

OXIDAÇÃO DE GRUPOS TIÓLICOS CATALISADA POR PALADACICLOS É RESPONSÁVEL PELA PERMEABILIZAÇÃO MITOCONDRIAL E LIBERAÇÃO DO CITOCROMO C

Débora Pereira Santana¹, Priscila Afonso de Faria², Antonio Carlos Fávero Caires³, Iseli Lourenço Nantes⁴, Tiago Rodrigues⁵

Estudante do Curso de Biologia; e-mail: deborapsantana@yahoo.com.br¹

Estudante do Curso de Mestrado; e-mail: priscilaafonsofaria@yahoo.com.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: caires@umc.br³

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

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: trodrigues@umc.br⁵

Área do Conhecimento: Bioenergética e metabolismo

Palavras-chaves: mitocôndria, paladaciclo, transição de permeabilidade mitocondrial, apoptose

INTRODUÇÃO

A TPM é um processo caracterizado pela abertura de um poro protéico na membrana mitocondrial, associado à apoptose (HIGUCHI, 2004), sendo que compostos são capazes de induzir este evento que pode estar associado à apoptose. Compostos paladaciclos derivados de N,N-dimetil-1-fenetilamina (dmpa) e bifosfina-1,2-bis-(difenilfosfina)etano (dppe) foram capazes de induzir a apoptose em células de melanoma em concentrações extremamente baixas, (RODRIGUES *et al.*, 2003).

OBJETIVO

Avaliar os efeitos de compostos paladaciclos, sobre a TPM em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, investigando os possíveis mecanismos de indução deste processo.

METODOLOGIA

Preparação e isolamento de mitocôndrias de fígado de rato. Ratos Wistar machos com peso menor que 200 gramas foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado foi alcançado por incisão na cavidade abdominal. Após sua remoção, o órgão foi cortado em pequenos fragmentos em meio de homogeneização contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, a 4°C, lavados no mesmo meio e homogeneizado em Potter-Elvehjen (1 ciclo com 3 passagens do pistilo). A suspensão foi centrifugada a 580g por 5 minutos e o sobrenadante, centrifugado a 10300g por 10 minutos. O sedimento resultante foi ressuspensão com 10 mL de um meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L, e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, e centrifugado a 3400g por 15 minutos. O sedimento final, contendo as mitocôndrias isoladas, foi ressuspensão com 1,0 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4. Todos os estudos com mitocôndrias energizadas foram realizados em um período máximo de 3 horas após o isolamento. A determinação da proteína foi realizada pelo método de Biureto. (CAIN & SKILLETER, 1987).

Inchamento osmótico mitocondrial. Em 1,5 mL do meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, à 30 °C, adicionado de succinato de potássio 5 mmol/L, rotenona 2,5 μ mol/L e CaCl₂ 10 μ mol/L, foi adicionado 0,4 mg de proteína mitocondrial e o inchamento osmótico mitocondrial foi avaliado pela diminuição da absorvância em 540 nm em um espectrofotômetro Hitachi

U-3000 (Tóquio, Japão), na presença de CaCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, utilizando como moduladores o α tocoferol (vitamina E), BHT e ácido úrico.

Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A geração de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias de fígado de rato foi avaliada utilizando o marcador fluorescente diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA). As mitocôndrias foram previamente incubadas por 30 minutos a 30°C com DCFDA 4 μM (equivalente à 4 nmol/mg) em um meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4. Para as medidas, as mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas em um meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, adicionado de rotenona 2 μM , succinato de potássio 5 mM e CaCl_2 10 μM e fluorescência foi determinada por 10 minutos utilizando como comprimentos de onda de excitação e emissão de 503 e 529 nm, respectivamente, em um espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Tóquio, Japão), usando 5 nm como fendas de emissão e excitação e a voltagem da lâmpada igual a 700V.

Espectroscopia de Infravermelho. As amostras das proteínas da membrana mitocondrial obtidas pelo procedimento de *freeze-thawing* foram secas e usadas para preparar uma pastilha de KBr que foi analisada por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) em um Spectrum 100 FTIR Spectrometer (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA). O espectro de infravermelho foi registrado em uma escala de 4000-400 cm^{-1} com 2 cm^{-1} de resolução e o efeito da água foi eliminado por subtração espectral. O cálculo de diferença espectral das amostras quantificadas foi realizado e utilizado na interpretação dos resultados.

RESULTADOS / DISCUSSÃO

A permeabilização mitocondrial induzida pelos paladacilos não corresponde ao processo de transição de permeabilidade mitocondrial descrito por HUNTER & HAWORTH (1979), pois no nosso caso este processo não é dependente de cálcio e também não é transitório. Por vezes, o uso do termo TPM ocorre na literatura de forma generalizada quando se observa inchamento osmótico mitocondrial e foi o que ocorreu em nosso trabalho. De acordo com a literatura, a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) ocorre pela abertura de um poro de transição de permeabilidade (PTP), cuja natureza molecular exata é ainda desconhecida, é um processo dependente de Ca^{2+} (GUNTER & PFEIFFER, 1990) e inibido por ciclosporina A (CsA) e ácido bongkréico (HALESTRAP, 1990; BERNARDI, 1992). Nossos resultados mostram que o inchamento mitocondrial promovido pelos paladacilos é independente de Ca^{2+} e sensível apenas parcialmente à CsA e ácido bongkréico (BkA) sugerindo ser uma permeabilização generalizada da membrana mitocondrial induzida por oxidação direta de grupos tiólicos (à exemplo de outros oxidantes tiólicos já descritos na literatura). Para verificar se a permeabilidade mitocondrial induzida pelos paladacilos está associada à liberação de citocromo *c* pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato, utilizamos um ensaio imunoenzimático com anticorpos anti-citocromo *c* monoclonais e a quantificação do citocromo *c* liberado foi feita com base em uma curva padrão de citocromo *c*. Então, nas mesmas condições do ensaio de inchamento osmótico mitocondrial, o composto ciclopaladado R(+)-Cl dmpa:dppe 1:1 2,5 $\mu\text{mol/L}$ foi capaz de promover a liberação de citocromo *c* (~ 74% em relação ao controle), sendo que essa liberação foi completamente inibida por DTT, indicando a correlação da abertura do PTP com a liberação de cit. *c*. Assim como nos experimentos de inchamento osmótico mitocondrial, CsA não foi capaz de prevenir a liberação de cit. *c* pelas mitocôndrias. Esses efeitos causados primariamente pela modificação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial podem ser responsáveis pelo efeito pró-apoptótico

desses compostos. Outros dados sugerem não haver participação de radicais livres no processo de permeabilização da membrana mitocondrial induzida pelos paladaciclos, uma vez que não observamos danos oxidativos aos fosfolípidos da membrana mitocondrial avaliado por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Utilizamos 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) pré-incubado com a suspensão mitocondrial para a verificação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por R(+) Cl dmpa:dppe 1:1. Nossos resultados demonstraram que o composto R(+) Cl dmpa:dppe 1:1 não induziu o aumento da fluorescência do DCF, sugerindo a não participação de radicais livres na permeabilização mitocondrial observada. Todos os controles experimentais foram realizados para verificar interferência da droga com o método, ou seja, se a droga era capaz de clivar o fluoróforo por si só ou se ocorria *quenching* de fluorescência pela droga, e nenhuma interferência foi observada, validando o método utilizado. Adotamos uma outra forma para avaliar o envolvimento de EROs na oxidação de grupos tiólicos de proteínas mitocondriais na presença de paladaciclos, uma vez que a medida com DCFDA é por muitas vezes tida como indireta, controversa e inespecífica. Dessa forma, realizamos os experimentos de inchamento osmótico mitocondrial pré-incubando a suspensão mitocondrial com alguns antioxidantes, tais como α -tocoferol (vitamina E), BHT e ácido úrico antes da adição do composto e estes não apresentaram efeito inibitório estatisticamente significativo sobre o inchamento osmótico mitocondrial induzido pelo R(+) Cl dmpa:dppe 1:1. Nossos resultados demonstram que a permeabilização mitocondrial induzida por compostos paladaciclos é decorrente de reação com grupos tiólicos críticos de proteínas da membrana mitocondrial. Para elucidar o provável mecanismo molecular da oxidação de grupos -SH por este composto, foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho das proteínas da membrana mitocondrial obtidas por precipitação nas mesmas condições experimentais dos ensaios de inchamento mitocondrial e dosagem de grupamentos tiólicos reduzidos. Amostras de proteínas da membrana mitocondrial tratadas com R(+) Cl dmpa:dppe 1:1 exibem uma banda de absorção em 474 cm^{-1} compatível com o estiramento de uma ligação dissulfeto (S-S), sendo que esse estiramento não foi observado nas amostras tratadas com DTT + R(+) Cl dmpa:dppe 1:1. Devido à complexidade e diversidade das biomoléculas que compõe a membrana mitocondrial, foi importante estabelecer se os efeitos do R(+) dmpa:dppe (1:1) sobre a mitocôndria é uma consequência exclusiva do ataque sobre os grupos sulfidrílicos. O espectro de infravermelho não é significativamente diferente entre amostras apenas com mitocôndria e amostras com mitocôndria tratadas com R (+) dmpa:dppe 1:1 na presença de DTT, sugerindo que o agente redutor DTT previne a modificação dos componentes mitocondriais pelos paladaciclos. A subtração dos espectros da mitocôndria com R(+) Cl dmpa:dppe 1:1 + DTT e amostras tratadas com apenas R(+) Cl dmpa:dppe 1:1 resultou em um espectro com uma banda de absorção em 2347 cm^{-1} designando modo de estiramento S-H de vibração normal (Bare et al., 1975), e o espectro vibracional exibido pela mitocôndria tratada com R(+) Cl dmpa:dppe 1:1, não apresentou essa banda. Estes resultados demonstram que R(+) Cl dmpa:dppe 1:1 possui uma específica ação catalítica sobre os grupos tiólicos reduzidos das proteínas da membrana mitocondrial promovendo ligações cruzadas induzindo a formação de pontes dissulfeto, responsáveis pela permeabilização da membrana mitocondrial. Dessa forma, estes resultados demonstraram que R(+) Cl dmpa:dppe 1:1 tem uma específica ação catalítica sobre grupos tiólicos reduzidos das proteínas da membrana mitocondrial promovendo a formação de pontes dissulfeto que levam à permeabilidade mitocondrial induzindo a liberação do citocromo c.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que a permeabilização mitocondrial induzida pelos compostos paladaciclos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato ocorre devido a ligação cruzada dos grupos tiólicos críticos presentes nas proteínas da membrana mitocondrial catalisada pelos paladaciclos com formação de pontes dissulfeto e é independente de Ca^{2+} e EROs, e. Uma vez que, esta permeabilização é associada com a liberação de citocromo *c* pelas mitocôndrias estes resultados podem ajudar a explicar os efeitos pró-apoptóticos exibido por estes compostos em células tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bare, G. H., Alben, J. O. and Bromberg, P. A. (1975) Sulfhydryl groups in hemoglobin. A new molecular probe at the alpha 1 beta 1 interface studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*. **14**, 1578-1583
- Bernardi, P. (1992) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. *J. Biol. Chem.* **267**, 8834 –8839
- Cain, K.; Skilleter, D.N. (1987) Preparation and use of mitochondria in toxicological research. Em: Snell, K.; Mullock, B. *Biochemical Toxicology, Oxford, IRL Press*. 217-254
- Gunter, T. E., Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*. **258**, 755-786
- Halestrap A. P, Davidson, A. M. (1990) Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine. *Biochem. J.* **268**, 153-60
- Hunter, D.R., Haworth, R.A. (1979) The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. The protective mechanisms. *Biochem. Biophys.* **195**, 453-459