

ESTUDO DA AÇÃO DO COMPOSTO ORGANOTELÚRICO(IV) SOBRE A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

César H. Yokomizo¹; Felipe S. Pessoto², Rodrigo L.O.R. Cunha³; Iseli L. Nantes⁴

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: henriqueyokomizo@yahoo.com.br¹

Colaborador(Doutorando da Unifesp); email :fpessoto@terra.com.br²

Colaborador(Pesquisador da Unifesp-Campus Diadema); email: rodrigo.lor.cunha@gmail.com³

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: ilnantes@umc.br⁴

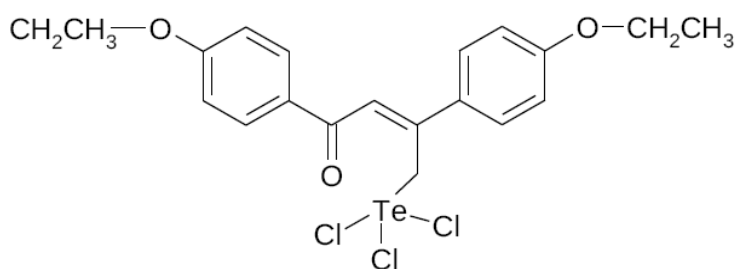
Área do Conhecimento: Bioenergética mitocondrial

Palavras-chaves : poro de transição de permeabilidade mitocondrial; RT-07c;

INTRODUÇÃO

A mitocôndria é a organela responsável pela produção da maior quantidade de ATP na célula. Além desta função, a mitocôndria também desempenha um papel fundamental na morte celular, seja por apoptose ou por necrose. Estudos demonstram que a membrana interna mitocondrial, normalmente impermeável, torna-se permeável a solutos de peso molecular maior do que 1500 Da quando ocorre a abertura de um poro denominado de poro de transição de permeabilidade (PTP). A abertura deste poro se dá de várias maneiras e pode ser decisivo no direcionamento da morte celular por apoptose ou por necrose. Oxidação de grupos SH, pH alcalino, entre outros, podem iniciar a abertura do poro. Compostos organotelúricos possuem alta reatividade com grupos SH e grande potencial para promover a abertura do PTP. Em trabalho recentemente realizado pelo nosso laboratório (Pessoto *et.al.*, 2007) foram testados os compostos RT-03 e RT-04. Realizamos os testes para o composto RT-07c(esquema 1) e seus resultados foram utilizados para comparação com os resultados obtidos para RT-03 e RT-04.

Esquema 1. RT-07c



OBJETIVOS

Em continuidade aos estudos efetuados com RT-03 e RT-04, testamos a ação do composto organotelúrico, RT-07c, sobre a bioenergética mitocondrial de modo a ter uma avaliação da relação entre a estrutura das teluranas e sua ação biológica. Para tanto avaliamos:

- Efeito da concentração de organotelúricos sobre a respiração mitocondrial. Neste caso avaliamos possíveis efeitos inibitórios sobre os sítios I, II e III da cadeia respiratória.
- Capacidade de abertura do poro de transição de permeabilidade. Abertura do poro de transição de permeabilidade é caracterizada pela oxidação de grupos

tiólicos e ocorrência de inchamento mitocondrial dependente de Ca^{2+} e fosfato e protegido por ciclosporina e agentes redutores como ditioneitol, um redutor de dissulfetos.

- Efeito da concentração do organotelúrico sobre a integridade da membrana mitocondrial.
- Efeito da concentração do organotelúrico sobre sua ação antioxidante.
- Correlação entre possível abertura do poro de transição de permeabilidade induzido por RT-07c e a ocorrência de estresse oxidativo mitocondrial.

METODOLOGIA

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos Wistar machos de aproximadamente 200g utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial (Schneider & Hogeboom, 1950). O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi analisado polarograficamente, em oxígrafo equipado com um eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.). O inchamento mitocondrial foi avaliado espectrofotometricamente, pela diminuição da absorvância em 540 nm. As suspensões mitocondriais são turvas, por isso espalham luz incidente. A permeabilização da membrana mitocondrial interna torna possível a entrada de solutos, aumentando o volume da matriz mitocondrial e diminuindo o espalhamento de luz incidente. A oxidação de grupos tiólicos é um evento que precede a abertura do poro de transição de permeabilidade. Após indução da oxidação de grupos tiólicos de proteínas, foi feita a adição de ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico), (DTNB), que sofre perda significativa de absorvância, quando em solução com menor número de grupos tiólicos, sugerindo que os mesmos sofreram oxidação ou formaram ligações cruzadas. A absorvância foi determinada em 412 nm, sendo que a concentração de grupamentos tiólicos oxidados foi calculada utilizando-se $\epsilon = 13.600(\text{M})^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Jocelyn, 1987). A fluidez da membrana mitocôndria foi medida incubando-se mitocôndrias (1 mg de proteína/ml) em meio padrão pH 7.4 a 30°C com 75 μM de ANS acrescido de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de CCCP. A fluorescência foi mensurada com espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) com excitação e emissão 380 e 485 nm, respectivamente (Lee et al., 1999). Quando ocorre oxidação das proteínas da membrana mitocondrial com conseqüente abertura do poro de transição de permeabilidade é formado um agregado protéico que pode ser visualizado em gel de eletroforese. A eletroforese das proteínas de membrana solubilizadas foi realizada em gel de poliácridamida 10% contendo SDS (SDS-PAGE). A abertura do poro de transição de permeabilidade pode ou não envolver danos à fração lipídica da membrana, que foi avaliada pela formação de MDA. Para determinação do MDA foi adicionado o ácido tiobarbitúrico (TBA) que se liga ao MDA formando um complexo MDA-TBA, que passa a ter coloração, de acordo com a quantidade de complexo formado. A concentração de MDA foi calculada a partir de um $\epsilon = 1,56 \times 10^5 (\text{moles/L})^{-1}$ (Buege & Aust, 1978).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto RT-07c possui capacidade de reagir de maneira significativa os grupos SH de proteínas mitocondriais (figura 1). A reatividade com grupos SH leva à diminuição do controle respiratório pelo aumento do estado 4 da respiração mitocondrial, provavelmente devido ao desacoplamento da cadeia respiratória. Contudo, o ataque químico de RT-07c, em concentrações acima 25 μM sobre os grupos SH é acompanhado de pequeno inchamento mitocondrial. O inchamento mitocondrial promovido por RT-07c é parcialmente inibido por CsA e exacerbado por Ca^{2+} sugerindo que existe contribuição do PTP e de poros inespecíficos no inchamento mitocondrial

promovido por RT-07c. O inchamento mitocondrial promovido por RT-07c não foi acompanhado de formação significativa de agregados protéicos condizente com uma contribuição pequena do PTP na alteração mitocondrial causada pela telurana. Estes resultados sugerem que, diferente de RT-03 e RT-04, a organotelurana RT-07c é preferencialmente um reagente monotiol de tal modo que seu ataque aos grupos SH não promove significativa formação de ligações cruzadas entre as proteínas, um efeito imprescindível para abertura do PTP. Também de forma diferente de RT-03 e RT-04, a telurana RT-07c não afetou a fluidez da membrana mitocondrial monitorada pela fluorescência da sonda ANS.

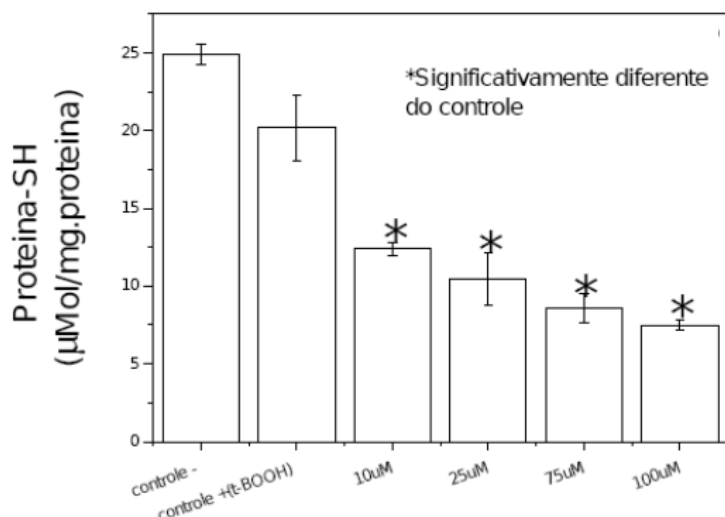


Figura 1. Efeito da concentração de RT-07c sobre grupos SH mitocondriais

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que RT-07c é um reagente monotiol que não possui a capacidade de afetar a fluidez da membrana mitocondrial, porém, perturba a cadeia respiratória (aumento do estado 4) através de alterações das proteínas mitocondriais. Apesar de RT-07c não apresentar um efeito linear no inchamento mitocondrial, este mostrou um efeito dose-dependente na oxidação de grupos SH que não é acompanhado por formação de agregados protéicos significativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buege, J.A. & Aust, S.D. – Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology** v. 52C, p.302-310, 1978.
- Jocelyn, P.C. – Spectrophotometric assay of thiols. **Methods Enzymology**, v. 143, p. 44-67, 1987.
- Lee, J., Yu, B.P. and Herlihy, J.T. – Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 26, p. 260-265, 1999.
- Pessoto, F. S., Faria, P. A., Cunha, R. L. O. R., Comasseto, J. V., Rodrigues, T. and Nantes, I. L. **Chem. Res. Toxicol.**, 20, 1453-1461, 2007.
- Schneider, W.C. & Hogeboom, G.H. – Intracellular distribution of enzymes. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. **Journal of Biological Chemistry**. v.183, p. 123–128, 1950.

Agradecimentos : FAEP-UMC, CNPQ E FAPESP.