

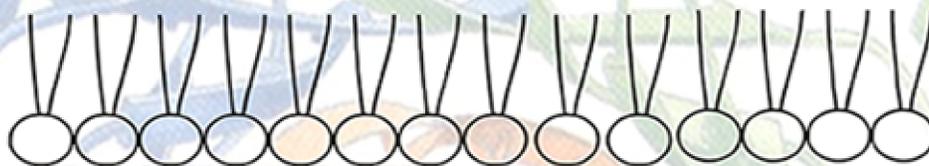
LABORATÓRIO DE OXIDAÇÕES BIOLÓGICAS



Universidade Estadual de Maringá
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas



III Curso de Inverno em
Biologia Celular e Molecular



1 a 5 de Julho de 2013

**MINICURSO: ISOLAMENTO E MEDIDAS DE ATIVIDADES DE
MITOCONDRIAS ANIMAIS E VEGETAIS: UMA ABORDAGEM
COMPARATIVA**

Alunos: Cristiane Vizzioli de Castro Ghizoni

Fernanda Lima Kagami

Franciele Neves Moreno

Gislaine Cristiane Mantovanelli

Márcio Shigueaki Mito

Sandra da Silva Silveira

Professores: Emy Luiza Ishii-Iwamoto

Clairce Luzia Salgueiro

Jurandir Fernando Comar

1. A compartimentalização celular

Uma das características das células eucarióticas é que as vias metabólicas estão compartimentalizadas em várias organelas subcelulares. O entendimento da fisiologia celular não pode, evidentemente, prescindir de experimentos com células inteiras ou mesmo grupos de células. No entanto, é verdade também que somente a separação dos diversos componentes pode fornecer os dados primários indispensáveis para uma correta interpretação dos dados obtidos de experimentos com células intactas. A separação das diversas frações celulares, por outro lado, depende de técnicas de centrifugação.

1.1. Fracionamento celular

A separação dos componentes celulares pode ser obtida por centrifugação fracionada. Esta técnica baseia-se no uso sucessivo de diferentes velocidades de centrifugação as quais, por sua vez, geram diferentes acelerações centrífugas. A velocidade necessária para obter a sedimentação de determinada fração subcelular pode ser previamente determinada com base nos valores dos coeficientes de sedimentação de cada fração.

Os valores dos coeficientes de sedimentação, em geral expressos como unidades de 10^{-13} s que são conhecidas como Svedberg (S), podem ser determinados previamente em uma centrífuga analítica ou através de dados disponíveis na literatura especializada. Este coeficiente é proporcional ao tamanho e forma da partícula, portanto, partículas com alto coeficiente de sedimentação (massa maior) sedimentam com rotações relativamente menores.

O isolamento das frações celulares por centrifugação fracionada só é possível se as células forem rompidas e separadas, um procedimento denominado homogeneização. Os homogenatos de tecidos animais ou vegetais contém as frações subcelulares em suspensão, enquanto que os componentes solúveis estão em solução.

2. A mitocôndria

Durante uma experiência em 1898 o cientista alemão Carl Brenda pode distinguir centenas de corpos minúsculos no citoplasma, através da membrana de uma célula, os quais denominou *mitochondria*, palavra grega que significa filamentos de cartilagem. Nem ele ou outro cientista daquela época deu às mitocôndrias a devida importância, eles apenas sabiam que elas existiam e que faziam parte de uma célula. Em

1910, os cientistas estavam mais bem equipados para ver através das paredes de uma célula e examinar as funções das células vivas. Muitos cientistas suspeitavam que as mitocôndrias forneciam energia para as células. Em 1920, os cientistas tinham determinado que a mitocôndria era a usina de força que fornecia mais de 90% da energia de que a célula precisa. O verdadeiro progresso para o entendimento de suas funções ocorreu, no entanto em 1948, graças aos procedimentos desenvolvidos para isolar estas organelas na forma intacta. Por razões técnicas, muitos estudos bioquímicos foram conduzidos com mitocôndrias purificadas do fígado. Cada célula hepática contém entre 1000 a 2000 mitocôndrias, que grosseiramente, ocupam um quinto do volume celular total.

Uma mitocôndria é composta por duas membranas delimitando dois espaços distintos: matriz mitocondrial e o espaço intermembranas. A matriz mitocondrial contém uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas que convertem piruvato e ácidos graxos em acetil-CoA e aquelas que oxidam Acetil-CoA em CO_2 através do ciclo do ácido cítrico. Essas reações de oxidação produzem NADH e FADH_2 .

A cadeia respiratória utiliza a energia derivada do transporte de elétrons para bombear prótons (H^+) para fora da matriz criando um gradiente eletroquímico transmembrana. O qual inclui tanto a contribuição de um potencial de membrana como uma diferença de pH. A grande quantidade de energia livre liberada quando o fluxo de H^+ flui de volta para a matriz (através da membrana interna) fornece a base para a produção de ATP na matriz por uma notável máquina protéica – a ATP sintase. O gradiente eletroquímico transmembrana também promove o transporte ativo de metabólitos selecionados através da membrana mitocondrial interna, incluindo uma eficiente troca ATP-ADP entre a mitocôndria e o citosol que mantém o estoque de ATP celular. A alta razão resultante de ATP em relação aos seus produtos de hidrólise torna a variação de energia livre extremamente favorável, permitindo que essa reação de hidrólise direcione um grande número de processos dependentes de energia.

2.1. Principais características das mitocôndrias de tecidos animais

As mitocôndrias de tecidos animais medem de 0,7 a 1,0 micrometro e possuem diferentes formatos dependendo do tecido a partir do qual foram isoladas e também do meio de suspensão utilizado. Uma das características mais importantes é seu sistema duplo de membranas. A membrana externa é permeável a solutos de baixo peso molecular (menores que 10 kDa) devido a presença de poros formados por proteínas

chamadas porinas. A membrana interna possui maior área superficial devido a numerosas cristas, tem baixa permeabilidade a solutos polares e íons (incluindo prótons) e é também o sítio de transdução de energia.

A matriz mitocondrial possui muitas proteínas, DNA e ribossomos. Entre as proteínas estão as do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (exceto a succinato desidrogenase), da β -oxidação dos ácidos graxos, do metabolismo de alguns aminoácidos e glicose, entre outras. Os estoques de NAD^+ e NADP^+ são separados do citosol enquanto os nucleotídeos de adenina, ATP e ADP comunicam com o citosol por meio de carreadores específicos.

A cadeia respiratória da mitocôndria de mamíferos é formado por cinco complexos polipeptídicos, localizados na membrana interna: complexo I (NADH-UQ oxidorreductase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (UQH₂-citocromo *c* oxidoreductase), complexo IV (citocromo *c* oxidase) e complexo V (F₀F₁ ATP sintase). A cadeia respiratória transfere elétrons do NADH para o oxigênio, o acceptor final, e a energia da diferença de potencial redox (1,1 V) é usada para criar um gradiente eletroquímico de prótons. Este gradiente resulta da extrusão de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV. A dissipação do gradiente de prótons, que retornam à matriz através do complexo V, é acoplada à síntese de ATP, preservando a energia da oxidação dos substratos. Em mitocôndrias do tecido adiposo marrom, um tecido presente em recém-nascidos e animais adultos hibernantes, uma proteína chamada termogenina permite que os prótons retornem à matriz mitocondrial sem passar pelo complexo V, desacoplando o fluxo de prótons da geração de ATP, de modo que a energia é dissipada na forma de calor.

2.2. Principais características das mitocôndrias de tecidos vegetais

As mitocôndrias vegetais possuem características muito similares às mitocôndrias animais (tamanho e forma), assim como sua função celular principal é o fornecimento de energia na forma de ATP, oxidando substratos de cadeia carbônica (glicídios e lipídeos). Os complexos enzimáticos presentes na membrana interna também são semelhantes: quatro complexos (I-IV) envolvidos no transporte de elétrons e o complexo FoF₁ ATP sintase (ou complexo V) que fosforila ADP em ATP.

Nas mitocôndrias vegetais existem complexos enzimáticos adicionais envolvidos na oxidação de substratos (L-malato, glicina e NAD(P)H endógeno) e um sistema NAD(P)H desidrogenase associado com a face externa da membrana interna da

mitocôndria. Existe também um complexo enzimático com componentes redox alternativo aos existentes denominado oxidase alternativa, cujo papel fisiológico não está bem estabelecido, mas com evidências que esteja associada à produção de calor para realização de diversos eventos no organismo vegetal: amadurecimento e senescência dos frutos, germinação de sementes, exalação de produtos voláteis entre outras coisas.

3. A cadeia respiratória

A cadeia respiratória na membrana mitocôndria interna contém três complexos enzimáticos respiratórios principais através dos quais os elétrons fluem do NADH para o O_2 . Cada um desses complexos é capaz de bombear H^+ quando os elétrons são transportados através deles. Nestes complexos os elétrons são transferidos através de uma série de carreadores de elétrons ligados à proteína, incluindo centros de heme e de ferro-enxofre. A energia liberada, quando os elétrons fluem de níveis de energia mais baixos e mais altos, é utilizada para dirigir as alterações alostéricas em cada um dos complexos enzimáticos da respiração que bombeiam os prótons. Os carreadores de elétrons móveis, ubiquinona e citocromo c, completam a cadeia transportadora de elétrons ao mediar o transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos. A via de fluxo dos elétrons é: $NADH \rightarrow$ complexo da NADH-desidrogenase \rightarrow ubiquinona \rightarrow complexo do citocromo b- c_1 \rightarrow citocromo c \rightarrow complexo da citocromo oxidase \rightarrow oxigênio molecular (O_2).

Os complexos enzimáticos respiratórios acoplam o transporte de elétrons energeticamente favorável com o bombeamento de H^+ para fora da matriz mitocondrial. Este resultante é utilizado para sintetizar ATP pela ATP-sintase, por meio do qual os prótons H^+ fluem de volta para a matriz.

3.1. Os inibidores e os desacopladores ajudam a entender o funcionamento da mitocôndria

A sequência de eventos na cadeia de transporte de elétrons foi elucidada por meio do uso de inibidores específicos e mais tarde confirmada pela medida do potencial redox padrão dos componentes redox. A taxa de consumo de O_2 por uma suspensão de mitocôndrias é uma medida sensível da atividade da cadeia de transporte de elétrons. Os compostos que inibem o transporte de elétrons incluem a rotenona (uma toxina vegetal

usada por índios da Amazônia para envenenar peixes e usada também como inseticida), o amital (um barbitúrico), a antimicina A (um antibiótico) e o cianureto, por exemplo.

A adição de rotenona ou amital a uma suspensão de mitocôndrias causa bloqueio do transporte de elétrons no complexo I, a antimicina A bloqueia o complexo III e o cianureto bloqueia o transporte de elétrons no complexo IV. Cada um desses inibidores interrompe o consumo de O_2 . O consumo de oxigênio reinicia-se após a adição de substâncias cujos elétrons entram na cadeia de transporte após o bloqueio. Por exemplo, a adição de succinato a mitocôndria bloqueada pela rotenona restaura o transporte de elétrons e o consumo de O_2 . Durante este curso realizaremos experimentos dessa maneira, com inibidores do transporte de elétrons que permite revelar o ponto de entrada de elétrons a partir de vários substratos.

Mitocôndrias supridas com succinato respiram e sintetizam ATP apenas quando o ADP e o Pi forem adicionados. A adição subsequente de oligomicina, que inibe a ATP sintase, bloqueia tanto a síntese de ATP quanto a respiração. Nos últimos anos, compostos como o 2,4-dinitrofenol (DNP) tem sido relacionados com o desacoplamento do transporte de elétrons e à síntese de ATP. O DNP liga prótons do espaço intermembranas, difunde-se através dela e libera os prótons na matriz, atuando como um ionóforo transportador de prótons. Assim, o transporte de elétrons segue livremente mesmo quando a síntese de ATP está inibida. Na década de 1920 o DNP foi usado como “pílula dietética”, uma pratica eficiente na indução da perda de peso, mas que apresenta efeitos colaterais fatais. Hoje em dia o uso do DNP como desacoplador se limita aos experimentos laboratoriais, como os que serão realizados durante este curso.

3.2. A mitocôndria como alvo da ação de fármacos e produtos naturais

As mitocôndrias são importantes alvos da ação de compostos químicos, como fármacos ou fitoterápicos, porque muitas destas substâncias podem provocar ruptura da membrana mitocondrial ou ainda inibir a função mitocondrial através de diferentes mecanismos. As drogas podem seqüestrar a coenzima A ou podem inibir as enzimas da β -oxidação, da transferência de elétrons ao longo da cadeia respiratória, ou a ATP sintase. As drogas também podem destruir o DNA mitocondrial, inibir a sua replicação, diminuir os transcritos mitocondriais, ou dificultar a síntese de proteínas mitocondriais. Muitas vezes, um único medicamento tem muitos efeitos diferentes sobre a função mitocondrial. Nos animais, por exemplo, uma deficiência grave da fosforilação oxidativa hepática compromete a formação do ATP, levando a disfunção celular ou

necrose. Também pode secundariamente inibir a β -oxidação, causando assim esteatose, e pode também inibir o catabolismo de piruvato, levando a acidose láctica. Todos esses efeitos apresentam conseqüências devastadores que podem levar ao coma e a morte. Assim novas moléculas usadas em terapias devem sempre ser avaliadas quanto a possíveis efeitos mitocondriais.

4. Medidas polarográficas de consumo de oxigênio

O estudo das funções mitocondriais ganhou grande impulso a partir do momento em que se tornou possível seguir de modo contínuo variações na concentração de oxigênio em um meio contendo mitocôndrias ou partículas mitocondriais em suspensão. O que tornou isso possível é um dispositivo polarográfico que muitas vezes recebe o nome de “eletrodo de oxigênio”. O tipo de eletrodo mais usado atualmente é o chamado Eletrodo de Clark.

O Eletrodo de Clark possui um fio de platina no centro (catódio) e um anel de prata (anódio) que circunda a platina. Revestindo o terminal há uma membrana de teflon que é fixada por um anel de borracha, sendo que, entre a membrana de teflon e o terminal coloca-se uma solução saturada de cloreto de potássio que serve como ponte eletrolítica entre os dois metais. Quando uma diferença de potencial é aplicada entre os dois metais (em geral 0,6 e 0,8 volt, polo negativo para a platina), o oxigênio é reduzido na superfície da platina, de acordo com as seguintes reações:



A soma das semirreações acima resulta em:



Dentro de certa faixa de polarização e concentração de oxigênio, o fluxo de elétrons, isto é, a corrente elétrica gerada, é proporcional a concentração de oxigênio.

Para ser utilizado, o sensor de oxigênio deve entrar em contato com a suspensão de mitocôndrias. O sistema de incubação da Universidade Estadual de Maringá é um dispositivo de acrílico com duas câmaras. Na câmara externa circula água termostaticada que permite o controle da temperatura durante os experimentos. A câmara interna contém a suspensão mitocondrial ou qualquer outro material biológico cujo consumo de oxigênio se queira estudar. O sensor de oxigênio é fixado de forma que o lado terminal revestido pela membrana de teflon fique em contato com a suspensão. Todo o conjunto é colocado sobre agitação para facilitar a difusão de

oxigênio na superfície da membrana. A câmara interna é fechada com uma tampa que possui um orifício interno que permite a adição de mitocôndrias, substratos, drogas, etc. À difusão de oxigênio por esse orifício é desprezível.

4.1. A avaliação da velocidade de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas

Quando o meio de reação contendo substrato é adicionado, a corrente gerada é a máxima possível para a concentração de oxigênio de uma solução aquosa saturada com ar. A 37°C isto corresponde a 190 μM ; a 25°C a solubilidade aumenta para 240 μM . Esta corrente máxima é chamada de G.

Quando mitocôndrias isoladas forem adicionadas ao meio de reação adequado (solução isosmótica tamponada) na câmara de incubação contendo substrato, haverá transformação do oxigênio em solução e será possível detectar uma queda progressiva na corrente através do polarógrafo. Inicialmente, haverá baixa velocidade de consumo de oxigênio pelo fato de que a concentração de ADP endógeno é bastante baixa, já que não há utilização de ATP nas condições de incubação. Este estado inicial pode ser chamado de velocidade inicial ou estado II.

A prova de que o ADP realmente é o fator limitante pode ser confirmado pelo fato de que a sua adição ao sistema de incubação provoca imediatamente um grande aumento na velocidade de consumo de oxigênio. Esta fase ativada da respiração é chamada de estado III e não dura muito. Na verdade a respiração permanece ativada apenas enquanto houver ADP para ser fosforilado. Desta forma, assim que todo ADP adicionado exogenamente tenha sido fosforilado, a respiração volta ao estado anterior de baixo consumo de oxigênio. Esta fase posterior pode ser chamada de estado IV, enquanto que, a capacidade de retorno a esta situação de menor consumo de oxigênio é chamada de controle respiratório (RC, *respiratory control*).

Conforme foi dito, o polarógrafo registra variações de corrente que são proporcionais à concentração de oxigênio. Estas variações de corrente podem ser avaliadas através de um registrador potenciométrico acoplado ao polarógrafo. O registrador nos fornece um registro gráfico com a correspondente deflexão referente ao consumo de oxigênio no interior da câmara. A velocidade de consumo de oxigênio pode então ser calculada desde que a solubilidade do oxigênio a uma determinada temperatura seja conhecida, sendo que este valor, correspondente ao G, foram mencionados anteriormente.

5. Isolamento de mitocôndrias animais

O isolamento de frações subcelulares, a partir de tecidos animais, é uma técnica bastante difundida. As frações purificadas (mitocôndrias, peroxissomos, microsomos e vesículas de membrana plasmática), podem ser utilizadas para o estudo de atividades enzimáticas, associadas ou não, a fenômenos de transportes. Um dos tecidos mais amplamente utilizados como fonte destas frações, é o fígado. O interesse pelo isolamento de frações subcelulares a partir de fígado de rato vem crescendo muito, não só pela facilidade com que estas frações podem ser obtidas, comparando com outros tecidos, mas também pela importância do fígado no controle do metabolismo de carboidratos, como órgão alvo da ação drogas, hormônios e em fenômenos envolvidos em alterações fisiopatológicas como a falência geral dos órgãos.

5.1. Procedimentos para o isolamento de mitocôndrias animais

Inicialmente, passaremos a descrição do meio de isolamento de mitocôndrias:

Obs. Para todos os meios deve-se utilizar água deionizada.

Solução estoque	Volume a ser adicionado (mL)	Concentração final (mM)
Manitol 0,5 M	100	200
Sacarose 1,0 M	19	76
Tris 1,0 M, pH 7,4	0,5	2
EGTA 0,2 M	0,25	0,2
PMSF 2 M	0,25	0,1
H ₂ O q.s.p 250 ml*	130	

Adicionar albumina bovina livre de ácidos graxos (FFA – *free fatty acids*) a uma concentração final de 50 mg% (0,125g em 250 ml). Acertar pH para 7,4.

As mitocôndrias serão obtidas pela homogeneização do fígado no meio de isolamento acima (0 a 4°C) utilizando-se um homogeneizador Dounce.

O homogeneizado será filtrado e em seguida será centrifugado a 536 g (2.200 rpm) em centrífuga refrigerada. O sobrenadante será coletado e centrifugado a 7.080 g (8.000 rpm). O sedimento passará por dois ciclos de lavagens, por ressuspensão e recentrifugação do sedimento a 6.392 g (7.600 rpm), as mitocôndrias serão ressuspensas no mesmo meio, até concentração protéica de cerca de 40 a 50 mg/ml.

5.2. Determinação do consumo de oxigênio por polarografia

Para a realização destes ensaios, o seguinte meio de reação deve ser preparado:

Solução estoque	Volume a ser adicionado (mL)	Concentração final (mM)
Manitol 0,5 M	25	250
KCl 1,0 M	0,5	10
TRIS 1,0 M, pH 7,4	0,5	10
EGTA 0,2 M	0,25	0,2
Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4	2,5	5,0
H ₂ O q.s.p 50 ml*	21,25	

Adicionar albumina bovina (FFA) a uma concentração final de 50 mg% (0,025g em 50 mL). Ajustar pH para 7,4. Incubar alíquotas da suspensão mitocondrial (1,0 a 1,5 mg) em 2,0 mL do meio de reação (mantido em banho-maria 37°C) na câmara de incubação termostaticada acoplada ao sensor de oxigênio.

Após estabilização do registro, acrescentar um substrato oxidável: 40 µl de succinato 0,5 M ou 40 µl de β-hidroxibutirato 0,5 M (concentração final = 10 mM).

Acompanhe o consumo de oxigênio através do registrador potenciométrico. Esta é a respiração inicial (ou estado II) e deve ser bastante lenta.

Em seguida, adicionar 5 µl de ADP 50 mM (0,25 µmoles). Com a adição do ADP, inicia-se o estado III da respiração, que apresenta maior velocidade de consumo de oxigênio. Quando todo ADP adicionado tiver sido consumido, a respiração volta a ficar lenta, caracterizando o estado IV da respiração mitocondrial.

6. Procedimentos para o isolamento de mitocôndrias vegetal

O isolamento das mitocôndrias será realizado a partir de raízes primárias de *Glicine max* (soja) crescidas por 72h em folha dupla de papel Germitest configurados em rolos, acondicionados em tubos e mantidos no escuro em câmara de germinação (BOD).

Vinte gramas de raízes das plântulas serão seccionadas e então colocadas em 200 ml de meio de extração.

Reagente	Volume para 200 ml	Concentração Final
Manitol 0,5 M	160 ml	0,4 M
Tris 1,0 M	10 ml	50 mM
EDTA 0,1 M	2 ml	1,0 mM
MgCl ₂ 1,0 M	0,2 ml	1,0 mM
Cisteína	0,2 g	1,0 mg/ml
Albumina bovina livre de ácidos graxos	1,0 g	5,0 mg/ml

Obs.: Adicionar a cisteína ao manitol e esperar dissolver. Somente após os demais reagentes deverão ser acrescentados.

O material obtido deve ser homogeneizado por 10s, com auxílio de mixer e filtrado através de várias camadas de gaze. O pH da solução será ajustado para 7,2 com adição de KOH e então centrifugado a 1000 g (3500 rpm) por 10 min. O sobrenadante contendo as mitocôndrias será centrifugado novamente a 15.000 g (12500 rpm) por 10 minutos. O sedimento resultante deste processo deve ser suspenso em 2 mL de meio de suspensão. Os procedimentos serão realizados em temperatura de 0-4 °C.

Reagente	Volume para 5 ml	Concentração Final
Manitol 0,5 M	3 ml	0,3 M
EDTA 0,1 M	50 µl	1,0 mM
Hepes 0,5 M	200 µl	20 mM
Albumina bovina livre de ácidos graxos	0,01 g	2,0 mg/ml

. Completar com água destilada até o volume final de 5 ml, acrescentar albumina e acertar o pH para 7,2 (HCl ou KOH). Deixar gelar.

6.1. Determinação da atividade respiratória de mitocôndrias isolada de *Glicine max*

O consumo de oxigênio das mitocôndrias isoladas será medido polarograficamente, a 25°C.

Reagente	Volume para 150 mL	Concentração Final
Manitol 0,5 M	120 mL	0,4 M
Tris 1,0 M	1,5 mL	10 mM
Fosfato de potássio monobásico 0,1 M	7,5 mL	5,0 mM
MgCl ₂ 1,0 M	0,75 mL	5,0 mM
Albumina bovina livre de ácidos graxos	1,5 g	10,0 mg/mL

Completar com água destilada até o volume final de 150 mL, acrescentar albumina e acertar o pH para 7,2 (HCl ou KOH). Deixar gelar.

O meio de reação será adicionado à câmara de acrílico (2 mL). Será adicionado quantidades de mitocôndria de modo a se obter de 1,4 a 1,6 mg de proteína mitocondrial. As avaliações relacionadas ao consumo de oxigênio iniciará pela adição de L-malato 10 mM + NAD⁺ 50 mM ou NADH 1,0 mM. A respiração basal é representada pelo consumo de oxigênio dos primeiros 5 minutos aproximadamente. ADP 160 µM será adicionado iniciando a respiração do estado III. O estado IV da respiração é considerado como o consumo de oxigênio após a exaustão do ADP adicionado. A razão ADP/O e o controle respiratório foram calculados de acordo com Chance & Williams (1955). Para a discriminação da respiração via citocromo-oxidase (COX) e respiração via oxidase alternativa utilizou-se o inibidor KCN 1 mM.

7. Dosagem de proteínas

Na determinação do teor de proteínas serão utilizados o reativo A (30 mg de Na₂CO₃, 4 g de NaOH em 1000 mL de H₂O destilada), o reativo B (CuSO₄. 5H₂O a 2%), o reativo C (tartarato de sódio a 4%) e o reativo D (reagente de Folin Ciocalteau 1 N).

No dia do experimento, misturar os reativos **a**, **b** e **c**, na seguinte ordem e volumes: 0,1 ml de **b**, 0,1 ml de **c** e 10 ml de **a** (**rigorosamente nesta ordem**).

Diluir a mitocôndria 200 vezes (995 µL de água + 5 µL da suspensão mitocondrial).

Adicionar em tubos de ensaio (triplicata, exceto o branco).

	Branco	Padrão	Amostra
Água	100 µL	-	-
Padrão	-	100 µL	-
Amostra diluída	-	-	100 µL
Mistura reativa	1000 µL	1000 µL	1000 µL
AGITAR CADA TUBO E AGUARDAR 10 MIN. (AMBIENTE)			
Folin 1N	100 µL	100 µL	100 µL
AGITAR CADA TUBO E AGUARDAR 10 MIN. (AMBIENTE)			

Após os 10 minutos em temperatura ambiente, realizar a leitura das amostras e padrão, em espectrofotômetro a 700 nm, contra o branco.

A concentração de proteína será calculada com base na absorbância encontrada no padrão de albumina 20 % de acordo com Lowry *et al.* (1951).

8. Ação de inibidores, drogas e desacopladores, tanto em mitocôndrias animais como vegetais.

- 8.1. Verificar a ação dos inibidores clássicos rotenona e cianeto;
- 8.2. Verificar a ação do desacoplador 2,4-dinitrofenol
- 8.3. Verificar o efeito da oligomicina
- 8.4. Verificar os possíveis efeitos de pineno

9. Avaliações da velocidade de consumo de oxigênio, controle respiratório (RC) e razão ADP/O

9.1. Velocidade de consumo de oxigênio:

A velocidade da respiração deve ser calculada em nmol de oxigênio consumido por minuto por miligrama de proteína (**nmoles. min⁻¹.mg⁻¹**), considere a solubilidade do oxigênio no ar como sendo igual a **190 μM** a 37°C.

G (cm) -----190x10⁻⁶ M

V (cm)-----x M

x M (x 2x10⁻³) ⇒ volume de incubação (2 ml)

x moles/min.mg de proteína⁻¹ (dividir pela mg de proteína adicionada)

= nmoles. min⁻¹.mg⁻¹

9.2. Determinação do controle respiratório (RC):

RC é o indicador do controle da fosforilação

O coeficiente de controle respiratório (RC) é calculado pela seguinte relação:

$$RC = \frac{\text{velocidade de consumo O}_2 \text{ no estado III}}{\text{velocidade de consumo O}_2 \text{ no estado IV}}$$

O consumo de O₂ no estado III é definido como a respiração durante a fosforilação do ADP adicionado; o consumo de O₂ no estado IV é a respiração após o ADP adicionado ter sido consumido.

9.3. Determinação da razão ADP/O:

Razão ADP/O é a estequiometria entre o número de moléculas de ADP fosforiladas por átomo de oxigênio consumido.

$$\text{Razão ADP/O} = \frac{\text{ADP adicionado}}{\text{consumo extra de O}_2 \text{ durante o estado III}}.$$

Razão ADP/O - É indicador da integridade da membrana.

Para isto será necessário calcular o nº de moles de ADP adicionado:

nº de moles = $M \times V$ (L), sendo que foram adicionados 5×10^{-6} L de uma solução de ADP com concentração de 50×10^{-3} M.

Portanto:

$$\text{nº de moles} = (50 \times 10^{-3}) \times (5 \times 10^{-6})$$

$$\text{nº de moles} = 2,5 \times 10^{-7}$$

Número de átomos-grama

$$G \text{ (cm)} \text{ -----} 190 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{Distancia entre Est. III e Est. IV (cm)} \text{-----} x \text{ M}$$

$$x \text{ M} (x 2 \times 10^{-3}) \Rightarrow \text{volume de incubação (2 ml)}$$

$$\text{nº de moles} = x \text{ moles (x2)} \Rightarrow \text{átomos de O}_2$$

$$\text{nº de átomos-grama} = Y$$

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.C. *Biologia molecular da célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. *Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular*. 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

PESSAYRE, D.; FROMENTY, B.; BERSON, A.; ROBIN, M.A.; LETTÉRON, P.; MOREAU, R.; MANSOURI, A. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev.* ; 44(1):3 4-87, 2012.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L. Técnica de centrifugação e fracionamento celular. In: Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (ed). *Métodos de Laboratório em Bioquímica*, Manole Ltda: São Paulo, pp. 77-101, 2003.