



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de concentração: Biologia Celular e Molecular



**VI CURSO DE INVERNO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR DO PBC
25 A 29 DE JULHO DE 2016**



Inscrições e mais informações:
www.pbc.uem.br



Avaliação Trienal
Conceito 5

A mitocôndria vegetal como sítio de ação de potenciais bioherbicidas

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, dependeu e ainda depende de técnicas de centrifugação.

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 contêm as frações subcelulares em suspensão, enquanto que os componentes solúveis estão em solução.

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*, da palavra grega que significa filamentos de cartilagem. Ele e nenhum outro cientista daquela época deram às mitocôndrias a devida importância, o que se sabia apenas que elas existiam e que faziam parte da 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 acreditavam que as mitocôndrias eram 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 1.000 a 2.000 mitocôndrias, que grosseiramente, ocupam um quinto do volume celular total.

A mitocôndria realiza a maior parte das oxidações celulares e produz uma grande quantidade de ATP para as células. Uma mitocôndria é limitada por duas membranas concêntricas e seu principal componente de trabalho é o espaço mais interno (a matriz) e a membrana interna que o circunda. 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 grandes quantidades de NADH (e de FADH_2)

A cadeia respiratória utiliza a energia derivada do transporte de elétrons para bombear prótons (H^+) para fora da matriz para criar 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, uma máquina acopladora reversível entre o fluxo de prótons e a síntese ou hidrólise do ATP. 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 altamente carregado. 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 da célula.

Principais características das mitocôndrias de tecidos animais

As mitocôndrias de tecidos animais medem de 0,7 a 1,0 micrometros 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, com a membrana externa e a interna. 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 e além de ter baixa permeabilidade a solutos polares e íons (incluindo prótons) 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 e 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 um carreador específico.

A cadeia respiratória da mitocôndria de mamíferos é uma associação de mais de vinte carreadores de elétrons agrupados em quatro complexos enzimáticos: complexo I (NADH-UQ oxidorreductase), complexo II (succinato desidrogenase) complexo III (UQH₂-citocromo *c* oxidoreductase) e complexo IV (citocromo *c* oxidase). O complexo V é a ATP-sintase (F₀F₁ ATP sintase) e todos os complexos estão localizados na membrana interna mitocondrial. A cadeia respiratória transfere elétrons do NADH para o oxigênio, o aceptor final, e a energia da diferença de potencial redox (1,1V) é usada para criar um gradiente eletroquímico de prótons que então guia a síntese de ATP. O gradiente de prótons 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 de 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.

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 eletros são transportados através deles. Nestes complexos os eletros 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 utilizado 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-c₁ \rightarrow citocromo c \rightarrow complexo da citocromo oxidase \rightarrow oxigênio molecular (O_2).

O acoplamento do transporte de elétrons energeticamente favorável ao bombeamento de H^+ para fora da matriz cria um gradiente eletroquímico de prótons. 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 por outro complexo protéico transmembrana, a ATP-sintase. Por meio do qual os prótons H^+ fluem de volta para a matriz.

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, devido ao seu efeito no consumo de O_2 , 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.

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 P_i 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 tem sido relacionados com o desacoplamento do transporte de elétrons e à síntese de ATP. O DNP liga prótons do espaço intermembranas e 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 prática 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.

A mitocôndria como alvo da ação de fármacos e produtos naturais

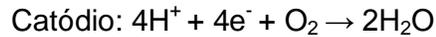
As mitocôndrias são importantes alvos da ação de compostos químicos, como fármacos ou fitoterápicos, porque muitas destas substâncias podem provocar ruptura da membrana mitocondrial ou ainda inibir a função mitocondrial através de diferentes mecanismos. As drogas podem seqüestrar coenzima A ou podem 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 levam ao coma e a morte. Assim novas moléculas usadas em terapias devem sempre ser avaliadas quanto a possíveis efeitos mitocondriais. Ao longo deste curso iremos investigar os possíveis efeitos de drogas sintéticas e extratos vegetais, que estão sendo utilizados pelo nosso laboratório sobre a mitocôndria.

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 as variações na concentração de oxigênio em um meio contendo mitocôndrias ou partículas mitocondriais em suspensão. O que tornou isso possível foi 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 Clarck.

O Eletrodo de Clarck possui um fio de platina no centro (catódio) e um anel de prata (anódio) que circunda a platina, que assoma rente a superfície terminal. 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 (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.

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 190µM; a 25°C a solubilidade aumenta para 240µM. 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.

Isolamento de mitocôndrias animais e vegetais

O isolamento de frações subcelulares, a partir de tecidos animais, é uma técnica bastante difundida. As frações purificadas (mitocôndrias, peroxissomos, microsossomos 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 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.

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.

Além disso, 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 etc.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos de germinação, respiração e extração de mitocôndria serão realizados nos laboratórios de oxidações biológicas e esteatose experimental da Universidade Estadual de Maringá – PR.

2.1. Isolamento e atividade respiratória de mitocôndria vegetal

Material biológico

As sementes de *Zea mays* foram compradas comercialmente.

Isolamento de mitocôndria vegetal

O isolamento das mitocôndrias será realizado a partir de raízes primárias de *Z.mays* crescidas por 120 horas após a semeadura em folha tripla de papel

germitest configurados em rolos, acondicionados em tubos e mantidos em câmara de germinação, com temperatura constante de 25 °C no escuro.

As raízes das plântulas serão lavadas em água destilada, suas raízes primárias seccionada em segmentos de 1 cm e então colocadas em 200 ml de meio de extração contendo a seguinte composição:

| Meio de extração | | |
|---|-------------------------------------|--------------------------------|
| Solução estoque | Volume a ser adicionado (ml) | Concentração final (mM) |
| Manitol 0,5 M | 160 | 0,4 M |
| Tris 1,0 M, pH 7,4 | 10 | 50 mM |
| EDTA 1,0 M | 2 | 1,0 mM |
| MgCl 1,0 M | 0,2 | 1 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 a dissolução os demais reagentes (exceto a albumina) deverão ser acrescentados. Completar com água destilada até o volume final de 200 ml, acertar o pH para 7,2 (HCl ou KOH), acrescentar a albumina e deixar gelar.

As raízes serão picotadas com tesoura, e em seguida, trituradas no mixer. O material triturado obtido será filtrado em gaze e o pH será acertado para 7,2 com adição de KOH e então centrifugado a 3.500 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante contendo as mitocôndrias será centrifugado novamente a 14.000 rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação retirar a camada de gordura que fica na superfície do sobrenadante. O sobrenadante será desprezado e com um pincel suspender o precipitado adicionando 0,5 ml do meio de lavagem no primeiro tubo. A suspensão (precipitado + meio de lavagem) será transferida do primeiro tubo para tubo seguinte com o auxílio de uma pipeta, assim consecutivamente. Outros 0,5 ml de meio de lavagem serão utilizados para lavar os tubos.

| Meio de suspensão | | |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Solução estoque | Volume a ser adicionado (ml) | Concentração final (mM) |

| | | |
|---|--------|-----------|
| Manitol 0,5 M | 3 | 0,3 M |
| EDTA 1,0 M | 50 µL | 1,0 mM |
| Hepes0,5 M | 200 µL | 20mM |
| Albumina bovina livre de ácidos graxos | 0,01 g | 2,0 mg/ml |

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

Dois tubos com gradiente de Percoll[®] deverão ser preparados. Depositar vagarosamente as soluções de Percoll[®] com uma seringa de vidro encostada no fundo do tubo, seguinte sequência: 6 ml da diluição a 13%, 6 ml da diluição a 21% e 3 ml da diluição a 45%. Observando a formação de três fases.

| Meio de gradiente | | |
|---|-------------------------|---------------------------|
| Reagente | Volume para 5 ml | Concentração final |
| Sacarose 1,0M | 12,5 ml | 0,25 M |
| HEPES 0,5 M | 1 ml | 10 mM |
| Albumina bovina livre de ácidos graxos | 0,1 g | 2,0 mg/ml |

Completar com água destilada até o volume final de 50 ml, acertar o pH para 7,2 (HCl ou KOH) e acrescentar albumina.

| Soluções de Percoll[®] | | |
|--|----------------------------|--------------------------|
| Diluição | Percoll[®] | Meio de gradiente |
| 45 % | 5,4 ml | 6,6 ml |
| 21 % | 2,5 ml | 9,5 ml |
| 13,5 % | 1,6 ml | 10,4 ml |

Preparar em béqueres de 15 ml e ajustar o pH para 7,2 (HCl ou KOH). Deixar gelar.

A suspensão (precipitado + meio de lavagem) deverá ser cuidadosamente depositada no topo do gradiente com o auxílio de uma pipeta. Liberar o material da pipeta pela parede do tubo lentamente.

Centrifugar a 8.500 rpm por 30 min. à 4 °C. Ao final da centrifugação a fração purificada fica situada num halo formado entre as soluções de 21% e 45%. Com um sugador retirar o líquido até próximo ao halo e com uma seringa

retirar a parte de baixo do halo (meio percoll + gradiente), ambos os procedimentos com muito cuidado para não desfazer o halo.

Suspender as mitocôndrias lentamente em meio de lavagem. Centrifugar a 13.500 rpm durante 15 min. a 4 °C. Desprezar o sobrenadante, coletar o sedimento que constitui a fração purificada de mitocôndria com cuidado e homogeneizar em meio de suspensão (0,5 ml ressuspendido + 0,5 ml de meio de lavagem) utilizando o homogeneizador Dounce. As mitocôndrias deverão ser mantidas em banho de gelo para a realização dos testes.

Determinação da atividade respiratória de mitocôndrias isolada de *Zea mays*

O consumo de oxigênio das mitocôndrias isoladas será medido polarograficamente, a 25°C. O meio de reação será adicionado à câmara de acrílico e é composto de:

| Meio de reação | | |
|---|---------------------------|---------------------------|
| 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 |
| KH₂PO₄ 5,0 mM | 7,5 ml | 5,0 mM |
| MgCl₂ 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, acertar o pH para 7,2 (HCL ou KOH) e acrescentar albumina. Deixar gelar.

Será adicionado quantidades de mitocôndria de modo a se obter de 1,4 a 1,6 mg de proteína mitocondrial. O conteúdo de proteína será dosado pela técnica de Bradford, da seguinte forma: três tubos serão separados para a amostra, três tubos para o padrão e três tubos para o branco. Colocar 100 µL de amostra nos tubos de amostra, 50 µL de padrão de albumina padrão 20% e 50 µL de água destilada nos tubos do padrão e 100 µL de água destilada nos tubos de branco. Nos tubos da amostra, do padrão e do branco adicionar 1000 µL do reativo de Bradford. Esperar 5 min e ler a absorbância em 595 nm.

As avaliações relacionadas ao consumo de oxigênio iniciarão pela adição de Malato 0,5 M + NAD⁺ 50 mM ou NADH 5,0 mM. A respiração basal é representada pelo consumo de oxigênio dos primeiros 5 minutos aproximadamente. ADP 50 mM 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 250 mM.

2.2. Isolamento e consumo de oxigênio de mitocôndrias animais

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 bidestilada.

| 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 | 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 de rato Wistar macho (180-200g) 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.

Procedimento para a dosagem de proteínas

Na determinação do teor de proteínas foram 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 | 100µL | - | - |
| 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 foi calculada com base na absorbância encontrada no padrão de albumina 20 % de acordo com Lowry *et al.* (1951).

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 |
| H₂O q.s.p 50 ml* | 21,25 | |

Adicionar albumina bovina (FFA) a uma concentração final de 50 mg% (0,025g em 50 ml). Acertar 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 termostatzada acoplada ao sensor de oxigênio.

Após estabilização do registro, acrescentar um substrato oxidável: 40 µl de succinato 0,5 M ou 40 µl de α-cetoglutarato 0,5 M (concentração final = 10 mM). (**Ensaio 1 e 2, ver abaixo**).

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.

No primeiro ensaio, adicionar ao final 40 µl de TMPD-Ascorbato para esgotar a quantidade de oxigênio da câmara.

Ação de inibidores e desacopladores

- Verificar a ação dos inibidores clássicos rotenona, antimicina e cianeto;
- Verificar a ação do desacoplador 2,4-dinitrofenol
- Verificar o efeito da oligomicina

Serão efetuados sete ensaios:

- | | |
|---|---|
| 1. 40uL de succinato 0,5 M 5uL de ADP 50 mM 40uL de TMPD-Ascorbato 20mM | 5. 40uL de succinato 0,5 M 10uL de Oligomicina 2mM 5uL de ADP 50mM |
| 2. 40uL de α -cetogluturato 0,5M 5uL de ADP 50mM | 6. 40uL de succinato 0,5 M 5uL de DNP 0,01M 5uL de ADP 50mM |
| 3. 40uL de α -cetogluturato 0,5M 5uL de ADP 50mM 5uL de Rotenona 2mM | 7. 40uL de α -cetogluturato 0,5M 5uL de ADP 50mM 5uL de Rotenona 2mM 40uL de succinato 0,5 M 2uL de Antimicina 1,5mM 40uL de TMPD-Ascorbato 20mM 40uL de KCN 80mM |
| 4. 40uL de succinato 0,5 M 5uL de ADP 50 mM 40uL de KCN 80mM | |

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

a) 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 μ M** a 37°C.

G (cm) -----190 x 10⁻⁶ M

V (cm)-----x M

x M

x n^o de moles -----1L

y -----2 x 10⁻³ L \Rightarrow volume de incubação (2 ml)

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

= nmoles. min⁻¹.mg⁻¹

Calculo do fator

[(190 x 2)/G(cm)]/mg de proteína

O fator já sai em nmoles. min⁻¹.mg⁻¹, portanto, para obter a velocidade de consumo de oxigênio multiplica-se a distancia medida no estado II, III e IV pelo fator e o resultado será expresso em nmoles. min⁻¹.mg⁻¹

b) 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 = velocidade de consumo O₂ no estado III
velocidade de consumo O₂ 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.

c) Determinação da razão ADP/O:

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

Razão ADP/O = ADP adicionado
consumo extra de O₂ durante o estado III

Razão ADP/O - É indicador da integridade da membrana, desta forma pode-se verificar se os prótons retornam apenas pela ATPase.

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

nº de moles = M x V (L), sendo que foram adicionados 5x10⁻⁶ L de uma solução de ADP com concentração de 50x10⁻³ M.

Portanto:

$$n^{\circ} \text{ de moles} = (50 \times 10^{-3}) \times (5 \times 10^{-6})$$

$$n^{\circ} \text{ de moles} = 2,5 \times 10^{-7}$$

Consumo extra de O_2 durante o estado III

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

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

$$x \text{ M}$$

$$x \text{ n}^{\circ} \text{ de moles} \text{ -----} 1 \text{ L}$$

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

$$n^{\circ} \text{ de moles} = y \text{ moles (x2)} \Rightarrow \text{átomos de O}$$

$$n^{\circ} \text{ de átomos-grama} = Y$$

$$\text{Sendo assim: Razão ADP/O} = 2,5 \times 10^{-7} / Y$$

REFERÊNCIAS

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

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.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R.A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. Nature. 175: 1120-1121; 1955.

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.

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