

ANA PAULA DA SILVA DE ALVARENGA SANTIAGO

**“FUNÇÃO ANTIOXIDANTE PREVENTIVA DE ATP-
FOSFOTRANSFERASES MITOCONDRIAIS EM
MAMÍFERO.”**

TESE DE DOUTORADO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO**

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Função antioxidante preventiva de ATP-fosfotransferases mitocondriais em mamífero.

Ana Paula da Silva de Alvarenga Santiago

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientação: Antonio Galina Filho

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Santiago, Ana Paula da Silva de Alvarenga

Função antioxidante preventiva de ATP-fosfotransferases mitocondriais em mamífero. / Ana Paula da Silva de Alvarenga, Santiago

--Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008.

xvii, 160 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Antonio Galina Filho

Tese (doutorado) – UFRJ, IBCCF, Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2008.

Referências bibliográficas: f. 123-140.

1. Mitocôndria 2. Hexocinase 3. Creatina cinase 4. Enzimas antioxidantes 5. Estresse Oxidativo 6. Espécies Reativas de Oxigênio 7. Rato 8. Camundongo

I. Galina, A.

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

III. Função antioxidante preventiva de ATP-fosfotransferases mitocondriais em mamífero.

Função antioxidante preventiva de ATP-fosfotransferases mitocondriais em mamífero.

Ana Paula da Silva de Alvarenga Santiago

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Banca examinadora:

Professora Denise Pires de Carvalho
Professora Adjunta/IBCCF/UFRJ

Professora Eleonora Kürtenbach
Professora Adjunta/IBCCF/UFRJ

Professor José Roberto Meyer Fernandes
Professor Adjunto/IBqM/UFRJ

Revisor:

Professor Ednildo Alcântara Machado
Professor Adjunto/IBCCF/UFRJ

Suplente Interno:

Professora Maria Cristina Machado Motta
Professora Adjunta/IBCCF/UFRJ

Suplente Externo:

Professora Monica Montero Lomeli
Professora Adjunta/IBqM/UFRJ

Orientador:

Professor Antonio Galina Filho
Professor Adjunto/IBqM/UFRJ

UFRJ-2008

O presente trabalho foi realizado no Instituto de Bioquímica Médica, CCS-UFRJ, no Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial, sob a orientação do Prof. Antonio Galina Filho, com o apoio das seguintes entidades:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)
- Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB / UFRJ).
- Programa Núcleos de Excelência (PRONEX /MCT).

"Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui outra.
Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai só
nem nos deixa sós.
Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.
Essa é a maior responsabilidade de nossa vida,
e a prova de que duas almas
não se encontram ao acaso. "

Antoine de Saint-Exupéry

Dedico essa Tese à minha família,
principalmente ao meu marido Cristiano e
aos meus pais, que não pouparam esforços
para que eu alcançasse o sucesso em mais
essa etapa da minha vida.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus essa força maior que nos conduz, por ter dado a mim, ao meu orientador e colaboradores, a confiança e a sabedoria necessárias para conduzir da melhor forma esse trabalho.

Ao meu querido orientador Prof. Antonio Galina (Tonhão) (♥♥♥♥♥♥), pela oportunidade de trabalhar com uma pessoa da qual tenho orgulho e me espelho profissionalmente. Obrigado pela paciência, pelos “puxões de orelha”, e principalmente por ter acreditado na minha capacidade profissional.

Aos professores Marcus Oliveira (♥♥♥♥♥), Fernando Bozza (♥♥♥♥♥) e Leopoldo de Meis (♥♥♥♥♥), obrigado pelo apoio e por todos os ensinamentos dados no decorrer de minha tese, por estarem sempre vibrando comigo com os resultados positivos, e por me apoiarem e me incentivarem nos momentos mais difíceis.

♥♥♥♥♥♥ Àquele que tem sido meu grande companheiro, Cristiano, que com seu amor e carinho, muito me ajudou durante toda a realização dessa tese, me incentivando, apontando meus erros e principalmente me ajudando a encontrar as soluções para os problemas que surgiam.

♥ À minha querida família, especialmente meus pais, Mariana e Wagner, meu irmão Fábio, minha tia Luiza, minhas queridas vovós,

Nair (em memória) e Jussélia, e meu sogro Luís, pelo amor e apoio sempre.

♥ À todas as crianças da minha vida, que adoçam a minha existência cada vez que dão um sorriso, Beatriz, Gabriel, Daniel e Bruno.

♥ Aos colegas do Lab. de Bioenergética Adaptativa e Fisiologia Mitocondrial: Ana Paula Pereira, Juju, Clarinha, Reinaldo, Luan, Douglas, Andressa, Wagner e Carol; pelo companheirismo, carinho e amizade sempre.

♥ Às minhas colegas Laudiene e Lilia, pelos momentos felizes que compartilhamos no Lab. de Bioenergética e a grande ajuda no começo do desenvolvimento dessa tese.

♥ À todos os amigos queridos que participaram direta ou indiretamente da confecção desse trabalho, me incentivando sempre.

♥ Às colegas Elen e Joana, que foram colaboradoras diretas no desenvolvimento dessa tese, pelo companheirismo, carinho e amizade sempre.

♥ À todos os colegas do Lab. de Bioenergética do Prof. Leopoldo de Meis, pela ajuda e carinho.

♥ Ao professor Wagner Seixas que apesar do pouco tempo de convivência sempre se mostrou muito solícito e incentivador.

ÍNDICE:

LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A mitocôndria e a fosforilação oxidativa	1
1.2 Produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria	15
1.3 Mecanismos de detoxificação de ERO da mitocôndria	23
1.4 Regulação da formação de ERO na mitocôndria	31
1.5 Cinasas mitocondriais e a geração de ERO na mitocôndria	43
2. OBJETIVOS	59
2.1 Objetivos específicos	59
3. METODOLOGIA	61
3.1. Animais e isolamento das mitocôndrias	61
3.2. Determinação da atividade de mt-HK	64
3.3. Determinação da atividade de mt-CK	65
3.4. Determinação da atividade de mt-AK	65
3.5. Determinação da atividade de MnSOD	65
3.6. Determinação da atividade de CAT	66
3.7. Determinação da atividade de GPx	66
3.8. Determinação da atividade de GR	67
3.9. Medidas de consumo de oxigênio	67
3.10. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	68
3.11. Determinação da geração de H_2O_2 mitocondrial	69
3.12. Análise estatística	70

4. RESULTADOS	71
4.1. Cinases mitocondriais na defesa antioxidante preventiva em mitocôndrias de cérebro, rim, coração e fígado de rato.	71
4.1.1 A atividade de mt-HK regula a geração de ERO nas mitocôndrias de cérebro de rato.	71
4.1.2 Efeitos da ativação das atividades de cinases mitocondriais sobre o consumo de O ₂ e a geração de H ₂ O ₂ nas mitocôndrias de diferentes tecidos de rato.	74
4.1.3 As atividades das cinases mitocondriais e das peroxidases variam inversamente em diferentes tecidos de rato.	81
4.1.4 O $\Delta\Psi_m$ e a geração de ERO são diferentemente regulados pelas atividades das cinases mitocondriais em diferentes tecidos de rato.	89
4.1.5 As atividades das peroxidases se correlacionam negativamente com a geração de H ₂ O ₂ em mitocôndrias de diferentes tecidos de rato.	95
4.2. Cinases mitocondriais na defesa antioxidante preventiva em mitocôndrias de cérebro de camundongos em desenvolvimento.	98
4.2.1 Atividades específicas da mt-HK e da mt-CK em mitocôndrias de cérebro de camundongos de diferentes idades.	98
4.2.2 Atividades específicas de mt-HK e mt-CK em diferentes frações celulares de cérebro de camundongos de 1 e 75 dias.	101
4.2.3 Capacidade antioxidante enzimática em mitocôndrias de cérebro de camundongos de diferentes idades.	103
4.2.4 A Geração de H ₂ O ₂ em mitocôndrias de cérebro é diferentemente inibida pela ativação de mt-HK e mt-CK dependendo das idades dos camundongos.	105
4.2.5 Correlação entre as taxas de geração de H ₂ O ₂ pelas mitocôndrias de cérebro de camundongo em desenvolvimento e as atividades das enzimas antioxidantes e cinases mitocondriais.	110
6. BIBLIOGRAFIA	123
ANEXO I	141
ANEXO II	142
ANEXO III	143

LISTA DE ABREVIATURAS:

Acetil-CoA – acetil coenzima A

ADP – difosfato de adenosina

AK – adenilato cinase

AMP – monofosfato de adenosina

ANT – do inglês, “adenine nucleotide translocase” - translocador de nucleotídeos de adenina

Ap5A – P^1 , P^5 - di(adenosina 5)-pentafosfato

ATP – trifosfato de adenosina

BAT – do inglês, “brown adipose tissue” - tecido adiposo marrom

BSA – do inglês, “bovine serum albumin” - soro albumina bovina

BSA FFA – do inglês, “bovine serum albumin free fatty acids” - soro albumina bovina livre de ácidos graxos

CAT – catalase

CK – creatina cinase

CoQ – coenzima Q

Cr – creatina

CTE – cadeia de transporte de elétrons

DNA – do inglês, “deoxyribonucleic acid” - ácido desoxirribonucleico

2-DOG – 2-deoxiglicose

DRP – do inglês, “dynamin-related protein” - proteína relacionada à dinamina

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA – ácido etileno glicol tetra-acético

ERO – espécie reativa de oxigênio

FAD⁺ – flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

FCCP – p-trifluorometoxifenilhidrazona carbonil cianeto
FosOx – fosforilação oxidativa
G – energia livre
GDP – guanosina difosfato
G6P – glicose-6-P
G6PDH – glicose-6-P desidrogenase
GPx – glutaciona peroxidase
GR – glutaciona redutase
Grx – glutaredoxina
GSH – glutaciona reduzida
GSSG – glutaciona oxidada
GTP – guanosina trifosfato
 H^+ – próton
HK – hexocinase
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
Mfn – mitofusina
MnSOD – manganês superóxido dismutase
mt-HK – hexocinase mitocondrial
mt-CK – creatina cinase mitocondrial
mt-AK – adenilato cinase mitocondrial
 β -NAD⁺ – β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
 β -NADH – β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
 β -NADP⁺ – β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
 β -NADPH – β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
 $O_2^{\bullet -}$ – radical superóxido
 O_2 – oxigênio
 OH^- – radical hidroxila

PCr – creatina fosfato
Pi – fosfato inorgânico
Prx – peroxiredoxina
 $Q^{\bullet-}$ – semiquinona
QH₂ – ubiquinol
RNA – do inglês, “ribonucleic acid” - ácido ribonucleico
Suc - succinato
TP – α -tocoferol
Trx – tioredoxina
TrxR – tioredoxina redutase
UCP – do inglês, “uncoupling protein” - proteína desacopladora
VDAC – do inglês, “voltage-dependent anion channel” - canal de ânions dependente de voltagem
 $\Delta\rho$ – força próton-motriz
 ΔpH – gradiente de pH
 $\Delta\Psi_m$ – potencial de membrana mitocondrial

RESUMO

Estudos recentes mostram que as atividades da hexocinase (mt-HK) e da creatina cinase (mt-CK) mitocondriais são capazes de reduzir a taxa de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) mitocondrial por um mecanismo baseado na reciclagem de ADP. Nessa tese foi determinado o papel dessas enzimas na regulação da geração de ERO mitocondrial em diferentes tecidos de rato e em cérebros de camundongos de diferentes idades, relacionando essas atividades aos níveis de enzimas antioxidantes clássicas mitocondriais. As atividades de ambas cinases foram maiores em cérebro que em outros tecidos de rato, enquanto que as atividades de catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) foram maiores nas mitocôndrias de fígado e rim. As atividades de manganês superóxido dismutase (MnSOD) não variaram entre os tecidos, com exceção das mitocôndrias de coração, onde estas são altas. A ativação das cinases mitocondriais por 2-deoxiglicose (2-DOG) e creatina (Cr) aumentou a reciclagem de ADP, e conseqüentemente a respiração, por estimular a fosforilação oxidativa. A geração de H_2O_2 induzida por succinato foi maior nas mitocôndrias de cérebro do que nas de rim e coração, e ainda menor nas mitocôndrias de fígado. O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diminuíram com a adição de 2-DOG ou Cr em cérebro e rim, mas não em fígado. A inibição da produção de H_2O_2 por 2-DOG e Cr correspondeu a quase 100% em cérebro de rato e a aproximadamente 70% em mitocôndrias de rim e coração. Em mitocôndrias de cérebro de camundongos em desenvolvimento (1 a 60 dias de vida), as atividades das cinases aumentaram com a idade, enquanto a atividade de CAT diminuiu. A geração de H_2O_2 mitocondrial, induzida por succinato, também aumenta com a idade, ficando mais susceptível às atividades das cinases. Finalmente, os resultados sugerem que as atividades da mt-HK e da mt-CK são um potente mecanismo antioxidante preventivo em mitocôndrias com baixas atividades de peroxidases, complementando as atividades das enzimas antioxidantes clássicas contra o estresse oxidativo.

ABSTRACT

Mitochondrial hexokinase (mt-HK) and creatine kinase (mt-CK) activities have been recently proposed to reduce the rate of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation through an ADP-recycling mechanism. Here, we determined the role of these enzymes in regulate mitochondrial ROS generation in different rat tissues and in the brain of mice at different ages, relating them to the levels of classical antioxidant enzymes. The activities of both kinases were significantly higher in the brain than in other rat tissues, whereas the activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) were higher in both liver and kidney mitochondria. In contrast, manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity was not significantly different among these tissues, with exception of heart mitochondria that showed high activities of this enzyme. Activation of mitochondrial kinases by addition of their substrates increased the ADP-recycling and thus the respiration by enhancing the oxidative phosphorylation. Succinate induced hydrogen peroxide (H_2O_2) generation was higher in brain than in kidney and heart mitochondria, and the lowest in liver mitochondria. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and H_2O_2 production, decreased with additions of 2-DOG (2-deoxyglucose) or Cr (creatine) to respiring brain, kidney mitochondria but not to liver. The inhibition of H_2O_2 production by 2-DOG and Cr correspond to almost 100% in rat brain and about 70% in kidney and heart mitochondria. In developing mice brain mitochondria (1-60 days after birth), mt-HK and mt-CK activities significantly increase with aging, whereas CAT displays an age-dependent decline. Mitochondrial ROS production, induced by succinate, also increased with age, becoming more susceptible to the kinases activities. Together our data suggest that mitochondrial kinases activities are potent preventive antioxidant mechanism in mitochondria with low peroxidase activities, complementing the classical antioxidant enzymes against oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A mitocôndria e a fosforilação oxidativa

As primeiras observações realizadas acerca das organelas que conhecemos atualmente como mitocôndrias datam de meados do século XIX, e foram feitas por diversos citologistas que as descreveram como elementos granulares e inclusões presentes no citoplasma de diferentes tipos celulares (LEHNINGER, 1965). Nessa época diversos nomes foram dados a essa organela, bem como lhe foram atribuídas várias possíveis funções. Algumas décadas mais tarde, após desenvolver estudos sistemáticos em células de músculo estriado, Kölliker descreveu uma disposição característica para esses grânulos no sarcoplasma dessas fibras musculares, e realizou os primeiros isolamentos dessas organelas do resto da estrutura celular, demonstrando que elas possuíam uma membrana e que inchavam quando eram colocadas em água (LEHNINGER, 1965). Daí em diante o desenvolvimento de técnicas de coloração específicas para identificação desses grânulos, por Altmann (1890), Benda (1898) e Michaelis (1890), permitiram a constatação de que esse conjunto de grânulos formava fios dentro das células, o que deu origem ao nome mitocôndria (do grego, *mitos*, filamento ou fio; e *chondros*, fibra) (Benda, 1898), e impulsionaram novos estudos buscando determinar suas funções (LEHNINGER, 1965). A observação de Benda sobre a estrutura das mitocôndrias foi confirmada anos mais tarde através do estudo de tecidos e células em cultura por microscopia ótica com contraste de fase, e pequenos filmes feitos para acompanhar o comportamento das células em cultura. Estes revelaram a existência de uma rede mitocondrial, e que as

mitocôndrias mudam constantemente de forma, tamanho e localização na célula (LEWIS e LEWIS, 1914).

Entretanto, apenas após o advento da microscopia eletrônica em meados do século XX, foi possível visualizar mais detalhadamente a estrutura dessa organela. As primeiras observações de mitocôndrias isoladas utilizando esta técnica foram feitas por Claude e Fullam em 1944 (PERKINS e MCCAFFERY, 2007), e abriram caminho para uma série de outros estudos por microscopia eletrônica visando a elucidação da estrutura e da função dessa organela.

Atualmente a estrutura da mitocôndria já se encontra bem descrita na literatura, sendo estas organelas constituídas por um sistema de membranas, que as dividem em dois compartimentos: o espaço intermembranar, localizado entre a membrana interna e a externa, e a matriz mitocondrial, densamente rica em proteínas e delimitada pela membrana interna (Fig.1 e 2) (LOGAN, 2006; MANNELLA, 2006). A membrana externa é normalmente permeável a metabólitos com peso molecular menor que 7 kDA, porém não a proteínas, o que permite determinar a permeabilização dessa membrana observando a translocação de proteínas do espaço intermembranar para o citoplasma celular. A membrana mitocondrial interna apresenta uma superfície muito maior do que a membrana externa, possuindo invaginações denominadas cristas (Fig. 1 e 2) (MANNELLA, 2006; RASMUSSEN, 1995; MUNN, 1974; MANNELLA et al, 1994; MANNELLA et al, 1997; PERKINS et al, 1997). A membrana interna é normalmente impermeável a íons e a água, sendo a sua permeabilidade medida através de métodos físico-químicos capazes de determinar a

capacidade da membrana de manter um gradiente eletroquímico ou separar solutos de baixo peso molecular.

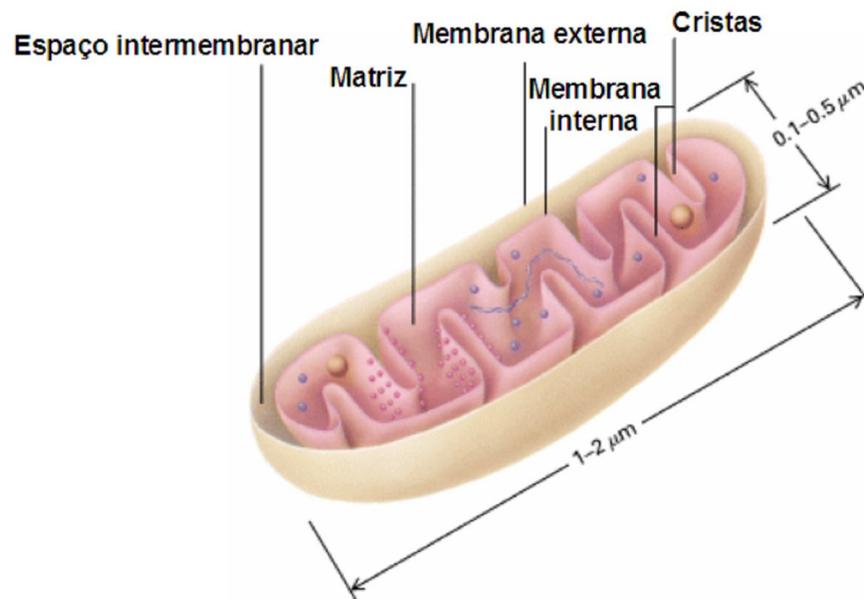
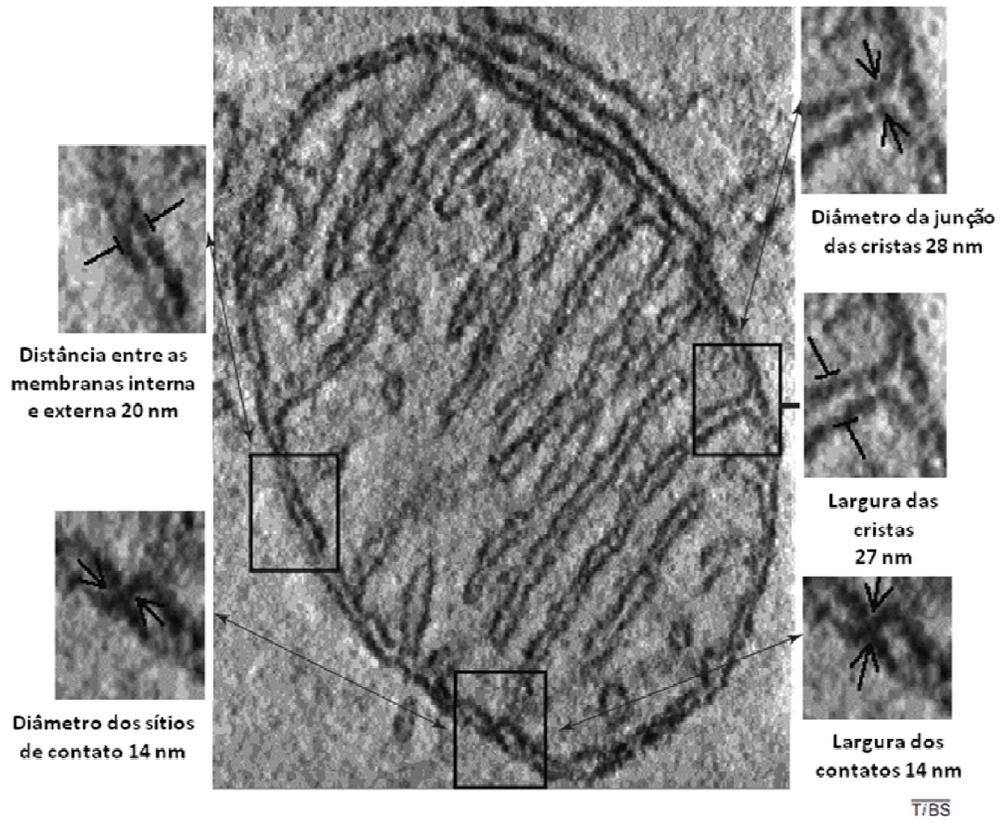


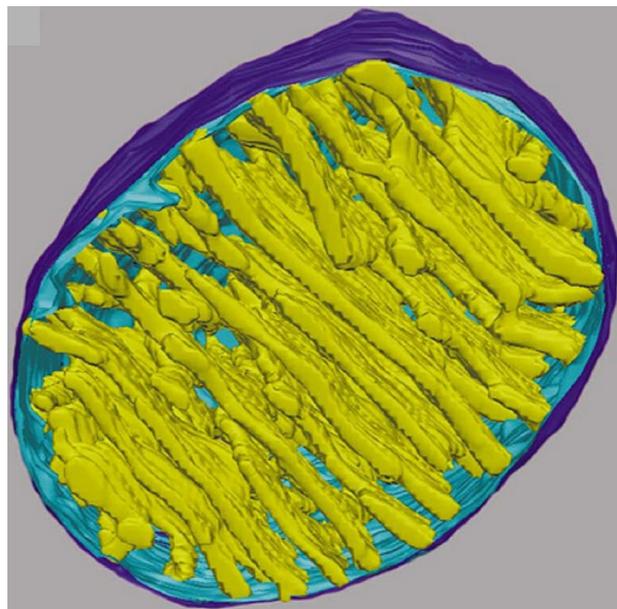
FIGURA 1. **Representação esquemática dos compartimentos da mitocôndria** (Adaptado do livro Molecular Cell Biology (207)).

FIGURA 2. Tomografia 3D com microscopia eletrônica de uma mitocôndria de cerebelo de pinto (A). Várias características estruturais dessa mitocôndria estão destacadas, identificadas e em maior aumento, com a indicação das médias de suas dimensões estimadas a partir da área completa das tomografias. **(B)** Modelo computacional gerado a partir da figura A, que mostra as cristas mitocondriais em amarelo, a membrana interna mitocondrial em azul claro e a membrana externa mitocondrial em azul escuro. (Adaptado de FREY e MANNELLA, 2001).

A



B



As mitocôndrias podem apresentar morfologias drasticamente diferentes dependendo do tipo celular onde se encontram, ou até mesmo quando estão na mesma célula. Sua forma pode variar de pequenas esferas ou bastões curtos, a longas estruturas tubulares (RASMUSSEN, 1995; MUNN, 1974; MANNELLA et al, 1994; MANNELLA et al, 1997; PERKINS et al, 1997; PERKINS e FREY, 2000; FREY e MANNELLA, 2001). Como são organelas extremamente dinâmicas, elas se movem continuamente através do citoesqueleto celular, e freqüentemente se fundem e se dividem (Fig. 3). Esses processos são importantes para a manutenção das funções mitocondriais e parecem estar relacionados com o estado metabólico das células (BENARD et al, 2007). São fundamentais também na divisão e na diferenciação celular, e durante o processo de apoptose. Ao longo da última década, diversos componentes envolvidos nessa dinâmica mitocondrial foram identificados e caracterizados funcionalmente. Isso inclui elementos da maquinaria de fusão e fissão mitocondriais, bem como proteínas responsáveis pela manutenção da sua forma tubular e motilidade, tais como GTPases, cinases e fosfatases, envolvidas também em vias de sinalização intracelular, e proteínas requeridas na manutenção da estrutura da membrana interna mitocondrial (DETMER e CHAN, 2007).

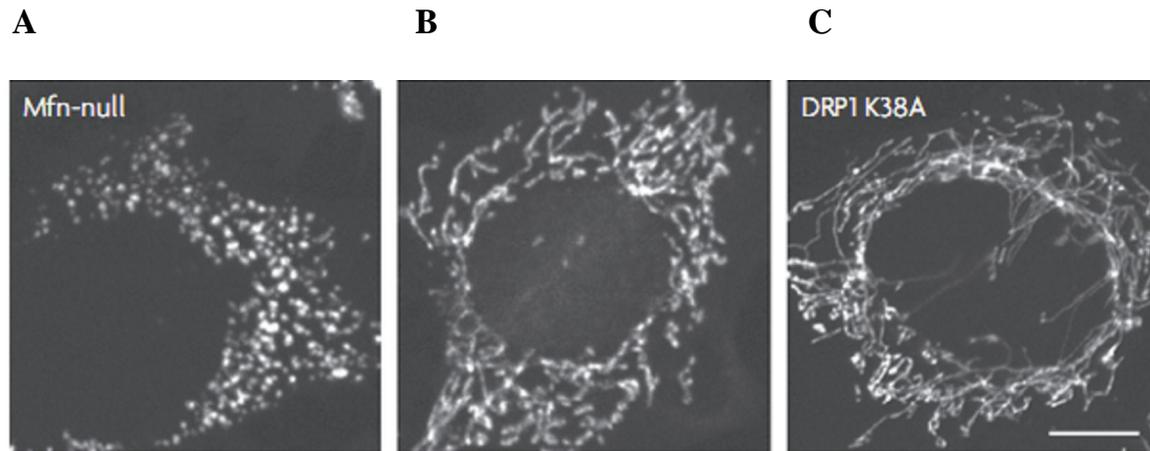


FIGURA 3. Os processos de fusão e fissão mitocondrial regulam a morfologia da mitocôndria. O comprimento, tamanho e conectividade mitocondriais são determinados pelas taxas de fusão e fissão mitocondrial. Nas células selvagens (B), as mitocôndrias formam túbulos de comprimento variável. Na ausência de fusão mitocondrial como, por exemplo, em células que não expressam mitofusina (Mfn) 1 e 2 (A), a população de mitocôndrias se encontra fragmentada. Ao contrário, o decréscimo da fissão em relação à fusão pela super expressão de DRP1, resulta em mitocôndrias muito alongadas e altamente interconectadas (C). A barra de escala corresponde a 10 μm . A morfologia mitocondrial foi monitorada por coloração com Mitotracker, e imunofluorescência utilizando anticorpo Anti-DRP1. (Adaptado de DETMER e CHAN, 2007).

Dentre as proteínas envolvidas na fusão mitocondrial em mamíferos destacam-se no mínimo três GTPases: a mitofusina 1 (Mfn1), a mitofusina 2 (Mfn2) (CHEN e CHAN, 2005; CHEN et al, 2003) e a Opa 1 (SATOH et al, 2003; CIPOLAT et al, 2004). Já o processo de fissão mitocondrial depende do recrutamento de outras proteínas, como a DRP1 (SMIRNOVA et al, 2001), uma GTPase da família das dinaminas, e a FIS1 (DETMER e CHAN, 2007; CHAN, 2006), uma proteína integral da membrana mitocondrial externa, que parece estar envolvida no recrutamento de DRP1 para os sítios de fissão.

Toda essa dinâmica estrutural da mitocôndria correlaciona-se com seus parâmetros bioenergéticos e as funções que esta organela desempenha nas células. A bioquímica da mitocôndria tem sido objeto de intensa investigação durante os últimos 60 anos, tendo sido demonstrado que esta organela desempenha um papel fundamental na manutenção de diversas atividades celulares. Dentre as diversas funções da mitocôndria podemos citar a respiração celular acoplada a síntese de adenosina trifosfato (ATP), a modulação do estado redox celular, a regulação osmótica celular, o controle do pH celular, a manutenção da homeostasia de cálcio no citosol, a síntese de DNA, RNA e proteína, o reparo de DNA, a termogênese (em alguns casos), geração e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a sinalização intracelular, além de um papel essencial no processo de apoptose (LIN e BEAL, 2006; KROEMER et al, 2007).

Grandes descobertas sobre a bioenergética mitocondrial marcaram a história da bioquímica no último século. Dentre elas podemos destacar a descrição do ciclo dos ácidos tricarboxílicos por Hans Krebs na década de 1930 (KREBS, 1940), da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação

oxidativa entre as décadas de 1950 e 1960, e a proposição da teoria quimiosmótica por Peter Mitchell em 1961 (MITCHELL, 1966).

A mitocôndria é considerada a principal organela transdutora de energia em células eucarióticas. É nesta organela que ocorre a fase aeróbica do catabolismo de hexoses, ácidos graxos e alguns aminoácidos, que são oxidados a moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) e alimentam as reações do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), gerando o potencial redutor a ser utilizado na fosforilação oxidativa (FosOx).

É na membrana interna mitocondrial que se localizam os complexos enzimáticos que formam a cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Fig. 4) (BOEKEMA e BRAUN, 2007), responsável pela respiração mitocondrial, que é o processo que oferece o maior rendimento em nível de armazenamento de energia na forma de ATP. Esse processo, conhecido como fosforilação oxidativa (FosOx) compreende reações de oxidação e redução através das quais dois aceptores de elétrons, a β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+ , forma oxidada) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD^+ , forma oxidada), que foram gradativamente reduzidos durante o catabolismo de glicose e a via de oxidação de ácidos graxos, são regenerados ao transferirem seus elétrons ao oxigênio (O_2) formando água (H_2O). Esses elétrons, porém, não são transferidos diretamente das moléculas de NADH e FADH_2 para o O_2 , sendo transportados através dos complexos protéicos inseridos na membrana interna mitocondrial formadores da CTE.

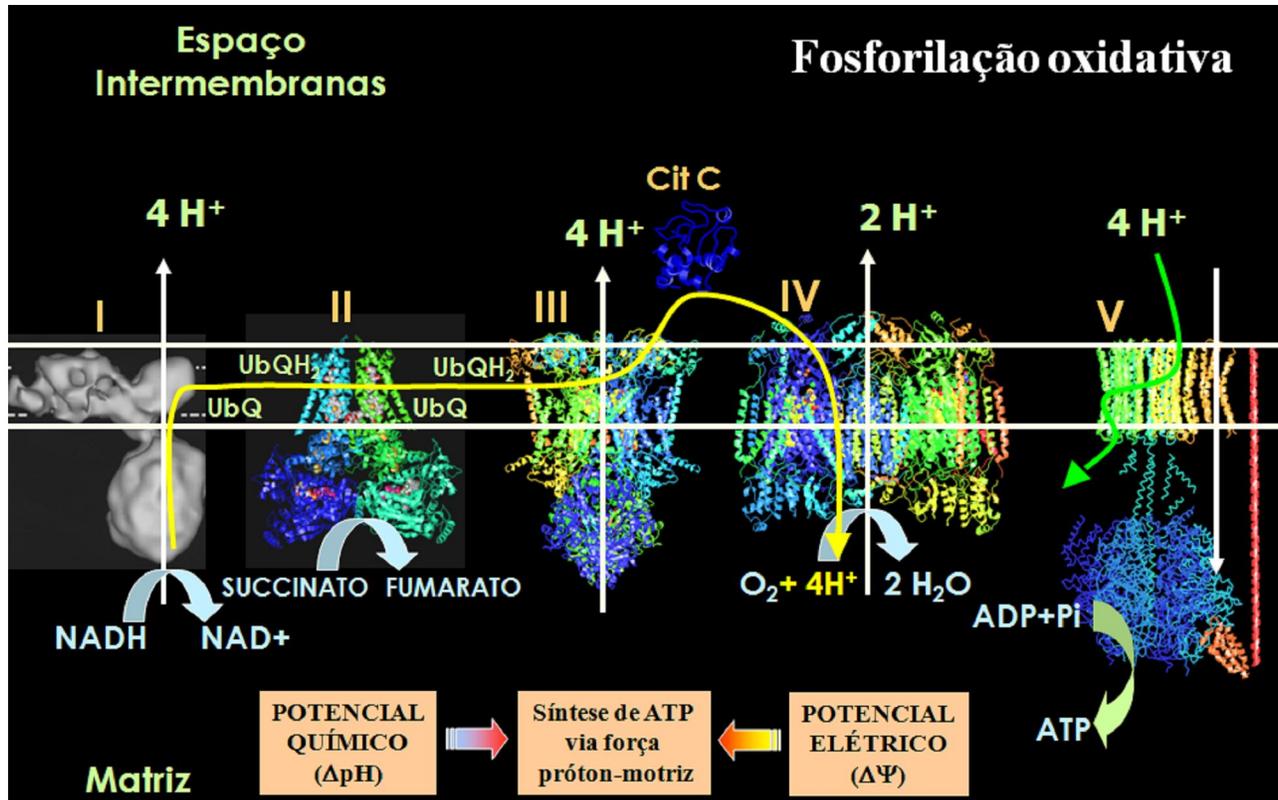


FIGURA 4. Representação da CTE localizada na membrana interna mitocondrial. Ilustração das reações da FosOx, da formação do $\Delta\Psi_m$ através do bombeamento de H^+ através do complexo I, III e IV, e da reação de síntese de ATP pela F_0F_1 ATP sintase, impulsionada pela força próton-motriz resultante da formação de um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. Os complexos estão representados em fita cristalográfica (FREY e MANNELLA, 2001).

Na maior parte dos organismos aeróbios, a CTE é composta por quatro complexos oxidoreductase: a NADH desidrogenase (complexo I), a succinato desidrogenase (complexo II), a citocromo c redutase (complexo III) e a citocromo c oxidase (complexo IV); e a F_0F_1 ATP sintase (complexo V) (Fig. 4). Esses complexos possuem tamanhos bastante variáveis, sendo formados por inúmeras subunidades e apresentando diversos grupos prostéticos (Tabela 1).

Tabela 1. Composição dos complexos oxidoreductase da CTE mitocondrial.

COMPLEXOS OXIDOREDUCTASE DA CTE MITOCONDRIAL				
Complexos enzimáticos	Massa (kDA)	Número de subunidades	Grupo(s) prostéticos	Refs.
I–NADH desidrogenase	850	43	FMN, Fe-S	PAPA et al,2002
II–Succinato desidrogenase	140	5	FAD, Fe-S	LANCASTER e KRÖGER, 2000
III–Ubiquinona: citocromo c oxidoreductase	250	11	Heme, Fe-S	ZHANG et al,1998
IV–citocromo c oxidase	160	13	Heme, Cu _A , Cu _B	STIBUREK et al, 2006

Os complexos I e II transferem elétrons do NADH ou do FADH₂ para a ubiquinona, a qual acredita-se que se difunda livremente pela membrana mitocondrial interna. O complexo III, por sua vez, transfere elétrons do ubiquinol (ubiquinona reduzida) para o citocromo c, uma pequena proteína encontrada no espaço intermembranas. Finalmente, o complexo IV transfere elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular. Três dos quatro complexos oxidoreductase acoplam o transporte de elétrons com o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas (MITCHELL, 1966; REID, 1966), são eles o complexo I, III e IV (Fig. 4). Assim, estabelece-se uma força próton-motriz ($\Delta\rho$), medida em milivolts (mV), constituída de um gradiente de pH (ΔpH) e um potencial elétrico transmembranar, também chamado de potencial de membrana ($\Delta\Psi$), que favorece energeticamente a passagem de prótons do espaço intermembranar para a matriz, e é definida pela seguinte equação:

$$\Delta\rho = \Delta\Psi - Z\Delta\text{pH}, \text{ onde } Z = (RT \ln 10) / F = 59 \text{ mV (a } 25^\circ\text{C)}$$

O componente da energia potencial mitocondrial que mais contribui para o aumento da $\Delta\rho$ é o $\Delta\Psi$, uma vez que em mitocôndrias de mamíferos que se encontram no estado não fosforilante, $\Delta\rho$ corresponde à aproximadamente 220 mV, dos quais 180 mV originam-se do $\Delta\Psi$ e apenas 40 mV do ΔpH .

O gradiente de prótons gerado é utilizado pela F₀F₁ ATP sintase (complexo V) para catalisar a formação de ATP através da fosforilação de adenosina difosfato (ADP) por um equivalente de fosfato inorgânico (P_i). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons armazenados no espaço intermembranar, então os prótons fluem de volta à matriz através da ATP sintase fornecendo a energia livre (G) necessária à síntese de ATP

(Fig. 4). A F_0F_1 ATP sintase é formada por duas porções distintas, uma ligada à membrana interna mitocondrial (F_0) que está envolvida na translocação dos prótons, e uma porção solúvel na matriz mitocondrial (F_1), responsável pela síntese ou pela hidrólise de ATP (Fig. 4). Essa enzima possui uma quantidade variável de subunidades dependendo do modelo de estudo (BOYER, 1997).

O aporte de oxigênio, a disponibilidade de potencial redutor nas formas de NADH e $FADH_2$, e a disponibilidade de ADP são os principais fatores que regulam o fluxo de elétrons pela CTE e a velocidade de síntese de ATP pela mitocôndria. Quando o complexo IV transfere os elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, completando a formação do gradiente de prótons necessário para a atividade fosforilativa da ATP sintase, acopla-se a síntese de ATP ao consumo de oxigênio. A diminuição do fluxo de elétrons através da CTE pode levar a um aumento no tempo de vida de intermediários reduzidos capazes de transferir elétrons ao O_2 sem o envolvimento da citocromo oxidase (complexo IV). Esta redução de O_2 em sítios alternativos ao do complexo IV é incompleta, favorecendo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são subprodutos altamente danosos às células.

1.2 Produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria

Em tecidos saudáveis, a mitocôndria é responsável pelo consumo de aproximadamente 90% de todo o oxigênio consumido pelo organismo. Sabe-se que uma pequena porção (1-2%) desse oxigênio é reduzido de forma incompleta e gera espécies reativas, tais como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e

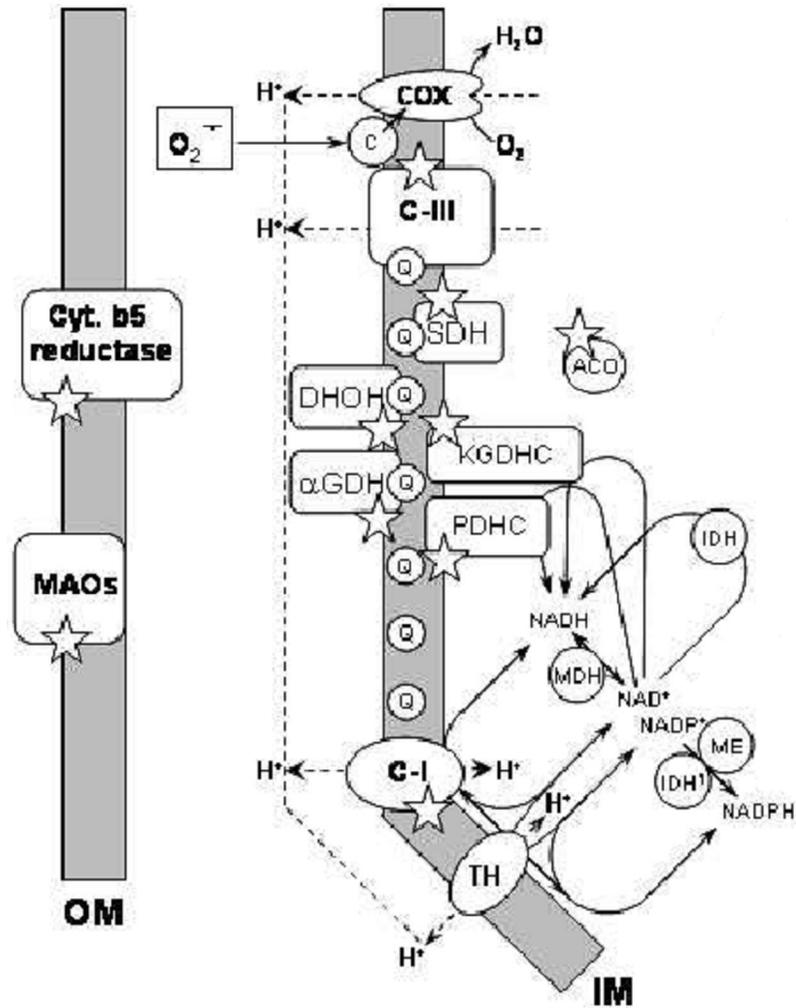
peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ANDREYEV et al, 2005; TURRENS, 2003 ; ADAM-VIZI e CHINOPOULOS, 2006).

As primeiras observações sobre produção de ERO em fragmentos de mitocôndria foram publicadas por Jensen em 1966 (JENSEN, 1966), mas passaram praticamente despercebidas até 1971 quando Loschen, Flohe e Chance (LOSCHEN, 1971) demonstraram que a adição de succinato a mitocôndrias de coração de pombos estimulava a produção de H_2O_2 . Os trabalhos seguintes do grupo de Britton Chance demonstraram sistematicamente que mitocôndrias metabolicamente competentes geram ERO (BOVERIS e CHANCE, 1973). Portanto, a geração intracelular de ERO é um processo inevitável, e até muitas vezes fisiologicamente importante (SKULACHEV, 1996) para o organismo, como por exemplo em processos celulares de defesa contra patógenos, e regulação de fatores de transcrição de genes envolvidos com o ciclo celular, onde as ERO têm uma função importante de sinalização (DROGE, 2002; BOGDAN et al, 2000).

Múltiplos sítios geradores de ERO já foram descritos em mitocôndria, nove ao todo (Fig. 5) (ANDREYEV et al, 2005), porém entre eles destacam-se dois: os complexos I e III da CTE.

FIGURA 5. Esquema ilustrando os sítios de produção de ERO na mitocôndria.

Abreviaturas: COX, citocromo c oxidase; c, citocromo c; C-III, Complexo III; SDH, succinato desidrogenase; ACO, aconitase; Q, coenzima Q; DHOH, dihidroorotato desidrogenase; KGDHC, complexo α -cetogluturato desidrogenase; α GDH, α -glicerolfosfato desidrogenase; PDHC, complexo piruvato desidrogenase; IDH, isocitrato desidrogenase, dependente de NAD^+ ; MDH, malato desidrogenase; IDH1, isocitrato desidrogenase, NADP^+ -dependente; ME, enzima málica, NADP^+ -dependente; C-I, Complexo I; TH, transidrogenase; Cyt. b5 reductase, citocromo b5 reductase; MAOs, monoamino oxidases A e B; OM, membrana mitocondrial externa; IM, membrana mitocondrial interna. As estrelas indicam os sítios de produção de ERO. (Adaptado de Andreyev et al, 2005).



Estudos mecanísticos demonstram que ainda não há um consenso sobre o sítio de produção de ERO no complexo I (Fig. 6) (LENAZ, 2001; KUSHNAREVA et al, 2002; LIU et al, 2002). Uma das hipóteses é que a reação de formação de $O_2^{\bullet-}$ por esse complexo envolva a geração de um intermediário reativo semi-reduzido, a ubisemiquinona, que seria responsável então pela redução incompleta do oxigênio molecular a superóxido (CADENAS et al, 1977), durante a reação catalizada por esse complexo enzimático de oxidação do NADH usando a coenzima Q (ubiquinona) como acceptor de elétron. Outros estudos com partículas submitocondriais e complexo I isolado, identificaram um sítio formador de ERO entre a flavina e o sítio de ligação de rotenona (inibidor específico do transporte de elétrons no complexo I) (TAKESHIGE e MINAKAMI, 1979; GENOVA et al, 2001; HINKLE et al, 1967; HERRERO e BARJA, 2000), enquanto outros estudos sugerem que haja nessa região mais de um sítio gerador de ERO (KANG et al, 1983). Já outros grupos acreditam que o ERO seja produzido pela própria flavina (LIU et al, 2002; STARKOV e FISKUM, 2003), ou especificamente por um dos seus centros ferro-enxofre (HERRERO e BARJA, 2000; GENOVA et al, 2001), ou ainda por um complexo formado por um radical NAD^+ semi-reduzido ligado à flavina (Fig. 6) (KRISHNAMOORTHY e HINKLE, 1988).

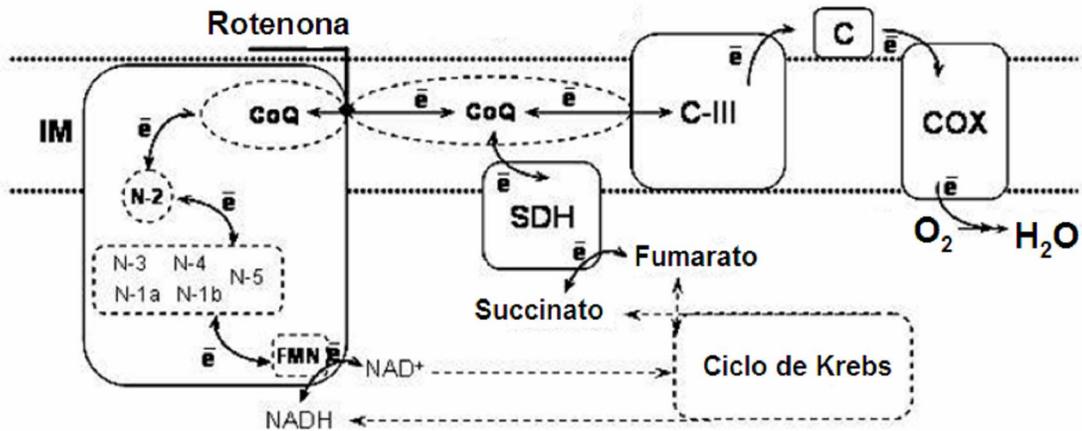


FIGURA 6. Representação da CTE, evidenciando os possíveis sítios de produção de ERO no complexo I. Abreviações: (IM) membrana mitocondrial interna; (SDH) succinato desidrogenase; (C-III) complexo III; (c) citocromo c; (COX) citocromo c oxidase; (FMN) flavina mononucleotídeo; (N-1a, N-1b, N-2, N-3, N-4, N-5) centros ferro-enxofre do complexo I; (CoQ) coenzima Q. (Adaptado de Andreyev et al, 2005).

O complexo III da CTE é um complexo enzimático que oxida a coenzima Q (QH₂) utilizando o citocromo c como aceptor de elétrons. A oxidação da coenzima Q compreende um conjunto de reações conhecido como “ciclo-Q” que é acoplado à translocação vetorial de prótons através da membrana interna, gerando potencial transmembrana (Fig. 7) (revisado em TRUMPOWER, 1990). Esse complexo é responsável por uma robusta produção de O₂^{•-} (TURRENS e BOVERIS, 1980; GRIGOLAVA et al, 1980; LOSCHEN et al, 1974; DIONISI et al, 1975; BOVERIS et al, 1976), que após isso é rapidamente dismutado enzimaticamente formando H₂O₂ (KSENZENKO et al, 1983). Esse mecanismo de produção de ERO tem sido vastamente investigado (BOVERIS e CHANCE, 1973; CADENAS et al, 1977; GRIGOLAVA et al, 1980; BOVERIS et al, 1976; KSENZENKO et al, 1983; TURRENS et al, 1985), e há um consenso de que uma semiquinona (Q^{•-}) instável formada no sítio Q_o seria a responsável pela formação de O₂^{•-}, como inicialmente sugerido por Rich e Bonner (RICH e BONNER, 1978).

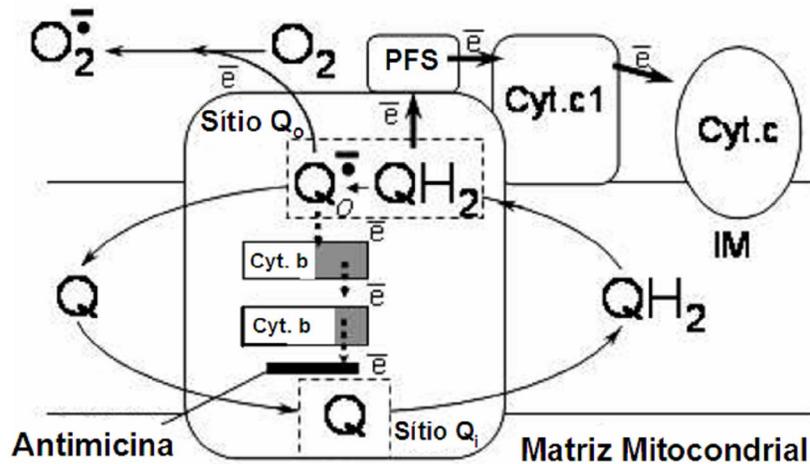


FIGURA 7. Modelo de oxidação da coenzima Q, “ciclo-Q”. Esquema ilustrando o mecanismo de produção de $O_2^{\bullet-}$ no complexo III da CTE. A reação inicia com a oxidação da CoQ quinol (QH_2) numa reação de transferência de elétrons bifurcada no sítio Q_o do complexo III. O primeiro elétron é transferido para uma cadeia com elevado potencial de redução formada por proteínas com centros ferro-enxofre (PFS), citocromo c1 e citocromo c, e posteriormente a citocromo c oxidase. A semiquinona formada é instável. É nessa etapa que pode haver o escape indevido do elétron, reduzindo o O_2 e formando o aníon $O_2^{\bullet-}$, ou a reação seguir corretamente e esse segundo elétron ser doado para a cadeia de baixo potencial de redução, formada por dois citocromos b que conduzem o elétron para o sítio Q_i . Neste sítio, estes elétrons reduzem outra molécula de CoQ. Para fornecer os dois elétrons requeridos à completa redução da CoQ quinona no sítio Q_i , o sítio Q_o oxida duas QH_2 em duas etapas sucessivas. O primeiro elétron do sítio Q_i gera uma semiquinona estável ($Q_i^{\bullet-}$) que é reduzida a quinol (QH_2) pelo segundo elétron. (Adaptado de Andreyev et. al., 2005).

Em oposição ao que ocorre nestes sítios da CTE (complexos I e III), os intermediários de oxigênio parcialmente reduzidos no complexo IV, não são liberados para o meio intracelular, e isto pode ser explicado pela presença de íons Fe^{2+} e Cu^{2+} no sítio catalítico da citocromo c oxidase que mantêm o oxigênio retido em seu interior até sua redução completa. Assim, o complexo IV não contribui para a formação de ERO pela mitocôndria.

1.3 Mecanismos de detoxificação de ERO da mitocôndria

As mitocôndrias de mamífero possuem uma variedade de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; KARIHTALA e SOINI, 2007).

Os mecanismos não enzimáticos de proteção contra ERO podem ser hidrofóbicos ou hidrofílicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Dentre os mecanismos hidrofílicos pode-se destacar o de defesa via α -tocoferol (TP), que evita a peroxidação dos lipídeos de membrana. O TP é um lipídeo solúvel que se intercala nas membranas celulares evitando a propagação da peroxidação lipídica, por reagir diretamente com o radical livre neutralizando-o. Este composto pode ser regenerado pela coenzima Q reduzida encontrada na membrana, ou por ácido ascórbico solúvel em água, na interface água/membrana (PACKER et al, 2001; LASS et al, 1999).

Como exemplos de controle antioxidante via compostos hidrofílicos, pode-se destacar a ação do ácido ascórbico (LI et al, 2001), da glutatona reduzida (GSH) (PASTORE et al, 2003; DRINGEN, 2000) e do citocromo c (HACKENBROCK et al, 1986; MCCORD e FRIDOVICH, 1970). O ácido ascórbico é encontrado em concentrações de aproximadamente 0,1 a 0,2 mM em mitocôndrias de tecidos de mamíferos, sendo capaz de reagir e

neutralizar por redução direta, diversos tipos de espécies reativas (LI et al, 2001). As mitocôndrias são sítios de regeneração do ascorbato oxidado, que é promovida pelas enzimas citocromo b5 redutase dependente de NADH, e outras desidrogenases dependentes de NADH componentes do ciclo de Krebs.

A GSH age como cofator de enzimas envolvidas na detoxificação de espécies reativas e encontra-se envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo de ácido ascórbico, e a prevenção direta da oxidação e da formação de ligações cruzadas de grupos -SH de proteínas. A GSH pode atuar também quelando íons cobre, diminuindo assim sua disponibilidade para a geração de espécies reativas (LEBOVITZ et al, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O citocromo c pode atuar como um removedor de radicais $O_2^{\bullet-}$ do meio. Sua concentração no espaço intermembranar é de aproximadamente 0,7 mM (HACKENBROCK et al, 1986) e ele pode ser reduzido pela cadeia respiratória ou por radicais $O_2^{\bullet-}$ (MCCORD e FRIDOVICH, 1970), sendo regenerado pela atividade da citocromo c oxidase.

Os mecanismos antioxidantes enzimáticos são responsáveis por lidar com o ERO primário gerado na mitocôndria, que consiste em espécies $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Dentre esses mecanismos podemos destacar a ação das seguintes enzimas: manganês superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (Fig. 8); as peroxiredoxinas (Prx, Trx) e a glutathiona-S-transferase.

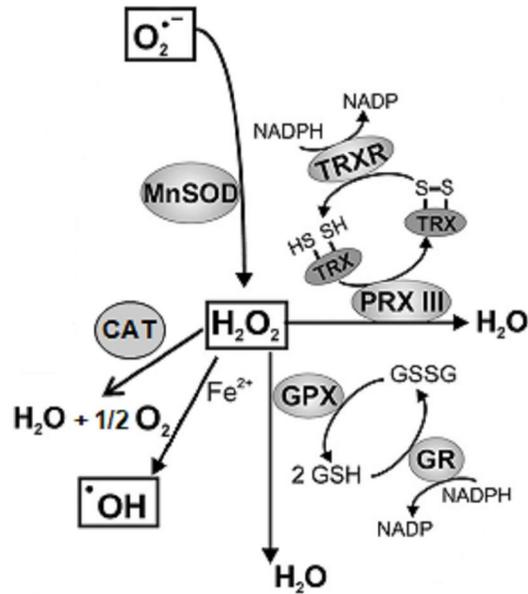
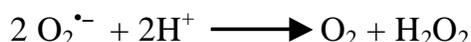


FIGURA 8. Representação de reações enzimáticas que envolvem o radical $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 nas mitocôndrias. Reações das enzimas antioxidantes manganês superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), peroxidase de tioredoxina 3 (PrxIII), tioredoxina (Trx) e tioredoxina redutase (TrxR). Reação de Fenton mediada pelo íon Fe^{2+} , formando o radical hidroxila ($\bullet OH$). (Adaptado de ECHTAY, 2007).

As superóxido dismutases (SODs) são as enzimas responsáveis pela primeira linha de defesa antioxidante contra a geração de ERO, particularmente contra o radical $O_2^{\bullet-}$ (FRIDOVITCH, 1995). Até o momento, encontram-se descritas três isoformas de SOD em mamíferos. Duas delas contêm Cu e Zn em seus sítios catalíticos, e se localizam em compartimentos intracelulares citoplasmáticos (CuZn-SOD ou SOD1), ou no meio extracelular (EC-SOD ou SOD3). A SOD1 já foi descrita em citoplasma, compartimentos nucleares e lisossomos de células de mamífero (FRIDOVITCH, 1995). A SOD3 tem alta afinidade por heparina, e foi detectada no plasma humano, linfa e fluido cérebro-espinhal (FRIDOVITCH, 1995). A terceira isoforma de SOD (MnSOD ou SOD2) contém Mn no seu sítio catalítico. A MnSOD é uma enzima que se localiza exclusivamente na matriz mitocondrial, e sua função é promover a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , protegendo desta forma as enzimas mitocondriais que contêm centros ferro-enxofre de ataques oxidativos (GARDNER et al, 1995). A reação catalizada por essa enzima é a seguinte:



A MnSOD não requer o uso de cofatores para sua atividade, portanto a eficiência desse sistema é determinada apenas pela quantidade de enzima presente. A ubiquidade das SODs sugere a importância do $O_2^{\bullet-}$ como subproduto tóxico do metabolismo oxidativo. O $O_2^{\bullet-}$ possui *per se* um potencial danoso significativo, independente da formação de outras espécies reativas das quais ele é precursor, como o H_2O_2 e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (Fig. 8). Sua meia vida é de apenas 50 μ s e sua distância de difusão de aproximadamente 320 nm (FRIDOVICH, 1986). Estima-se que a concentração fisiológica de $O_2^{\bullet-}$ seja da ordem de 10^{-10} M, ou menos, em

organismos que contêm MnSOD, enquanto que em *E. coli*, que não contém essa enzima, essa concentração sobe para aproximadamente 10^{-7} M, comprovando a eficácia da enzima mesmo em meios com baixa concentração de $O_2^{\bullet-}$ (FRIDOVICH, 1995). A atividade de MnSOD encontra-se em geral distribuída por todos os tecidos de mamíferos; em camundongos, essa atividade é maior em fígado e rim, seguidos por cérebro, músculo, coração e baço, sendo os menores níveis de atividade detectados em pulmão, que pode chegar a ter vinte vezes menos atividade que o fígado (VAN REMMEN et al, 1999).

A dismutação do $O_2^{\bullet-}$ leva à formação de outra espécie reativa de oxigênio, o H_2O_2 que *per se* pode ser tóxico, ou dar origem a outra espécie altamente reativa o radical OH^{\bullet} , através da reação de Fenton (Fig. 8), que ocorre na presença de metais de transição como Fe^{2+} e Cu^{2+} . O radical OH^{\bullet} é muito reativo, sendo a sua meia-vida da ordem de 10^{-9} segundos em condições fisiológicas (PRYOR, 1986). Duas enzimas são majoritariamente responsáveis pela detoxificação do H_2O_2 em mamíferos, a CAT e a GPx (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

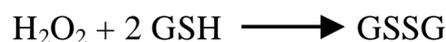
A CAT converte o H_2O_2 em O_2 e H_2O , catalizando a seguinte reação:



Em tecidos de murinos, a atividade de CAT é maior em fígado, seguido pelo rim, pulmão, coração e por último o cérebro (HO et al, 2004). O fato da CAT estar preferencialmente localizada nos peroxissomos e possuir baixa afinidade por H_2O_2 , sugere que outros mecanismos possam agir em conjunto com ela visando a remoção do H_2O_2 intracelular. Dois trabalhos recentes demonstraram após estudos sistemáticos utilizando mitocôndrias altamente purificadas em gradiente descontínuo de ficoll,

comprovadamente livres de contaminações por peroxissomos e membranas microsomais, a presença de CAT na matriz mitocondrial de células cardíacas e hepáticas (RADI et al,1991; SALVI et al, 2007). Portanto acredita-se que a remoção de H_2O_2 ocorra pela ação conjunta da CAT com outra peroxidase, a fosfolípídeo hidroperóxido glutaciona peroxidase (GPx), que tem uma constante de afinidade (K_m) bem mais baixa para H_2O_2 do que a CAT, sendo muito eficiente na decomposição dessa espécie reativa mesmo quando ela se encontra em baixas concentrações (ANTUNES et al, 2002).

A GPx é uma selenoenzima, que pertence à família das glutacionas peroxidases e utiliza glutaciona como fonte de equivalentes redutores. Sua baixa seletividade permite que essa enzima reduza diversos substratos, tais como fosfolípídeos hidroperóxidos, H_2O_2 , peróxidos de colesterol (MAIORINO et al, 1991; THOMAS et al, 1990) e peróxido de timina (BAO et al, 1997). Essa enzima cataliza a seguinte reação:



É a única enzima que se conhece, capaz de reduzir fosfolípídeos peroxidados em membranas (IMAI e NAKAGAWA, 2003). A GPx é capaz de utilizar diferentes doadores de elétrons para reduzir o H_2O_2 a água. O principal deles é a glutaciona reduzida (GSH), que reage com H_2O_2 indo para sua forma oxidada (GSSG).

A manutenção dos níveis de GSH é fundamental para a capacidade antioxidante mitocondrial, especialmente quanto à atividade de GPx. O GSSG não pode ser exportado para o citosol (OLAFSDOTTIR e REED, 1988), tendo que ser reduzido novamente a GSH dentro da matriz mitocondrial. Essa redução é catalisada por uma enzima específica, a glutaciona redutase GR, presente na matriz mitocondrial (KOZHEMIKIN et al, 1993;

ZOCCARATO et al, 2004; PANFILI et al, 1991; KELNER e MONTOYA, 2000), pela reação a seguir:



A GR utiliza o NADPH intramitocondrial como fonte de equivalentes redutores. O NADPH mitocondrial é regenerado majoritariamente por duas vias, que são: reduções substrato-dependentes via desidrogenases da matriz mitocondrial (isocitrato desidrogenase e enzima málica) (KIRSCH e DE GROOT, 2001), e a reação de transferência de prótons dependente da força próton-motriz, utilizando NADH intramitocondrial na redução de NADP^+ , catalisada por uma proteína da membrana interna da mitocôndria chamada nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (HOEK e RYDSTROM, 1988).

Essas vias de regeneração do NADPH ligam a habilidade das mitocôndrias de se defenderem do ERO exógeno ou gerado endogenamente, e suas capacidades bioenergéticas e oxidativas. Com isso, a detoxificação do ERO dissipa energia derivada de substratos oxidáveis tanto diretamente, pela oxidação de malato e isocitrato, como indiretamente, consumindo a força próton-motriz gerada pela oxidação de outros substratos na matriz mitocondrial (incluindo o malato e o isocitrato). Nos dois casos, a energia é gasta na detoxificação de ERO via NADPH e GSH em lugar de ser usada para outras funções como a síntese de ATP, por exemplo. As enzimas envolvidas na redução de NADPH são expressas diferentemente em tecidos de mamífero, sendo que cada uma delas tem uma via de regeneração de NADPH mitocondrial dominante, dependendo de suas necessidades e características próprias. Isso resulta em respostas

teciduais diferentes ao ERO ou a outros subprodutos tóxicos relacionados ao ERO (HOEK e RYDSTROM, 1988; KIRSCH e DE GROOT, 2001).

Outras enzimas também participam da detoxificação de H_2O_2 , hidroperóxidos e produtos da peroxidação lipídica na mitocôndria, são elas a glutathiona-S-transferase (KIRSCH e DE GROOT, 2001) e as peroxiredoxinas (e outras oxinas) (RAZA et al, 2002; FUJII e IKEDA, 2002). A glutathiona-S-transferase protege as mitocôndrias de várias toxinas, incluindo produtos da peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonenal, promovendo a conjugação de uma molécula de GSH a essa toxina (WOOD et al, 2003; GRIFFITH e MEISTER, 1985; MARTENSSON et al, 1990; CHEN e LASH, 1998). Diversas isoformas dessa enzima encontram-se presentes na mitocôndria. Já as peroxiredoxinas, ou peróxido redutases dependentes de tioredoxina, são peroxidases que foram descritas mais recentemente, e que reduzem o H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos, segundo a reação a seguir:



Duas isoformas de peroxiredoxinas (Prx) foram descritas em mitocôndrias de mamíferos, a Prx3 e a Prx5. A capacidade de detoxificação de H_2O_2 dessas enzimas em relação a outros mecanismos antioxidantes mitocondriais ainda não está determinada. Sabe-se que a Prx3 tem uma distribuição ubíqua em vários tecidos de rato, e que essas enzimas são regeneradas as suas formas ativas pela ação da tioredoxina dissulfeto oxidoreductase (Trx2), uma das enzimas que compõem o sistema tioredoxina mitocondrial. A Trx2 é reduzida pela tioredoxina redutase (Trx2R) que utiliza o NADPH intramitocondrial como fonte de equivalentes redutores, conforme a seguinte reação:



Portanto, as atuações das Prxs dependem da eficiência bioenergética da mitocôndria, assim como ocorre com os sistemas dependentes de GSH. Outro membro dessa família, a glutaredoxina (Grx2), que também catalisa reações de oxidoredução de Trx dissulfeto. Esta enzima não só reduz proteínas dissulfeto, como também liga dissulfetos a moléculas de GSH (JOHANSSON et al, 2004). As Trxs, TrxR e a Grx são proteínas ubíquas presentes na maioria, senão em todos os tecidos, e desempenham múltiplas funções além de seus papéis como antioxidantes celulares (GROMER et al, 2004; FERNANDES e HOLMGREN, 2004) Porém, pouco se conhece sobre suas isoformas mitocondriais, Trx2, Trx2R e Grx2, inclusive no que diz respeito as suas funções no combate ao ERO formado na mitocôndria.

Apesar de algumas controvérsias, diversos trabalhos da literatura demonstram que a inativação de enzimas antioxidantes, através de transgênese ou RNA de interferência, resulta em fenótipos mais susceptíveis ao estresse oxidativo, particularmente quando esses procedimentos atingem as isoformas mitocondriais dessas enzimas (GARDNER et al, 1995; HO et al, 2004; SCHRINER et al, 2005; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Ao contrário, a superexpressão dessas enzimas, principalmente de suas isoformas mitocondriais, levam a uma maior proteção dos animais ou das células estudadas contra danos causados por espécies reativas.

1.4 Regulação da formação de ERO na mitocôndria

Além dos mecanismos de defesa antioxidantes previamente descritos, as células possuem outras estratégias para impedir a formação de ERO. O desbalanço entre a produção de ERO e os níveis de defesas

antioxidantes intracelulares leva ao estresse oxidativo, condição que vem sendo associada a diversos estados patológicos, tais como diabetes e condições de hiperglicemia (PACKER et al, 2001; VAN DEN BERGHE et al, 2001; DA-SILVA et al, 2004; MEYER et al, 2006; BROWNLEE, 2001; RUSSELL et al, 2002), doenças neurodegenerativas (SOUCEK et al, 2003; NICHOLLS e BUDD, 2000; MULTHAUP et al, 1997; GIASSON et al, 2002), apoptose (HOCKENBERY et al, 1993; SKULACHEV, 1998), inflamação (HENSLEY et al, 2000), injúria por isquemia-reperfusão (FISKUM, 1985; KIM et al, 2002) e sepse (VAN DEN BERGHE et al, 2001).

A geração de ERO mitocondrial é dependente, principalmente, dos níveis do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), já que o potencial elevado de prótons aumenta a formação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (BOVERIS e CHANCE, 1973; KORSHUNOV et al, 1997; CADENAS e DAVIES, 2000) por favorecer o estado reduzido dos complexos I e III. Um pequeno decréscimo nos níveis do $\Delta\Psi_m$, dentro de uma faixa próxima à polarização máxima da membrana interna mitocondrial, reduz significativamente a produção de ERO pela mitocôndria (Fig. 9). Portanto, mecanismos capazes de regular o $\Delta\Psi_m$, podem prevenir a geração de ERO pela CTE mitocondrial.

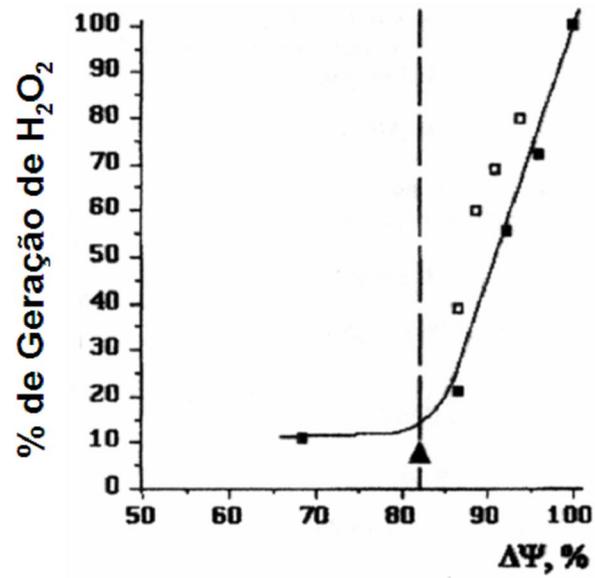


FIGURA 9. Influência do potencial de membrana mitocondrial na formação de H_2O_2 (Adaptado de KORSHUNOV et al, 1997).

Diversos compostos podem agir diminuindo o $\Delta\Psi_m$, dentre eles os ionóforos de prótons desacopladores da FosOx, os ácidos graxos e as proteínas desacopladoras (UCP) (KADENBACH, 2003).

As UCPs são proteínas integrais de membrana, pertencentes à superfamília das proteínas mitocondriais carreadoras de ânions, e se localizam na membrana interna mitocondrial. Sua forma monomérica tem peso molecular de aproximadamente 30 kDa, apresentando ambas extremidades N- e C-terminal voltadas para o espaço intermembranas da mitocôndria. Acredita-se que a forma funcional das UCPs seja a de homodímero (ECHTAY, 2007).

Os mamíferos expressam cinco proteínas UCP homólogas (UCP1-UCP5), que se encontram distribuídas de forma tecido-específica. UCP2 e UCP3 têm 59 e 57% de identidade, respectivamente, com a UCP1, e 73% de identidade entre si (KRAUSS et al, 2005). A UCP4 e a UCP5 (proteínas carreadoras de mitocôndria de cérebro) são largamente expressas no sistema nervoso central (SANCHIS et al, 1998; MAO et al, 1999) e possuem muito menos identidade de seqüências com a UCP1, sendo suas funções ainda pouco conhecidas. Já foi descrita também, uma homologia entre as UCPs e o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) presente na membrana interna mitocondrial.

A UCP1 foi primeiramente identificada no tecido adiposo marrom (BAT) e é a proteína mais estudada dessa família (Fig. 10). Estudos iniciados na década de 1960, utilizando mitocôndrias isoladas de BAT, revelaram a existência de uma alta taxa de respiração desacoplada não controlada por ADP nessas mitocôndrias, o que provoca uma robusta termogênese mediada pela UCP1 (Fig. 10). Em resumo, o escape de

prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial através da UCP1 desacopla a oxidação de substratos pela CTE, da síntese de ATP, o que resulta em um rápido aumento no consumo de O₂ e conversão livre da energia da oxidação dos substratos na forma de calor. O BAT é capaz de regular a termogênese não associada à tremor em recém-nascidos, mamíferos capazes de se aclimatar ao frio e hibernar, e pequenos roedores (CANNON e NEDERGAARD, 2004).

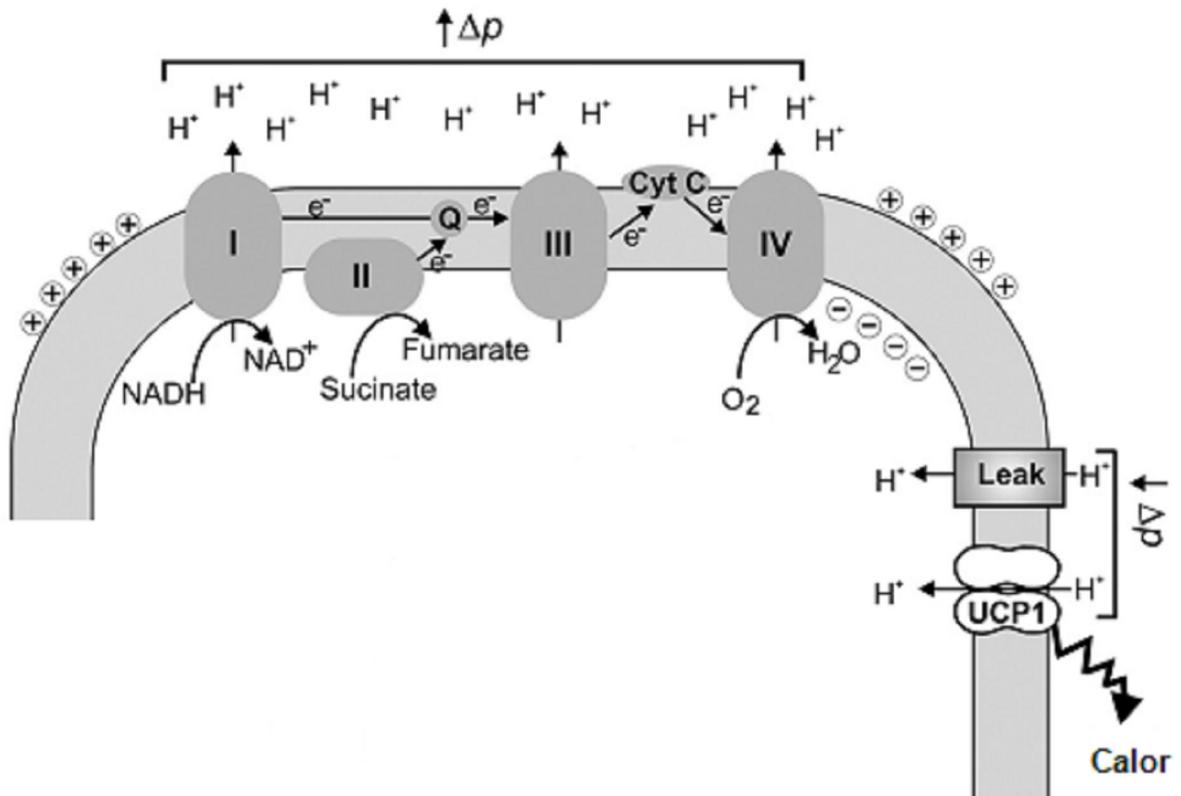


FIGURA 10. Mecanismo de produção de calor mediado pela UCP1. (Adaptado de ECHTAY, 2007).

Já em outros tecidos, o escape de prótons provocado pelos os homólogos de UCP1 não parece estar relacionado à geração de calor, mas sim ao controle da produção de $O_2^{\bullet-}$ e outras ERO (Fig. 11). Alguns trabalhos recentes têm mostrado que a indução de estresse oxidativo e o aumento da produção de ERO estimulam a expressão e o aumento da atividade de alguns tipos de UCPs (ECHTAY et al, 2002; MATTIASSON et al, 2003; LIU et al, 2006).

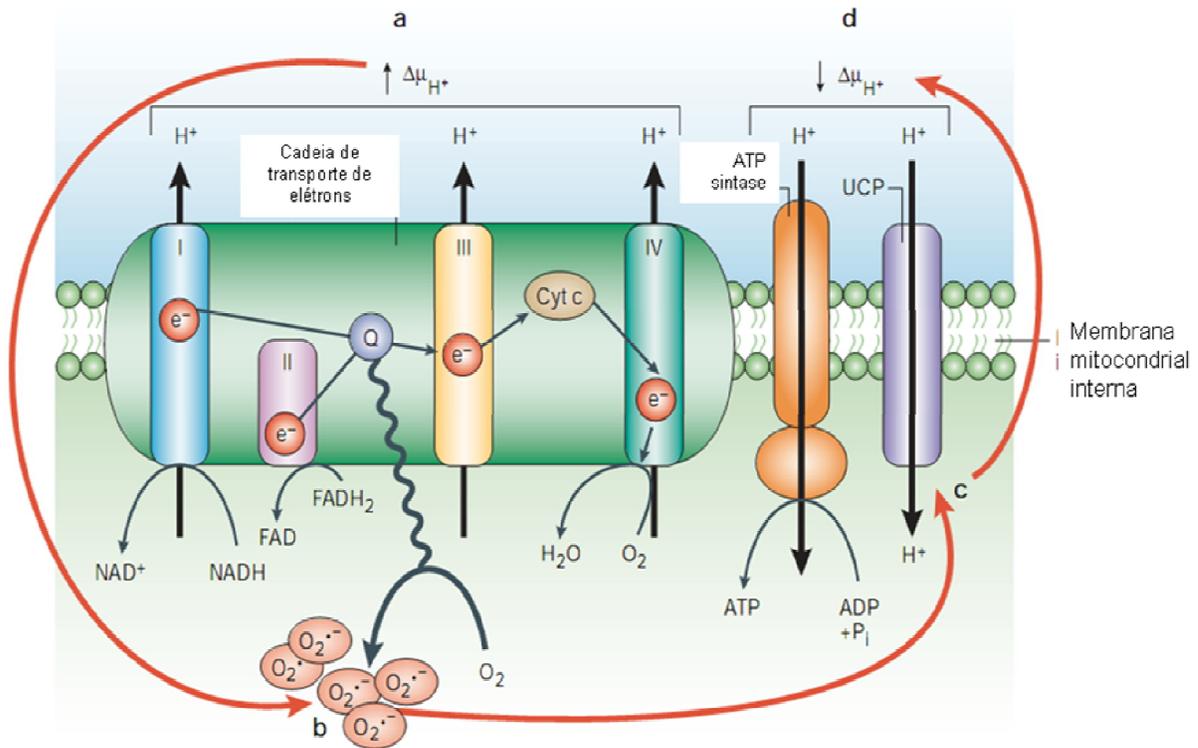


FIGURA 11. Ativação da UCP2 por $O_2^{\bullet-}$. (A) A produção de $O_2^{\bullet-}$ pela CTE aumenta, (B) como resultado da aceleração da redução parcial do oxigênio molecular nos complexos I e III. O $O_2^{\bullet-}$ então ativa a UCP, provavelmente, pela ação de outros intermediários (C), aumentando a volta de prótons para o interior da matriz mitocondrial. Isso causa um decréscimo do $\Delta\Psi_m$ (D), o que diminui a produção de $O_2^{\bullet-}$ pela CTE. (Adaptado de KRAUSS et al, 2005).

De fato, o papel das UCPs na fisiologia normal permanece desconhecido. Sabe-se que essas proteínas são fortemente ativadas por ácidos graxos (geralmente liberados dos estoques intracelulares de triacilgliceróis após estímulos β -adrenérgicos em resposta ao frio), e inibidas por nucleotídeos de purina di- e trifosfatos, tais como ATP, ADP, GTP e GDP, que se ligam fortemente ao sítio de ligação de nucleotídeo presente nessas proteínas.

Dois mecanismos foram propostos para ativação das UCPs pelos ácidos graxos. O primeiro modelo é chamado de “modelo de tamponamento de prótons”, e propõe que as UCPs possuem um canal de translocação através do qual os prótons entrariam na matriz mitocondrial. A movimentação dos prótons ocorreria com o auxílio de aminoácidos tamponadores de prótons (KLINGENBERG e HUANG, 1999; WINKLER e KLINGENBERG, 1994).

A outra hipótese, o “modelo de ciclagem de ácidos graxos”, sustenta que os ânions de ácidos graxos, e não os prótons, são transportados para fora da matriz mitocondrial pela UCP1 (GARLID et al, 1998; SKULACHEV, 1991; JEZEK et al, 1994; GARLID et al, 1996; JABUREK et al, 2001). Na ausência de um carreador, ânions de ácidos graxos de dentro da matriz não seriam capazes de passar a membrana mitocondrial interna. Uma vez que o ânion de ácido graxo é transportado através da membrana interna pela UCP1, este aceita um próton no espaço intermembranas e então faz o flip-flop de volta para a matriz através da membrana mitocondrial interna. Na seqüência o próton é liberado na matriz, e a UCP1 transporta o ânion de ácido graxo monovalente de volta para o espaço intermembranas, onde o ciclo pode então recomeçar.

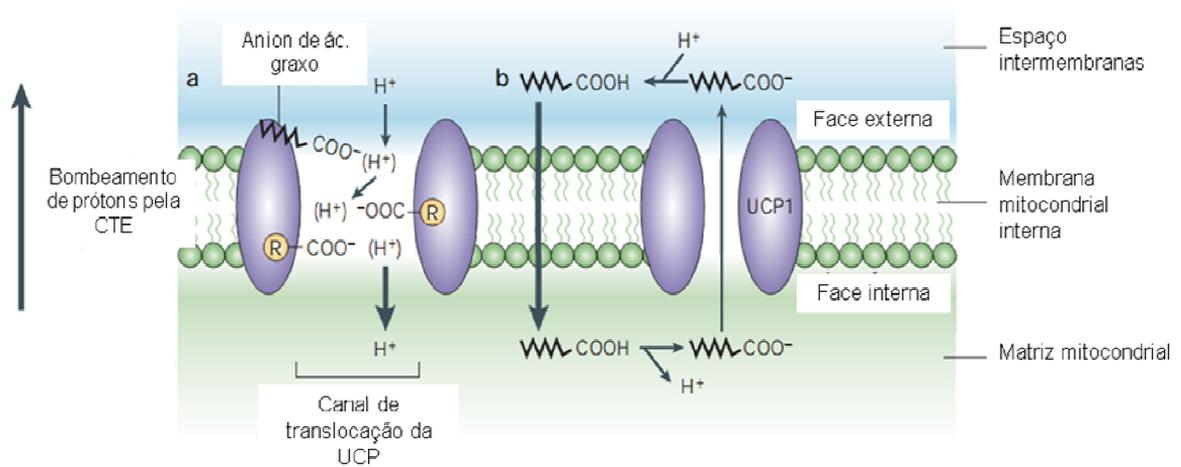


Figura 12. **Mecanismos propostos para a ativação das UCPs pelos ácidos graxos.** (A) Primeiro modelo: “modelo de tamponamento de prótons”. (B) Segundo modelo: “modelo de ciclagem de ácidos graxos” (Adaptado de KRAUSS et al, 2005).

O $\Delta\Psi_m$ também pode ser modulado pelos diferentes estados respiratórios da mitocôndria, como definido por Britton Chance em 1955 (CHANCE e WILLIAMS, 1955). A figura 13 mostra um esquema desses estados respiratórios e seus efeitos sobre o $\Delta\Psi_m$.

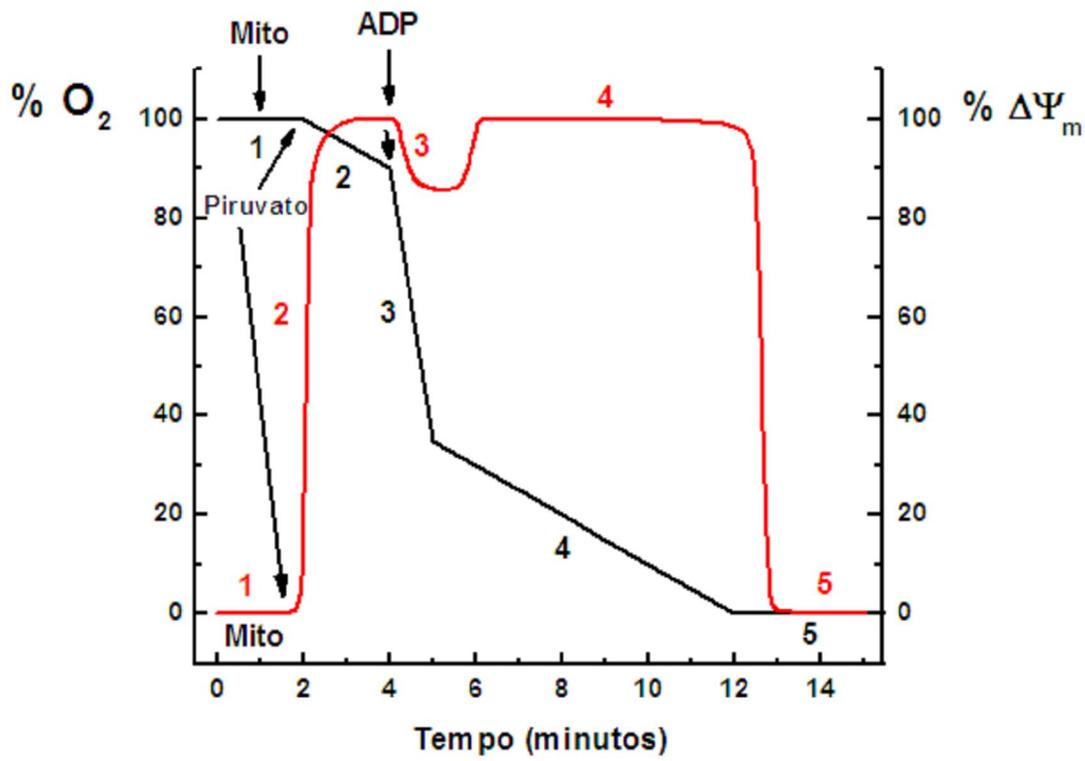


FIGURA 13. Esquema representando os estados respiratórios da mitocôndria e seus efeitos sobre o $\Delta\Psi_m$. A linha preta corresponde ao consumo de oxigênio pela mitocôndria (porcentagem de O_2 por minuto), onde os números representam o: (1) estado 1, mitocôndria sem substrato (na presença de P_i); (2) estado 2, respiração com substrato limitada pela falta de ADP; (3) estado 3, respiração ativada pela adição de ADP; (4) estado 4, todo ADP convertido em ATP, respiração diminui; (5) estado 5, anoxia. A linha vermelha representa o percentual de polarização do $\Delta\Psi_m$ nos diferentes estados respiratórios (representados pelos mesmos números, só que em vermelho). Pode-se observar que após a adição de substrato respiratório (piruvato, por exemplo), há um drástico aumento do $\Delta\Psi_m$ (estado 2), provocado pelo aumento da oferta de elétrons para a CTE mitocondrial. O $\Delta\Psi_m$ diminui cerca de 10 a 20 % com a adição de ADP à mitocôndria (estado 3), pois a atividade de fosforilação do ADP pela F_0F_1 ATPase dissipa o $\Delta\Psi_m$. Quando todo o ADP é convertido em ATP (estado 4), o $\Delta\Psi_m$ retorna a valores máximos.

A taxa fisiológica da produção de ERO é inversamente proporcional à disponibilidade de ADP (BOVERIS e CHANCE, 1973; KORSHUNOV et al, 1997), e a diminuição nos níveis de ADP (estado 4 da respiração mitocondrial) resulta num aumento do $\Delta\Psi_m$, que por sua vez, leva a um decréscimo na taxa respiratória mitocondrial, estimulando a produção de ERO devido ao estado reduzido dos complexos da CTE. Quando os níveis de ADP aumentam (estado 3 da respiração mitocondrial), o inverso ocorre (KORSHUNOV et al, 1997). Isto se deve à diminuição parcial do $\Delta\Psi_m$ pela atividade do complexo da F_0F_1 ATP sintase e à atividade do translocador de nucleotídeos (ANT).

1.5 Cinases mitocondriais e a geração de ERO na mitocôndria

Da-Silva e colaboradores (2004), e Meyer e colaboradores (2006) demonstraram recentemente a importância das atividades de duas enzimas comumente relacionadas ao metabolismo energético celular, mas que não são consideradas como participantes das defesas antioxidantes enzimáticas celulares, a hexocinase mitocondrial (mt-HK) e a creatina cinase mitocondrial (mt-CK), na prevenção da formação de ERO durante a FosOx em mitocôndrias de cérebro de rato, em condições de hiperglicemia. A implicação desse mecanismo antioxidante preventivo em patologias nas quais os pacientes apresentam quadros hiperglicêmicos, como por exemplo, a diabetes e a sepse, permanece desconhecida.

A hexocinase (HK) catalisa a transferência de um grupamento fosfato da posição γ do ATP para o carbono 6 de uma hexose, produzindo hexose 6-fosfato e ADP. Essa reação está exemplificada abaixo, utilizando-se nesse caso, a glicose e o ATP como substratos.



Essa enzima foi descrita pela primeira vez em extratos de levedura (MEYERHOF, 1927) e desde então, verificou-se que é uma enzima ubíqua ao longo da evolução biológica, estando presente em quase todos os seres vivos (CÁRDENAS et al, 1998), tamanha a importância de sua função biológica. A atividade da HK inicia várias vias de utilização de glicose, dentre elas a via de pentose fosfato, responsável por gerar potencial redutor para a célula, a via glicolítica, a síntese de glicogênio, etc (Fig. 14).

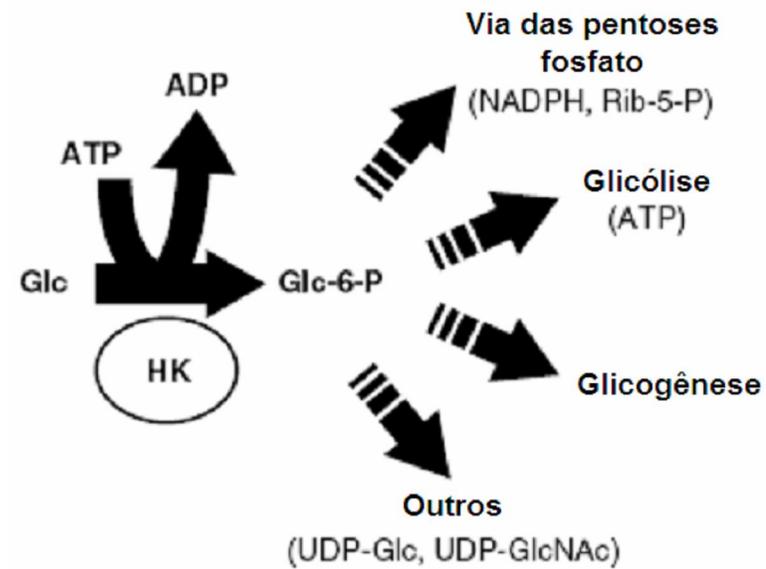


FIGURA 14. Esquema das diversas vias de utilização de glicose iniciadas pela reação da hexocinase.

Em mamíferos, existem quatro isoformas de HK (HK-I a HK-IV) diferindo na afinidade por glicose, inibição por glicose-6-P (G6P) e Pi, e na distribuição subcelular (WILSON, 1997). A isoforma I é a forma predominantemente expressa em cérebro, eritrócitos, rins e diversos outros tecidos. A isoforma II está presente em músculo, coração e adipócitos. A isoforma III está distribuída em vários tecidos e a isoforma IV, também conhecida como glucocinase, é expressa no fígado, no pâncreas e em algumas células neuroendócrinas raras. As isoformas I e II podem estar tanto associadas à mitocôndria quanto solúveis no citosol. A isoforma III se situa associada ao núcleo das células e a isoforma IV pode se translocar entre o interior do núcleo e o citoplasma em resposta às variações nas concentrações de glicose (GOSHANI-HEBRONI e BESSMAN, 1997).

Foi demonstrado que as HK I e HK II se ligam à membrana mitocondrial externa, podendo ser dissociadas da mitocôndria dependendo dos níveis de G6P (BUSTAMANTE e PEDERSEN, 1980; WILSON, 2003). A mt-HK de mamíferos tem preferência pelo ATP, gerado pela FosOx, sendo este mandado para o exterior da mitocôndria através da proteína canal de ânions dependente de voltagem (VDAC)/ANT, local onde a mt-HK está fisicamente ligada (BELTRANDELRIO e WILSON, 1992) (Fig. 15).

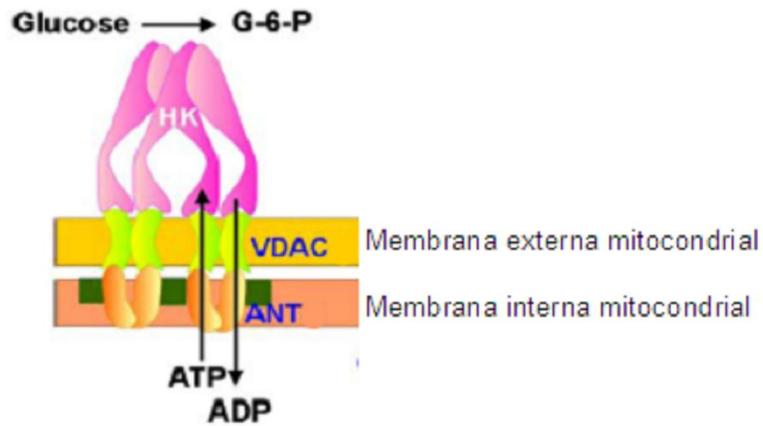


FIGURA 15. Localização da mt-HK ligada à membrana externa da mitocôndria através da associação ao VDAC e ao ANT (Adaptado de BRDICKZA et al, 2006).

As associações das isoformas HK-I e HK-II com mitocôndria têm sido identificadas em vários órgãos como cérebro, rins, músculo esquelético e cardíaco. Além disso, células tumorais possuem grandes quantidades de HK-II associadas à mitocôndria, quando comparadas com outros tecidos (BUSTAMANTE e PEDERSEN, 1977). Esta associação também foi demonstrada em mitocôndrias de plantas (GALINA e DA SILVA, 2000; GALINA et al, 1995). Em praticamente todos os tecidos onde a HK se encontra ligada à mitocôndria, a sua atividade foi capaz de estimular dramaticamente o consumo de O_2 levando a um estado respiratório permanentemente estimulado pela presença de ADP (estado 3), gerado a partir de sua reação. Como já descrito anteriormente, nosso grupo demonstrou em 2004 (DA-SILVA et al, 2004), que a atividade da mt-HK do tipo I associada às mitocôndrias pelo VDAC da membrana mitocondrial externa de cérebro de ratos, participa do mecanismo de controle da geração de ERO induzida pela glicose, já que a sua atividade é capaz de acelerar o consumo de O_2 . Nos tecidos de mamíferos e em tumores, a mt-HK do tipo I e/ou II se associam ao VDAC que fazem sítios de contato com a membrana mitocondrial interna pelo ANT podendo trocar ATP e ADP às custas da dissipação do $\Delta\Psi_m$. Assim, esses resultados mostraram que, de fato, o complexo mt-HK-VDAC-ANT, junto com a F_0F_1 ATP-sintase podem formar um sistema de ciclagem de ADP, que usa glicose e ATP para a manutenção de níveis menores de $\Delta\Psi_m$, prevenindo a geração de ERO. Deste modo, a mt-HK em normoglicemia funcionaria como uma defesa antioxidante preventiva (Fig.16).

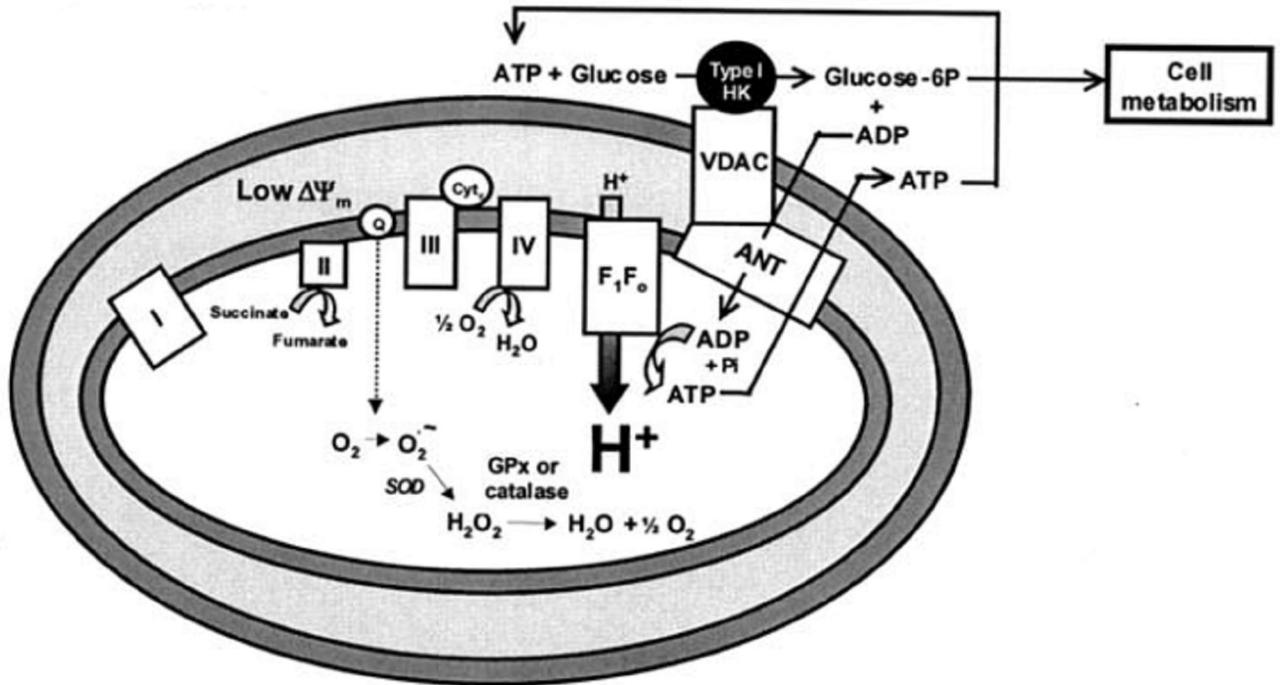


FIGURA 16. Atividade da mt-HK, influenciando a geração de ERO nas mitocôndrias em glicemia normal. As setas e linhas contínuas significam o alto fluxo metabólico, e as linhas pontilhadas representam o baixo fluxo (DA-SILVA et al, 2004).

Já com altos níveis de glicose no meio, a geração de ERO induzida em cultura de neurônios aumenta, acompanhando o aumento dos níveis intracelulares de G6P, um potente inibidor da atividade da mt-HK (Fig. 17). Além disso, a G6P foi capaz de induzir aumento do $\Delta\Psi_m$ e da geração de ERO em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato quando a mt-HK se encontrava ativa (DA-SILVA et al, 2004). Portanto, a modulação da ação catalítica da mt-HK pode estar envolvida no mecanismo de toxicidade da glicose observada na hiperglicemia. Assim, a mt-HK seria importante para manter os altos níveis de ADP nas proximidades do trocador ANT, sendo a produção de ATP ativada e conseqüentemente o $\Delta\Psi_m$ caindo juntamente com a produção de ERO (Fig. 16).

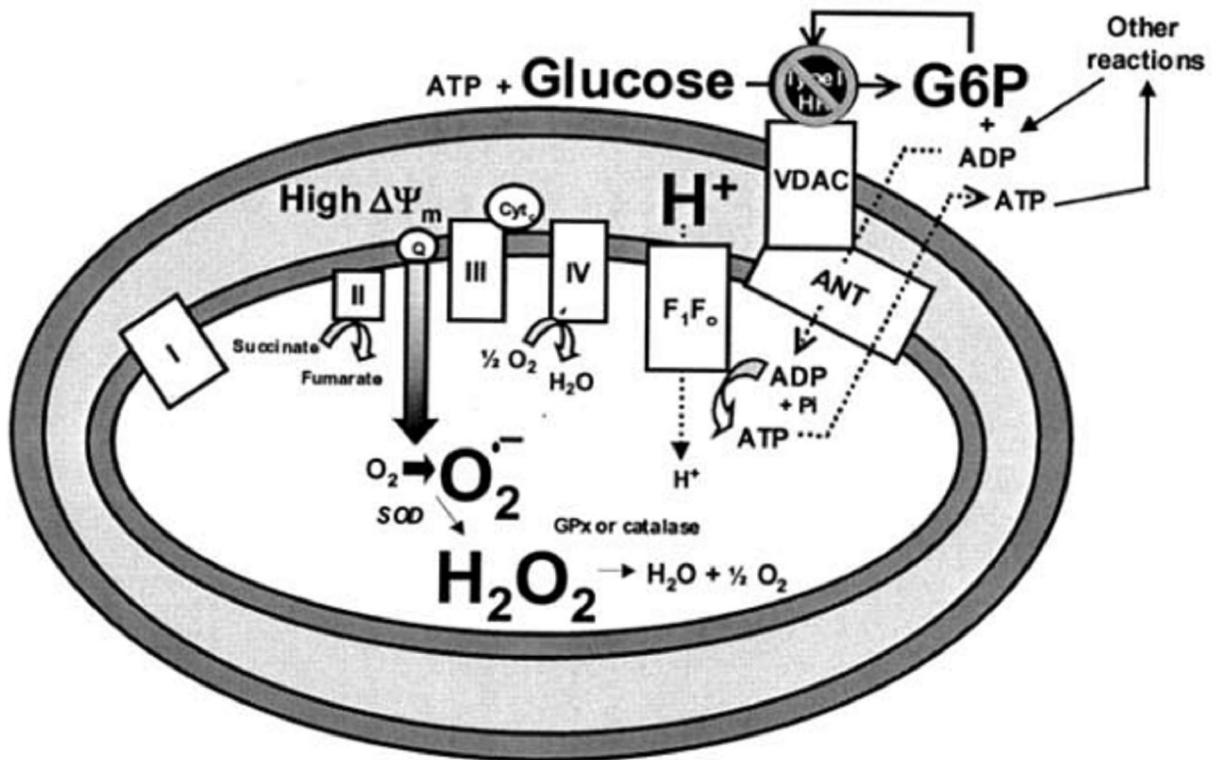


FIGURA 17. **Atividade da mt-HK em alta glicose.** Nesta situação o acúmulo de G6P leva à inibição do sistema de reciclagem de ADP (complexo mt-HK/VDAC/ANT) resultando na geração de ERO (DA-SILVA et al, 2004).

Outra cinase mitocondrial que teve seu papel antioxidante preventivo verificado foi a creatina cinase (CK) que catalisa a reação na qual o grupo γ fosfato do ATP é transferido para a creatina (Cr), resultando em ADP e fosfocreatina (PCr). Essa reação é reversível, e pode ser representada da seguinte forma:



Por muitos anos a atividade de CK foi relacionada apenas à produção de PCr como uma forma de armazenar moléculas de alta energia, formando assim um “tampão energético” em locais com alta demanda de energia. Porém, a identificação de isoformas distintas de CK, uma citosólica e outra mitocondrial, nas décadas de 1960 e 1970, levou Saks e colaboradores (1978) e Bessman e Geiger (1981) a proporem a existência de uma “lançadeira mitocondrial de PCr”. De acordo com esta hipótese, o sistema CK/PCr/Cr aumentaria consideravelmente a capacidade intracelular total de transporte de fosfato de alta energia, e a PCr não serviria unicamente como um tampão local imediato, mas também como uma fonte de energia vinda da mitocôndria e/ou glicólise, para locais onde normalmente há um consumo alto de energia (ATPases do músculo esquelético, cardíaco e neurônios, por exemplo), porém que são distantes de fontes de síntese de ATP (SAKS et al, 1978; BESSMAN e GEIGER, 1981; WALLIMANN e HEMMER, 1994). Portanto, a isoforma citosólica catalisa a conversão reversível de PCr e ADP para ATP e Cr, enquanto a isoforma mitocondrial, a qual é ubiquamente expressa, catalisa a conversão reversível de Cr e ATP gerando ADP e PCr, com o intuito de fornecer energia para o citosol (Fig. 18). A maioria dos tecidos dos vertebrados expressa as duas isoformas da CK, sendo a citosólica dimérica, e a mitocondrial normalmente octamérica.

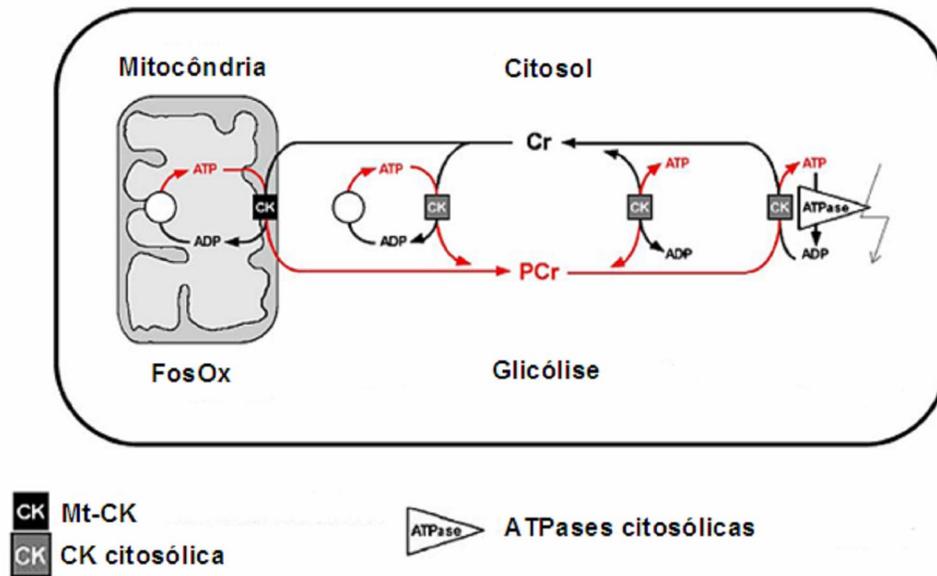


FIGURA 18. **O sistema Cr/PCr.** Compartimentalização específica das isoformas da CK e envolvimento destas com os processos de liberação de ATP, FosOx ou glicólise, e processos de consumo de ATP (ATPases que mantêm as taxas locais de ATP/ADP). A PCr é exportada para o citosol, enquanto o ADP produzido é bombeado de volta para a matriz mitocondrial via ANT, deste modo estimulando a FosOx e mantendo as taxas citosólicas de ATP/ADP. (Adaptado de SCHALATTNER et al, 2006)

Foi descrito por Beutner e colaboradores em 1996 e 1998, que a mt-CK está localizada no espaço intermembranar da mitocôndria, associada ao VDAC e ao ANT (Fig. 19). Porém, isso só ocorre se enzima estiver na sua forma octamérica. A atividade da mt-CK acopla a FosOx e a produção mitocondrial de PCr, catalisando a conversão de Cr para PCr às custas do ATP produzido intramitocondrialmente (Fig. 18). A PCr é exportada para o citosol enquanto o ADP produzido é bombeado de volta para a matriz mitocondrial via ANT, deste modo estimulando a FosOx (WALLIMANN et al, 1992; SAKS et al, 1991; JACOBUS e SAKS, 1982). De fato, a Cr é um estimulante excelente para a respiração mitocondrial durante a geração de PCr (JACOBUS e LEHNINGER, 1973; KERNEC et al, 1996; O'GORMAN et al, 1996), como mostra um estudo recente em humanos utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear, que observou que a re-síntese de PCr estava acoplada à respiração mitocondrial (SMITH et al, 2004).

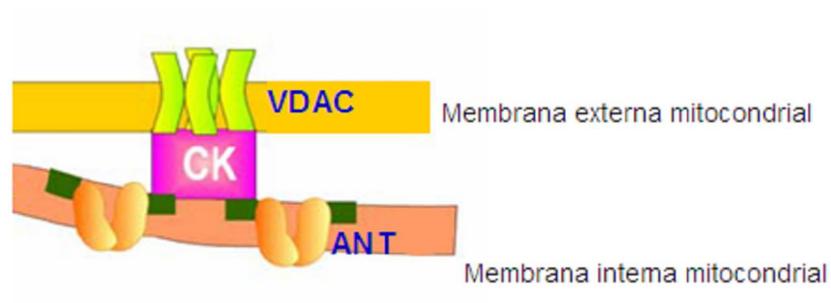


FIGURA 19. Localização da mt-CK no espaço intermembranar da mitocôndria, através da associação ao VDAC e ao ANT, em verde está representada a cardiolipina. (Adaptado de BRDICKZA et al, 2006).

Assim, nosso grupo em um trabalho recente (MEYER et al, 2006), demonstrou que quando as concentrações de glicose no meio são altas, condição que leva à supressão da ação antioxidante preventiva da mt-HK (DA-SILVA et al, 2004), a reciclagem de ADP é garantida pela atividade da mt-CK. Nessa situação, a disponibilização de ADP para a mitocôndria, promovida pela atividade da mt-CK induzida por Cr, é suficiente para reduzir tanto o $\Delta\Psi_m$ quanto a geração de ERO em neurônios corticais de embrião de rato.

Os processos de formação e detoxificação de ERO nas mitocôndrias são tecido-específicos, e dependem das características e demandas metabólicas de cada tecido (ADAM-VIZI e CHINOPOULOS, 2006). Os experimentos realizados durante essa tese buscaram contribuir com o entendimento da distribuição e do papel desempenhado pelo mecanismo antioxidante preventivo dependente de mt-HK e mt-CK, em diferentes modelos, no caso, diferentes tecidos de rato, e cérebros de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal (1 a 60 dias de vida).

Dentre os tecidos estudados, o cérebro é especialmente susceptível a danos causados por ERO, por diversos motivos, o primeiro é o alto conteúdo de ácidos graxos insaturados facilmente peroxidáveis; o segundo um grande conteúdo de ferro e ascorbato; e o terceiro, o fato desse tecido consumir grandes quantidades de oxigênio e glicose por unidade de peso, se comparado com outros tecidos (FLOYD, 1999; FLOYD e HENSLEY, 2002). As atividades das enzimas antioxidantes em cérebro também são de baixas a moderadas quando comparadas com os outros tecidos estudados, o rim, o coração e o fígado (TIAN et al, 1998; COOPER e KRISTAL, 1997).

As mitocôndrias derivadas de fígado e rim, órgãos implicados em processos de detoxificação e que frequentemente entram em contato com substâncias pró-oxidantes, têm uma grande quantidade de defesas antioxidantes detoxificadoras diretas (ANDREYEV et al, 2005). Já as mitocôndrias de coração possuem altos níveis de MnSOD, mas por outro lado, esse tecido consome grandes quantidades de ATP e O₂ com o intuito de garantir sua ininterrupta atividade contrátil (CHEN et al, 2006). Sabe-se que assim como o cérebro, durante episódios isquêmicos, o coração é altamente comprometido pela exacerbação da produção de ERO (CHEN et al, 2006). Dessa forma, como para outras patologias já citadas anteriormente, também nos casos de isquemia e reperfusão, a ativação de mecanismos antioxidantes que previnam a formação ou retirem o ERO já formado dos tecidos atingidos, podem representar uma alternativa interessante para combater danos oxidativos.

É descrito na literatura que o cérebro de indivíduos adultos é responsável pela metabolização de aproximadamente 20% de todo o O₂ consumido pelo organismo, apesar de sua pequena massa (BLOMGREN e HAGBERG, 2006). Essa discrepância é ainda maior em crianças, que têm corpos muito menores, mas não cérebros proporcionalmente menores. Cérebros imaturos são particularmente sensíveis a injúrias por estresse oxidativo, pois possuem sistemas antioxidantes pouco desenvolvidos e alta disponibilidade de ferro, que pode ser utilizado em reações de formação de ERO (BLOMGREN e HAGBERG, 2006). O sistema nervoso central de ratos e camundongos é relativamente imaturo no nascimento. Em ratos ocorre um acréscimo substancial na taxa metabólica cerebral para glicose (NEHLIG et al, 2006) e oxigênio (KREISMAN et al, 1989), utilização de energia (DUFFY et

al, 1975; SAMSON et al, 1958; SIESJO, 1978; VANNUCCI e VANNUCCI, 1978), e fluxo sanguíneo cerebral (NEHLIG et al, 1989) entre 7 e 21 dias do desenvolvimento pós-natal, que corresponde à fase de aumento da transmissão sináptica e demanda de energia para manter o equilíbrio iônico (ERECINSKA et al, 2004). Essas mudanças bioquímicas são acompanhadas por mudanças na estrutura e atividade funcional mitocondrial. Diversos estudos têm mostrado que durante processos inflamatórios, tais como os causados por hemorragia cerebral, e isquemia e reperfusão, indivíduos jovens são muito mais atingidos por danos oxidativos do que adultos (MCLEAN et al, 2005; CHANG et al, 2005; BLOMGREN e HAGBERG, 2006). Assim, a ativação de mecanismos antioxidantes como o mediado pelas atividades das cinases mitocondriais, também poderia ser interessante nessas situações. Durante estudos da regulação de genes mediadores da internalização e manutenção de glicose em cérebro de murinos em desenvolvimento, foram realizados experimentos que demonstraram que os níveis de atividade de HK do tipo I em homogenados totais de cérebro aumentavam com a idade dos camundongos (1 a 35 dias em camundongos Balb-C) (KHAN et al, 1999).

2. OBJETIVOS

Considerando a diversidade das atividades das enzimas antioxidantes mitocondriais clássicas (MnSOD, CAT, GPx e GR) e das cinases mitocondriais mt-HK e mt-CK em diferentes tecidos de mamíferos, o objetivo dessa tese foi investigar a existência de uma relação de compensação entre esses dois mecanismos enzimáticos envolvidos na regulação dos níveis de ERO produzido nas mitocôndrias de diferentes tecidos de rato, e cérebros de camundongo em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal (1 a 60 dias de vida).

2.1 Objetivos específicos

✓ Avaliar como a modulação da atividade de mt-HK pelo seu produto, G6P, regula o $\Delta\Psi_m$ e a geração de H_2O_2 em mitocôndrias de cérebro de rato. Este estudo permite avaliar o efeito do acúmulo de G6P em neurônios em cultura, submetidos a condições de hiperglicemia.

✓ Comparar os níveis de atividade de mt-HK e mt-CK, e os níveis de atividades das enzimas antioxidantes (MnSOD, CAT, GPx e GR), localizadas exclusivamente nas frações mitocondriais em diferentes tecidos de rato. Para minimizar ao máximo a contaminação das frações mitocondriais por peroxissomos e membranas microssomais, as mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial em gradiente de percoll.

✓ Avaliar o potencial de reciclagem de ADP das mitocôndrias dos diferentes tecidos de rato, na presença dos substratos de mt-HK e mt-CK,

relacionando esse potencial à capacidade de prevenir a formação de ERO dessas mitocôndrias.

✓ Avaliar a respiração mitocondrial, o $\Delta\Psi_m$ e a geração de H_2O_2 pelas mitocôndrias de diferentes tecidos de rato, e cérebros de camundongos de 1, 14, 35 e 60 dias de vida, na presença dos substratos de mt-HK e mt-CK.

✓ Correlacionar a geração de H_2O_2 basal (estado 2 da respiração), com as atividades das cinases e das enzimas antioxidantes mitocondriais em diferentes tecidos de rato, e cérebros de camundongos de 1, 14, 35 e 60 dias de vida.

✓ Avaliar o perfil das atividades de mt-HK e mt-CK, e das enzimas antioxidantes (MnSOD, CAT, GPx e GR) localizadas exclusivamente nas frações mitocondriais de cérebro, ao longo do desenvolvimento de camundongos (1, 14, 35 e 60 dias de vida).

3. METODOLOGIA

3.1. Animais e isolamento das mitocôndrias

Os animais utilizados neste trabalho foram mantidos e sacrificados segundo as normas de biossegurança determinadas pelo comitê de ética da UFRJ. Para a obtenção das mitocôndrias utilizadas na primeira parte desse trabalho, foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando 200–230 g. Os animais foram sacrificados, e as mitocôndrias de cérebro (SIMS, 1990), rim, coração e fígado foram isoladas por centrifugação diferencial. O procedimento de isolamento descrito a seguir foi utilizado para as mitocôndrias de cérebro, rim e fígado. Resumidamente, os três tecidos foram rapidamente removidos para um tampão de isolamento a 4°C contendo 0,32 M de sacarose, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, e 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4). Após cinco lavagens para retirar todo o sangue residual, os tecidos foram cortados em pequenos pedaços dentro do tampão de isolamento e manualmente homogeneizados em três ciclos de 10 segundos em um homogeneizador de vidro com pistão de teflon. Os homogenados foram então centrifugados a 1.330 x g por 3 min a 4°C em uma centrífuga Hitachi Himac SCR20B com rotor RPR 20-2. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e reservados, enquanto os precipitados eram ressuspensos, homogeneizados e novamente centrifugados a 1.330 x g por 3 min a 4°C. Os sobrenadantes das duas centrifugações foram misturados e centrifugados a 21.200 x g por 10 min a 4°C. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em solução tampão de isolamento contendo Percoll 15% (v/v). Gradientes descontínuos de densidade foram preparados manualmente, após a adição de frações de 3

mL dos precipitados ressuspensos, sobre duas camadas pré-formadas constituídas por 3,5 ml de solução de Percoll 23%, sobre 3,5 mL de solução de Percoll 40%. Os tubos contendo os gradientes foram centrifugados por 5 min a $30.700 \times g$ a 4°C . O material encontrado, em cada amostra, próximo à interface das camadas de Percoll 23 e 40%, foi gentilmente removido e diluído em uma proporção de 1:4 v/v no tampão de isolamento, e então centrifugados a $16.700 \times g$ por 10 min a 4°C . Precipitados firmes foram obtidos, e novamente ressuspensos no tampão de isolamento, no qual a sacarose foi substituída por 0,32 M de manitol e suplementado com 0,2 mg/mL de soro albumina bovina livre de ácidos graxos (BSA FAF). Após uma centrifugação a $6.900 \times g$ por 10 min a 4°C , os sobrenadantes foram rapidamente decantados e os precipitados ressuspensos no mesmo tampão com o auxílio de um fino pistão de teflon. A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Folin-Lowry utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão (LOWRY et al, 1951).

As mitocôndrias de coração foram isoladas segundo anteriormente descrito por Starkov e Fiskum (STARKOV e FISKUM, 2001) com algumas modificações. O coração foi retirado e rapidamente removido para um tampão de isolamento a 4°C contendo 75 mM de sacarose, 225 mM de manitol, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, e 10 mM de HEPES (pH 7.4). O músculo ventricular resfriado foi lavado exaustivamente para a retirada de todo o sangue, e separado da gordura e dos tendões. O tecido foi cortado em pequenos pedaços e incubado por 10 minutos em tampão de isolamento contendo 0,4 mg/L de protease do tipo XXIV (Sigma Aldrich). O excesso de protease foi removido após diversas lavagens dos fragmentos de ventrículo com 6 mL de tampão de isolamento contendo 1 mg/mL de BSA.

O tecido foi homogeneizado cinco vezes em um homogeneizador de vidro com o auxílio de um pistão de Teflon. O homogenado foi centrifugado a 600 x g por 4 minutos a 3°C. O precipitado foi ressuspensão em 10 mL de tampão de isolamento contendo 1 mg/mL de BSA, e então centrifugado a 9.000 x g por 8 minutos a 4°C. Este procedimento foi repetido mais uma vez, e o precipitado final foi ressuspensão em tampão de isolamento. A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Folin-Lowry utilizando-se BSA como padrão (LOWRY et al, 1951). Todos os experimentos com as mitocôndrias isoladas de tecidos de rato foram realizados à 37°C, com agitação constante, e em um tampão de respiração padrão contendo 10 mM de Tris-HCl pH 7,4, 0,32 M de manitol, 8 mM de fosfato inorgânico, 4 mM de MgCl₂, 0,08 mM de EDTA, 1 mM de EGTA e 0,2 mg/mL de BSA FAF.

Na segunda parte do trabalho foram utilizados camundongos suíços de 1, 14, 35 e 60 dias de idade. Os isolamentos das mitocôndrias de cérebro desses animais foram realizados por um método mais simplificado (ROSENTHAL et al, 1987), descrito a seguir:

Os animais foram sacrificados e seus cérebros removidos rapidamente para um recipiente contendo o tampão de homogeneização a 4°C formado por 300 mM de manitol, 1 mM de EGTA-K⁺, 0,1% de BSA e 10 mM de Hepes-K⁺. Foram retiradas as meninges e o material restante foi exaustivamente lavado até que fosse removido todo o resíduo de sangue ainda presente no tecido. O material foi cortado em pequenos pedaços e homogeneizado manualmente com o auxílio de um homogeneizador de vidro, com tampão de homogeneização 1:10 (v/v). O homogenado foi centrifugado por 3 minutos a 1.330 x g a 4°C, o pellet foi descartado e o

sobrenadante foi centrifugado por 8 minutos a 13.250 x g a 4°C. O pellet foi ressuspensão em tampão de homogeneização contendo digitonina 0,1% e centrifugado por 8 minutos a 13.250 x g a 4°C. O pellet contendo as mitocôndrias foi então gentilmente ressuspensão no tampão de homogeneização. A dosagem de proteína da amostra foi realizada segundo o método de Folin-Lowry utilizando BSA como padrão (LOWRY et al, 1951). Todos os experimentos com as mitocôndrias isoladas de cérebro de camundongos foram realizados à 28°C, com agitação constante, e em um tampão de respiração padrão contendo 10 mM de Tris-HCl pH 7,4, 0,32 M de manitol, 8 mM de fosfato inorgânico, 4 mM de MgCl₂, 0,08 mM de EDTA, 1 mM de EGTA e 0,2 mg/mL de BSA FAF.

3.2. Determinação da atividade de mt-HK

A atividade da hexocinase ligada à mitocôndria foi determinada com base em um método previamente descrito com pequenas modificações (WILSON, 1989). Resumidamente, foram utilizados 0,1 mg/ml de proteína das amostras de mitocôndrias isoladas e as atividades de hexocinase foram determinadas pela formação de NADH observada por espectrofotometria a 340 nm a 37°C. O meio de reação continha 10 mM de Tris-HCl pH 7,4, 5 mM de D-glucose, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de β-NAD⁺, 1 U/mL de Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides* e 50 μM de P¹, P⁵-di(adenosina 5)-pentafofato (Ap5A) (inibidor da atividade de adenilato cinase), em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada com a adição de 1 mM ATP.

Os ensaios radiométricos de determinação da atividade da mt-HK foram realizados como descrito por Newsholme e colaboradores (NEWSHOLME et al, 1967), utilizando 2-DOG [H^3].

3.3. Determinação da atividade de mt-CK

Para estes ensaios foram usados 0,05mg/mL de proteína mitocondrial e as atividades foram determinadas pela formação de NADH observada por espectrofotometria a 340 nm a 37°C. O meio de reação continha: 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 10 mM de D-glucose, 5 mM de $MgCl_2$, 2mM de ADP, 1 mM de β -NAD⁺, 5 U/mL de hexocinase de levedura, 1 U/mL de G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* e 50 μ M de Ap5A. A reação foi iniciada com a adição de 5 mM de creatina fosfato.

3.4. Determinação da atividade de mt-AK

Para estes ensaios foram usados 0,1mg/mL de proteína mitocondrial e as atividades foram determinadas pela formação de NADH observada por espectrofotometria a 340 nm a 37°C. O meio de reação continha: 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 10 mM de D-glucose, 5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de β -NAD⁺, 5 U/mL de hexocinase de levedura e 1 U/mL de G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*. A reação foi iniciada com a adição de 2 mM ADP (ADAM, 1965).

3.5. Determinação da atividade de MnSOD

A velocidade de redução de citocromo C pelo radical superóxido foi monitorada a 480 nm, utilizando-se o sistema xantina/xantina oxidase como fonte de radicais superóxido (MCCORD e FRIDOVICH, 1969).

Resumidamente, a fração mitocondrial (5-20 µg de proteína/mL) foi misturada a 50 µM de xantina, 20 µM de cianeto de potássio (inibidor das outras isoformas de SOD), 20 µM de citocromo C e 2 mU/mL de xantina oxidase em um volume final de 1 mL, e a mudança na absorbância foi observada. Uma unidade de MnSOD inibe a velocidade de redução do citocromo C em 50% na reação acoplada ao sistema xantina/xantina oxidase em pH 7,8 a 25°C, como determinado com uma curva padrão feita com a enzima SOD purificada.

3.6. Determinação da atividade de CAT

A atividade de CAT foi determinada de acordo com o método descrito por Aebi (AEBI, 1984). Em resumo, a fração mitocondrial (50 µg de proteína/mL) foi adicionada a um tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo 15 mM de H₂O₂ como substrato, e a mudança na absorbância foi observada a 240 nm. As atividades enzimáticas foram determinadas com base numa curva padrão feita com CAT purificada, onde uma unidade de CAT corresponde à decomposição de 1 µmole de H₂O₂ por minuto em pH 7,0 a 25°C. Em nossas preparações de mitocôndria de fígado de rato, a atividade específica da CAT foi muito similar às descritas para outras preparações de mitocôndrias isoladas de fígado de rato (SALVI et al, 2007), indicando que não houve contaminação das preparações utilizadas, com outros componentes celulares.

3.7. Determinação da atividade de GPx

A atividade de GPx foi medida indiretamente monitorando-se a oxidação de NADPH (FLOHÉ e GUNZLER, 1984). O meio de reação continha

0,5 mM de glutathiona reduzida (GSH), uma fração mitocondrial de 50µg de proteína/mL e 0,24U/mL de GR pré-incubada por 10 min a 37°C em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) totalizando um volume final de 1 mL. Ao meio foi adicionado 0,15 mM de NADPH e o consumo de NADPH independente da adição de hidroperóxido foi monitorado por aproximadamente 3 min. A reação de GPx em si, foi disparada pela adição ao meio de 1,2 mM de *t*-butil hidroperóxido (solução pré-aquecida a 37°C). O decréscimo na absorção a 340 nm foi monitorado por 5 min. O controle da queda de absorção não correspondente à reação enzimática foi monitorado adicionando-se ao meio tampão ao invés da fração mitocondrial. Uma unidade de GPx é equivalente a oxidação de 1 µmol de NADPH por minuto em pH 7,0 à 37°C.

3.8. Determinação da atividade de GR

A atividade de GR foi medida monitorando-se a oxidação do NADPH (FLOHÉ e GUNZLER, 1984). O meio de reação continha 1 mM de glutathiona oxidada (GSSG) e 0,1 mM de NADPH em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) totalizando um volume final de 1 mL na temperatura de 30°C. A reação foi iniciada com a adição da fração mitocondrial (50 µg de proteína/mL) à cubeta, sendo o decréscimo na absorbância a 340 nm monitorado a 30°C. Uma unidade de GR é equivalente a oxidação de 1 µmol de NADPH por minuto em pH 7,0 à 30°C.

3.9. Medidas de consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi medido em um oxígrafo adaptado a uma jaqueta de água circulante para controle da temperatura com um eletrodo

do tipo de Clark (Yellow Springs Instruments Co, modelo 5.300). Mitocôndrias (0,2 mg/mL de proteína) foram incubadas em 1,5 mL de volume final de tampão de respiração padrão contendo Tris-HCl 10 mM pH 7,4, 0,32 M de manitol, 8 mM de Pi, 4 mM de MgCl₂, 0,08 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 0,05 mM de Ap₅A e 0,2 mg/mL de BSA FAF. Coeficientes de controle respiratório foram medidos usando substratos respiratórios do complexo I (piruvato e malato) e do complexo II (succinato, em presença de 2 μM de rotenona) da CTE das diferentes preparações mitocondriais para avaliação de seus respectivos estados de acoplamento e integridade (SIMS, 1990). Cada experimento foi repetido no mínimo três vezes com diferentes preparações de mitocondriais isoladas.

3.10. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial foi medido pelo uso do sinal de fluorescência do corante catiônico safranina O, que é acumulado no interior da mitocôndria e tem sua fluorescência suprimida (AKERMAN e JARVISALO, 1980). As mitocôndrias (0,2 mg/mL de proteína) foram incubadas no tampão de respiração padrão (vide seção 3.9) com a adição de 10 μM de safranina O. FCCP (p-trifluorometoxifenilhidrazona carbonil cianeto) 5 μM, um ionóforo de prótons, foi usado como um controle positivo do colapso do $\Delta\Psi_m$. A fluorescência foi detectada em um comprimento de onda de excitação de 495 nm (slit 5 nm) e um comprimento de onda de emissão de 586 nm (slit 5 nm) usando um espectrofluorímetro Hitachi (Tokyo, Japan) modelo F-3010. Os dados estão representados como porcentagem da depolarização máxima. Cada experimento foi repetido no mínimo três vezes com diferentes preparações

de mitocôndrias isoladas. As adições de substratos e reagentes às cubetas se encontram devidamente indicadas na legenda da figura 25.

3.11. Determinação da geração de H₂O₂ mitocondrial

A produção de H₂O₂ foi detectada utilizando-se o sistema fluorogênico Amplex red (Invitrogen)/peroxidase, por este ser um sistema muito sensível à produção de peróxido. As mitocôndrias (0,2 mg/mL de proteína) foram incubadas no tampão de respiração padrão (ver acima) com a adição de 10 µM de Amplex red com 5 U/mL de peroxidase (horseradish peroxidase). A fluorescência foi detectada em um comprimento de onda de excitação de 563 nm (slit 5 nm) e um comprimento de onda de emissão de 587 nm (slit 5 nm) usando um espectrofluorímetro Hitachi (Tokyo, Japan) modelo F-3010 (volume final de 2 mL por cubeta) ou um espectrofluorímetro com leitor de placas Spectra Max[®] M5 (Molecular Devices) (volume final de 0,2 mL por poço). A calibração do sistema de medidas foi feita pela adição de quantidades conhecidas de H₂O₂. Cada experimento foi repetido no mínimo três vezes com diferentes preparações de mitocôndrias isoladas. As adições de substratos e reagentes às cubetas se encontram devidamente indicadas na legenda da figura 20, 26, 31 e 32. Pequenas mudanças na velocidade de formação de H₂O₂ induzida por 10 mM de succinato (estado 2), foram detectadas ao longo dos experimentos com diferentes preparações do mesmo tecido, porém as respostas aos diferentes estímulos e moduladores utilizados não foram afetadas. Assumimos que a velocidade máxima de formação de H₂O₂ mitocondrial (100%) consistia na diferença entre a velocidade de formação de H₂O₂ na ausência de substrato respiratório, e após a adição de succinato.

3.12. Análise estatística

Os resultados representam a média entre os experimentos \pm o erro padrão (\pm SE), e na análise estatística foi utilizado o método one-way ANOVA seguido por Tukey's test para comparações múltiplas. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Cinases mitocondriais na defesa antioxidante preventiva em mitocôndrias de cérebro, rim, coração e fígado de rato.

4.1.1 A atividade de mt-HK regula a geração de ERO nas mitocôndrias de cérebro de rato.

As enzimas mt-HK, mt-CK e mt-AK catalizam reações que produzem ADP, e conseqüentemente desempenham um papel importante no metabolismo celular de nucleotídeos, no controle da FosOx mitocondrial e no controle de parâmetros bioenergéticos da mitocôndria, tais como $\Delta\Psi_m$, respiração mitocondrial e geração de ERO.

Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo que a mt-HK desempenha um papel antioxidante preventivo em mitocôndrias de cérebro de rato devido à ciclagem de ADP que ela realiza (DA-SILVA et al, 2004). Assim sendo, o primeiro experimento realizado durante essa tese (MEYER et al, 2006) determinou como a modulação da atividade de mt-HK pelo seu produto, G6P, regula o $\Delta\Psi_m$ e a geração de H_2O_2 em mitocôndrias de cérebro de rato (Fig. 20A). Este estudo permitiu avaliar o efeito do acúmulo de G6P em neurônios em cultura, submetidos à condições de hiperglicemia (MEYER et al, 2006).

A indução da atividade da mt-HK por 2-DOG após a ativação da respiração por ADP (estado 3), levou a uma persistente despolarização do $\Delta\Psi_m$, que foi progressivamente revertida por G6P. A produção de ERO em mitocôndrias de cérebro de rato é inversamente relacionada com a atividade da mt-HK ativada por 2-DOG e ATP gerado intramitocondrialmente (Fig. 20B). Isso ocorre porque a G6P inibe a atividade da mt-HK bloqueando a

ciclagem de ADP através da membrana mitocondrial interna, o que aumenta o $\Delta\Psi_m$ e a geração de H_2O_2 . É importante notar também que os aumentos observados no $\Delta\Psi_m$ estão estritamente correlacionados com a inibição da atividade da mt-HK (Fig. 20B, círculos brancos e triângulos pretos), porém a quantidade de G6P necessária para provocar o aumento da geração de H_2O_2 é maior do que a requerida para aumentar o $\Delta\Psi_m$ (Fig. 20B, círculos pretos). Essa observação está de acordo com dados de Boveris e Chance (BOVERIS e CHANCE, 1973), e Korshunov e colaboradores (KORSHUNOV et al, 1997), que demonstraram que grandes mudanças na velocidade de geração de H_2O_2 ocorrem dentro de uma pequena faixa de variação do $\Delta\Psi_m$, quando este apresenta valores próximos ao máximo de polarização.

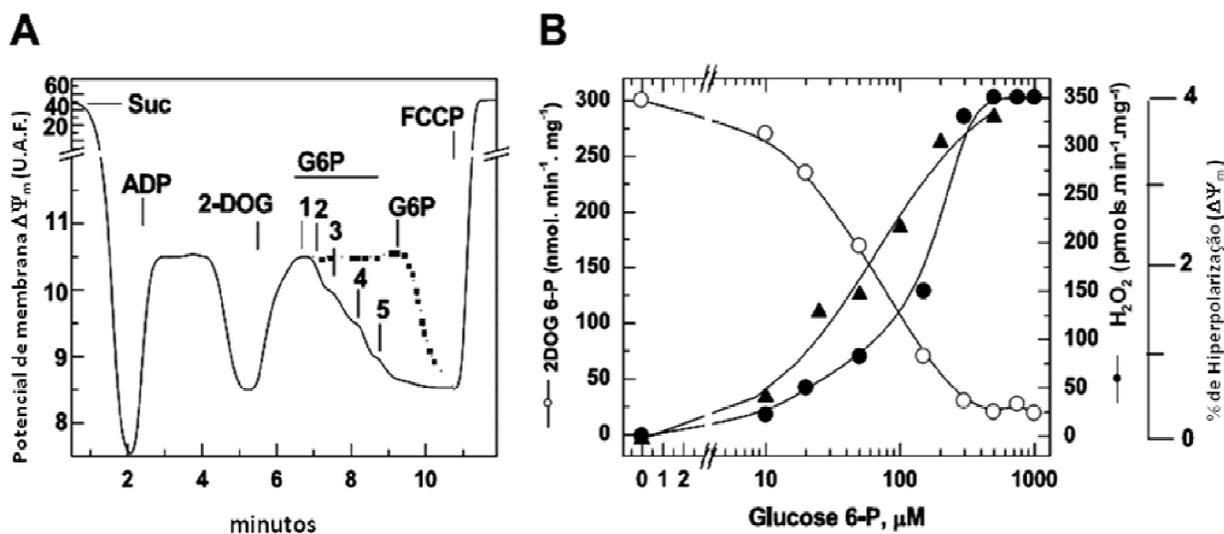
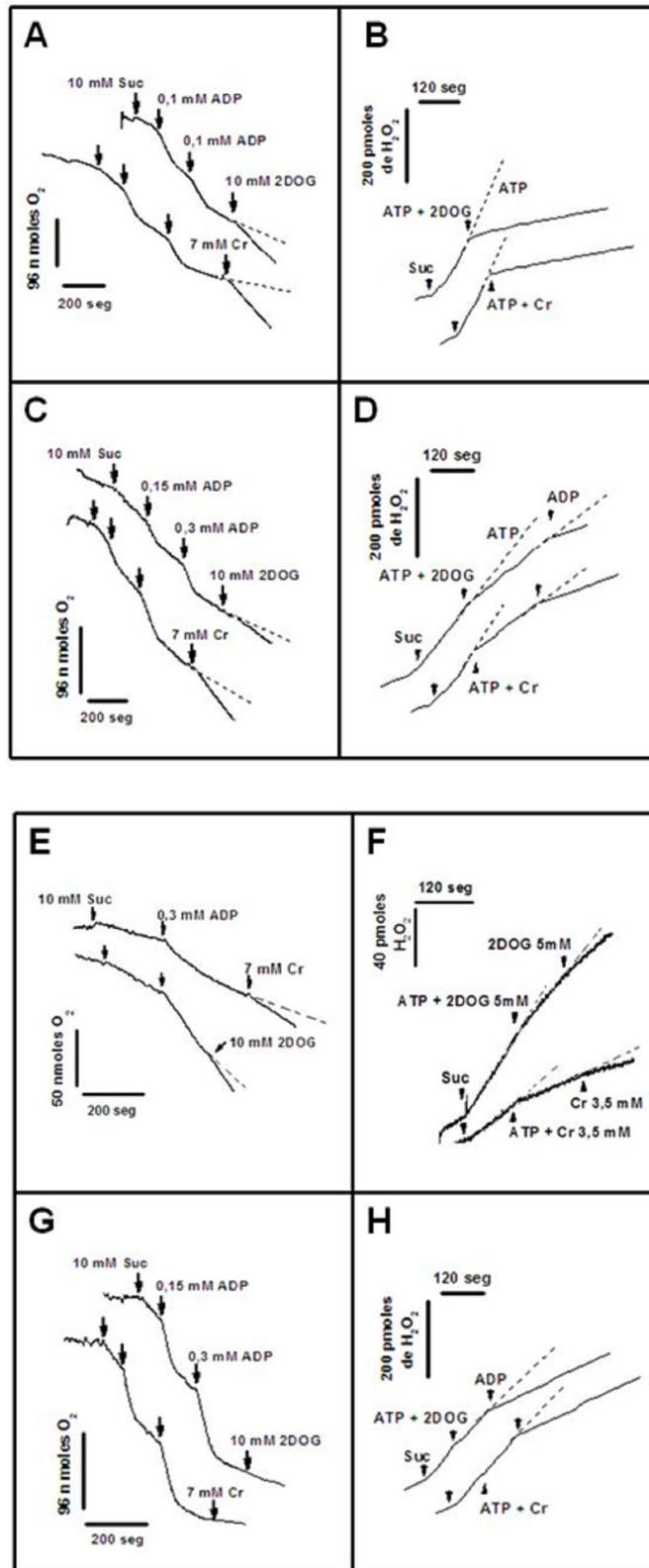


FIGURA 20. G6P induz a hiperpolarização do $\Delta\Psi_m$ e estimula a produção de H_2O_2 quando a mt-HK está fosforilando 2-DOG em mitocôndrias de cérebro de rato. (A) medidas de $\Delta\Psi_m$ com safranina O. Os números indicam as concentrações finais de G6P adicionadas às cubetas: 1, 10 μM ; 2, 25 μM ; 3, 50 μM ; 4, 200 μM e 5, 350 μM . A linha pontilhada representa as medidas de $\Delta\Psi_m$ nas quais foram adicionadas 300 μM de G6P em uma dose única. **(B)** a atividade da mt-HK foi medida pela quantidade de [^3H]2-DOG-6-P formada a partir da fosforilação de [^3H]2-DOG por ATP sintetizado pela FosOx das mitocôndrias de cérebro de rato (círculos brancos). A formação de H_2O_2 foi medida utilizando-se a sonda fluorescente Amplex Red (círculos pretos). Os aumentos no $\Delta\Psi_m$ induzidos por G6P estão representados pelos triângulos pretos. Nas medidas de $\Delta\Psi_m$ foram utilizados 4,5 μM de rotenona, 10 mM de succinato, 10 mM de 2-DOG, 0,15 mM de ADP e 0,5 mg/mL de mitocôndria purificada em percoll. Os detalhes das técnicas utilizadas estão descritos na seção 3 “Metodologia”. Os mesmos resultados foram obtidos com no mínimo cinco preparações de mitocôndrias diferentes.

4.1.2 Efeitos da ativação das atividades de cinases mitocondriais sobre o consumo de O_2 e a geração de H_2O_2 nas mitocôndrias de diferentes tecidos de rato.

Na figura 21 foi avaliado como as atividades da mt-HK e da mt-CK afetam o consumo de oxigênio e a geração de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas de cérebro, rim, coração e fígado de rato. Nas curvas de consumo de O_2 ficou demonstrado que a adição dos substratos das cinases (2-DOG e Cr) durante o estado 4 da respiração mitocondrial, aumenta consideravelmente mais a velocidade de consumo de O_2 nas mitocôndrias de cérebro (Fig. 21A) do que nas mitocôndrias de rim (Fig. 21C) e coração (Fig. 21E), sendo que não é observada nenhuma ativação na respiração das mitocôndrias de fígado (Fig. 21G). Esse perfil se repete nas curvas de geração de H_2O_2 , nas quais as adições dos substratos das cinases (2-DOG e Cr) são capazes de praticamente abolir a geração de H_2O_2 nas mitocôndrias de cérebro (Fig. 21B), diminuir a produção nas mitocôndrias de rim (Fig. 21D) e coração (Fig. 21F), mas não provocar alterações nas mitocôndrias de fígado (Fig. 21H).

FIGURA 21. Atividades de mt-HK e mt-CK afetando o consumo de oxigênio e a geração de ERO em mitocôndrias de cérebro (A,B), rim (C,D), coração (E,F) e fígado (G,H) de rato. (A,C,E,G), Consumo de oxigênio após adição de 10mM de succinato e 0,15 (ou 0,3) mM de ADP, com ou sem adição dos substratos das cinases. (B,D,F,H), Geração de H₂O₂ quando adicionado ao meio de reação 10 mM de succinato e 1mM de ATP com ou sem adição dos substratos das cinases (Cr e 2-DOG). Todas as medidas foram realizadas nas condições descritas previamente na seção 3 “metodologia”. A concentração de mitocôndria utilizada em cada experimento foi de 0,2 mg de proteína/mL. Nos traçados 1 foram adicionadas doses de 10 mM de 2-DOG e nos traçados 2 foram adicionadas doses de 7 mM Cr. Os traçados apresentados representam os experimentos realizados com cinco preparações mitocondriais diferentes, para cada tecido.



A adição dos substratos das cinases aumentam a ciclagem de ADP, e conseqüentemente a respiração (Fig. 22A) por estimular a FosOx nas mitocôndrias de cérebro, rim e coração, resultando numa inibição significativa da geração de H_2O_2 (Fig. 22B). Na figura 22 estão representadas as quantificações da ativação da respiração durante o estado 4 induzidas pelos substratos das cinases (2-DOG e Cr) (Fig. 21A) em comparação com a velocidade de consumo controle (estado 4), e da inibição de geração de H_2O_2 (Fig. 22B) induzidas pelos mesmos substratos (2-DOG e Cr) nas diferentes frações mitocondriais. Em mitocôndrias de cérebro, o consumo de O_2 aumentou duas vezes após a adição de 10 mM de 2-DOG, se comparado com o controle (estado 4), e aumentou aproximadamente quatro vezes após adição de 7 mM de Cr (Fig. 22A). Em mitocôndrias de rim e coração, a respiração foi levemente ativada (por volta de 40% do valor do controle em ambos os tecidos) após adição de 2-DOG, e 60% and 75% após adição de Cr, em rim e coração, respectivamente (Fig. 22A). A inibição da geração de H_2O_2 em mitocôndrias de cérebro foi praticamente completa após a adição de 2-DOG ou Cr (Fig. 22B), enquanto que em mitocôndrias de rim e coração a inibição da geração de H_2O_2 foi de 70-80% com a adição de ambos substratos (Fig. 22B). Como demonstrado na figuras 21G e 21H, as preparações de fígado não responderam às adições de 2-DOG e Cr em nenhum dos dois tipos de medida (Fig. 22A e 22B).

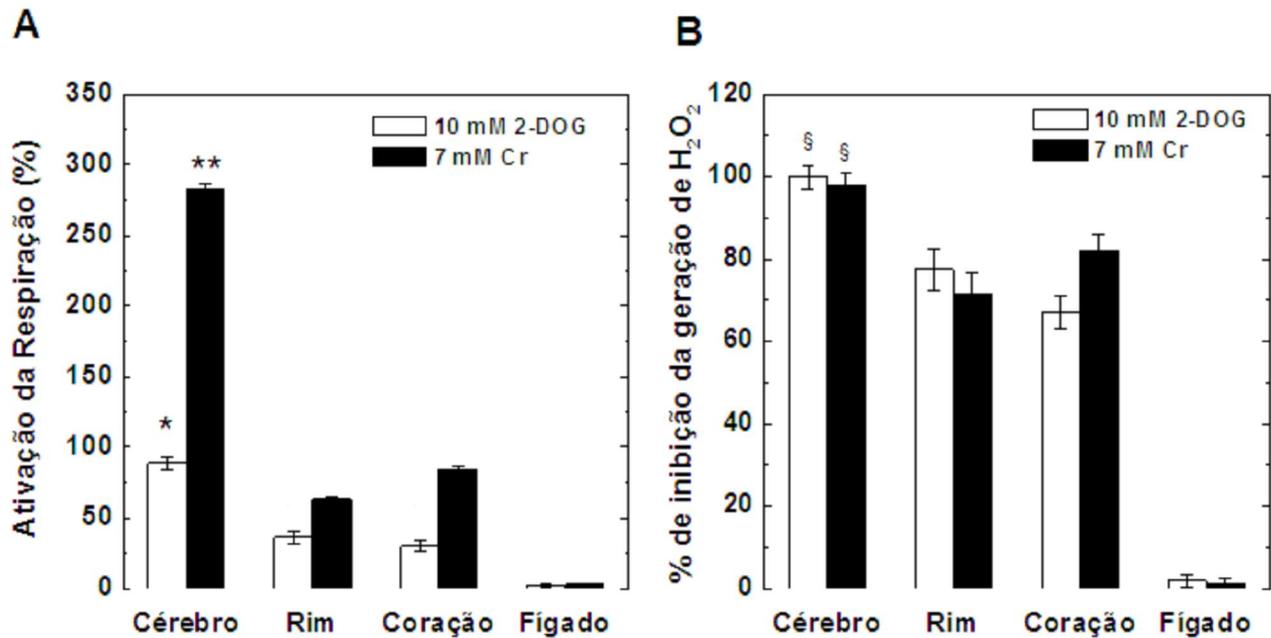


FIGURA 22. As atividades das cinases mitocondriais aumentam o consumo de O_2 e inibem a geração de H_2O_2 em mitocôndrias de diferentes tecidos de rato. (A) As medidas de consumo de O_2 foram realizadas como descrito previamente na seção 3 “metodologia”, após a adição de 10 mM de succinato e 0,2 mM de ADP ao meio de reação padrão contendo 0,2 mg de proteína/mL de mitocôndria isoladas de cérebro, rim, coração e fígado, com os substratos das cinases (10 mM de 2-DOG (barras brancas) e 7 mM de Cr (barras pretas)). (B) As velocidades de geração de H_2O_2 foram medidas após a adição de 10 mM de succinato e 1 mM de ATP ao meio de reação padrão contendo 0,2 mg de proteína/mL de mitocôndria isoladas de cérebro, rim, coração e fígado, com os substratos das cinases (10 mM de 2-DOG (barras brancas) e 7 mM de Cr (barras pretas)). Os dados representam a média \pm o erro padrão (SE), de cinco preparações mitocondriais diferentes, para cada tecido. (A) $*p < 10^{-3}$ comparado com os outros tecidos; $**p < 10^{-6}$ comparado com os outros tecidos. (B) $§p < 0.01$ comparado com os outros tecidos.

A tabela 2 confirma os dados da figura 22B, descritos acima, expressos agora por valores absolutos de velocidade de produção de H_2O_2 (pmoles de H_2O_2 /mg de ptn da fração mitocondrial.min). Vale ressaltar na tabela 2 as diferenças na produção de H_2O_2 induzida por succinato (estado 2), que é 2 vezes maior em mitocôndrias de cérebro do que em mitocôndrias de rim, 3 vezes maior que em mitocôndrias de coração e mais de 10 vezes maior que em mitocôndrias de fígado. A inclusão de 2-DOG ou Cr diminuiu as velocidades de geração de H_2O_2 a valores equivalentes a menos de 5% dos números do controle (respiração em estado 2) em mitocôndrias de cérebro, a 20% em rim e 30% em coração (tabela 2). Não houve redução na produção de H_2O_2 nas mitocôndrias de fígado.

As velocidades de formação de H_2O_2 nas diferentes preparações de mitocôndria podem ser função das diferentes velocidades de respiração dessas mitocôndrias. Assim, procurando avaliar o grau de escape de elétrons para a formação de H_2O_2 , as velocidades de consumo de O_2 das diferentes mitocôndrias foram medidas após a adição de succinato (estado 2) (Tabela 3). As mitocôndrias de cérebro apresentaram níveis mais altos de escape de elétrons, do que os observados para rim, coração e fígado (Tabela 3).

Tabela 2
Geração de H₂O₂ em mitocôndrias de cérebro, rim, coração e fígado de rato.

	Geração de H ₂ O ₂ (pmoles/ mg ptn.min)		
	Controle (n=8) (estado 2 com succinato)	ATP + 2-DOG (n=5)	ATP + Cr (n=5)
Cérebro	220,6 ± 29,9 *	9,2 ± 5,3	8,2 ± 5,4
Rim	98,7 ± 11,7 §	22,4 ± 7,7	25,9 ± 6,2
Coração	65,3 ± 13,8 †	21,6 ± 5,4	11,7 ± 5,2
Fígado	19,5 ± 1,7	25,1 ± 5,8	22,0 ± 3,0

As taxas de geração de H₂O₂ foram medidas após a adição de 10 mM de succinato e 1 mM de ATP ao meio de reação padrão, que continha 0,2 mg ptn/mL de mitocôndria derivada de cérebro, rim, coração e fígado de rato, com e sem a adição dos substratos das cinases (10 mM 2-DOG ou 7 mM Cr). Os resultados apresentados são a média dos n experimentos indicados para cada grupo com os respectivos erros padrão. Obtivemos após análise estatística que * $p < 0.01$ comparando com os outros tecidos; § $p < 10^{-4}$ comparando com coração e fígado; e † $p < 10^{-4}$ comparando com fígado. Os valores obtidos para geração de H₂O₂ após a adição dos substratos das cinases não foram significativamente diferentes, $p > 0.05$.

Tabela 3

Escape de elétrons para formação de H₂O₂ em mitocôndrias de diferentes tecidos de rato.

	(A) Geração de H ₂ O ₂ (nmoles/ mg ptn.min) (estado 2 com succinato)	(B) Consumo de O ₂ (nmoles/mg ptn.min) (estado 2 com succinato)	A/B (x10 ⁻³)
Cérebro	0,221 ± 0,030	109 ± 25,4	2,02
Rim	0,099 ± 0,012	85 ± 19,7	1,16
Coração	0,066 ± 0,014	75 ± 21,9	0,88
Fígado	0,020 ± 0,002	127 ± 22,3	0,15

As taxas de produção de H₂O₂ e de consumo de O₂ foram obtidas como descrito na seção 3 “metodologia”, após a energização das mitocôndrias com a adição de 10 mM de succinato. Os valores obtidos para A/B (x10⁻³) foram significativamente diferentes entre os tecidos, $p \leq 0.01$.

4.1.3 As atividades das cinases mitocondriais e das peroxidases variam inversamente em diferentes tecidos de rato.

Após a constatação de que os substratos das cinases (mt-HK e mt-CK) têm diferentes atuações na respiração e na produção de ERO dependendo da fonte de mitocôndrias, o próximo passo foi avaliar se havia diferenças entre as atividades específicas da mt-HK, da mt-CK e das enzimas antioxidantes CAT, GPx, MnSOD e GR entre as preparações de mitocôndrias isoladas de cérebro, rim, coração e fígado de rato (Fig. 23). Os níveis de atividade específica de mt-HK foram pelo menos três vezes maiores em mitocôndrias de cérebro do que em mitocôndrias de rim e coração, e não detectáveis em mitocôndrias de fígado (Fig. 23A). Já as atividades específicas de mt-CK foram muito altas em mitocôndrias de cérebro e coração, sendo cerca de duas vezes maior em coração que em cérebro, e pelo menos três vezes menor em mitocôndrias de rim que em mitocôndrias de cérebro, e não detectáveis em mitocôndrias de fígado (Fig. 23A). Isso explica o incremento na velocidade de consumo de O_2 e na inibição da geração de H_2O_2 pelas mitocôndrias de cérebro, rim e coração, pois estes parâmetros são alterados de acordo com as quantidades de ADP reciclado e disponibilizado pelas reações dessas enzimas para as mitocôndrias. O perfil das atividades enzimáticas encontrado nesses órgãos parecem se inverter quando são avaliadas as atividades específicas das enzimas antioxidantes mitocondriais (Fig. 23B). As atividades de CAT, GPx e GR são maiores nas mitocôndrias de fígado e de rim, do que nas mitocôndrias de cérebro e coração. As atividades de MnSOD são comparáveis entre cérebro, rim e fígado, porém muito maiores em coração.

Esse resultado mostra que quanto à capacidade antioxidante enzimática clássica, o cérebro é um tecido que possui mitocôndrias muito mais susceptíveis a danos oxidativos do que o rim, o coração e o fígado. Essa característica em conjunto com os dados que demonstram que as mitocôndrias de cérebro tem uma produção de ERO em estado 2 bem mais elevada do que os outros dois tecidos (tabela 2), torna qualquer mecanismo que previna a produção de ERO muito interessante para essas mitocôndrias.

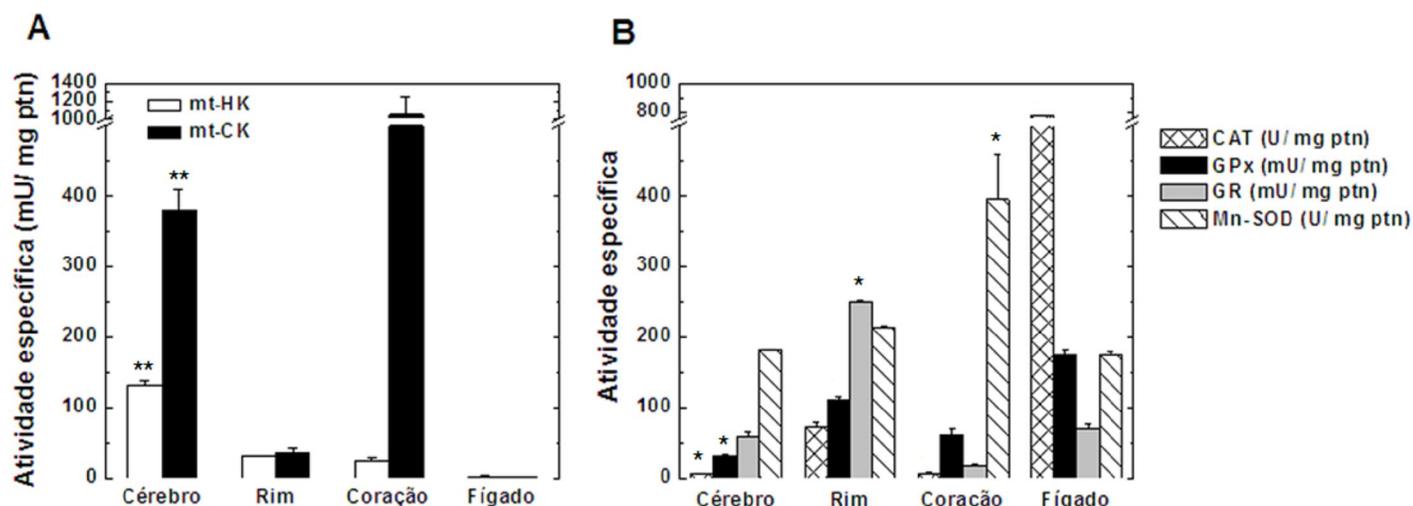
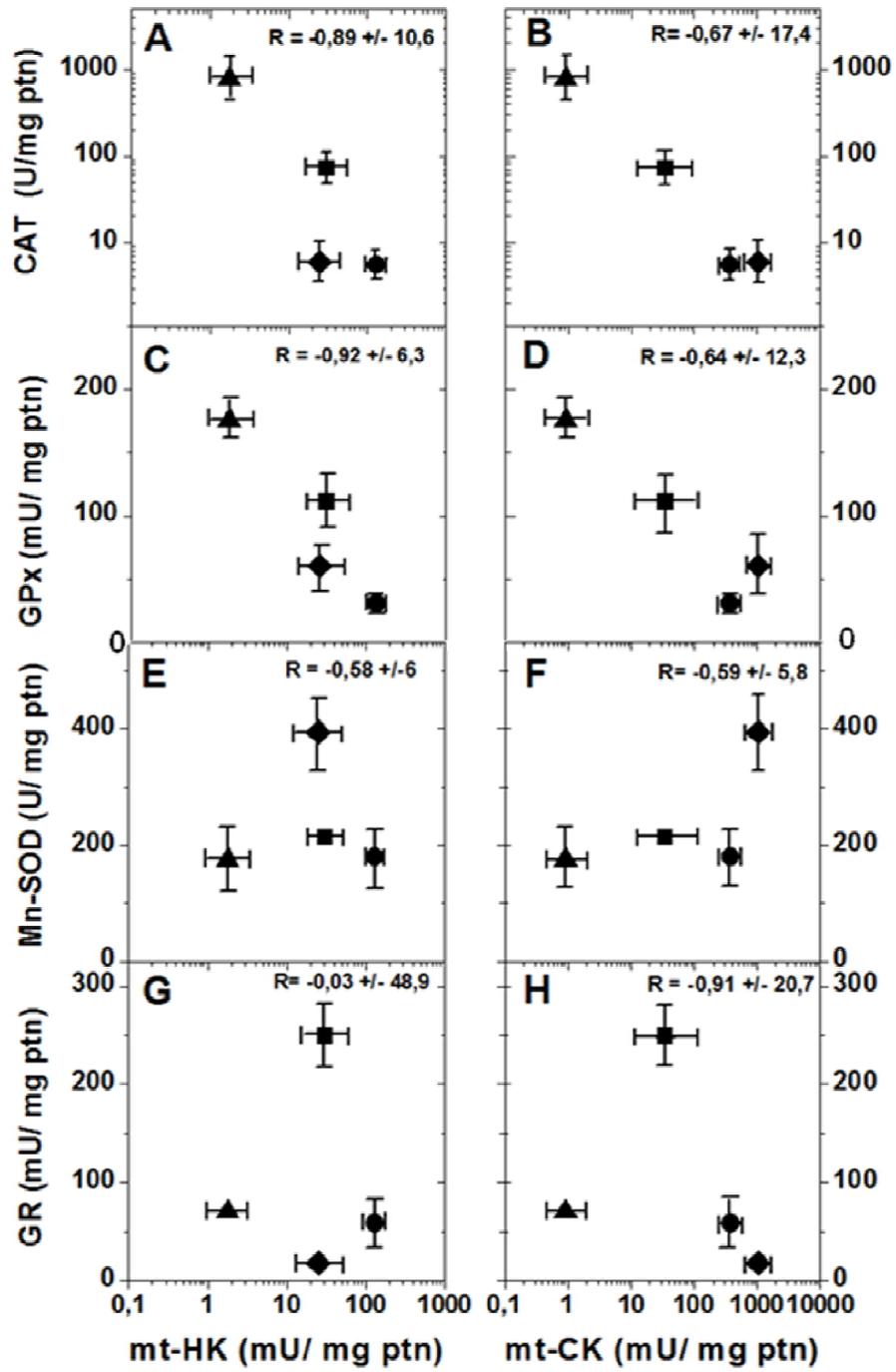


FIGURA 23. (A) Atividades específicas das cinases mitocondriais recicladoras de ADP (mt-HK and mt-CK) e (B) das enzimas antioxidantes mitocondriais (CAT, GR, GPx e MnSOD) em cérebro, rim, coração e fígado de rato. (A) Atividades específicas (mU/mg de proteína) de mt-HK (barras brancas) e mt-CK (barras pretas); (B) Atividades específicas (mU ou U/mg de proteína) de GR (barras cinzas), GPx (barras pretas), MnSOD (barras listrada) e CAT (barras xadrez). O conteúdo de mitocôndrias das preparações foi normalizado pela atividade de F_0F_1 ATPase (dados não mostrados). Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de oito preparações mitocondriais diferentes para cada tecido. (A) $**p < 10^{-6}$ comparado com os outros tecidos; (B) $*p < 10^{-5}$ comparado com os outros tecidos.

Como os perfis das atividades de cinases e enzimas antioxidantes pareciam se inverter nas mitocôndrias dos diferentes tecidos, a figura 24 apresenta uma série de gráficos de correlação entre as atividades dessas enzimas. Apesar de não ter sido demonstrada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre essas enzimas nos tecidos testados, foi observada uma tendência das atividades específicas de CAT e GPx a variar inversamente aos níveis de atividade da mt-HK e da mt-CK (Fig. 24A a 24D). As atividades de MnSOD e GR não se correlacionaram às atividades das duas cinases mitocondriais, com exceção da atividade de GR que tendeu a diminuir com o aumento da atividade da mt-CK (Fig 24H). Possivelmente, somente com o aumento do número de tecidos estudados, a falta de significância estatística observada para a correlação entre as peroxidases e as cinases mitocondriais possa ser resolvida. A tendência de inversão dos níveis dessas atividades enzimáticas, sugerida nos experimentos realizados, sugere a existência de um mecanismo compensatório, direcionado a manter o balanço entre os níveis de produção e detoxificação de ERO nas mitocôndrias.

FIGURA 24. **Correlação entre os níveis de atividade das cinases mitocondriais (mt-HK e mt-CK) e as enzimas antioxidantes mitocondriais (CAT, GPx, MnSOD e GR) em diferentes tecidos de rato.** Cérebro (círculos), rim (quadrados), coração (lozangos) e fígado (triângulos). As atividades específicas das enzimas estão representadas em mU ou U/mg de proteína. O conteúdo de mitocôndrias das preparações foi normalizado pela atividade de F₀F₁ ATPase (dados não mostrados). Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de oito preparações mitocondriais diferentes para cada tecido. R é o coeficiente de regressão da reta. As correlações tiveram significância estatística quando $p \leq 0,05$.



As enzimas mt-HK, mt-CK e mt-AK catalizam reações que produzem ADP, e conseqüentemente desempenham um papel importante no metabolismo celular de nucleotídeos, no controle da FosOx mitocondrial e no controle de parâmetros bioenergéticos da mitocôndria, tais como $\Delta\Psi_m$, respiração mitocondrial e geração de ERO.

Assim, também foram testadas as atividades da adenilato cinase mitocondrial (mt-AK) em mitocôndrias isoladas de cérebro, rim, coração e fígado de rato (Fig. 25). Como os níveis de atividade dessa cinase não foram significativamente diferentes entre esses tecidos, ao contrário do que ocorre com as atividades específicas de mt-HK e mt-CK, não foi dada continuidade a investigação do papel antioxidante dessa enzima, priorizando-se os estudos com mt-HK e mt-CK.

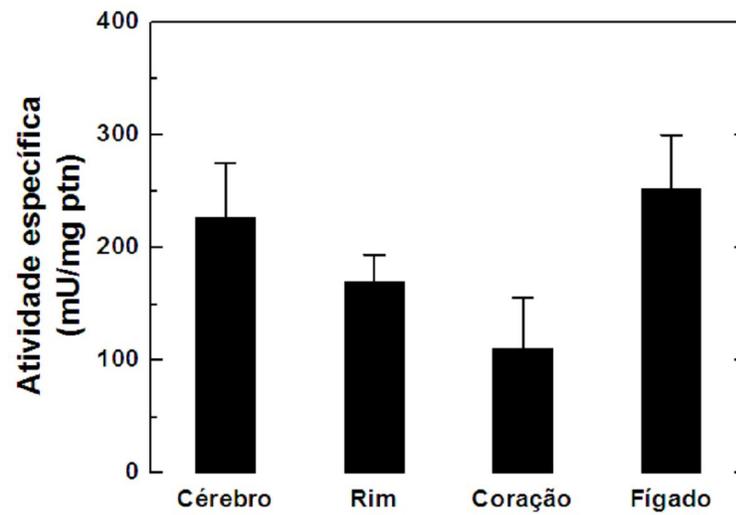


FIGURA 25. **Atividades específicas de mt-AK em mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos.** Os testes estatísticos indicaram que $P > 0,05$ comparando as atividades encontradas nos diferentes tecidos.

4.1.4 O $\Delta\Psi_m$ e a geração de ERO são diferentemente regulados pelas atividades das cinases mitocondriais em diferentes tecidos de rato.

Com o intuito de investigar as concentrações de ADP que levam a despolarizações do $\Delta\Psi_m$ dentro das faixas obtidas pela adição dos substratos da mt-HK ou da mt-CK, o $\Delta\Psi_m$ foi titulado com ADP e a curva de despolarização do $\Delta\Psi_m$ expresso em percentual da despolarização máxima com ADP, está apresentada na figura 26. Nos experimentos apresentados nas figuras 26 e 27, procuramos utilizar mitocôndrias com perfis bem diferentes de atividades de cinases mitocondriais, e os tecidos escolhidos foram o cérebro, o rim e o fígado. O $\Delta\Psi_m$ das mitocôndrias de cérebro, rim e fígado exibiram dependências parecidas ao ADP (Fig. 26A). Entretanto, a ativação das enzimas mt-HK ou mt-CK, por 10 mM de 2-DOG ou 7 mM de Cr, promoveu a despolarização de 65% e 75% do $\Delta\Psi_m$, respectivamente, em mitocôndrias de cérebro, e 45% e 78% em mitocôndrias de rim (Fig. 26B). O $\Delta\Psi_m$ das mitocôndrias de fígado foram insensíveis aos dois substratos das cinases (Fig. 26B), o que está de acordo com a ausência de estimulação da respiração mostrada na figura 21G. Na verdade, os efeitos da ativação das cinases na despolarização do $\Delta\Psi_m$ em diferentes tecidos é diretamente proporcional aos níveis de ADP gerados e disponibilizados por essas enzimas em cada tecido. Esses resultados sugerem que, nas condições utilizadas nos experimentos, a atividade de reciclagem do ADP induzida pelas cinases (mt-HK ou mt-CK) despolarizam o $\Delta\Psi_m$ de forma equivalente a pulsos de 125 e 150 μM ADP, respectivamente (Fig. 26A, círculos brancos) em mitocôndrias de cérebro

de rato, e de 30 μM e 150 μM em mitocôndrias de rim de rato (Fig. 26A, círculos pretos).

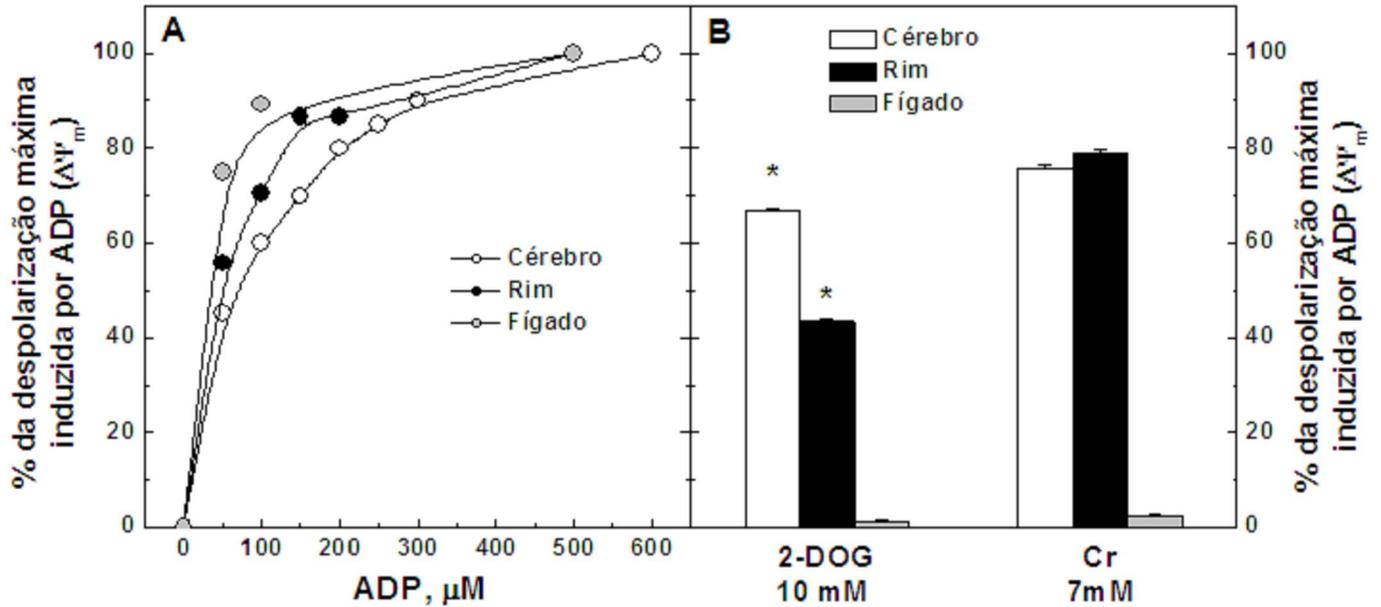


FIGURA 26. Comparação entre a percentagem da despolarização máxima induzida por ADP no $\Delta\Psi_m$ provocadas por doses crescentes de ADP (A) ou pela adição dos substratos das cinases mitocondriais (B) em mitocôndrias de cérebro, rim e fígado de rato. As magnitudes do $\Delta\Psi_m$ foram medidas após a adição de 10 mM de succinato e (A) quantidades crescentes de ADP em mitocôndrias de cérebro (círculos brancos), rim (círculos pretos) e fígado (círculos cinzas) de rato; (B) substratos da cinases, 10 mM de 2-DOG ou 7 mM de Cr após um pulso de 0,25 mM de ADP. Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de cinco preparações mitocondriais diferentes para cada tecido. * $p < 0.01$ comparado com os outros tecidos.

A afinidade aparente das diferentes mitocôndrias por ADP para controlar a geração de ERO parece ser uma característica intrínseca de cada mitocôndria, e estaria envolvida no mecanismo de geração de H_2O_2 , podendo refletir diferentes afinidades do sistema ANT- F_0F_1 ATP sintase. Para testar esta possibilidade, na figura 27, a dependência de ADP para inibir a geração de H_2O_2 foi avaliada em duas diferentes condições: (i) quando as três mitocôndrias têm uma alta velocidade de reciclagem de ADP garantida pela adição de um excesso de HK de levedura (exógena) (5U/mL) ao meio de reação, com o intuito de igualar as condições de disponibilidade de ADP em todas as mitocôndrias testadas (Fig. 27A) e (ii) quando a reciclagem de ADP depende exclusivamente das atividades endógenas de mt-HK e mt-CK de cada tecido (Fig. 27B). Os níveis mitocondriais de geração de H_2O_2 decaíram de forma similar nos três tecidos com o aumento das concentrações de ADP na presença de um excesso de HK exógena (Fig. 27A). Perfis completamente diferentes foram obtidos para as curvas de inibição da geração de H_2O_2 quando apenas as atividades endógenas de mt-HK e mt-CK estavam ativadas. Nas mitocôndrias de cérebro, o ADP foi mais eficiente em inibir a geração de H_2O_2 do que nas mitocôndrias de rim, sendo a menor eficiência observada nas mitocôndrias de fígado (Fig. 27B). Como as afinidades aparentes por ADP nas mitocôndrias dos três tecidos foram muito parecidas na figura 27A, fica descartada a possibilidade das atividades do ANT e da F_0F_1 ATP sintase serem os fatores limitantes na utilização dos pulsos de ADP pelos tecidos, uma vez que somente quando as atividades das cinases variam percebe-se uma grande diferença do IC_{50} para inibição da geração de H_2O_2 por ADP. A figura 27C mostra que, quando a mt-HK e a mt-CK foram

estimuladas por 2-DOG e Cr e uma concentração alta de ADP (0,5 mM), quase toda a geração de H₂O₂ foi abolida em mitocôndrias de cérebro, enquanto que em mitocôndrias de rim e fígado foram promovidas inibições de 80% e 40%, respectivamente. Quando oligomicina foi adicionada ao meio de reação, condição que bloqueia a síntese de ATP e aumenta o $\Delta\Psi_m$, a geração de H₂O₂ foi máxima nas mitocôndrias dos três tecidos (100%), o que confirmou que a atividade da F₀F₁ ATP sintase não era um fator limitante no uso das doses de ADP oferecidas às mitocôndrias (Fig. 27C).

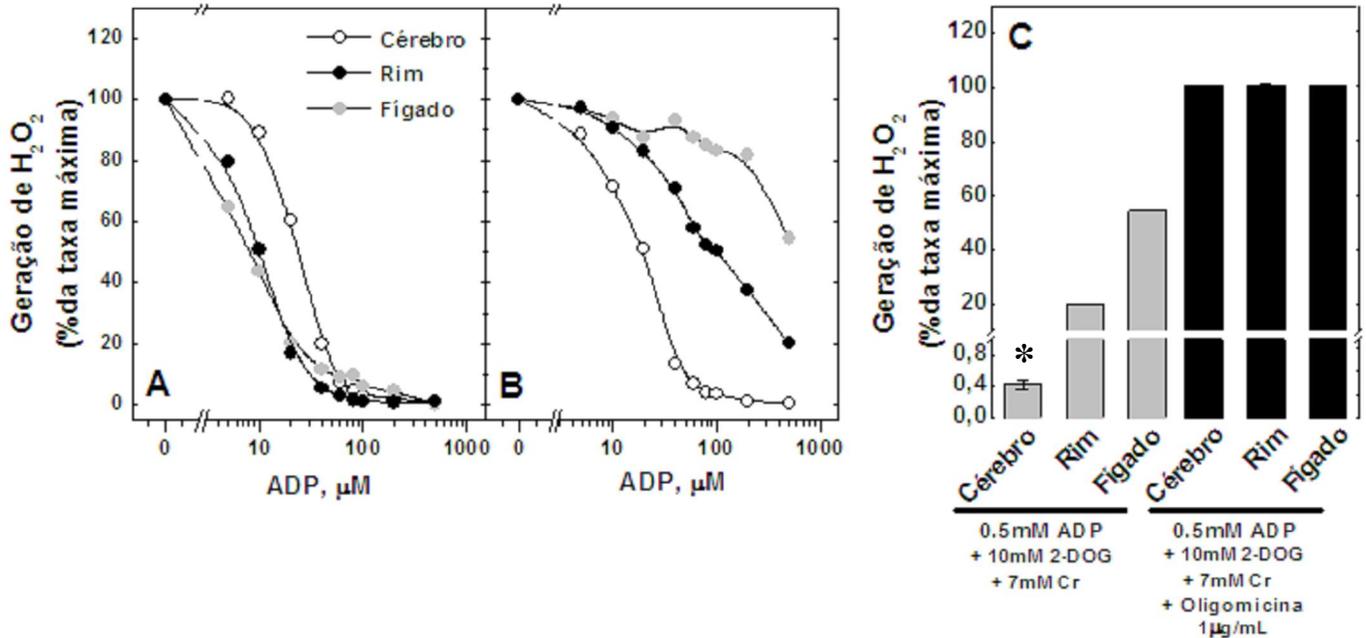
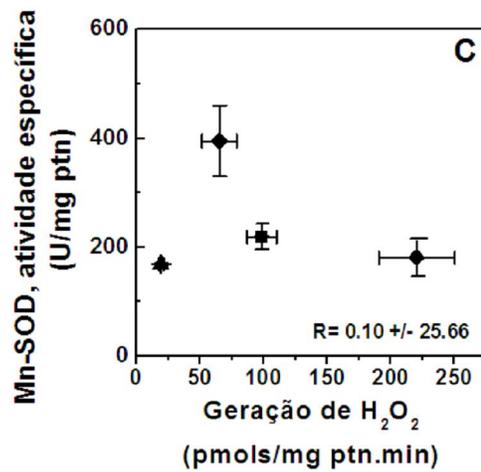
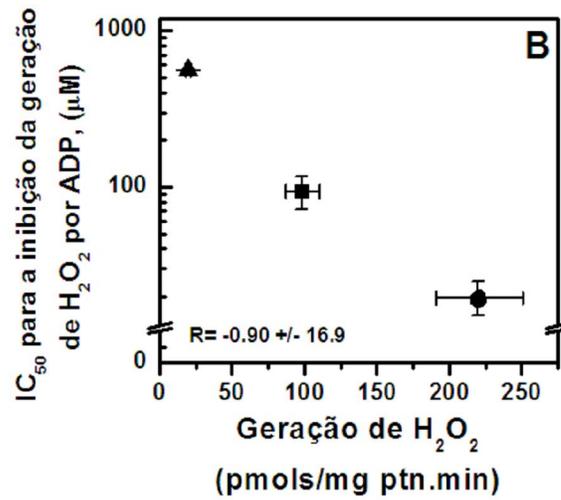
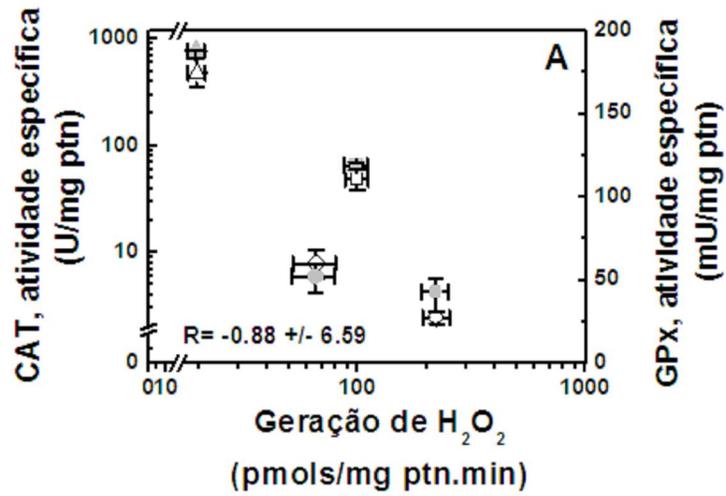


FIGURA 27. A geração de H₂O₂ é diferentemente regulada por ADP em tecidos de rato que exibem níveis variados de atividades de mt-HK e mt-CK. A geração de H₂O₂ foi expressa como percentual da velocidade máxima obtida durante a respiração mitocondrial em estado 2 induzida por 10 mM de succinato, que corresponde no cérebro a aproximadamente 190 pmols/ mg ptn.min (círculos brancos), em rim a 91 pmols/ mg ptn.min (círculos pretos) e em fígado a 17,5 pmols/ mg ptn.min (círculos cinzas). (A) O meio de reação continha 5 U/mL de HK de levedura e 10 mM de glicose. (B,C) O meio de reação continha 10 mM de 2-DOG e 7 mM de Cr, sem a adição de HK exógena. A oligomycin estava numa concentração final de 1 μg/mL. Os dados representam a média dos experimentos ± SE de cinco preparações mitocondriais diferentes para cada tecido, em cada condição de ensaio. **p*<0.01 comparado com os outros tecidos.

4.1.5 As atividades das peroxidases se correlacionam negativamente com a geração de H₂O₂ em mitocôndrias de diferentes tecidos de rato.

A figura 28A mostra uma correlação inversa entre as atividades das peroxidases mitocondriais CAT e GPx, e as velocidades de geração de H₂O₂, induzida por 10 mM de succinato, nas mitocôndrias dos diferentes tecidos testados. No entanto, não há correlação entre as atividades de MnSOD e as velocidades de geração de H₂O₂ para as diferentes mitocôndrias (Fig. 28C). Interessantemente, os valores de IC₅₀ para a inibição da geração de H₂O₂ pelo ADP gerado pelas atividades de mt-HK e de mt-CK, mostraram uma correlação inversa com as velocidades de geração de H₂O₂ induzida por succinato para mitocôndrias de cérebro, rim e fígado de rato (Fig. 28B). As afinidades por ADP para inibir a geração de H₂O₂ estão na mesma faixa se comparadas as diferentes preparações de mitocôndria (Fig. 27A).

FIGURA 28. Correlação entre as velocidades de geração de H_2O_2 induzidas por 10 mM de succinato, em mitocôndrias de cérebro (círculos), rim (quadrados), coração (lozangos) e fígado (triângulos) de rato, com: (A) as atividades de CAT (símbolos cinza) e de GPx (símbolos brancos); (B) valores de IC_{50} para a inibição da geração de H_2O_2 com ADP (μM), quando apenas as atividades endógenas de mt-HK e mt-CK estão ativadas (o meio de reação continha 10 mM de 2-DOG e 7 mM de Cr); e (C) atividades de MnSOD. Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de no mínimo cinco preparações mitocondriais diferentes para cada tecido, em cada condição de ensaio. R é o coeficiente de regressão da reta. As correlações tiveram significância estatística quando $p \leq 0,05$.



Após constatarmos pelos resultados obtidos na primeira parte dessa tese, que o cérebro é, dentre os quatro tecidos estudados, o menos protegido por defesas antioxidantes enzimáticas clássicas, mas em contra partida é o mais beneficiado pela proteção antioxidante preventiva fornecida pela atividade das cinases mitocondriais, decidimos investigar se esse mecanismo antioxidante protege da mesma forma mitocôndrias de cérebro de camundongos de diferentes idades. Uma vez obtendo resultados positivos, o objetivo era investigar como ocorre a implementação desse sistema durante o desenvolvimento pós-natal desses animais, do nascimento até sua fase adulta.

4.2. Cinases mitocondriais na defesa antioxidante preventiva em mitocôndrias de cérebro de camundongos em desenvolvimento.

4.2.1 Atividades específicas da mt-HK e da mt-CK em mitocôndrias de cérebro de camundongos de diferentes idades.

Especula-se que as defesas antioxidantes no cérebro vão sendo implementadas durante o crescimento dos indivíduos (MCLEAN et al, 2005; CHANG et al, 2005). Assim sendo, decidimos avaliar o impacto que níveis diferentes de atividades das cinases mitocondriais podem causar em termos de defesa antioxidante em cérebros de camundongos de diferentes idades (1, 14, 35 e 60 dias após o nascimento). Para isso, o primeiro passo foi dosar as atividades de mt-HK (Fig. 29A), mt-CK (Fig. 29B) e mt-AK (Fig. 29C) em mitocôndrias isoladas dos cérebros desses animais.

As atividades de mt-HK (Fig. 29A) foram crescentes até o trigésimo quinto dia de vida dos camundongos, se estabilizando num patamar quatro vezes maior do que o valor encontrado nas mitocôndrias dos animais de 1 dia. As atividades de mt-CK (Fig. 29B) também foram crescentes até os dois meses de vida dos camundongos, chegando a um patamar quase cinco vezes maior que o inicial (camundongos com 1 dia de vida). O nível de atividade da mt-AK não sofreu alterações consideráveis durante os primeiros dois meses de vida dos camundongos.

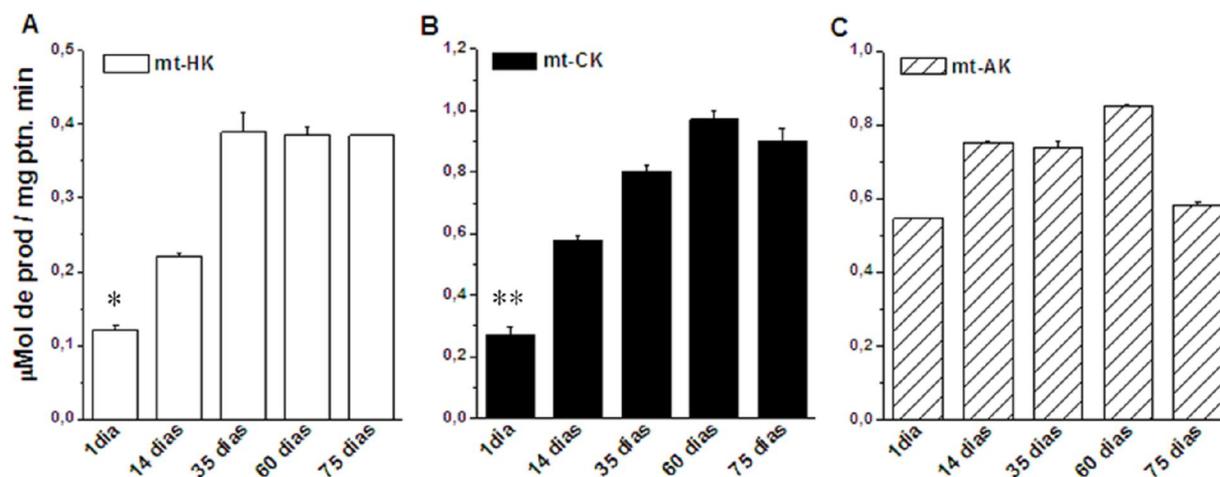


FIGURA 29. Atividades específicas das cinases mitocondriais recicladoras de ADP (A) mt-HK (barras brancas), (B) mt-CK (barras pretas) e (C) mt-AK (barras listradas) em cérebro de camundongo em diferentes idades. As atividades foram expressas em μMoles de produto/mg de proteína mitocondrial por minuto, e os experimentos realizados segundo descrito na seção 3 “metodologia”. Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de no mínimo cinco preparações mitocondriais diferentes para cada idade testada. * $p < 0,01$ comparado com animais de 14, 35, 60 e 75 dias de idade. ** $p < 0,05$ comparado com animais de 14, 35, 60 e 75 dias de idade.

4.2.2 Atividades específicas de mt-HK e mt-CK em diferentes frações celulares de cérebro de camundongos de 1 e 75 dias.

Na figura 30 foram avaliadas as atividades de HK, CK e AK em frações mitocondriais que representavam os extremos, mínimo e máximo de atividade enzimática dentre as diversas idades estudadas. Objetivo desse experimento foi verificar a distribuição das atividades dessas enzimas entre o citosol e a mitocôndria em cérebros de camundongos dessas duas idades.

Nos estudos prévios de Khan e colaboradores (KHAN et al, 1999) a atividade de HK foi avaliada em homogenados totais de cérebro e a atividade de CK não foi estudada. É descrito na literatura que a HK pode se dissociar de maneira reversível da mitocôndria, ficando solúvel no citoplasma celular, dependendo dos níveis de G6P nas células (BUSTAMANTE e PEDERSEN, 1980; WILSON, 2003). Na figura 30A ficou demonstrado que a HK não estava deslocada para o citosol, sendo as atividades recuperadas nas duas frações (1 e 75 dias) majoritárias nas mitocôndrias, como esperado em cérebro. As atividades de CK aumentam de modo equivalente nas frações mitocondriais e nas citosólicas de 1 para 75 dias de vida dos camundongos; enquanto a AK não aumenta de atividade nas mitocôndrias de 1 para 75 dias, mas tem um acréscimo significativo no citosol.

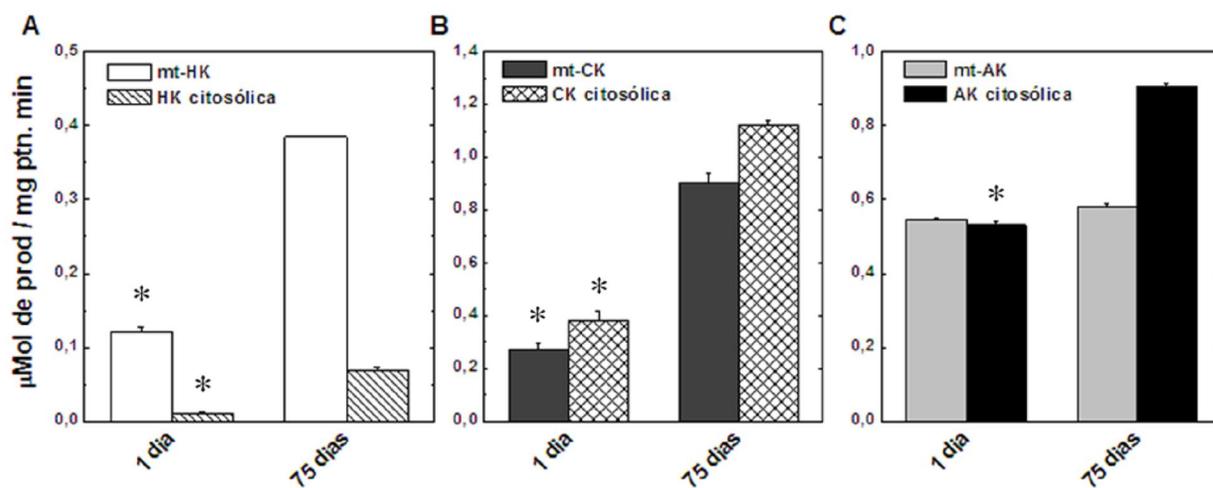


FIGURA 30. Avaliação das atividades de (A) HK, (B) CK e (C) AK, nas frações mitocondrial e citosólica das preparações de cérebro de camundongos de 1 e 75 dias. As atividades foram expressas em $\mu\text{Moles de produto/mg de proteína mitocondrial por minuto}$, e os experimentos realizados segundo descrito na seção 3 “metodologia”. Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de no mínimo cinco preparações mitocondriais diferentes para cada idade testada. $*p < 0,01$ comparado com animais de 75 dias de idade.

4.2.3 Capacidade antioxidante enzimática em mitocôndrias de cérebro de camundongos de diferentes idades.

Visando avaliar a capacidade antioxidante de cada fração mitocondrial, foram realizados ensaios de atividade para enzimas antioxidantes clássicas, tais como CAT, GPx, GR e MnSOD, nas preparações de cérebro de camundongos de 1, 14, 35 e 75 dias de idade. A atividade de CAT (Fig. 31A) apresentou um decréscimo significativo após o décimo quarto dia de vida dos camundongos. A atividade de GPx (Fig. 31B) foi crescente até os 35 dias de vida dos animais, e depois se manteve num patamar aproximadamente 30% maior que os valores obtidos com os animais de 1 dia de idade. A atividade de GR (Fig. 31C) duplica do primeiro para o décimo quarto dia de vida dos camundongos, tendendo após isso a diminuir. A atividade de MnSOD (Fig. 31D) triplica do primeiro para o décimo quarto dia de vida dos camundongos, mas volta a cair após 35 dias de vida, tendo um decréscimo de 50% após os dois meses de idade do animal.

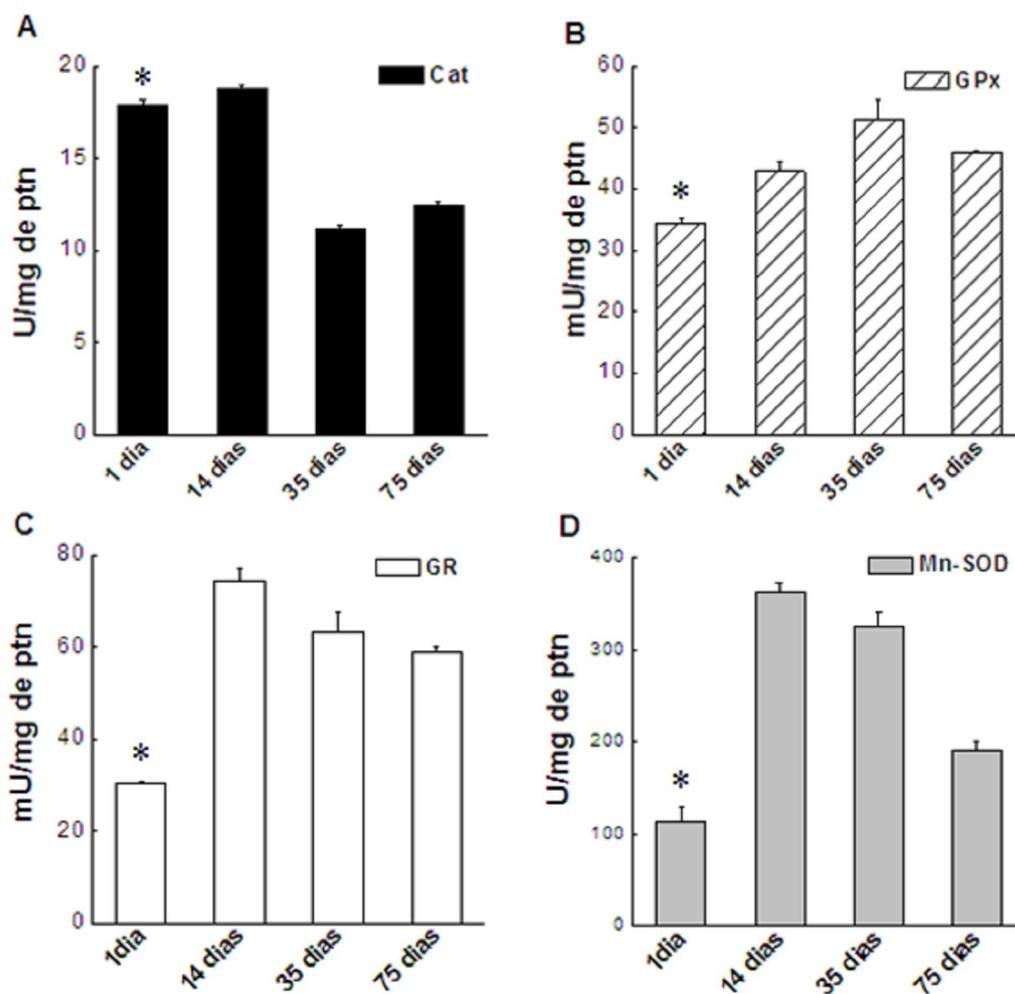


FIGURA 31. Atividades específicas das enzimas antioxidantes mitocondriais (A) CAT, (B) GPx, (C) GR e (D) MnSOD em cérebro de camundongo em diferentes idades. As atividades foram expressas em mU ou U/mg de proteína mitocondrial, e os experimentos realizados segundo descrito na seção 3 “metodologia”. Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de no mínimo cinco preparações mitocondriais diferentes para cada idade testada. * $p < 0,05$ comparado com animais de 35 e 75 dias de idade.

4.2.4 A Geração de H₂O₂ em mitocôndrias de cérebro é diferentemente inibida pela ativação de mt-HK e mt-CK dependendo das idades dos camundongos.

Na figura 32 são apresentados traçados representativos dos experimentos que avaliaram como as atividades da mt-HK e da mt-CK afetam a geração de H₂O₂ em mitocôndrias isoladas de cérebro de camundongos em diferentes idades. Nas curvas de produção de H₂O₂, as respostas das mitocôndrias à adição dos substratos das cinases, 2-DOG (Fig. 32A e Fig. 33) e Cr (Fig. 32B e Fig. 33) e a percentagem de inibição da formação de ERO (fig. 33C) aumentam acompanhando o desenvolvimento dos animais.

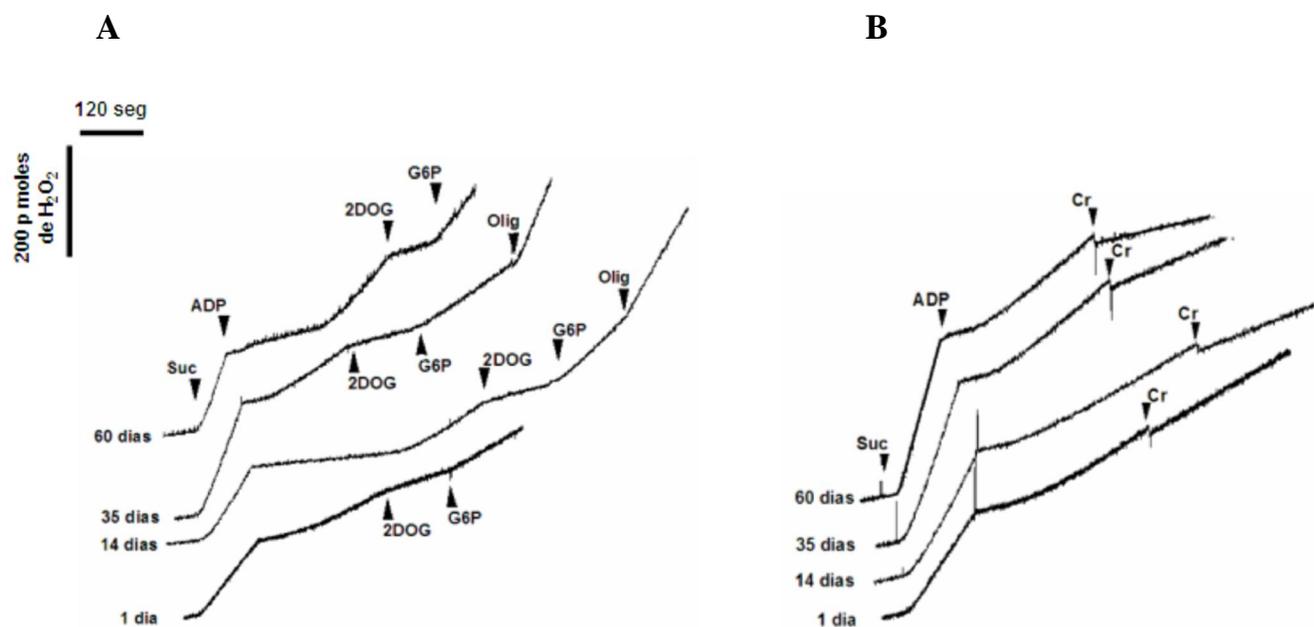
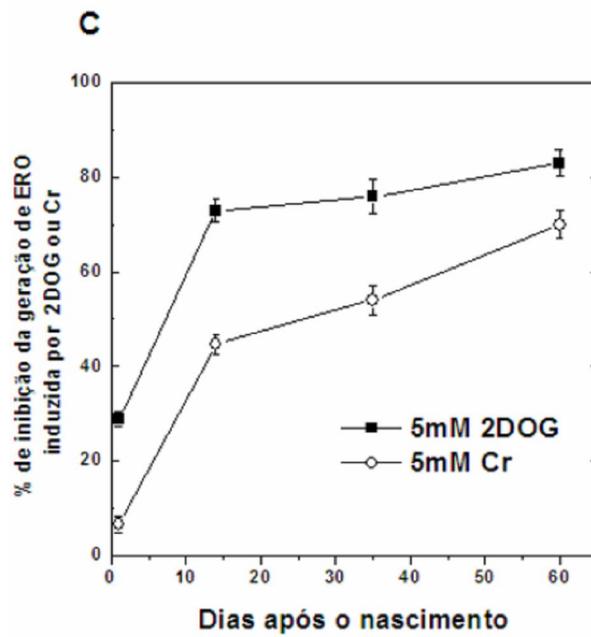
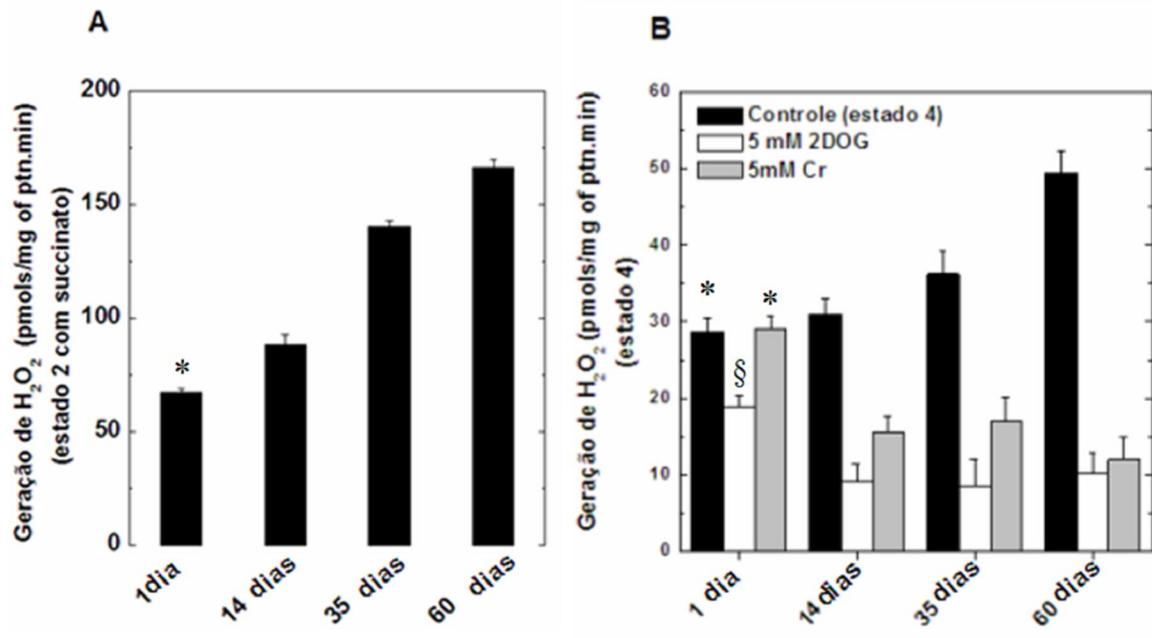


FIGURA 32. Atividades de mt-HK e mt-CK afetando diferentemente a geração de H_2O_2 em mitocôndrias de cérebro de camundongo de 1, 14, 35 e 60 dias de vida. (A) Produção de H_2O_2 quando adicionado ao meio de reação 10 mM de succinato e 0,075 (1 e 35 dias) ou 0,15 (14 e 60 dias) mM de ADP, com a adição de 5 mM de 2DOG e 0,5 mM de G6P. Os pulsos de oligomicina (Olig) foram de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B) Produção de H_2O_2 quando adicionado ao meio de reação 10 mM de succinato e 0,075 mM de ADP, com a adição de 5 mM de Cr. Os traçados apresentados representam os experimentos realizados com cinco preparações mitocondriais diferentes, para cada idade.

Na figura 33 estão representadas as quantificações das taxas de geração de H_2O_2 induzida por succinato (estado 2 da respiração mitocondrial) de acordo com o aumento da idade dos animais (Fig. 33A), e das taxas de geração de H_2O_2 (Fig. 33B) induzidas por 2-DOG e Cr nas diferentes frações mitocondriais, em comparação com a taxa de geração de H_2O_2 do controle (estado 4 da respiração mitocondrial). Surpreendentemente, há um aumento de três vezes na taxa de produção de H_2O_2 , induzida por succinato, do primeiro dia de vida até os dois meses de idade dos camundongos (Fig. 33A). As taxas de formação de H_2O_2 são duas vezes menores após a ativação da mt-HK, e três vezes menores após a ativação da mt-CK em animais com 60 dias do que em animais com 1 dia de vida (Fig. 33B). Isso é acompanhado por um aumento de quase 100% na taxa de geração de H_2O_2 do controle (estado 4), de 1 para 60 dias de idade dos camundongos. Portanto, conforme aumentam as taxas de geração de H_2O_2 , aumentam também as atividades das cinases mitocondriais, que conseqüentemente passam a inibir de forma mais eficaz a produção de ERO nessas mitocôndrias durante o desenvolvimento (Fig. 33C).

FIGURA 33. **Quantificações das taxas de geração de H₂O₂ nas preparações de mitocôndrias de camundongos de diferentes idades.** (A) Geração de H₂O₂ induzida por 10 mM de succinato (estado 2 da respiração); (B) Geração de H₂O₂ após as mitocôndrias consumirem um pulso de 0,075 mM de ADP (estado 4 da respiração), e após a adição de 5 mM de 2-DOG ou 5 mM de Cr às mitocôndrias de cérebro de animais com 1, 14, 35 e 60 dias de idade (o meio de reação já continha 10 mM de succinato). (C) Inibição da geração de ERO induzida por 5 mM de 2-DOG (quadrado) ou 5 mM de Cr (círculo) (o meio de reação continha 10 mM de succinato e 0,075 mM de ADP). Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de cinco preparações mitocondriais diferentes para cada idade testada. * $p < 0,01$ comparado com animais de 14, 35 e 60 dias de idade. § $p < 0,05$ comparado com animais de 14, 35 e 60 dias de idade.

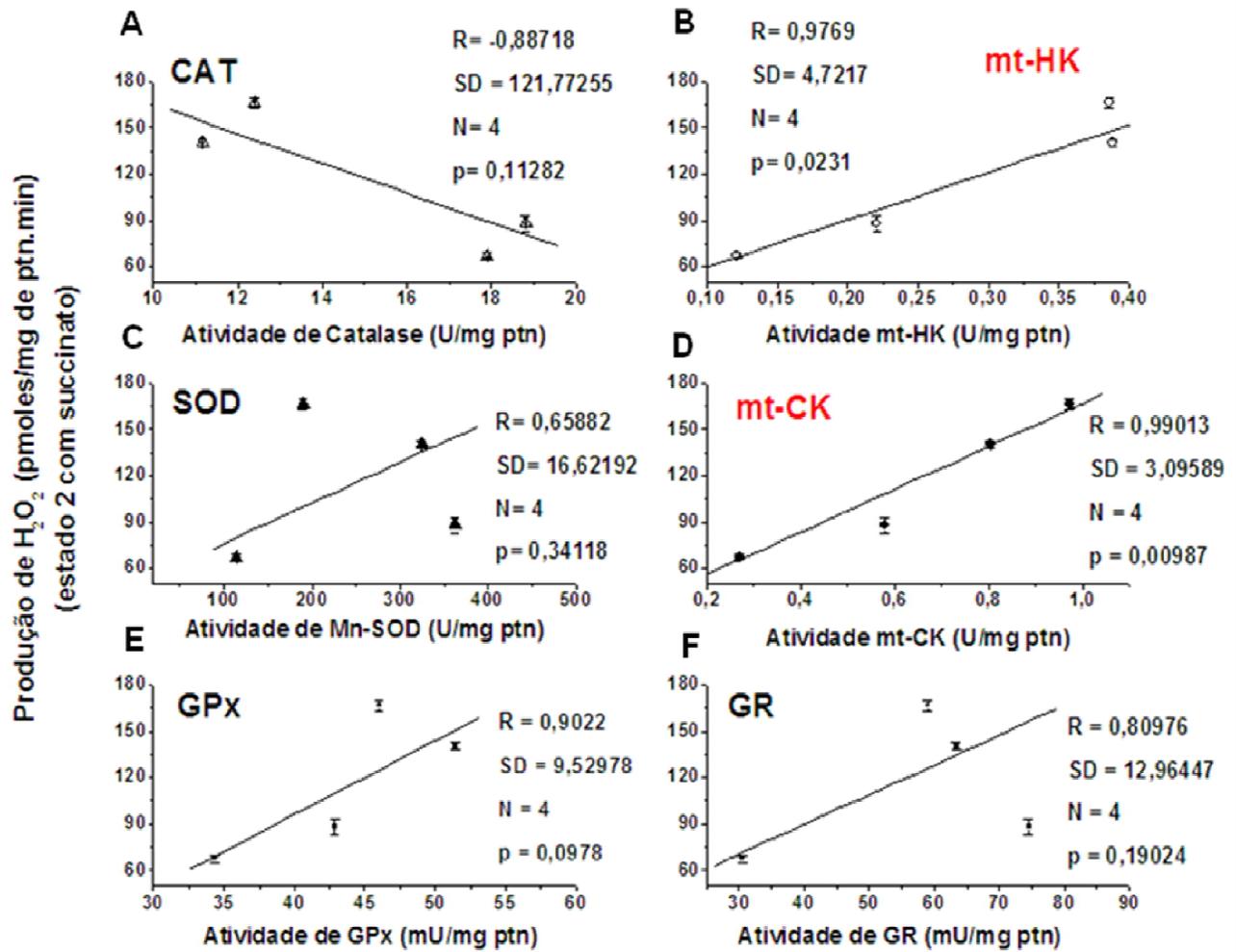


4.2.5 Correlação entre as taxas de geração de H₂O₂ pelas mitocôndrias de cérebro de camundongo em desenvolvimento e as atividades das enzimas antioxidantes e cinases mitocondriais.

Os gráficos B e D da figura 34 mostram uma correlação positiva entre a geração de H₂O₂, induzido por 10 mM de succinato, e as atividades de mt-HK e mt-CK, respectivamente. As correlações positivas encontradas entre a geração de H₂O₂ (estado 2) e as atividades das enzimas antioxidantes mitocondriais GPx (Fig. 34E), MnSOD (Fig. 34C) e GR (Fig. 34F), não foram estatisticamente significativas. A atividade de CAT tendeu a uma correlação negativa com a geração de H₂O₂ (estado 2), porém também sem significância estatística.

Após a indução da respiração com succinato, o H₂O₂ detectado pelo método de oxidação da sonda fluorescente Amplex Red é resultante do balanço entre o H₂O₂ que é gerado pela CTE durante a respiração em estado 2, e o H₂O₂ retirado pela ação dos mecanismos antioxidantes mitocondriais detoxificadores, tais como as enzimas antioxidantes clássicas. Dessa forma, o aumento observado nas atividades de GPx, GR e MnSOD nas mitocôndrias de cérebro conforme os animais se desenvolvem, não parecem suficientes para conter o acréscimo significativo na geração de H₂O₂ observado com o aumento das idades dos animais. Isso torna o aumento na capacidade protetora desempenhada pelas cinases, bastante importante em mitocôndrias de cérebro de animais adultos.

FIGURA 34. Correlação entre as taxas de geração de H₂O₂ e as atividades das cinases e enzimas antioxidantes, em mitocôndrias de cérebro de camundongos em desenvolvimento. Correlação entre a geração de H₂O₂ após a indução da respiração em estado 2 por 10 mM de succinato e as atividades de (A) CAT; (B) mt-HK; (C) MnSOD; (D) mt-CK; (E) GPx; e (F) GR, medidas em mitocôndrias isoladas de cérebro de camundongos de 1, 14, 35 e 60 dias de idade. As atividades foram medidas de acordo com as descrições encontradas na seção 3 “metodologia”. Os dados representam a média dos experimentos \pm SE de quatro preparações mitocondriais diferentes para cada tecido, em cada condição de ensaio. R é o coeficiente de regressão da reta, SD é o desvio padrão e n é o número de idades diferentes testadas. As correlações tiveram significância estatística quando $p \leq 0,05$.



5. DISCUSSÃO

Em células eucarióticas a CTE mitocondrial é uma das principais fontes celulares de ERO, que é gerado pela redução parcial do oxigênio molecular a $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , durante a FosOx. Evidências crescentes na literatura indicam que o desbalanço entre a produção e a detoxificação de ERO está associado a diversas patologias, tais como diabetes e estados hiperglicêmicos (DA-SILVA et al, 2004; MEYER et al, 2006 (anexo I); BROWNLEE, 2001), sepse (VAN DEN BERGHE et al, 2001 (anexo III)) e doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington (SOUCEK et al, 2003; NICHOLLS e BUDD, 2000; MULTHAUP et al, 1997; GIASSON et al, 2002). Os danos causados às mitocôndrias estão entre as razões pelas quais injúrias teciduais e processos inflamatórios causam estresse oxidativo nas células, durante o curso dessas doenças. Entre os motivos que provocam esses danos podemos citar o descontrole na homeostase de cálcio e do pH celulares, e o desbalanço do estado redox celular (disponibilidade de equivalentes redutores para a FosOx) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2006). Diversas patologias envolvem também, a diminuição total ou parcial das atividades de um ou mais complexos da CTE (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Isso pode acarretar um aumento da geração de ERO intramitocondrial, devido a mudanças na magnitude do $\Delta\Psi_m$, o que induz em última instância, a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) e a apoptose. Como as mitocôndrias são ao mesmo tempo fontes e alvos de estresse oxidativo, alguns componentes mitocondriais podem ser severamente afetados pelo ataque por ERO, tais como os complexos I, II e

IV da CTE mitocondrial, e algumas enzimas do ciclo de Krebs, como a aconitase, a α -cetoglutarato desidrogenase e a succinato desidrogenase (TURRENS, 2003; ADAM-VIZI e CHINOPOULOS, 2006). O estresse oxidativo pode causar ainda a peroxidação de lipídeos das membranas mitocondriais e danos ao DNA mitocondrial (ANDREYEV et al, 2005).

Tendo em vista que, como foi descrito por Boveris e Chance em 1973 (BOVERIS e CHANCE, 1973), a geração de ERO pela mitocôndria é controlada pela magnitude do $\Delta\Psi_m$, nosso grupo demonstrou em dois trabalhos recentes que a mt-HK e a mt-CK, duas enzimas recicladoras de ADP localizadas nessa organela, têm a capacidade de prevenir a produção de ERO por estimular a atividade da F_0F_1 ATP sintase mitocondrial em mitocôndrias de cérebro de rato (DA-SILVA et al, 2004; MEYER et al, 2006 (anexo I)). A manutenção do $\Delta\Psi_m$ baixo, nesse caso, resulta do acoplamento da FosOx à formação de G6P ou PCr. A investigação deste mecanismo antioxidante em condições patológicas nas quais há a exacerbação da produção de ERO, como no caso das doenças citadas anteriormente, constitui um campo promissor de estudos buscando um maior entendimento dos mecanismos que exacerbam ou controlam a produção de ERO nas mitocôndrias, para que futuramente seja possível o desenvolvimento de novas terapias. Dois trabalhos foram desenvolvidos nesse sentido durante essa tese. O primeiro investigou o efeito da ativação das cinases mitocondriais em neuronônios corticais de cérebro de rato submetidos a condições de hiperglicemia (MEYER et al, 2006 (anexo I)), confirmando que a mt-HK pode ser inibida por quantidades de G6P encontradas fisiologicamente em tecidos submetidos a altas concentrações de glicose (Fig. 20). Essa inibição exacerba a geração de ERO pelas

mitocôndrias de cérebro, mas esse quadro pode ser revertido pela induzida atividade da mt-CK, pela oferta de Cr a essas mitocôndrias (MEYER et al, 2006 (anexo I)). Um segundo trabalho (anexo III) determinou a ocorrência de disfunção mitocondrial no cérebro de animais sépticos. O mecanismo responsável por esse comprometimento dos parâmetros bioenergéticos e conseqüentemente das funções mitocondriais continua desconhecido, porém ficou sugerido o envolvimento de ERO nesse processo.

Os mecanismos de formação e detoxificação de ERO nas mitocôndrias são tecido-específicos, e dependem das características e demandas metabólicas de cada tecido (ADAM-VIZI e CHINOPOULOS, 2006). Os experimentos realizados durante essa tese buscaram contribuir com o entendimento da distribuição e do papel desempenhado pelo mecanismo antioxidante preventivo dependente de mt-HK e mt-CK. Para isso, foram utilizados dois modelos: mitocôndrias isoladas de cérebro, rim, coração e fígado de rato; e mitocôndrias de cérebro de camundongo em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal. Os dados obtidos indicam que as cinases mitocondriais parecem agir em conjunto com as enzimas antioxidantes clássicas (CAT, GPx, GR e MnSOD), por um mecanismo compensatório. A expressão e a contribuição desses mecanismos antioxidantes parecem ser diferentes dependendo do tecido e da idade dos animais avaliados.

O cérebro, órgão alvo de diversas doenças degenerativas relacionadas com dano oxidativo, é particularmente vulnerável a esse estresse deletério, pois consome grandes quantidades de O₂, produz grandes quantidades de equivalentes redutores (NADH e FADH₂) a partir da

oxidação de glicose, para sintetizar ATP, e está inadequadamente equipado com mecanismos de defesa antioxidante detoxificadores (HALLIWELL, 2006). Os resultados dos experimentos com mitocôndrias de cérebro de rato confirmaram essas observações, uma vez que, com exceção da MnSOD, as atividades de GPx, GR e CAT mitocondriais são as menores dentre os tecidos avaliados, e a velocidade de geração de ERO mitocondrial é a maior dentre os tecidos testados (Fig. 21B, Tabela 2). Por outro lado, as mitocôndrias derivadas de fígado e rim, órgãos implicados em processos de detoxificação e que freqüentemente entram em contato com substâncias pró-oxidantes, têm uma grande quantidade de defesas antioxidantes detoxificadoras diretas (ANDREYEV et al, 2005). Experimentos realizados com mitocôndrias de rim e fígado de rato confirmam esses dados. (Fig. 21D e 21H, Tabela 2 e Fig. 23B). As divergências observadas entre os valores das atividades específicas das enzimas antioxidantes clássicas mitocondriais dentre os tecidos testados, podem estar relacionadas a diferenças observadas na produção basal de ERO mitocondrial em cada tecido (Tabela 2 e 3), uma vez que o H_2O_2 detectado pelo método de oxidação da sonda fluorescente Amplex Red é resultante do balanço entre o H_2O_2 que é gerado pela CTE durante a respiração em estado 2, e o H_2O_2 retirado pela ação dos mecanismos antioxidantes mitocondriais detoxificadores, tais como as enzimas antioxidantes clássicas.

As atividades específicas da mt-HK e da mt-CK variaram muito entre os tecidos estudados (Fig. 23A). Os maiores níveis detectados de atividades dessas enzimas foram nas mitocôndrias de cérebro, que conseqüentemente foram as mais beneficiadas quanto à inibição da geração de H_2O_2 quando essas cinases eram ativadas (Fig. 21, 22 e Tabelas 2 e 3). É

importante notar que *in vivo*, a atividade de reciclagem de ADP promovida por ambas cinases mitocondriais, opera em taxas fisiológicas em estado estacionário. No caso da mt-HK, sob condições normais de glicemia, o balanço entre a taxa de internalização de glicose e a taxa de remoção de G6P pelo metabolismo celular, asseguram um fluxo contínuo de fosforilação pela HK *in vivo* (FEHR et al, 2003; RODEN e SHULMAN, 1999). Dessa maneira, uma porção da respiração celular basal é resultante da ativação do consumo de O₂ mitocondrial pela reciclagem de ADP promovida pela reação da mt-HK nas células que expressam essa isoforma de HK. Particularmente durante a degeneração do sistema nervoso central, induzida por estados hiperglicêmicos, a atividade da mt-HK parece desempenhar um importante papel, uma vez que o aumento na concentração de glicose leva a um grande aumento na formação de ROS em neurônios antes de ocorrer a morte celular (RUSSELL et al, 2002). Esse fenômeno pode ser interpretado como uma inibição da atividade da mt-HK por G6P, o que provoca um aumento no $\Delta\Psi_m$ que pode ser revertido com a ativação de ambas cinases, tanto a mt-CK quanto a mt-HK (DA-SILVA et al, 2004; MEYER et al, 2006 (anexo I)). Os benefícios da ativação da atividade de mt-CK dependem do balanço de Cr entre o tecido e o sangue, especialmente em tecidos com alta demanda energética, como o cérebro. De fato, existem evidências que indicam que a suplementação de neurônios com Cr aumenta os estoques intracelulares de ATP e PCr (WYSS et al, 2002; ROSENSHTRAUKH et al, 1978). Interessantemente, concentrações de Cr na faixa de 0,1 mM, são capazes de abolir a formação de ERO em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, mas esses mesmos níveis de PCr não provocam essa mesma inibição (MEYER et al, 2006 (anexo I)). Isso

indica que a formação de ERO em mitocôndrias de neurônios depende da relação de concentração Cr/PCr, como demonstrado para neurônios sob estresse hiperglicêmico (MEYER et al, 2006 (anexo I)). Baseados nessas observações, os dados presentes na figura 27 reforçam a relevância da ativação das cinases mitocondriais na prevenção da formação de ERO em mitocôndrias de cérebro e, adicionalmente, indicam que em mitocôndrias que não apresentam atividades dessas cinases, como as de fígado, por exemplo, a formação de ERO é fracamente inibida por baixas concentrações de ADP (Fig. 27B). Em patologias neurodegenerativas que apresentam um aumento da formação de ERO, como a esclerose lateral amiotrófica, e as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington, ocorre um decréscimo na atividade de mt-CK (WYSS et al, 2002; ROSENSHTRAUKH et al, 1978). Quando a mt-CK está ativa, ela apresenta forma octamérica e se localiza no espaço intermembranas da mitocôndria, associando-se ao VDAC e ao ANT (BRDICZKA et al, 2006; MANOS et al, 1991; MOLLOY et al, 1992; HEMMER et al, 1994; KALDIS et al, 1996; JACOBS et al, 1964; SCHOLTE et al, 1973; WYSS e SCHULZE, 2002). Em condições pró-oxidantes, a atividade da mt-CK fica fortemente inibida, o que faz com que a enzima passe para sua forma dimérica (forma inativa). O dano oxidativo à mt-CK também está associado ao processo de permeabilidade de transição, levando a um aumento da formação de ERO e disparando o processo de apoptose (WYSS e SCHULZE, 2002; ROSENSHTRAUKH et al, 1978). Portanto, comparando com outros tecidos, a grande ativação da respiração e a potente inibição na formação de H₂O₂ em mitocôndrias de cérebro de rato, quando mt-HK ou mt-CK estão ativadas (Fig. 21, 22 e Tabela 2), fortalece o conceito de que

ambos parâmetros podem ser afetados pelo aumento da disponibilidade de ADP na presença do análogo de glicose ou de Cr.

Os dados indicam que provavelmente duas características das mitocôndrias de rim, coração e fígado, corroboram para a menor (rim e coração) ou total (fígado) ineficiência do mecanismo que previne a geração de ERO pela ação das cinases mitocondriais nesses tecidos: (i) primeiro, os níveis das atividades de mt-HK e mt-CK *per se*, que são baixas em nas mitocôndrias de rim e coração (em coração a mt-CK é uma exceção, tem atividade alta) , e não foram detectadas nas mitocôndrias de fígado de rato (Fig. 23A); e (ii) uma baixa capacidade intrínseca de utilizar ADP para controlar a geração de H₂O₂, que ficou refletida no alto IC₅₀ para a inibição da formação de H₂O₂ com ADP nessas mitocôndrias, induzido pela adição de Cr e 2-DOG (Fig. 27B e 28B). Como as afinidades aparentes por ADP nas mitocôndrias dos três tecidos foram muito parecidas na figura 26A e 27A, foi descartada a possibilidade das atividades do ANT e da F₀F₁ ATP sintase serem os fatores limitantes na utilização dos pulsos de ADP pelos tecidos, uma vez que somente quando as atividades das cinases variam percebe-se uma grande diferença do IC₅₀ para inibição da geração de H₂O₂ por ADP. As atividades de mt-HK e mt-CK podem representar dessa forma, uma defesa antioxidante preventiva alternativa nas mitocôndrias de cérebro de rato, uma vez que este tecido possui baixas atividades das enzimas antioxidantes clássicas, principalmente das peroxidases. Em rim e coração, a proteção antioxidante mitocondrial parece ser desempenhada de modo complementar pelos dois sistemas, as cinases de forma preventiva e as enzimas antioxidantes como detoxificadores diretos. No fígado, as atividades de mt-HK e de mt-CK estão ausentes, em contraste com as altas

atividades observadas para as enzimas antioxidantes. Isso sugere que as vias antioxidantes clássicas de detoxificação são as principais responsáveis pela proteção desse tecido contra o ERO formado.

A propriedade de manter o $\Delta\Psi_m$ em níveis baixos, quando as cinases mitocondriais estão ativas, é em alguns aspectos contrário ao mecanismo antioxidante que envolve a ativação das UCPs, que desacoplam o consumo de O_2 da síntese de ATP (ECHTAY, 2007). Apesar do fato de valores similares de despolarização de $\Delta\Psi_m$ serem alcançados por qualquer um dos mecanismos, o balanço entre as razões de $[AMP]/[ATP]$ e $[NAD(P)^+]/[NAD(P)H]$ podem afetar de maneiras diferentes tanto a energia celular quanto os sistemas sensores de estado redox, tais como AMP cinase e Sir2, ativando diferentes vias de sinalização (WU et al, 2006; FULCO et al, 2003; DASGUPTA e MILBRANDT, 2007; ZHANG et al, 2002).

Finalmente, os resultados obtidos com o estudo dos diferentes tecidos, indicam que as atividades de mt-HK e de mt-CK, além de acoplarem o metabolismo energético extramitocondrial com a FosOx intramitocondrial, podem participar também da bioenergética mitocondrial como uma defesa antioxidante preventiva, particularmente no cérebro, por provocarem o decréscimo dos níveis de $\Delta\Psi_m$, evitando a formação de H_2O_2 . Os dados sugerem ainda que esse mecanismo antioxidante preventivo proposto para as cinases mitocondriais são de maior importância e mais ativos em tecidos com baixas atividades de peroxidases (CAT e GPx) mitocondriais (Fig. 24). Porém, essa correlação sugerida na figura 24, só poderá ser confirmada, tendo significância estatística, após estudos complementares aumentando a quantidade de tecidos avaliados.

Os experimentos realizados com mitocôndrias de cérebro isoladas de camundongos de diferentes idades corroboram diversas observações experimentais já discutidas anteriormente. É descrito na literatura, que cérebros imaturos são particularmente sensíveis a injúrias por estresse oxidativo, pois possuem sistemas antioxidantes pouco desenvolvidos e alta disponibilidade de ferro, que pode ser utilizado em reações de formação de ERO (BLOMGREN e HAGBERG, 2006). As mudanças bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento pós-natal desses animais (1 a 30 dias de vida) são acompanhadas por mudanças na estrutura e atividade funcional mitocondrial deste tecido. Diversos estudos têm mostrado que durante processos inflamatórios, tais como os causados por hemorragia cerebral, e isquemia e reperfusão, indivíduos jovens são muito mais atingidos por danos oxidativos do que adultos (MCLEAN et al, 2005; CHANG et al, 2005; BLOMGREN e HAGBERG, 2006). Assim, a ativação de mecanismos antioxidantes como o mediado pelas atividades das cinases mitocondriais, também poderia ser interessante nessas situações. Porém, os experimentos realizados nessa tese demonstraram que, assim como ocorre com os sistemas antioxidantes clássicos, as atividades das cinases mitocondriais mt-HK e mt-CK de cérebro de camundongos somente vão sendo implementadas conforme ocorre o crescimento desses animais (Fig. 29). Esse fenômeno já foi descrito para atividade de HK em homogenados totais de cérebro de camundongos (KHAN et al, 1999), e para a atividade de mt-CK de diversos tecidos estudados em diferentes modelos de mamíferos (KEKELIDZE et al, 2000; INGWALL et al, 1981; PERRY et al, 1988). Apesar disso, os dados demonstram que uma vez funcionando na sua plenitude, como ocorre nas mitocôndrias de cérebro dos animais adultos, o mecanismo

antioxidante dependente da ativação de mt-HK e mt-CK passa a ser de grande relevância na prevenção da formação de ERO nessas mitocôndrias (Fig. 32 e 33). Quanto às enzimas antioxidantes (Fig. 31), a atividade de CAT decaiu nas mitocôndrias de cérebro conforme os animais cresciam, e as atividades de GPx, MnSOD e GR mitocondriais, apesar de aumentarem, não foram suficientes para conter a disparada na produção de ERO basal nessas mitocôndrias (Fig. 33A). Esse incremento substancial na produção de H_2O_2 que ocorre conforme os animais se desenvolvem, provavelmente é resultante do aumento da taxa metabólica das células desse tecido com a idade. Portanto, nossos experimentos com as mitocôndrias de cérebro de animais em desenvolvimento, demonstraram que existe uma correlação positiva entre o aumento das atividades de mt-HK (Fig. 34B) e mt-CK (Fig. 34D) e o aumento na produção de H_2O_2 basal (respiração em estado 2) mitocondrial; e que conforme os animais se desenvolvem, maiores são as inibições na produção de H_2O_2 induzidas pela ativação das atividades das cinases mitocondriais (Fig. 32, 33B e 33C).

Finalmente, outros estudos são necessários para a elucidação do controle da expressão gênica das enzimas antioxidantes mitocondriais e das cinases recicladoras de ADP das mitocôndrias dos diferentes modelos testados. A investigação deste mecanismo antioxidante, em condições patológicas nas quais há a exacerbação da produção de ERO e quadros hiperglicêmicos associados, como é o caso da sepse, será o foco de futuras investigações.

6. BIBLIOGRAFIA

- ADAM, H. (1965). *Methods of Enzymatic Analysis (Berg-Meyer, H. U., ed.)*, Acad. Press NY, pp. 573-577.
- ADAM-VIZI, V. AND CHINOPOULOS, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci.* **27**(12), 639-45.
- AEBI, H. (1984). *Methods in Enzymology*, Acad. Press, NY. 121-126.
- AKERMAN, K. E, JARVISALO, J. O. (1980). Effects of ionophores and metabolic inhibitors on the mitochondrial membrane potential within isolated hepatocytes as measured with the safranin method. *Biochem. J.* **192**(1), 183-90.
- ANDREYEV, A. Y., KUSHNAREVA, Y. E., STARKOV, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc).* **70**(2), 200-14.
- ANTUNES, F., HAN, D., AND CADENAS, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Rad. Biol. Med.*, **33**, 1260-1267.
- ARDEN, C., BALTRUSCH, S., AGIUS, L. (2006). Glucokinase regulatory protein is associated with mitochondria in hepatocytes. *FEBS Lett.* **580**, 2065-70.
- BAO, Y., JEMTH, P., MANNERVIK, B., AND WILLIAMSON, G. (1997). Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. *FEBS Lett.*, **410**, 210-212.
- BELTRANDELRIO, H., AND WILSON, J. E. (1992). Interaction of mitochondrially bound rat brain hexokinase with intramitochondrial compartments of ATP generated by oxidative phosphorylation and creatine kinase. *Arch Biochem Biophys.* **299**, 116-124.
- BENARD, G., BELLANCE, N., JAMES, D., PARRONE, P., FERNANDEZ, H., LETELLIER, T., ROSSIGNOL, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci.* **120**, 838-48.
- BESSMAN, S. P. AND GEIGER, P. J. (1981). Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* **211**, 448-452.
- BEUTNER, G., RUCK, A., RIEDE, B., BRDICZKA, D. (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implications for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1368**, 7-18.

- BEUTNER, G., RUCK, A., RIEDE, B., WELTE, W., BRDICZKA, D. (1996). Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Letter* **396**, 189-195.
- BLOMGREN, K., HAGBERG, H. (2006). Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med.* **40**(3), 388-97.
- BOEKEMA, E. J. AND BRAUN, H. (2007). Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System. *J. Biol. Chem.* **282**(1), 1-4.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M., DIEFENBACH, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* **12**, 64-76.
- BOVERIS, A., AND CHANCE, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, **134**, 707-716.
- BOVERIS, A., CADENAS, E., AND STOPPANI, A. O. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, **156**, 435-444.
- BOYER, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* **66**, 717-49.
- BRDICZKA, D. G, ZOROV, D. B., SHEU, S. S. (2006). Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* **1762**(2), 148-63.
- BROWNLEE, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820.
- BUSTAMANTE, E., AND PEDERSEN, P. L. (1980). Mitochondrial hexokinase of rat hepatoma cells in culture: solubilization and kinetic properties. *Biochemistry* **19**(22), 4972-4977.
- BUSTAMANTE, E., PEDERSEN, P. L. (1977). High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci.* **74**, 3735-3739.
- BUSTAMANTE, E., PEDIADITAKIS, P., HE, L., LEMASTERS, J. J. (2005). Isolated mouse liver mitochondria are devoid of glucokinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **334**, 907-10.
- CADENAS, E., BOVERIS, A., RAGAN, C. I., AND STOPPANI, A. O. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone

- reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 248-257.
- CADENAS, E., DAVIES, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* **29**, 222-230.
- CANNON, B., NEDERGAARD, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277-359.
- CÁRDENAS, M. L., CORNISH-BOWEN, A, URETA, A. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim. et Biophys. Acta* **1401**, 242 – 264.
- CHAN, D. C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* **125**(7), 1241-52.
- CHANCE, B. AND WILLIAMS, G. R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization; II. Difference spectra III; The steady state; IV. The respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **217**, 395-438.
- CHANG, E. F., ET AL. (2005). Heme regulation in traumatic brain injury: relevance to the adult and developing brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* **25**(11), 1401-17.
- CHEN, H., AND CHAN, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum.Mol. Genet.* **14**, R283-R289.
- CHEN, H., DETMER, S. A., EWALD, A. J., GRIFfIN, E. E., FRASER, S. E., CHAN, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189-200.
- CHEN, Q., CAMARA, A. K., STOWE, D. F., HOPPEL, C. L., LESNEFSKY, E. J. (2006). Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **292**(1), C137-47.
- CHEN, Z., AND LASH, L. H. (1998). Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 608-618.
- CIPOLAT, S., MARTINS DE BRITO, O., DAL ZILIO, B., SCORRANO, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15927-15932.
- COOPER, A. J. L., KRISTAL, B. S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* **378**, 793-802.

- CROFTS, A. R., BARQUERA, B., GENNIS, R. B., KURAS, R., GUERGOVA-KURAS, M., AND BERRY, E. A. (1999). Physicochemical aspects of the movement of the rieske iron sulfur protein during quinol oxidation by the bc(1) complex from mitochondria and photosynthetic bacteria. *Biochemistry*, **38**, 15807-15826.
- DASGUPTA, B., MILBRANDT, J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *PNAS* **104**, 7217-7222.
- DA-SILVA, W. S., GÓMEZ-PUYOU, A. P., GÓMEZ-PUYOU, M. T., MORENO-SANCHEZ, R., DE FELICE, F. G., DEMEIS, L., OLIVEIRA, M. F., GALINA, A. (2004). Mitochondrial Bound Hexokinase Activity as a Preventive Antioxidant Defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem.* **279**, 39846–39855.
- DETMER, S. A., CHAN, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 **8**, 870-9.
- DIONISI, O., GALEOTTI, T., TERRANOVA, T., AND AZZI, A. (1975). Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 292-300.
- DRINGEN, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progr. Neurobiol.*, **62**, 649-671.
- DROGE, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95.
- DUFFY, T. E., KOHLE, S. J., VANNUCCI, R. C. (1975). Carbohydrate and energy metabolism in perinatal rat brain: relation to survival in anoxia. *J. Neurochem.* **24**, 271–276.
- ECHTAY K. S., ET AL. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* **415**, 96-9.
- ECHTAY, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* **43**(10), 1351-71.
- ERECINSKA, M., CHERIAN, S., SILVER, I. A. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog. Neurobiol.* **73**, 397– 445.
- FEHR, M., LALONDE, S., LAGER, I., WOLFF, M. W., FROMMER, W. B. (2003). Free Full Text In vivo imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. *J Biol Chem.* **278**, 19127-33.

- FERNANDES, A. P, HOLMGREN, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal.* **6**(1), 63-74.
- FISKUM, G. (1985). Mitochondrial damage during cerebral ischemia. *Ann. Emerg. Med.* **14**, 810-815.
- FLOHÉ, L., GUNZLER, W. A. (1984). *Methods in Enzymology*, Acad. Press, NY. 114-121.
- FLOYD, R. A. (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **222**, 236– 245.
- FLOYD, R. A. AND HENSLEY, K. (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging.* **23**, 795– 807.
- FREY, T. G. AND MANNELLA, C. A. (2001). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 319–324.
- FRIDOVICH, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1–11.
- FRIDOVITCH, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97–112.
- FUJII, J., AND IKEDA, Y. (2002). Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep.*, **7**, 123-130.
- FULCO, M., SCHILTZ, R. L., IEZZI, S., KING, M. T., ZHAO, P., KASHIWAYA, Y., HOFFMAN, E., VEECH, R. L., SARTORELLI, V. (2003). Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell.* **12**, 51-62.
- GALINA, A., DA SILVA, W.S. (2000). Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. *Phytochemistry.* **53**(1), 29-37.
- GALINA, A., REIS, M., ALBUQUERQUE, M. C., PUYOU, A. G., PUYOU, M. T., DE MEIS, L. (1995). Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochem J.* **309**, 105-12.
- GARDNER, P. R., RAINERI, I., EPSTEIN, L. B., AND WHITE, C. W. (1995). Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13399-13405.

- GARDNER, P.R., RAINERI, I., EPSTEIN, L.B., WHITE, C.W. (1995). Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 13399-13405.
- GARLID, K. D., JABUREK, M., JEZEK, P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* **438**, 10–14.
- GARLID, K. D., OROSZ, D. E., MODRIANSKY, M., VASSANELLI, S., JEZEK, P. (1996). On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 2615–2620.
- GENOVA, M. L., VENTURA, B., GIULIANO, G., BOVINA, C., FORMIGGINI, G., PARENTI CASTELLI, G., AND LENAZ, G. (2001). The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett.*, **505**, 364-368.
- GIASSON, B. I., ISCHIROPOULOS, H., LEE, V. M., AND TROJANOWSKI, J. Q. (2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 1264-1275.
- GOSHANI-HEBRONI, S. G. AND BESSMAN, S. P. (1997). Hexokinase binding to mitochondria: a basis for proliferative energy metabolism. *J. Bioenerg. Biomem.* **29**(4), 331 – 338.
- GRIFFITH, O. W., AND MEISTER, A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4668-4672.
- GRIGOLAVA, I. V., KSENZENKO, M., KONSTANTINOV, A. A., TIKHONOV, A. N., AND KERIMOV, T. M. (1980). Tiron as a spin-trap for superoxide radicals produced by the respiratory chain of submitochondrial particles. *Biokhimiya*, **45**, 75-82.
- GROMER, S., URIG, S., BECKER, K. (2004). The thioredoxin system--from science to clinic. *Med Res Rev.* **24**(1), 40-89.
- HACKENBROCK, C. R., CHAZOTTE, B., AND GUPTE, S. S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **18**, 331-368.
- HALLIWELL, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* **97**, 1634-58.
- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.

- HEMMER, W., ZANOLLA, E., FURTER-GRAVES, E. M., EPPENBERGER, H. M., WALLIMANN, T. (1994). Creatine kinase isoenzymes in chicken cerebellum: specific localization of brain-type creatine kinase in Bergmann glial cells and muscle-type creatine kinase in Purkinje neurons. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 538-549.
- HENSLEY, K., ROBINSON, K. A., GABBITA, S. P., SALSMAN, S., AND FLOYD, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1456-1462.
- HERRERO, A., AND BARJA, G. (2000). Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **32**, 609-615.
- HINKLE, P. C., BUTOW, R. A., RACKER, E., AND CHANCE, B. (1967). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5169-5173.
- HO, Y. S., XIONG, Y., MA, W., SPECTOR, A., AND HO, D. S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32804-32812.
- HO, Y.S., XIONG, Y., MA, W., SPECTOR, A., HO, D.S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J. Biol. Chem.* **279**, 32804-32812.
- HOCKENBERY, D. M., OLTVAI, Z. N., YIN, X. M., MILLIMAN, C. L., AND KORSMEYER, S. J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* **75**, 241-251.
- HOEK, J. B., AND RYDSTROM, J. (1988). Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem. J.*, **254**, 1-10.
- IMAI, H., AND NAKAGAWA, Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Rad. Biol. Med.*, **34**, 145-169.
- INGWALL, J. S., KRAMER, M. F., WOODMAN, D., FRIEDMAN, W. F. (1981). Maturation of energy metabolism in the lamb: changes in myosin ATPase and creatine kinase activities. *Pediatr Res.* **15**(8), 1128-33.
- JABUREK, M., VARECHA, M., JEZEK, P., GARLID, K. D. (2001). Alkylsulfonates as probes of uncoupling protein transport mechanism. Ion pair transport demonstrates that direct H⁺ translocation by UCP1 is not necessary for uncoupling. *J. Biol. Chem.* **276**, 31897-31905.

- JACOBS, H., HELDT, H. W., KLINGENBERG, M. (1964). High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 516-521.
- JACOBUS, W. E. AND LEHNINGER, A. L. (1973). Creatine kinase of rat heart mitochondria. coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J. Biol. Chem.* **248**, 4803 – 4810.
- JACOBUS, W. E. AND SAKS, V. A. (1982). Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **219**, 167-178.
- JENSEN, P. K. (1966). Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 157-166.
- JEZEK, P., OROSZ, D. E., MODRIANSKY, M., GARLID, K. D. (1994). Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J. Biol. Chem.* **269**, 26184–26190.
- JOHANSSON, C., LILLIG, C. H, HOLMGREN, A. (2004). Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *J Biol Chem.* **279**(9), 7537-43.
- KADENBACH, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1604**(2), 77-94.
- KALDIS, P., STOLZ, M., WYSS, M., ZANOLLA, E., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., VORHERR, T., WALLIMANN, T. (1996). Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J. Cell Sci.* **109**, 2079-2088.
- KANG, D., NARABAYASHI, H., SATA, T., AND TAKESHIGE, K. (1983). Kinetics of superoxide formation by respiratory chain NADH- dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 1301-1306.
- KARIHTALA, P. AND SOINI, Y. (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. Review article. *APMIS*, **115**, 81–103.

- KEKELIDZE, T., KHAIT, I., TOGLIATTI, A., HOLTZMAN, D. (2000). Brain creatine kinase and creatine transporter proteins in normal and creatine-treated rabbit pups. *Dev Neurosci.* **22**, 437-43.
- KELNER, M. J., AND MONTOYA, M. A. (2000). Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 366-368.
- KERNEC, F., LE TALLEC, N., NADAL, L., BEGUE, J. M., LE RUMEUR, E. (1996). Phosphocreatine synthesis by isolated rat skeletal muscle mitochondria is not dependent upon external ADP: a ³¹P NMR study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 819-825.
- KHAN, J. Y., RAJAKUMAR, R. A., MCKNIGHT, R. A., DEVASKAR, U. P. AND DEVASKAR S. U. (1999). Developmental regulation of genes mediating murine brain glucose uptake. *Am. J. Physiol.* **276** (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 45), 892-900.
- KIM, G. W., KONDO, T., NOSHITA, N., AND CHAN, P. H. (2002). Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke.* **33**, 809-815.
- KIRSCH, M., AND DE GROOT, H. (2001). NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB J.*, **15**, 1569-1574.
- KLINGENBERG, M., HUANG, S. G. (1999). Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**, 271-296.
- KORSHUNOV, S. S., SKULACHEV, V. P., STARKOV, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**, 15-18.
- KOZHEMIKIN, L. A., BULAVIN, D. V., UDINTSEV, A. V., AND SMIRNOV, V. V. (1993). The subcellular distribution of the glutathione system enzymes in the brain tissue of the rat. *Tsitologiya*, **35**, 58-63.
- KRAUSS, S., ZHANG, C. Y., LOWELL, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. (2005) *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* **6**, 248-261.
- KREBS, H. A. (1940) The citric acid cycle: A reply to the criticisms of F. L. Breusch and of J. Thomas. *Biochem J.* **34**(3), 460-3.

- KREISMAN, N. R., OLSON, J. E., HORNE, D. S., HOLTZMAN, D. (1989). Cerebral oxygenation and blood flow in infant and young adult rats. *Am. J. Physiol.* **256**, R78–R85.
- KRISHNAMOORTHY, G., AND HINKLE, P. C. (1988). Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17566-17575.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. AND BRENNER, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev* **87**, 99–163.
- KSENZENKO, M., KONSTANTINOV, A. A., KHOMUTOV, G. B., TIKHONOV, A. N., AND RUUGE, E. K. (1983). Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett.*, **155**, 19-24.
- KUSHNAREVA, Y., MURPHY, A. N., AND ANDREYEV, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J.*, **368**, 545-553.
- LANCASTER, C. R., KRÖGER, A. (2000). Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim Biophys Acta.* **1459**(2-3), 422-31.
- LASS, A., FORSTER, M. J., AND SOHAL, R. S. (1999). Effects of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol administration on their tissue levels in the mouse: elevation of mitochondrial alpha-tocopherol by coenzyme Q10. *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 1375-1382.
- LEBOVITZ, R. M., ZHANG, H., VOGEL, H., CARTWRIGHT, J., JR., DIONNE, L., LU, N., HUANG, S., AND MATZUK, M. M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9782-9787.
- LEHNINGER, A. L. (1965). The mitochondrion. Molecular basis of structure and function. *W. A. Benjamin, Inc. New York* **1**, 1–14.
- LENAZ, G. (2001). The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*, **52**, 159-164.
- LEWIS, M. R. and LEWIS, W. H. (1914) Mitochondria in tissue culture. *Science* **39**(1000), 330-333.
- LI, X., COBB, C. E., HILL, K. E., BURK, R. F., MAY, J.M. (2001). Mitochondrial uptake and recycling of ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys.* **387**(1), 143-53.

- LIN, M. T. AND BEAL, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–785.
- LIU D., ET AL. (2006). Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress. *Neuromolecular Med.* **8**(3), 389-414.
- LIU, Y., FISKUM, G., AND SCHUBERT, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.*, **80**, 780-787.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, JAMES E. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th ed., New York: W. H. Freeman & Co.
- LOGAN, D. C. (2006). The mitochondrial compartment. *Journal of Experimental Botany* **57**(6), 1225–1243.
- LOSCHEN, G., AZZI, A., RICHTER, C., AND FLOHE, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.*, **42**, 68-72.
- LOSCHEN, G., FLOHE, L., AND CHANCE, B. (1971). Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.*, **18**, 261-264.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**(1), 265-75.
- MAIORINO, M., THOMAS, J. P., GIROTTI, A. W., AND URSINI, F. (1991). Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Rad. Res. Commun.*, **12/13**, 131-135.
- MANNELLA, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 542–548.
- MANNELLA, C. A., BUTTLE, K., MARKO, M. (1997). Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 37–38.
- MANNELLA, C. A., MARKO, M., PENCZEK, P., BARNARD, D., FRANK, J. (1994). The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc. Res. Tech.* **27**, 278–283.
- MANOS, P., BRYAN, G. K., EDMOND, J. (1991). Creatine kinase activity in postnatal rat brain development and in cultured neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *J. Neurochem.* **156**, 2101-2107.

- MAO, W., YU, X. X., ZHONG, A., LI, W., BRUSH, J., SHERWOOD, S. W., ADAMS, S. H., PAN, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* **443**, 326–330.
- MARTENSSON, J., LAI, J. C., AND MEISTER, A. (1990). High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7185-7189.
- MATTIASSON G., ET AL. (2003). Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med.* **9**(8), 1062-8.
- MCCORD, J. M., AND FRIDOVICH, I. (1970). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1374-1377.
- MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
- MCLEAN, C.W., ET AL. (2005). Overexpression of glutathione peroxidase protects immature murine neurons from oxidative stress. *Dev Neurosci.* **27**(2-4), 169-75.
- MEYER, L. E, MACHADO, L. B., SANTIAGO, A. P., DA-SILVA, W. S., DE FELICE, F. G., HOLUB O., OLIVEIRA M. F., GALINA A. (2006). Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem.* **281**(49), 37361-71.
- MEYERHOF, O. (1927). Die chemischen vorgänge im muskel. *Biochem. Z.* **183**, 176 - 215.
- MITCHELL, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **41**(3), 445-502.
- MOLLOY, G. R., WILSON, C. D., BENFIELD, P., DE-VELLIS, J., KUMAR, S. (1992). Rat brain creatine kinase messenger RNA levels are high in primary cultures of brain astrocytes and oligodendrocytes and low in neurons. *J. Neurochem.* **59**, 1925-1932.
- MULTHAUP, G., RUPPERT, T., SCHLICKSUPP, A., HESSE, L., BEHER, D., MASTERS, C. L., AND BEYREUTHER, K. (1997). Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 533-539.
- MUNN, E. A. (1974) The Structure of Mitochondria. *Academic Press*, London.

- NEHLIG, A., DE VASCONCELOS, A. P., BOYET, S. (1988). Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. *J. Neurosci.* **8**, 2321–2333.
- NEHLIG, A., PEREIRA DE VASCONCELOS, A., BOYET, S. (1989). Postnatal changes in local cerebral blood flow measured by the quantitative autoradiographic [¹⁴C]iodoantipyrine technique in freely moving rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **9**, 579–588.
- NELSON, D. L., COX, M. M. (2000). *Lehninger, Principles of Biochemistry*. 3rd ed., New York: Worth Publishers.
- NEWSHOLME, E. A., ROBINSON, J., TAYLOR, K. (1967). A radiochemical enzymatic activity assay for glycerol kinase and hexokinase. *Biochim Biophys Acta.* **132**(2), 338-46.
- NICHOLLS, D. G., AND BUDD, S. L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* **80**, 315-360.
- O'GORMAN, E., BEUTNER, G., WALLIMANN, T., BRDICZKA, D. (1996). Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, and brain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1276** (2), 161-170.
- OLAFSDOTTIR, K., AND REED, D. J. (1988). Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, **964**, 377-382.
- PACKER, L., WEBER, S. U., AND RIMBACH, G. (2001). Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J. Nutr.*, **131**, 369S-373S.
- PACKER, L., WEBER, S. U., AND RIMBACH, G. (2001). Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J. Nutr.*, **131**, 369S-373S.
- PANFILI, E., SANDRI, G., AND ERNSTER, L. (1991). Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS Lett.*, **290**, 35-37.
- PAPA, S., SARDANELLI, A. M., SCACCO, S., PETRUZZELLA, V., TECHNIKOVA-DOBROVA, Z., VERGARI, R., SIGNORILE, A. (2002). The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of the mammalian respiratory chain and the cAMP cascade. *J Bioenerg Biomembr.* **34**(1), 1-10.
- PASTORE, A., FEDERICI, G., BERTINI, E., AND PIEMONTE, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, 333, 19-39.

- PERKINS, E. M. and MCCAFFERY, J. M. (2007) Conventional and immunoelectron microscopy of mitochondria. *Methods Mol Biol.* **372**, 467-83.
- PERKINS, G., FREY, T. G. (2000). Recent structural insights into mitochondria gained by microscopy. *Micron.* **31**, 97-111.
- PERKINS, G., RENKEN, C., MARTONE, M. E., YOUNG, S. J., ELLISMAN, M., FREY, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.* **119**, 260-272.
- PERRY, S. B., MCAULIFFE, J., BALSCHI, J. A., HICKEY, P. R., INGWALL, J. S. (1988). Velocity of the creatine kinase reaction in the neonatal rabbit heart: role of mitochondrial creatine kinase. *Biochem.* **27**(6), 2165-2172.
- PRYOR, W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* **48**, 657-667.
- RADI, R., TURRENS, J. F., CHANG, L. Y., BUSH, K. M., CRAPO, J. D., FREEMAN, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* **266**(32), 22028-34.
- RASMUSSEN, N. (1995). Mitochondrial structure and the practice of cell biology in the 1950 s. *J. History Biol.* **28**, 381-429.
- RAZA, H., ROBIN, M. A., FANG, J. K., AND AVADHANI, N. G. (2002). Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem. J.*, **366**, 45-55.
- REID, R. A., MOYLE, J., MITCHELL, P. (1966). Synthesis of adenosine triphosphate by a protonmotive force in rat liver mitochondria. *Nature.* **212**(5059), 257-8.
- RICH, P. R., AND BONNER, W. D. (1978). The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 206-213.
- RODEN, M., SHULMAN, G. I. (1999). Applications of NMR spectroscopy to study muscle glycogen metabolism in man. *Annu Rev Med.* **50**, 277-90.
- ROSENSHTRAUKH, L. V., SAKS, V. A., UNDROVINAS, A. I., CHAZOV, E. I., SMIRNOV, V. N., SHAROV, V. G. (1978). Studies of energy transport in heart cells. The effect of creatine phosphate on the frog ventricular contractile force and action potential duration. *Biochem. Med.* **19**, 148-164.
- ROSENTHAL, R. E., HAMUD, F., FISKUM, G., VARGHESE, P. J. AND SHARPE S. (1987). Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **7**, 752-758.

- RUSSELL, J. W., GOLOVOY, D., VINCENT, A. M., MAHENDRU, P., OLZMANN, J. A., MENTZER, A., FELDMAN, E. L. (2002). High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J.* **16**, 1738-1748.
- SAKS, V. A., BELIKOVA, Y.O., KUZNETSOV, A. V., KHUCHUA, Z. A., BRANISHTE, T. H., SEMENOVSKY M. L., NAUMOV, V. G. (1991). Phosphocreatine pathway for energy transport: ADP diffusion and cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.* **261**(4), 30-8.
- SAKS, V. A., ROSENSHTRAUKH, L. V., SMIRNOV, V. N., CHAZOV, E. I. (1978.). Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *Can J. Physiol. Pharmacol.* **56**, 691-706.
- SALVI, M., BATTAGLIA, V., BRUNATI, A. M., LA ROCCA, N., TIBALDI, E., PIETRANGELI, P., MARCOCCI, L., MONDOVÌ, B., ROSSI, C. A., TONINELLO, A. (2007). Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem.* **282**, 24407-24415.
- SAMSON, F. E. JR., BALFOUR, W. M., DAHL, N. A. (1958). The effect of age and temperature on the cerebral energy requirement in the rat. *J. Gerontol.* **13**, 248–251.
- SANCHIS, D., FLEURY, C., CHOMIKI, N., GOUBERN, M., HUANG, Q., NEVEROVA, M., GREGOIRE, F.; EASLICK, J., RAIMBAULT, S., LEVI-MEYRUEIS, C., MIROUX, B., COLLINS, S., SELDIN, M., RICHARD, D., WARDEN, C., BOUILLAUD, F., RICQUIER, D. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* **273**, 34611–34615.
- SATOH, M., HAMAMOTO, T., SEO, N., KAGAWA, Y., ENDO, H. (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 482–493.
- SCHLATTNER, U., TOKARSKA-SCHLATTNER, M., WALLIMANN, T. (2006). Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta.* **1762**(2), 164-80.
- SCHOLTE, H. R., WEIJERS, P. J., WIT-PEETERS, E. M. (1973). The localization of mitochondrial creatine kinase, and its use for the determination of the sidedness of submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 764–773.
- SCHRINER, S. E., LINFORD, N. J., MARTIN, G. M., TREUTING, P., OGBURN, C. E., EMOND, M., COSKUN, P. E., LADIGES, W., WOLF, N., VAN REMMEN, H., WALLACE, D. C., RABINOVITCH, P. S. (2005). Extension of murine life

- span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308**, 1909-1911.
- SIESJO, B.K. (1978). Brain energy metabolism. *Wiley, New York*, pp.1 – 607.
- SIMS, N. R. (1990). Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.* **55**, 698-707.
- SKULACHEV, V. P. (1991). Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **294**, 158–162.
- SKULACHEV, V. P. (1996). Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q. Rev. Biophys.*, **29**, 169-202.
- SKULACHEV, V. P. (1998). Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* **423**, 275-280.
- SMIRNOVA, E., GRIPARIC, L., SHURLAND, D. L., VAN DER BLIEK, A. M. (2001). Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2245–2256.
- SMITH, S. A., MONTAIN S. J., ZIENTARA, G. P., FIELDING, R. A. (2004). Use of phosphocreatine kinetics to determine the influence of creatine on muscle mitochondrial respiration: an in vivo ³¹P-MRS study of oral creatine ingestion. *J. Appl. Physiol.* **96**, 2288– 2292.
- SOUCEK, T., CUMMING, R., DARGUSCH, R., MAHER, P., AND SCHUBERT, D. (2003). The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide. *Neuron.* **39**, 43-56.
- STARKOV, A. A., AND FISKUM, G. (2003). Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J. Neurochem.*, **86**, 1101-1107.
- STARKOV, A. A., FISKUM, G. (2001). Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **281**, 645-50.
- STIBUREK, L., HANSIKOVA, H., TESAROVA, M., CERNA, L., ZEMAN, J. (2006). Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res.* **55** Suppl 2, S27-41.
- TAKESHIGE, K., AND MINAKAMI, S. (1979). NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem. J.*, **180**, 129-135.

- THOMAS, J. P., MAIORINO, M., URSINI, F., AND GIROTTI, A. W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, **265**, 454-461.
- TIAN, L., CAI, Q. AND WEI, H. (1998). Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med.* **24**(9), 1477-1484.
- TRUMPOWER, B. L. (1990). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.*, **265**, 11409-11412.
- TURRENS, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**, 335-344.
- TURRENS, J. F., ALEXANDRE, A., AND LEHNINGER, A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 408-414.
- TURRENS, J. F., AND BOVERIS, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.*, **191**, 421-427.
- VAN DEN BERGHE, G., WOUTERS, P., WEEKERS, F., VERWAEST, C., BRUYNINCKX, F., SCHETZ, M., VLASSELAERS, D., FERDINANDE, P., LAUWERS, P., BOUILLON, R. (2001) Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1359-1367.
- VAN REMMEN, H., SALVADOR, C., YANG, H., HUANG, T. T., EPSTEIN, C. J., AND RICHARDSON, A. (1999). Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch. Biochem. Biophys.*, **363**, 91-97.
- VANNUCCI, R. C., VANNUCCI, S. J. (1978). Cerebral carbohydrate metabolism during hypoglycemia and anoxia in newborn rats. *Ann. Neurol.* **4**, 73-79.
- WALLIMANN T. AND HEMMER W. (1994). Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol. Cell. Biochem.* **133**, 193-220.
- WALLIMANN T., WYSS M., BRDICZKA D., NICOLAY K., AND EPPENBERGER H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* **281**, 21-40.

- WILSON, J. E. (1989). Rapid purification of mitochondrial hexokinase from rat brain by a single affinity chromatography step on Affi-Gel blue. *Prep Biochem.* **19**(1), 13-21.
- WILSON, J. E. (1997). Homologous and heterologous interactions between hexokinase and mitochondrial porin: evolutionary implications. *J. Bioenerg. Biomem.* **29**(1), 97 – 102.
- WILSON, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol.* **206**, 2049-57.
- WINKLER, E., KLINGENBERG, M. (1994). Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 2508–2515.
- WOOD, Z. A., SCHRODER, E., ROBIN HARRIS, J., AND POOLE, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 32-40.
- WU, A., YING, Z., GOMEZ-PINILLA, F. (2006). Oxidative stress modulates Sir2alpha in rat hippocampus and cerebral cortex. *Eur J Neurosci.* **23**, 2573-2580.
- WYSS, M., SCHULZE, A. (2002). Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* **112**, 243–260.
- ZHANG, Q., PISTON, D. W., GOODMAN, R. H. (2002). Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* **295**, 1895-1897.
- ZHANG, Z., HUANG, L., SHULMEISTER, V. M., CHI, Y. I., KIM, K. K., HUNG, L. W., CROFTS, A. R., BERRY, E. A., AND KIM, S. H. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature*, **392**, 677-684.
- ZOCCARATO, F., CAVALLINI, L., AND ALEXANDRE, A. (2004). Respiration-dependent removal of exogenous H₂O₂ in brain mitochondria: inhibition by Ca²⁺. *J. Biol. Chem.*, **279**, 4166-4174.

ANEXO I

ANEXO II

ANEXO III

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)