoplador.

Assim, poderemos concluir que grupos amínicos situados no local catalítico são importantes para a catálise efectuada pelos complexos I, II, III e ATP sintase, uma vez que a sua função é inibida parcial ou totalmente, na presença do FDNB.

6 - REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of The Cell*. Fourth edition, Garland Science, New York.

ANDREWS, W. W. and Allison W. S. (1981) 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene modifies a tyrosine residue when it inactivates the bovine mitochondrial F₁-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**: 813-819.

BERG, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2002) *Biochemistry*. 5th edition, W. H. Freeman and Company, New York.

BERNARDI, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. and Lisa, F. D. (1999) Mitochondria and cell death – Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, **264**: 687-701.

CAMPOS, L. S. (1999) *Entender a Bioquímica*. 2^a edição, Escolar Editora, Lisboa.

COOPER, G. M. (2000) *The Cell - A Molecular Approach*. Second edition, ASM Press, Washington.

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

CSORDÁS, G., Thomas A. P. and Hajnóczky, G. (1999) Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *The EMBO Journal*, **18**: 96-108.

DEVLIN, T. M. (1997) Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. Fourth edition, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New York.

ESTABROOK, R. W. (1967) Mitochondrial Respiratory Control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. *Meth. Enzymol.* **10**: 41-47.

GARRETT, R. H. and Grisham, C. H. (1995) Biochemistry. International Edition, edited by Saunders College Publishing, Orlando.

GODIN, D. V. and Garnett, M. (1976) Perturbational Effects of Inorganic Cations on Human Erythrocyte Membranes. *J. Membrane Biol.*, **28**: 143-168.

GORDESKI, S. E. Marinetti, G. V. and Love, R. (1975). The reaction of chemical probes with the erythrocyte membrane. *J. Membrane Biol.* **20**: 111.

GREEN, D. R. and Reed, J. C. (1998) Mitochondria and Apoptosis. *Science*, **281**: 1309-1316.

GREENSTEIN, B., Greenstein, A. (1996) Medical Biochemistry at a Glance. Blackwell Science, Cambridge.

HADAD, N., Feng, W. and Shoshan-Barmatz, V. (1999) Modification of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel with dinitrofluorobenzene. *Biochem. J.*, **342**: 239-248.

HAJNÓCZKY, G., Hager, R., and Thomas, A. P. (1999) Mitochondria Suppress Local Feedback Activation of Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptors by Ca²⁺. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**: 14157-14162.

HAJNÓCZKY, G., Csordás, G., Madesh, M. and Pacher, P. (2000) Control of apoptosis by IP₃ and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell Calcium*, **28**: 349-363.

HARRIS, D. A. (1995) Bioenergetics at a Glance. Blackwell Science, Cambridge.

HENGARTNER, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**: 770-776.

HEYTLER, P. G. (1963) Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones. I. Some Characteristics of *m*-Cl-CCP Action on Mitochondria and Chloroplasts. *Biochemistry*, **2**: 357-361.

JOUAVILLE, L. S., Ichas, F., Holmuhamedov, E. L., Camacho, P. and Lechleiter, J. D. (1995) Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*, **377**: 438-441.

JOZA, N., Susin, S. A. , Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y. J., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H.-Y. M., Ravagnen, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y-Y, Mak, T. W., Zúñiga-Pflucker, J. C., Kroemer, G. and Penninger, J. M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, **410**: 549-554.

KAMO, M., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, Y. (1979) Membrane Potential of Mitochondria Measured with an Electrode Sensitive to Tetraphenyl Phosphonium and Relationship Between Proton Electrochemical Potential and Phosphorylation Potential in Steady State. *J. Membrane Biol.*, **49** 105-121.

KIBERTIS, P. A. (1999) Mitochondria Make A Comeback. *Science*, **283**: 1475.

KROEMER, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M. (1998) The Mitochondrial Death/Life Regulation In Apoptosis and Necrosis. *Annu. Rev. Physiol.*, **60**: 619-642.

KROEMER, G. and Reed, J. C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*, **6**: 513-519.

LANDOLFI, B., Curci, S., Debellis, L., Pozzan, T. and Hofer, A. M. (1998) Ca²⁺ Homeostasis in the Agonist-sensitive Internal Store: Functional Interactions Between Mitochondria and the ER Measured In Situ in Intact Cells. *The Journal of Cell Biology*, **142**: 1235-1243.

LEHNINGER, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1993) Principles of Biochemistry. Second edition, Worth Publishers, New York.

LODISH, H., Berk A, Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (1999) Molecular Cell Biology. Fourth edition, W. H. Freeman and Company, New York.

MAYES, P. A (2000) The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation. *In* Harper's Biochemistry, (Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes and Victor W. Rodwell, eds.), Appleton & Lange, Stamford. 137-148.

MATSUNO-YAGI A. and Hatefi, Y. (1984) Inhibitory Chemical Modifications of F₁-ATPase: Effects on the Kinetics of Adenosine 5'-Triphosphate Syntesis and Hidrolysis in Reconstituted Systems. *Biochemistry*, **23**: 3508-3514.

MEANS, G. E., Congdon, W. I. and Bender, M. L. (1972) Reactions of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonate Ion with Amines and Hydroxide Ion. *Biochemistry*, **11**: 3564-3571.

MORENO, A. J. M. (1992) Estudo do efeito de insecticidas de uso comum na bioenergética mitocondrial. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.

POZZAN, T. and Rizzuto, R. (2000) The renaissance of mitochondrial calcium transport. *FEBS*, **267**: 5269-5273.

RIZZUTO, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A and Pozzan, T (1998) Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science*, **280**: 1763-1766.

ROBB-GASPERS, L., Burnett, P., Rutter, G. A., Denton, R. M., Rizzuto, R and Thomas A. P. (1998) Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *The EMBO Journal*, **17**: 4987-5000.

RODWELL, V. W. (2000) Peptides. *In* Harper's Biochemistry, (Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes and Victor W. Rodwell, eds.), Appleton & Lange, Stamford. 37-47.

RUTTER, G. A. and Rizzuto, R. (2000) Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection. *TIBS*, **25**: 215-220.

SALWAY, J. G. (1994) *Metabolismo at a Glance*. Blackwell Scientific publications, Oxford.

SANGER, F. (1988) Sequences, Sequences and Sequences. *Ann. Rev.Biochem.*, **57**: 1-28.

SANTOS, D. J. S. L. (2002) Stresse oxidativo mitocondrial associado a patologias: acção protectora de fármacos. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.

SARASTE, M. 1999, Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, **283**: 1488-1493.

SLATER, E. C. (1967) Application of Inhibitors and Uncouplers for a Study of Oxidative Phosphorylation. *Methods of Enzymol.*, **10**: 48-57

SZALAI, G., Krishnamurthy, R. and Hajnóczky, G. (1999) Apoptosis driven by IP₃-linked mitochondrial calcium signals. *The EMBO Journal*, **18**: 6349-6361.

TERADA, H., Nagamune, H., Morikawa, N. And Ikuno, M. (1985) Uncoupling of oxidative phosphorylation by divalent cationic cyanine dye. Participation of phosphate transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, **807**: 168-176.

THORLEY-LAWSON, D. A. and Green, N. M. (1980) Reaction of 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene and 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic Acid with Membranes of Sarcoplasmic Reticulum. *Biochem. J.*, **185**:223-226.

TING, L. P. and Wang, J. H. (1980) Functional Groups at the Catalytic Site of F₁ Adenosine Triphosphatase. *Biochemistry*, **19**: 5665-5670.

TYLER, D. D., Estabrook, R. W. and Sanadi, D. R. (1966) Studies of Oxidative Phosphorylation and Energy-Linked Cytochrome *b* Reduction with Tetramethyl-*p*-Phenylene Diamine as Substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **114**: 239-251.

VALE, M. G. P. (1976) Inhibition of the Ca^{2+} -Pump Activity by Trinitrobenzenesulfonate in Sarcoplasmic Reticulum Membranes. *Ciênc. Biol.* **2**: 255-263.

VALE, M. G. P. (1977) Localization of the Amino Phospholipids in Sarcoplasmic Reticulum Membranes Revealed by Trinitrobenzene-sulfonate and Fluorodinitrobenzene. *Biochimica et Biophysica Acta*, **471**: 39-48.

VALE, M. G. P. and Carvalho, A. P.(1980) Interaction of Chemical Probes With Sarcoplasmic Reticulum Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **601**: 620-629.

VALE, M. G. P. (1980) Molecular Arrangement of Phosphatidylcholine and Sphingomyelin in Sarcoplasmic Reticulum Membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **204**: 148-152.

VALE, M. P. G. (1981) Effect of Cations and ATP on the Incorporation of Trinitrobenzenesulfonate by Sarcoplasmic Reticulum Membranes. *Ciênc. Biol.*, **6**: 193-201.

VICENTE, J. A. F., Santos, M. S. Vercesi, A. E. and Madeira, V. M. C. (1998) Comparative Effects of the Herbicide Dinitro-*o*-cresol on Mitochondrial Bioenergetics. *Pestic. Sci.*, **54**: 43-51.

VOET, D. and Voet, J. G. (1995) Biochemistry. 2th edition, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New York.

WALLACE, D. C. (1999) Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science*, **283**: 1482-1487.

WOOD, D. E. and Newcomb, E. W. (2000) Cleavage of Bax Enhances Its Cell Death Function. *Experimental Cell Research*, **265**: 375-382

YAFFE, M. P. (1999) The Machinery of Mitochondrial Inheritance and Behavior. *Science*, **283**: 1493-1497.