

UNICAMP

Proteção da Transição de Permeabilidade Mitochondrial por Sequestradores de Óxido Nítrico

Braga, B.P.¹; Leite, A.C.R.^{1,2}; Vercesi, A.E.¹.

Departamentos de ¹Patologia Clínica e ²Fisiologia e Biofísica, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é uma permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna, induzida por excesso de Ca²⁺ intramitocondrial e estresse oxidativo. Estudos recentes deste laboratório mostraram evidências de que o estresse nitrosativo promovido tanto por altas concentrações quanto por baixas concentrações de NO ou seus derivados poderiam promover a TPM. Por outro lado, em níveis fisiológicos, NO⁻ pode prevenir a formação do poro de transição. Neste trabalho mostramos que o composto 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (CPTIO) e seu análogo PTIO são potentes inibidores da TPM em mitocôndrias de fígado, coração e cérebro de rato. Este efeito também foi observado na presença de SNAP, um doador de NO. Além disso, CPTIO e PTIO reduzem a produção de H₂O₂, mensurada pelo método AMPLEX®. O duplo efeito nas espécies reativas de nitrogênio e oxigênio sugerem que a proteção pelos sequestradores de NO ocorre pela redução da produção de peroxinitrito (ONOO⁻) pelas mitocôndrias. Efeito direto dos sequestradores de NO na cadeia respiratória ou no estado redox dos nucleotídeos de piridina não foi constatado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Mitocôndrias de Fígado de Rato - Isoladas a partir de fêmeas Wistar por centrifugação diferencial, proposta por Kaplan e Pedersen, (1983).

Procedimento padrão de incubação - Os experimentos foram realizados a 28°C em um meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de tampão HEPES, pH 7,2, e uma mistura de substratos do complexo I feita de 3,4 mM de malato, 1,7 mM de piruvato, 1,7 mM de cetoglutarato e 1,7mM de glutamato.

Consumo de oxigênio mitocondrial - Medido em um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.), em uma câmara de vidro de 1,4 ml equipada com agitador magnético e termostalizada (30 °C).

Inchamento mitocondrial - Determinado como a diminuição da turbidez da suspensão mitocondrial, medido em 540 nm no espectrofotômetro Hitachi U-3000.

Potencial elétrico de membrana mitocondrial - Utilizamos o probe Safranina O (Akerman and Wikstrom, 1976), para estimar o potencial de membrana mitocondrial através da sua fluorescência medida com um espectrofluorímetro Hitachi F4500. Temperatura: 30°C, Ex=495 nm e Em=586 nm, com agitação constante.

Transporte de cálcio por mitocôndrias - A captação de cálcio mitocondrial foi monitorada segundo a fluorescência de 0,1 μM de cálcio green-5N sal de hexapotássio (Molecular Probes) em um espectrofluorímetro Hitachi F4500. Temperatura: 28°C, Ex=506 nm e Em=513 nm, com agitação constante (Murphy et al, 1996).

Cinética da oxidação de nucleotídeos de piridina - O estado redox dos nucleotídeos de piridina na suspensão de mitocôndria (1 mg/ml) foi acompanhado em um espectrofluorímetro SHIMADZU RF-5301 usando Ex=366 e Em=450 nm, slit de 5nm (Oliveira et al, 2005).

Estimativa da produção de ROS - Monitorada espectrofluorimetricamente (Hitachi F-4500), usando o corante permeável à membrana H₂-DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 1μM) (Garcia-Ruiz et al, 1997). Fluorescência monitorada em Ex=488 nm e Em=525 nm, slit=2,5 nm.

RESULTADOS

Proteção do inchamento mitocondrial por CPTIO

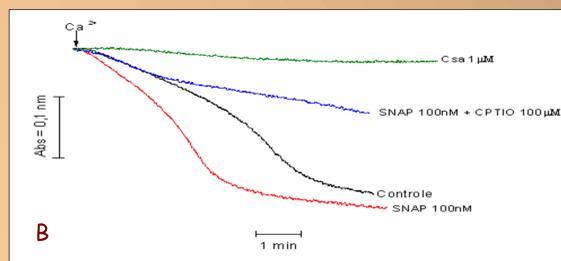
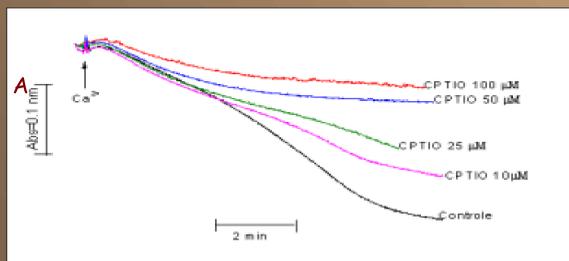


Figura 1. Painel A: As absorbâncias médias em 450 segundos foram: 0,92 ± 0,06 (CPTIO 100 μM), 0,91 ± 0,07 (CPTIO 50 μM), 0,87 ± 0,07 (CPTIO 25 μM), 0,87 ± 0,07 (CPTIO 10 μM) vs. 0,79 ± 0,09 (Controle: Ca²⁺ 15 μM). Painel B: As absorbâncias em 450 segundos foram: 0,51 ± 0,02 (SNAP 100 nM 50), 0,6 ± 0,05 (SNAP 100 nM + CPTIO 100 μM), 0,68 ± 0,07 (Ciclosporina 1 μM) vs. 0,54 ± 0,03 (Controle: Ca²⁺ 10 μM).

Transporte de Ca²⁺ e potencial de membrana na presença de CPTIO

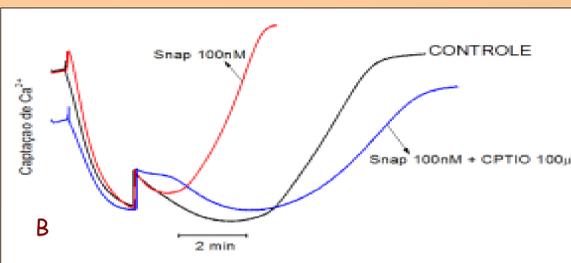
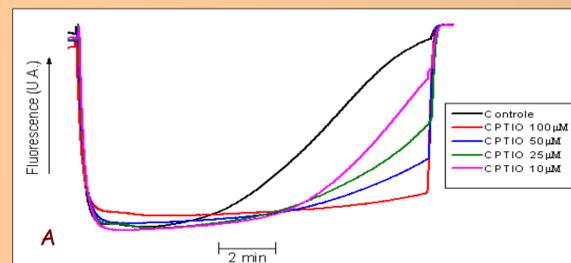


Figura 2. Painel A: Tempos médios de retenção de Δψ em minutos: 12,23 ± 1,43 (CPTIO 100 μM), 8,91 ± 3,69 (CPTIO 50 μM); 7,0 ± 3,26 (CPTIO 25 μM); 6,12 ± 2,92 (CPTIO 10 μM) vs. 4,93 ± 1,14 (Controle). Painel B: Os tempos de início da liberação de Ca²⁺ pelas mitocôndrias, em segundos, foram: 387,03 ± 79,14 (SNAP 100nM), 530,98 ± 122,69 (SNAP 100nM + CPTIO 100 μM) vs. 450,55 ± 69,10 (Controle).

Proteção da TPM em mitocôndrias de cérebro e coração de rato

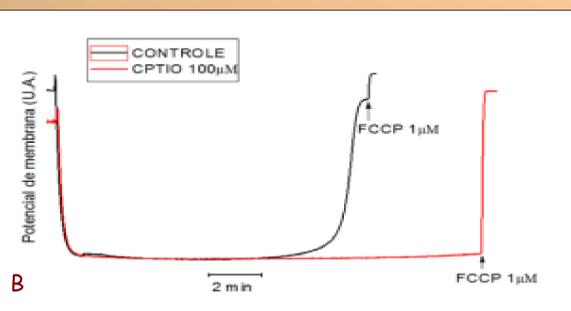
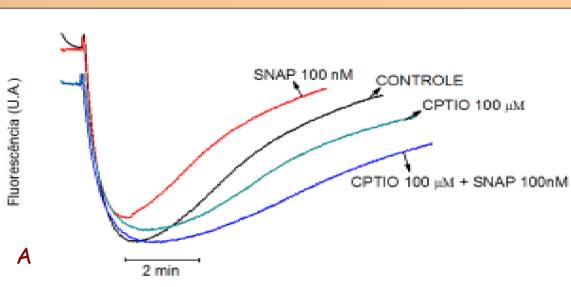


Figura 3 - Painel A: CPTIO retarda a liberação do potencial de membrana mitocondrial interna desencadeada por SNAP. Mitocôndria de cérebro de rato (0,3mg/ml) foi incubada a 30°C em meio padrão contendo 10μM de Ca²⁺. Tempos médios de retenção de Δψ em segundos: 36,47 ± 79,55 (SNAP 100nM), 252,14 ± 106,69 (CPTIO 100μM), 208,01 ± 106,45 (SNAP 100nM + CPTIO 100μM), vs. 160,6 ± 74,19 (Controle). Painel B: CPTIO retarda a liberação do potencial de membrana em mitocôndrias de coração de rato. Mitocôndrias (0,3mg/ml) foram incubadas a 30°C em meio padrão contendo 15 μM de Ca²⁺. Foi adicionado 1 μM de FCCP ao final de cada experimento. Tempos médios de retenção de Δψ em segundos: 892,58 ± 101,00 (CPTIO 100 μM) vs. 559,69 ± 115,65 (Controle).

CPTIO reduz a produção de ROS em MFR

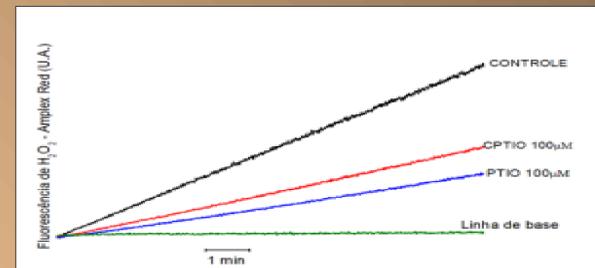


Figura 4: Os experimentos foram realizados com 0,3mg de proteína/ml, a 30°C. MFR foram incubadas em meio contendo Amplex (10 μM), na presença de HRP (1 U/mL). O controle foi estabelecido com 10 μM de Ca²⁺. As drogas CPTIO e PTIO foram utilizadas em concentrações de 100 μM. As porcentagens de redução da produção de H₂O₂ com relação ao controle foram: 42,16 ± 17,44 (CPTIO 100 μM) e 58,25 ± 8,44 (PTIO 100 μM).

Velocidade de consumo de O₂ na presença e ausência de CPTIO

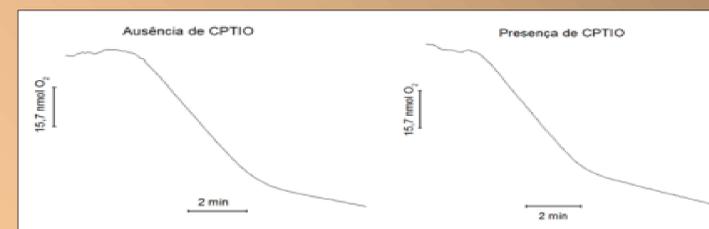


Figura 5- A figura mostra a velocidade de consumo de oxigênio na ausência e presença de CPTIO. A velocidade de consumo de fosforilação (V3) foi estimulada através de ADP 200μM, na presença de substrato para o complexo I (5mM) e EGTA (100μM). Esses resultados são representativos de 4 experimentos. A porcentagem média de redução da razão das velocidades de fosforilação e de repouso com relação ao controle foi 8,03% (± 6,56).

Estado Redox dos nucleotídeos de piridina na presença e ausência de CPTIO

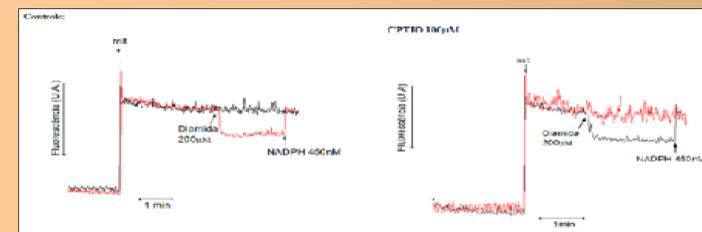


Figura 6- : Estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina na presença e ausência de CPTIO. Foi adicionado 0,1mg proteína/ml a um meio contendo rotenona 5μM, Succinato 5mM e EGTA 100μM. A Diamida (200μM) foi responsável pela oxidação do NADPH intramitocondrial, cujos níveis foram recuperados através da adição de 450nM deste nucleotídeo em sua forma reduzida. A adição de NADPH recuperou completamente a fluorescência que havia sido perdida durante a oxidação dos nucleotídeos, assim como descrito para o experimento controle.

CONCLUSÃO

Esses dados sugerem que o efeito protetor dos sequestradores de NO sobre a TPM seria causado por uma redução na produção de peroxinitrito pela mitocôndria, através de um duplo mecanismo de sequestro de NO e redução das concentrações de ROS.

Patrocinado pela

