

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MIRELE DAIANA POLETI

Estudo proteômico para determinação da expressão relativa das isoformas de VDAC e caracterização dos sítios de ligação da hexoquinase em mitocôndrias cerebrais de rato, boi e ave

Pirassununga

2008

MIRELE DAIANA POLETI

Estudo proteômico para determinação da expressão relativa das isoformas de VDAC e caracterização dos sítios de ligação da hexoquinase em mitocôndrias cerebrais de rato, boi e ave

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Cerqueira César

Pirassununga

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

P765e	<p>Poleti, Mirele Daiana</p> <p>Estudo proteômico para determinação da expressão relativa das isoformas de VDAC e caracterização dos sítios de ligação da hexoquinase... / Mirele Daiana Poleti – Pirassununga, 2008. 71 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas. Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal. Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Cerqueira César.</p> <p>Unitermos: 1. VDAC 2. Isoformas 3. Hexoquinase 4. Glicólise 5. Apoptose I. Título.</p>
-------	--

*Aos meus pais, Maria e Osvaldir,
que me ensinaram os valores e princípios para a vida,*

*Às minhas irmãs, Gisele e Daniele,
por todo apoio e compreensão,*

*Às minhas sobrinhas, Layana, Thábata e Samanta,
por me proporcionarem momentos de lazer e descontração,*

*Ao Denis, meu noivo,
por todo apoio, dedicação e incentivo,
pelo amor e amizade*

... à vocês, dedico essa dissertação!

Agradecimentos

Ao imensurável DEUS, por seres o meu porto seguro em todos os momentos, por iluminar os meus passos. Enfim, pela concessão da vida. Muitíssimo obrigado por tudo!

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga, pela oportunidade e base educacionária de crescer profissionalmente.

À minha família e ao meu noivo, por estarem sempre presentes em todos os momentos e por sempre torcerem pelo meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Cerqueira César, pela orientação, dispensando confiança na minha capacidade e pelos conhecimentos transmitidos durante todo o processo de orientação.

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia, que nos anos de convivência, sempre se preocupou com o meu crescimento científico e intelectual e contribuiu muito para isso.

As minhas grandes amigas Márcia Monteiro da Silva e Silvana Marina Piccoli Pugine, pela sincera amizade, pela convivência e pelos ensinamentos transmitidos.

As minhas grandes amigas de laboratório Andrea Tesch, Flávia Munin e Alessandra Rosa, por todo o apoio dispensado, pela compreensão, pela boa vontade, pela paciência e momentos de descontração.

À estagiária Carla Rossini Crepaldi, pela amizade adquirida e pela grande ajuda nos experimentos.

Ao amigo Antonio (China), pela amizade e pelos seus cuidados com os animais, sempre atencioso e disposto a ajudar em tudo que fosse preciso.

Ao João, técnico de radiologia do Hospital Veterinário, pelo apoio e atenção dispensados durante as revelações das radiografias.

Aos amigos que fiz no abatedouro-escola, pelo apoio na coleta das amostras e pela atenção dispensada.

Aos funcionários do ZAB, Giovana, Elisângela, Ricardo, Sandra, Rosângela, Rafael, Aldo e Nilton pela amizade, incentivo e apoio.

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação (Layla e Conceição) e ao pessoal da Biblioteca, pela paciência e atenção.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, meu sincero obrigado!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

POLETI, M.D. **Estudo proteômico para determinação da expressão relativa das isoformas de VDAC e caracterização dos sítios de ligação da hexoquinase em mitocôndrias cerebrais de rato, boi e ave.** 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Os canais seletivos a ânions dependente de voltagem (VDACs) são um grupo de proteínas, primeiramente identificadas na membrana mitocondrial externa, capazes de formar estruturas de poros hidrofílicos em membranas. As VDACs são conhecidas pela sua função essencial no metabolismo celular e nos estágios recentes de apoptose. Em mamíferos, foram identificadas três isoformas de VDACs (VDAC1, 2 e 3). Uma pesquisa proteômica, consistindo de eletroforese bi-dimensional seguida por western blotting com anticorpos anti-VDAC 1, anti-VDAC 2 e anti-VDAC 3 e espectrometria de massas com fonte de ionização/desorção à laser assistido por matriz e tempo de voo foi utilizada para estudar a expressão das isoformas de VDAC em mitocôndrias cerebrais de aves, ratos e bois. Foi estudada a possibilidade que diferenças na expressão relativa das isoformas de VDAC possam ser um fator determinante da proporção espécie-dependente dos sítios de ligação da hexoquinase tipo A: tipo B nas mitocôndrias cerebrais. Os spots foram caracterizados, e a intensidade de sinal foi comparada entre os spots. VDAC1 e VDAC2 foram divididas dentro de múltiplos spots. A VDAC1 foi dividida em dois spots nos géis bi-dimensionais realizados com amostras de cérebros de ratos e bois, e três spots para cérebros de aves. A VDAC2 foi separada em três, cinco e dois spots para cérebros de ratos, bois e aves, respectivamente. Os resultados reportam uma heterogeneidade de carga das VDACs 1 e 2 nos cérebros analisados. A VDAC1 foi a mais expressa das três isoformas. Além disso, a expressão da VDAC1 mais VDAC2 foi muito maior em cérebros de aves e bois do que em cérebros de ratos. Mitocôndrias de cérebro de aves mostraram uma maior expressão de VDAC1 e menor de VDAC2. As mitocôndrias de cérebro bovino apresentaram os níveis mais altos de VDAC2. A VDAC3 não foi detectada nos cérebros das espécies estudadas.

Palavras-chave: VDAC, isoformas, hexoquinase, glicólise, apoptose.

ABSTRACT

POLETI, M.D. **Proteomic study to determination of relative expression of VDAC isoforms and characterization of hexokinase binding sites in rat, bovine and avian brain mitochondria.** 2008. 69 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

The voltage dependent anion selective channels (VDACs) are a group of proteins first identified in the mitochondrial outer membrane that are able to form hydrophilic pore structures in membranes. VDAC are known to play an essential role in cellular metabolism and in the early stages of apoptosis. In mammals, three VDACs isoforms (VDAC1, 2, 3) have been identified. A proteomic approach, consisting of two dimensional electrophoresis, followed by western blotting with anti-VDAC 1, anti-VDAC 2 and anti-VDAC 3 and by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry was used to study the expression of VDAC isoforms in rat, bovine and avian brain mitochondria. We were studying the possibility that differences in the relative expression of VDAC isoforms may be a factor in determining the species-dependent ratio of type A: type B hexokinase binding sites on brain mitochondria. The spots were characterized, and the signal intensities among spots were compared. VDAC1 and VDAC2 were divided into multiple spots. VDAC1 was divided in two spots in two dimensional gels of rat and bovine brains and three spots in avian brains. VDAC2 was separated into three, five and two spots in rat, bovine and avian brains, respectively. The results report charge heterogeneity of VDACs 1 and 2 in the analyzed brains. VDAC1 was the most abundantly expressed of the three isoforms. Moreover the expression of VDAC1 plus VDAC2 was much higher in avian and bovine brains than in rat brains. Avian brain mitochondria showed the highest expression of VDAC1 and the lowest of VDAC2. Bovine brain mitochondria had the highest levels of VDAC2. No VDAC 3 was detected in studied species brains.

Keywords: VDAC, isoforms, hexokinase, glycolysis, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática simplificada da estrutura de uma mitocôndria. A membrana externa forma um envelope contínuo em volta da mitocôndria enquanto que a membrana interna é altamente invaginada e forma estruturas denominadas cristas. Ambas as membranas contém proteínas canais que regulam a fisiologia mitocondrial..... 18
- Figura 2. Esquema do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP), composto pela VDAC na membrana externa, o translocador de adenilato (ANT) na membrana interna e a ciclofilina D (Cph) na matriz. Demonstração do acoplamento da hexoquinase a VDAC, especificando os dois tipos de sítios de ligação. Um sistema que utiliza e produz ATP em cérebros21
- Figura 3. Representação esquemática do procedimento para isolar as mitocôndrias do tecido cerebral. O isolamento consiste principalmente na dissociação do tecido levando à formação de um homogenato e na separação das organelas celulares por centrifugação em um gradiente descontínuo de ficoll31
- Figura 4. Gel de eletroforese Bi-dimensional de proteínas mitocondriais de tecido cerebral de ratos corado por coomassie-blue (A). Western blotting bi-dimensional com anticorpo anti-VDAC 1 (B) e anti-VDAC 2 (C). As setas no gel indicam os spots imunorreativos.....43
- Figura 5. Gel de eletroforese Bi-dimensional de proteínas mitocondriais de tecido cerebral de aves corado por coomassie-blue (A). Western blotting bi-dimensional com anticorpo anti-VDAC 1 (B) e anti-VDAC 2 (C). As setas no gel indicam os spots imunorreativos44

- Figura 6. Gel de eletroforese Bi-dimensional de proteínas mitocondriais de tecido cerebral de bois corado por coomassie-blue (A). Western blotting bi-dimensional com anticorpo anti-VDAC 1 (B) e anti-VDAC 2 (C). As setas no gel indicam os spots imunorreativos45
- Figura 7. Representação esquemática evidenciando a expressão dos spots de VDAC 1 e VDAC 2 em géis de eletroforese bi-dimensional de mitocôndrias cerebrais murina, aviar e bovina corados por coomassie blue. As letras dos spots são correspondentes as apresentadas nas figuras 4, 5 e 6, sendo VDAC1 os spots “a”, “b” em todas as espécies e “d” em aves e VDAC2 os spots “c”, “e”, “f”, “g” em todas as espécies e “d” apenas em murinos e bovinos47
- Figura 8. Análise da expressão das proteínas VDAC 1 e VDAC 2 em mitocôndrias cerebrais murina, bovina e aviar. O nível de expressão de cada spot foi mensurado pela somatória dos pixels dentro da área do spot (volume do spot) e convertido para uma porcentagem em relação à intensidade do total de spots do gel, são os valores de porcentagem de volume (% volume)50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Proporção da enzima hexoquinase ligada aos sítios tipo A e tipo B da mitocôndria cerebral, baseando-se na solubilização da mesma com Glc-6-P. Os valores correspondem à média e erro padrão (E.P.) 40
- Tabela 2. Coordenadas experimentais (P.M. – peso molecular e pI – ponto isoelétrico) das isoformas da proteína VDAC identificadas pelo western blotting e encontradas no gel bi-dimensional 46
- Tabela 3. Valores Médios* de porcentagem de volume dos spots individuais das proteínas VDAC 1 e VDAC 2 identificados pelos anticorpos específicos e confirmados por MALDI-QTOF nas mitocôndrias cerebrais aviar, murina e bovina 49
- Tabela 4. Valores médios e erro padrão (E.P.) da porcentagem de volume das proteínas VDAC 1 e VDAC 2, do total de VDACs e da relação VDAC1/VDAC2 nas mitocôndrias isoladas de tecido cerebral murino, bovino e aviar 52

LISTA DE ABREVIATURAS

%V	porcentagem de volume
$\Delta\psi_m$	potencial transmembrana mitocondrial
2-DE	eletroforese bi-dimensional
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
ANT	transportador de nucleotídeos de adenina
ATP	<i>adenosine 5'-triphosphate</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Ca ²⁺	Cálcio
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
CHCA	α -cyano-4- hydroxycinnamic acid
Da	Daltons
DNA	ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E.P.	Erro Padrão
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
G ₆ PDH	glicose -6- fosfato desidrogenase
Glc-6-P	glicose-6-fosfato (<i>glucose - 6 - phosphate</i>)
GLUTs	transportadores de glicose
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCL	ácido clorídrico
HXK	Hexoquinase
IEF	focalização isoeétrica
IPG	<i>immobilized pH gradient</i>
KCL	cloreto de potássio
KCSN	tiocianato de potássio
kDa	kilo Daltons
MALDI-QTOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization quadrupole time of flight</i>
MS/MS	Espectros de fragmentação obtidos no espectrômetro de massas

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MME	membrana mitocondrial externa
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NADP	<i>β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium</i>
NADPH	<i>β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced</i>
OD	<i>optical density</i>
P.M.	peso molecular
PCAPS	Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga
pI	ponto isoelétrico
pKA	proteína kinase A
PMSF	<i>phenylmethysulphonyl fluoride</i>
PTP	poro de transição de permeabilidade
RNA	ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	ácido ribonucléico ribossomal
RNA _t	ácido ribonucléico transportador
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SMAC/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein</i>
SNC	sistema nervoso central
TBS	<i>tris buffer saline</i>
TFA	ácido trifluoroacético
VDAC	canal seletivo a ânions dependente de voltagem (<i>voltage dependent anion selective channels</i>)

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	15
II. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Estrutura e Função Mitocondrial	17
2.1.1. Mitocôndria e Apoptose	19
2.2. Os canais de VDAC	20
2.2.1. Isoformas de VDAC	23
2.3. Metabolismo energético cerebral e as propriedades funcionais da hexoquinase	24
III. HIPÓTESE	27
IV. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo Geral	27
4.2. Objetivos Específicos	27
V. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1. Local do Experimento	28
5.2. Animais	28
5.3. Material Experimental	28
5.3.1. Cérebros Bovinos	29
5.3.2. Cérebros Aves e Ratos	29
5.4. Isolamento das Mitocôndrias Cerebrais	30
5.5. Quantificação da Concentração de Proteínas	32
5.6. Tratamento das Mitocôndrias com Glicose-6-fosfato	32
5.7. Mensuração espectrofotométrica da atividade da hexoquinase.....	32

5.8.	Eletroforese Bi-Dimensional (2-DE)	33
5.8.1.	Preparação da amostra e reidratação das tiras	33
5.8.2.	Primeira Dimensão – Focalização Isoelétrica	33
5.8.3.	Segunda Dimensão – SDS-PAGE	34
5.9.	Análise do Mapa “ <i>In silico</i> ”	35
5.10.	Western Blotting	35
5.11.	Digestão Tríplica dos spots em gel	36
5.12.	Caracterização de proteínas por MALDI-QTOF MS/MS	36
5.13.	Análises Estatísticas	38
VI.	RESULTADOS	39
6.1.	Caracterização da proporção de hexoquinase ligada aos sítios tipo A e tipo B em mitocôndrias cerebrais	39
6.2.	Identificação das isoformas de VDAC em mitocôndrias cerebrais de bois, aves e ratos através de técnicas imunológicas e proteômicas	40
VII.	DISCUSSÃO	53
VIII.	CONCLUSÕES	60
IX.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

I. INTRODUÇÃO

O canal seletivo a ânions dependente de voltagem (VDAC) é uma proteína formadora de poros presente na membrana mitocondrial externa (MME) de células eucariotas, responsável por controlar sua permeabilidade regulando o fluxo de ânions de uma série de metabólitos, incluindo adenosina 5' tri-fosfato - ATP (BENZ, 1988). Além de sua função como uma porina, a VDAC, em mamíferos, também está envolvida nos mecanismos de morte celular, permitindo a passagem de proteínas apoptogênicas para o citosol através do poro de transição de permeabilidade (PTP) e atuando como sítio de ligação para kinases periféricas como a hexoquinase e a glicerol kinase (SHOSHAN-BARMATZ; GINCEL, 2003).

Três isoformas de VDAC (VDAC 1, VDAC 2 e VDAC 3) foram identificadas em mitocôndrias de mamíferos (SAMPSON et al., 1996) e a VDAC 1 é relatada como a mais expressa das três isoformas (YAMAMOTO et al., 2006), porém não há relatos na literatura de comparações quantitativas entre os níveis de expressão das isoformas de VDAC atualmente existentes nas mitocôndrias. Essa escassez de informação talvez seja devida à dificuldade de se identificar as isoformas de VDAC por anticorpos ou por espectrometria de massa, uma vez que elas possuem aproximadamente 70% de identidade em termos de sua seqüência de aminoácidos.

A hexoquinase (HXK) associada à membrana mitocondrial externa implica na regulação da síntese de ATP e na prevenção da apoptose (DA-SILVA et al., 2004). Pastorino e Hoek (2003) propuseram que a associação HXK-VDAC é importante para a integração da glicólise com o metabolismo de energia mitocondrial contribuindo para as vantagens de sobrevivência de muitos tipos celulares, incluindo células tumorais.

O tecido cerebral, o qual constitui menos que 2% da massa do corpo humano, é altamente glicolítico e aeróbio, utilizando aproximadamente 25% da glicose circulante no sangue e 20% do oxigênio consumido (WILSON, 1980). Do ponto de vista metabólico, o cérebro assume uma característica única sendo totalmente dependente de glicose como substrato para a geração de grandes quantidades de energia. Em mamíferos, quatro isoenzimas de hexoquinase são conhecidas por catalisar a fosforilação da glicose (WILSON, 1995).

A interação hexoquinase-mitocôndria pode ser revertida através de um tratamento da mitocôndria com Glicose-6-fosfato (Glc-6-P). Kabir e Wilson (1993) demonstraram que a hexoquinase mitocondrial de cérebros de espécies distintas apresentam uma susceptibilidade diferenciada à solubilização com Glc-6-P, porém, isso não reflete intrinsecamente na forma da enzima e/ou nas suas propriedades cinéticas, mas sim no determinado ambiente de ligação da enzima. Esses autores foram os primeiros a correlacionar a existência de discretos sítios de ligação (tipo A e tipo B) para hexoquinase em mitocôndrias cerebrais, sendo os sítios A definidos como sítios dos quais a enzima é liberada pela ação da Glc-6-P, enquanto os sítios B são refratários a esse tratamento. Nesses termos, a razão de sítios de ligação tipo A: tipo B é aproximadamente 90:10; 60:40; 40:60 e 20:80 para as mitocôndrias cerebrais de rato, coelho, boi e humano, respectivamente (HUTNY; WILSON, 2000).

Dada a importância provável da hexoquinase ligada mitocondrialmente na regulação da glicólise aeróbica em cérebros, essas diferenças nas interações hexoquinase-mitocôndria devem estar relacionadas com as diferenças previamente documentadas do metabolismo de energia cerebral de várias espécies. Contudo, o presente trabalho tem por objetivo correlacionar a proporção de sítios de ligação da hexoquinase em espécies metabolicamente diferentes com os níveis de expressão das isoformas de VDAC. Para isso, utilizamos das vantagens oferecidas pelas análises proteômicas a fim de identificar as isoformas de VDAC presentes nas mitocôndrias de tecido cerebral de aves, bois e ratos, e compará-las quanto à sua expressão com a proporção de sítios de ligação da hexoquinase nessas espécies.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Estrutura e Função Mitocondrial*

A mitocôndria é uma organela de membrana dupla presente em células eucarióticas e que desempenha funções vitais na manutenção da vida celular. São organelas esféricas ou alongadas, medindo de 0,5 a 1,0 μm de largura e até 10 μm de comprimento, sendo constituídas, principalmente, por proteínas, lipídios, e uma pequena quantidade de DNA e RNA (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A estrutura dessa organela é subdividida em quatro regiões: membrana externa, espaço intermembranas, membrana interna e matriz (Figura 1). A membrana mitocondrial interna contém canais iônicos, proteínas carreadoras e os complexos protéicos de transferência de elétrons envolvidos na fosforilação oxidativa. Cruz e colaboradores (2003) identificaram 182 proteínas da membrana mitocondrial interna envolvidas em processos de síntese protéica, metabolismo lipídico e transporte de elétrons, substratos e íons.

Na matriz estão presentes o genoma mitocondrial, as enzimas do ciclo do ácido cítrico, da via da β -oxidação dos ácidos graxos e das vias de oxidação dos aminoácidos e o complexo da piruvato desidrogenase (LEHNINGER et al., 1994).

Em mamíferos, o genoma mitocondrial possui, aproximadamente, 16500 pares de bases que codificam RNAs ribossomais (rRNA) 12 e 16S, 22 unidades de RNAs transportadores (tRNA), 13 genes polipeptídicos, todos codificadores de componentes essenciais da cadeia respiratória (LOPEZ et al., 2000).

A membrana mitocondrial externa (MME) faz a interface entre o citosol e o espaço mitocondrial separando a organela do ambiente e agindo como barreira seletiva para a entrada e saída de metabólitos. A via comum de acesso para a translocação de metabólitos através da membrana externa é a VDAC (COLOMBINI, 2004).

Entre as membranas interna e externa reside o espaço intermembranas que pode ser funcionalmente separado em dois compartimentos, o lúmen cristal e o espaço intermembranas (GOTTLIEB, 2000). Uma pequena quantidade de proteínas mitocondriais reside nesse espaço, entre elas encontram-se os reguladores chave

da apoptose. É estimado que 85-97% do citocromo *c*, um mediador da apoptose, reside no lúmen cristal e o restante no espaço intermembranas (BERNARDI et al., 1999).

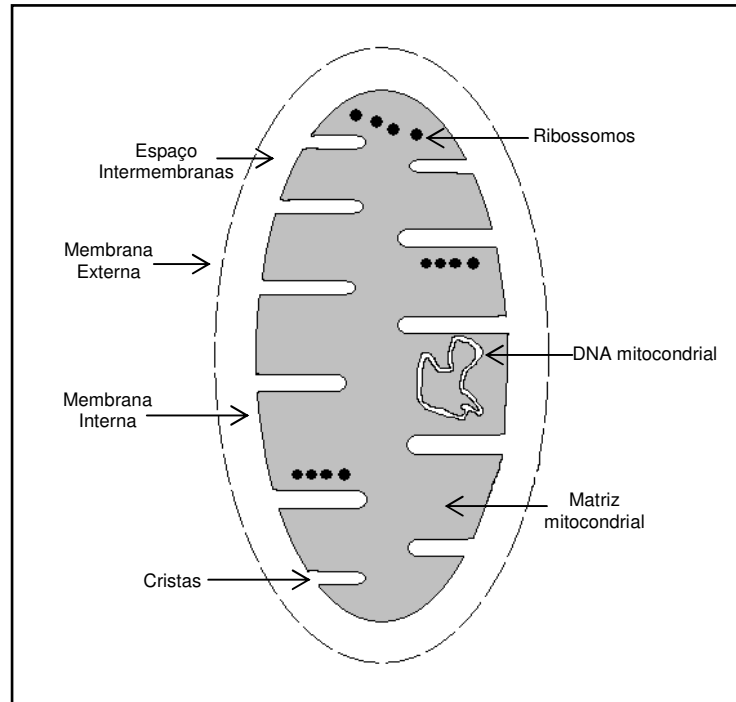


Figura 1. Representação esquemática simplificada da estrutura de uma mitocôndria. A membrana externa forma um envelope contínuo em volta da mitocôndria enquanto que a membrana interna é altamente invaginada e forma estruturas denominadas cristas. Ambas as membranas contém proteínas canais que regulam a fisiologia mitocondrial

A fisiologia mitocondrial desperta um interesse crescente devido as suas diversas funções tanto na fisiologia normal quanto na disfunção celular, implicando em inúmeras doenças como diabetes, câncer, doença de Alzheimer e nos processos apoptóticos (LOPEZ et al., 2000). As proteínas mitocondriais estão envolvidas nas maiores vias de biossíntese (heme) e degradação (ciclo da uréia), sendo essa organela também a maior fonte e alvo de radicais livres, e serve como uma ponte de decisão crítica para a propagação de cascatas de sinalização envolvidas na morte celular, tanto apoptose como necrose (GREEN; REED, 1998).

2.1.1. Mitocôndria e Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo fisiológico regulado por mecanismos de eliminação seletiva de células, e é essencial para o desenvolvimento normal e manutenção da homeostase tissular (DESAGHER; MARTINOU, 2000).

As mitocôndrias possuem uma função essencial na iniciação da morte celular (GOTTLIEB, 2000), atuando como reservatório para múltiplas proteínas apoptogênicas, como o citocromo *c*, Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein), AIF (apoptosis inducing factor), endonucleases G e procaspases 2, 3, 8 e 9 (PARONE et al., 2002).

Há vários estímulos que podem desencadear a liberação do citocromo *c*, entre eles estão os membros da família Bcl-2 (Bax, Bak e Bid), a concentração elevada de cálcio (Ca^{2+}), as concentrações reduzidas de nucleotídeos adenílicos e/ou fosfatos inorgânicos, presença de espécies reativas de oxigênio e baixo potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (CROMPTON, 1999; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2000). Uma vez no citoplasma, o citocromo *c* cessa o transporte de elétrons, interrompe a glicólise e altera o potencial de oxido-redução (redox) celular (ADAMS; CORY, 1998; GREEN; REED, 1998) promovendo a morte celular.

A apoptose, quando desregulada, pode resultar em várias doenças incluindo câncer, desordens neurodegenerativas e doenças autoimunes (DESAGHER; MARTINOU, 2000).

2.2. Os Canais de VDAC

A VDAC (voltage-dependent anion-selective channel) é uma proteína localizada na membrana externa de mitocôndrias e de bactérias gram-negativas, com alta permeabilidade iônica e baixo peso molecular (30-35 kDa). Nessas membranas, essa proteína forma poros de difusão geral, inespecíficos, em forma de barril (MANELLA, 1997) compostos por 1 α – hélice e 13 fitas β (BLACHLY-DYSON et al., 1990; SONG et. al., 1998; THOMAS et. al., 1993) com um diâmetro de aproximadamente 1,3 nm em bactérias e 1,7 nm em mitocôndrias (DE PINTO et al., 1987). A VDAC também está presente na membrana do retículo endoplasmático que se comunica com mitocôndrias (SHOSHAN-BARMATZ et al., 2004).

As VDACs têm uma função importante no controle da passagem de nucleotídeos adenílicos (ROSTOVTSEVA; COLOMBINI, 1996), Cálcio (Ca^{2+}) (GINCEL et al., 2001) e outros metabólitos (HODGE; COLOMBINI, 1997) para dentro e fora da mitocôndria. Além de funcionar como um sítio de ligação para quinases celulares, hexoquinases (CERQUEIRA CÉSAR; WILSON, 1998; SHOSHAN-BARMATZ; GINCEL, 2003), e para sinalização apoptótica (CROMPTON, 1999; KROEMER et al., 1997; SHOSHAN-BARMATZ; GINCEL, 2003).

A VDAC interage com reguladores críticos da apoptose, os membros anti- e pró-apoptóticos da família Bcl-2 (SHIMIZU et AL., 1999), e participa como um dos componentes do PTP, o qual aberto induz a liberação do citocromo c da mitocôndria desencadeando a cascata de sinalização da morte celular programada (Figura 2).

O PTP é um complexo protéico encontrado nas mitocôndrias de todas as células eucarióticas composto pela VDAC, na membrana externa, o transportador de nucleotídeos de adenina (ANT – adenine nucleotide transporter) na membrana interna, e a ciclofilina-D na matriz (CROMPTON, 1998; HALESTRAP, 1999).

A família das proteínas Bcl-2 consistem de membros anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-xL), membros pró-apoptóticos (Bax e Bak) e proteínas pró-apoptóticas (Bid, Bik e Bin) (ADAMS; CORY, 1998; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2000).

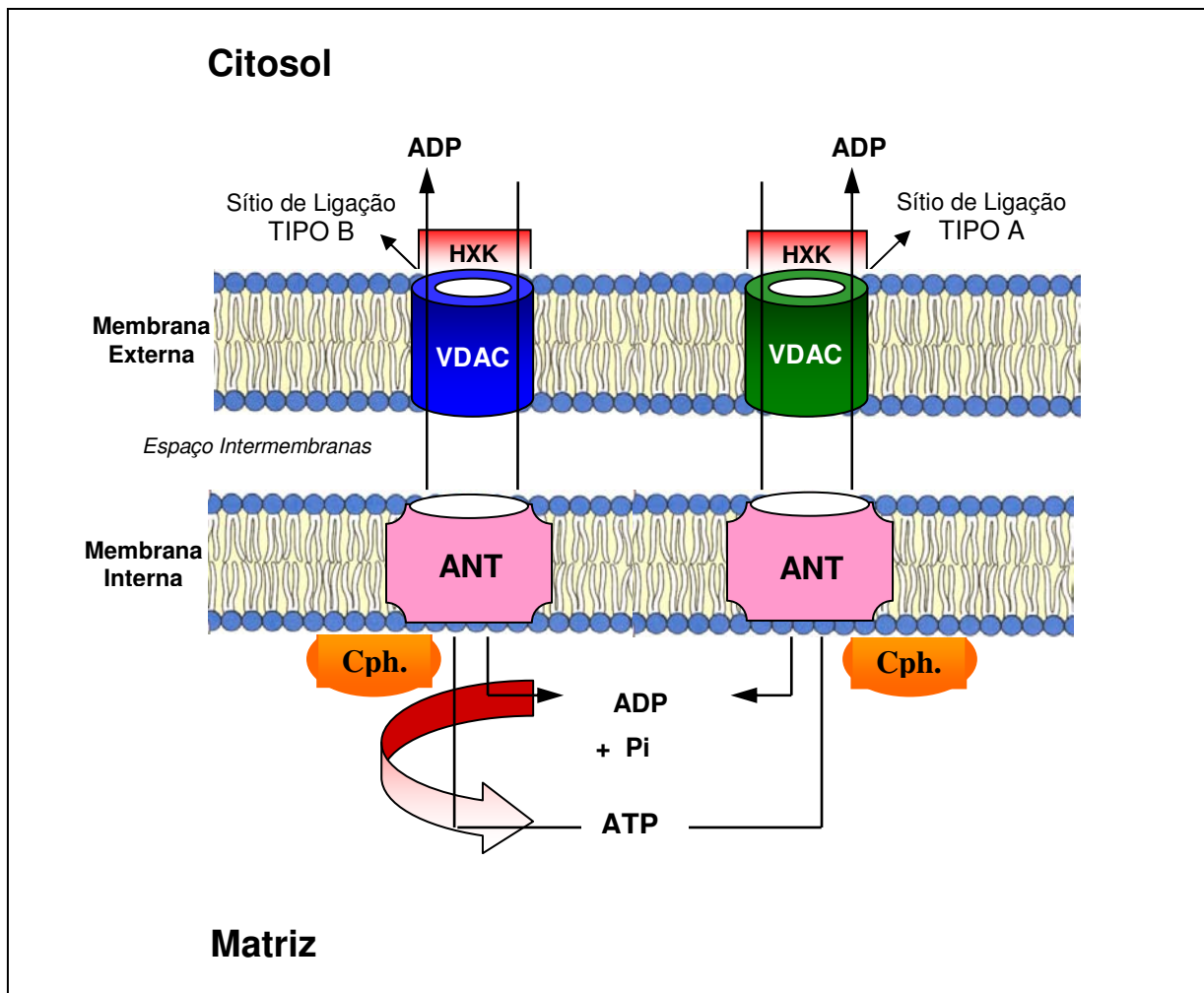


Figura 2. Esquema do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP), composto pela VDAC na membrana externa, o translocador de adenilato (ANT) na membrana interna e a ciclofilina D (Cph.) na matriz. Demonstração do acoplamento da hexoquinase a VDAC, especificando os dois tipos de sítios de ligação. Um sistema que utiliza e produz ATP em cérebros

A localização da VDAC permite que essa influencie na liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembrana mitocondrial. Bernardi et al. (2001) e Vander Heiden et al. (2001) têm relacionado à VDAC com a iniciação da fase mitocondrial de apoptose. É sabido que a permeabilidade da MME é regulada por vários ligantes e proteínas solúveis (SHOSHAN-BARMATZ; GINCEL, 2003), além da sua própria composição lipídica (ROSTOVTSEVA et al., 2006).

As proteínas Bax e Bak podem ligar-se a VDAC, porém demonstram efeitos antagônicos, isto é, a interação Bax-VDAC promove a permeabilização da membrana mitocondrial externa (mitochondrial outer membrane permeabilization - MOMP), e a interação Bak-VDAC2 parece ser inibitória (CHENG et al., 2003). Já Bcl-x_L promove a configuração aberta da VDAC sem permitir a liberação do citocromo *c* (VANDER HEIDEN et al., 2001).

A VDAC de mitocôndria cerebral de rato forma um grande poro na presença de Bax e tBid monomérico, o qual provoca a turgidez na mitocôndria e finalmente o rompimento da membrana mitocondrial externa. Uma vez a membrana rompida o citocromo *c* é liberado para dentro do citosol em conjunto também com outras moléculas apoptogênicas levando a morte celular cerebral (BANERJEE; GHOSH, 2004). O aumento do poro de VDAC após sua interação com Bax e tBid é controlado via fosforilação oxidativa de seu canal pela proteína kinase A (pKA) (BANERJEE; GHOSH, 2006).

Estudos detalhados das propriedades da VDAC têm revelado que esses canais não agem simplesmente como portas que podem ser abertas ou fechadas. As VDACs exibem transições para estados parcialmente fechados dos canais quando na presença de pequenas voltagens transmembrana (MANELLA et al., 1997). Em um pequeno potencial transmembrana (± 10 mV) o canal de VDAC está em um estado de condutância máximo de longa-vida, e é mais seletivo a ânions do que a cátions. Em contraste, em altos potenciais transmembrana (> 40 mV), o canal converte-se para um baixo estado de condutância, o qual é mais seletivo para cátions do que para ânions (MANNELA, 1997). O diâmetro do poro da VDAC de mamíferos foi estimado em 2.4 ± 0.08 nm no estado de subcondutância enquanto no estado de condutância principal o diâmetro foi estimado ser de 3.0-3.8 nm. Dessa forma, o estado fechado da VDAC faz parte do controle do metabolismo mitocondrial devido a sua diferença de seletividade e permeabilidade quanto ao estado aberto (BENZ et

al., 1988) apresentando uma função importante no controle da passagem de nucleotídeos de adenina e outros metabólicos para dentro e para fora da mitocôndria.

No estado de condutância principal, a VDAC é permeável a grandes ânions, como glutamato⁻ e também a grandes cátions como acetilcolina⁺ e dopamina⁺. Já no estado de subcondutância a permeabilidade a acetilcolina⁺ foi reduzida e essencialmente eliminada para glutamato (GINCEL et al., 2000).

2.2.1. Isoformas de VDAC

Em mamíferos, Sampson et al. (1996) e Shinohara et al. (2000) verificaram a expressão de três isoformas de VDAC, enquanto Lee et al. (1998) encontraram duas isoformas em *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) e uma em *Neurospora crassa*.

As diferenças nas funções entre essas isoformas vêm sendo estudadas, isto é, algumas diferenças na abertura dos canais de VDAC e outras propriedades das isoformas de VDAC estão sendo descritas, mas as possíveis relações entre as distintas funções fisiológicas para essas isoformas permanecem ainda não bem definidas (XU et al., 1999). Como exemplos, ratos “knock-out” em VDAC 3 resultam em esterilidade em machos devido à perda de mobilidade dos espermatozoides (SAMPSON et al., 2001) enquanto os “knock-out” para VDAC 1 ou VDAC 2 demonstraram uma redução de 30% na capacidade respiratória (WU et al., 1999).

Estudos em ratos demonstraram que a ausência de VDAC 1 resulta em morte entre o 10^o e 11^o dias após a concepção, enquanto que a ausência de ambas, VDAC 1 e VDAC 3, resultam em uma maior frequência de morte embrionária (SAMPSON et al., 1998). Adicionalmente, VDAC 2 demonstra estar relacionada com a etiologia da esclerose lateral amiotrófica (FUKADA et al., 2004)

As isoformas de VDAC também demonstram propriedades diferentes com relação à plasticidade sináptica (WEEBER et al., 2002) e a permeabilidade da membrana mitocondrial externa a solutos (XU et al., 1999).

Abu-Hamad et al. (2006) observaram uma redução na capacidade de sintetizar ATP de células com baixo nível de expressão da isoforma VDAC1.

2.3. *Metabolismo Energético Cerebral e as Propriedades Funcionais da Hexoquinase*

Sob condições normais, a fonte de energia necessária para realização das funções cerebrais provém da glicose e do oxigênio presentes na circulação sanguínea. São estimados que mais de 50% do consumo de energia cerebral sejam destinados para atividades de excitação sináptica e potenciais de ação (ATTWELL; LAUGHLIN, 2001).

A glicose é transportada da barreira hemato-encefálica para o fluido intersticial cerebral e diretamente captada por proteínas transportadoras, os GLUTs, existentes nos astrócitos e nos neurônios (QUTUB, HUNT; 2005). Quando captada pelos astrócitos, a glicose é metabolizada até a produção de lactato, que uma vez liberado, pode ser transformado pelos neurônios em piruvato para participar do ciclo do ácido tricarboxílico e servir como fonte de energia (MAGISTRETTI; PELLERIN, 1999).

O metabolismo da glicose é a principal via de geração de energia cuja etapa inicial é a fosforilação da glicose catalisada pela hexoquinase, gerando glicose-6-fosfato (WILSON, 2003).

A hexoquinase (HXK) presente em mamíferos consiste de uma cadeia polipeptídica simples com peso molecular de 98.000 Da (Daltons) (CHOU; WILSON, 1972; REDKAR; KENKARE, 1972), e em leveduras consiste de subunidades diméricas, com aproximadamente 50.000 Da (RUSTUM et al., 1971).

Grossbard; Schimke (1966) e Katzen; Schimke (1965) relataram a existência de quatro isoformas de hexoquinase em tecidos de rato, sendo apenas as isoenzimas tipo I e II presentes em tecido cerebral. As isoformas de hexoquinase estão presentes no citosol da célula, mas também podem ser encontradas associadas ao retículo endoplasmático, membrana plasmática e mitocôndria (CRANE; SOLS, 1954; TRAVIS et al., 1999). A maior porção (>80%) da atividade da hexoquinase em cérebro está associada com a mitocôndria (CRANE; SOLS, 1954) e significativamente somente as hexoquinases I e II ligam-se a ela (MATHUPALA et al., 1997).

Essa diversidade de localização subcelular de hexoquinases reflete em suas funções em uma variedade de processos celulares, incluindo sua função chave na regulação da taxa metabólica da glicose em cérebros (HUTNY; WILSON, 2000).

Experimentos com mitocôndrias de cérebro de rato evidenciaram que, durante a fosforilação oxidativa, a hexoquinase ligada à mitocôndria seletivamente usa ATP do compartimento intramitocondrial como substrato, com a taxa de fosforilação da glicose sendo diretamente correlacionada com a taxa de fosforilação oxidativa mitocondrial (CERQUEIRA CÉSAR; WILSON, 1998). Em células tumorais altamente glicolíticas, Arora e Pedersen (1988) demonstraram que a hexoquinase ligada à mitocôndria também tem acesso preferencial ao ATP gerado mitocondrialmente.

Em células tumorais, elevados níveis de isoformas de hexoquinase (HXK-I e HXK-II) ligada a mitocôndria resultam na evasão da apoptose, permitindo que as células continuem proliferando (AZOULAY-ZOHAR et al., 2004; MACHIDA et al., 2006; PASTORINO et al., 2002).

A hexoquinase mitocondrial é susceptível a solubilização no tratamento de mitocôndrias com glicose-6-fosfato (Glc-6-P). Kabir e Wilson (1993) observaram uma solubilização de 90% da atividade da hexoquinase em mitocôndrias cerebrais de rato com Glc-6-P, enquanto que somente 20% em mitocôndrias cerebrais humanas. A ligação da Glc-6-P a metade N-terminal da HXK-I é primeiramente responsável para a liberação da enzima da membrana mitocondrial. É concebível que a HXK – I deva dividir entre um estado solúvel com Glc-6-P ligada à metade N-terminal e um estado associado à mitocôndria pela metade C-terminal (SKAFF et al., 2005).

Essas diferenças na susceptibilidade de liberação da hexoquinase pela Glc-6-P são atribuídas à existência de discretos tipos de sítios de ligação, tipo A: tipo B, da hexoquinase à mitocôndria cerebral (Figura 2), com proporções relativas variando entre espécies (KABIR; WILSON, 1993). Dessa forma, a hexoquinase ligada ao sítio tipo A é liberada pelo tratamento da mitocôndria com Glc-6-P, enquanto que a hexoquinase ligada ao sítio tipo B é refratária a esse tratamento, sendo liberada apenas com posterior tratamento da mitocôndria com agentes caotrópicos como tiocianato de potássio (KSCN). Nesses termos, a razão de sítios de ligação tipo A: tipo B é aproximadamente 90:10; 60:40; 40:60 e 20:80 para as mitocôndrias cerebrais de rato, coelho, boi e humano, respectivamente (HUTNY; WILSON, 2000). As propriedades da enzima ligada ao sítio tipo B são modificadas pela remoção da hexoquinase ligada ao sítio tipo A, de forma que o metabolismo glicolítico cerebral

deva depender da proporção de sítios tipo A : tipo B, a qual varia nas diferentes espécies (CERQUEIRA CÉSAR; WILSON, 2002).

As bases moleculares para a ocorrência desses tipos distintos de sítios de ligação ainda permanecem obscuras, mas a hipótese mais aceita é que os sítios tipo A e tipo B residam em domínios de membranas que diferem em sua composição fosfolipídica. Sendo o sítio tipo A enriquecido com fosfolípideos ácidos e assim permanecendo mais susceptível a solubilização com Glc-6-P (HUTNY; WILSON, 2000).

A porina (VDAC) tem se mostrado como um “receptor” para ligação da hexoquinase à mitocôndria (FELGNER et al., 1979; NAKASHIMA et al., 1986). Blachly-Dyson et al. (1993) demonstraram que a VDAC1, mas não a VDAC2 pode servir como sítio de ligação da hexoquinase, mas Azoulay-Zohar e Aflalo (1999) encontraram que as três isoformas podem funcionar como sítio de ligação a hexoquinase, embora VDAC1 seja mais efetiva. Os 15 aminoácidos N-terminal da HXK II são necessários e suficientes para permitir sua ligação a VDAC (SUI; WILSON, 1997), uma vez iniciada a ligação, outras regiões da proteína também devem interagir.

A interação VDAC1-HXK I promove a sobrevivência de células tumorais via inibição da liberação do citocromo *c* (ABU-HAMAD et al., 2008).

Cerqueira César e Wilson (2004) correlacionaram a taxa espécie dependente de sítios de ligação tipo A : tipo B da hexoquinase à mitocôndria cerebral com os níveis de expressão de RNAm para VDACS, sendo que o RNAm para VDAC 2 foi predominantemente expresso em todas as três espécies estudadas (rato, coelho e boi) e que os níveis de expressão do RNAm para VDAC 1 e 2 foram aumentados em cérebro de boi e rato quando comparado com o RNAm para VDAC3.

É aceitável que diferenças na proporção de sítios de ligação tipo A : tipo B da hexoquinase à mitocôndria cerebral de espécies diferentes devem estar relacionadas a variação nas isoformas de VDAC presentes.

III. HIPÓTESE

Verificar a existência de correlação entre a predominância de determinada isoforma de VDAC (1, 2 ou 3) em mitocôndrias de tecido cerebral de espécies com metabolismo glicolítico diferente com a variação da proporção dos sítios de ligação da hexoquinase (tipo A e tipo B) à mitocôndria.

IV. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo Geral*

- Comparar a expressão diferenciada das isoformas de VDAC nas mitocôndrias cerebrais de aves, bovinos e ratos correlacionando com a proporção dos sítios de ligação (tipo A: tipo B) da hexoquinase à mitocôndria cerebral dessas espécies.

4.2. *Objetivos Específicos*

- Quantificar a proporção de sítios de ligação Tipo A: Tipo B da hexoquinase nas mitocôndrias das espécies aviar, bovina e murina.
- Identificar as isoformas de VDAC em géis bidimensionais de mitocôndrias cerebrais através de western blotting e espectrometria de massa.
- Comparar a expressão das isoformas de VDAC intra e inter espécies.
- Correlacionar a forma predominante de VDAC com a proporção de sítios de ligação da hexoquinase e com as condições metabólicas glicolíticas teciduais de cada espécie.

V. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local do Experimento

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Neurociência e Proteômica localizado no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – campus de Pirassununga.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Eberlin no Laboratório Thomson do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

5.2. Animais

Os ratos (*Rattus norvegicus*) foram provenientes do biotério localizado no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – campus de Pirassununga.

As aves (*Gallus gallus*) e os bovinos (*Bos indicus*) eram pertencentes ao rebanho da Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga (PCAPS).

5.3. Material Experimental

Foram utilizados tecidos cerebrais de bovinos, aves e ratos. Os cérebros de aves e bois foram coletados no matadouro-escola pertencente à PCAPS logo após o abate e sangria dos animais. Os ratos foram sacrificados no local do experimento e os cérebros íntegros imediatamente retirados e processados.

5.3.1. Cérebros Bovinos:

Após a finalização da sangria, a cabeça foi separada do resto do corpo na altura da primeira vértebra cervical e imediatamente transferida para uma mesa de alumínio onde se procedeu a abertura da caixa craniana com uma secção frontal na parte dorsal da cabeça para extração do cérebro. Durante este procedimento, cuidou-se para não haver nenhum tipo de lesão no mesmo.

Após a retirada do cérebro, este foi imerso em meio de isolamento refrigerado (0,25 M Sacarose; 0,1 mM EGTA; 0,2 mM MOPS; pH 7.4) e imediatamente transportado para o laboratório de Neurociência e Proteômica, onde procedeu-se, com o auxílio de um bisturi, a retirada de cinco gramas (5g) da substância cinzenta (córtex cerebral).

5.3.2. Cérebros Aves e Ratos:

As aves e os ratos tiveram a cabeça separada do corpo por uma secção transversal. Uma tesoura cirúrgica foi inserida no canal medular e cortes laterais foram realizados até a ruptura do osso occipital e posterior abertura da caixa craniana. Imediatamente o cérebro foi retirado e o cerebelo descartado. Para cada isolamento das mitocôndrias desses animais foram utilizados três cérebros íntegros. Os cérebros coletados foram transferidos para um béquer contendo 40 mL de meio de isolamento refrigerado.

5.4. Isolamento das Mitocôndrias Cerebrais

As mitocôndrias foram isoladas utilizando um sistema de centrifugação por gradiente descontínuo de Ficoll 3 a 6% (Figura 3).

As amostras cerebrais foram picotadas com uma tesoura e em seguida lavadas por três vezes com o meio de isolamento. Com um volume final de 30 mL foram submetidas à homogeneização em homogeneizador de Potter (Marconi, MA 099), e em seguida, o homogenado foi centrifugado a 1940 x g por 3 minutos em centrífuga Beckman J2-21 em um rotor JA-21. Com o auxílio de uma pipeta, 15 mL do sobrenadante foi cuidadosamente removido, transferido para outro tubo e centrifugado a 16000 x g por 8 minutos.

O pellet resultante foi ressuspensão em 6 mL de meio de ficoll 3% e, vagarosamente transferido para outro tubo de centrífuga, no qual havia sido previamente colocado 25 mL de meio de ficoll 6% (0,24 M Manitol; 0,1 mM EGTA; 60 mM Sacarose; 5 mM MOPS e 6% v/v Ficoll). Em seguida, essa suspensão foi centrifugada a 14600 x g por 30 minutos.

Por fim, as mitocôndrias isoladas foram lavadas com 6 mL de meio de isolamento e centrifugadas a 15100 x g por 10 minutos em um rotor JA-20. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 0,4 mL de meio de isolamento. As mitocôndrias isoladas foram armazenadas em nitrogênio líquido.

Todos os meios utilizados continham inibidores de proteases na concentração de 5 µg/mL Leupeptina, 10 µg/mL Apropina, 1 µg/mL Pepstatina e 25 µg/mL PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride).

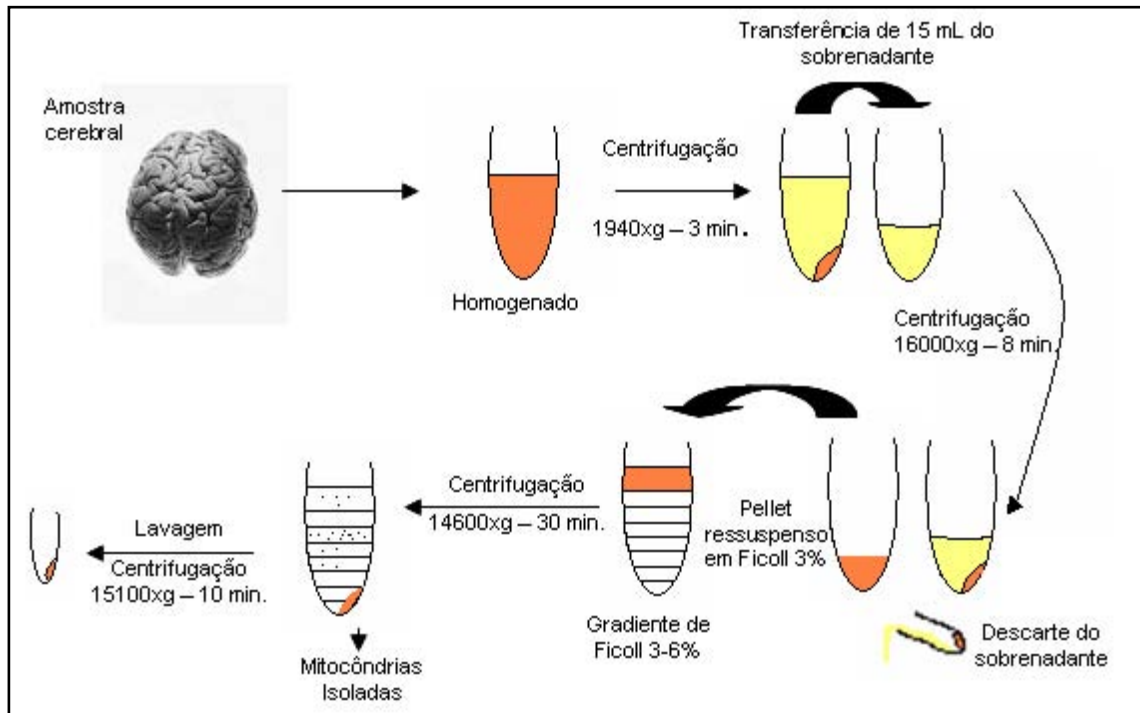


Figura 3. Representação esquemática do procedimento para isolar as mitocôndrias do tecido cerebral. O isolamento consiste principalmente na dissociação do tecido levando a formação de um homogenado e na separação das organelas celulares por centrifugação em um gradiente descontínuo de ficoll

5.5. Quantificação da Concentração de Proteínas

As proteínas totais foram determinadas pelo kit de análise de proteína ácido bicinchoninic (BCA - Pierce, Rockford, Illinois, EUA) utilizando como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 2 mg/mL.

5.6. Tratamento das Mitocôndrias com Glicose-6-fosfato

Foram tratados 200 μ l de mitocôndrias isoladas com meio de isolamento contendo Glicose-6-fostato (Glc-6-P) na concentração de 1 mM. A amostra foi incubada por 10 minutos sob agitação constante à temperatura ambiente, e depois centrifugada a 13800 x g por 30 minutos a 4°C em uma microcentrífuga (Eppendorf 5415 C). O sobrenadante foi descartado e o pellet, contendo somente hexoquinase ligada ao sítio B, foi ressuspenso em 180 μ l de meio de isolamento.

5.7. Mensuração espectrofotométrica da Atividade da Hexoquinase

A atividade da hexoquinase foi determinada através de ensaio espectrofotométrico, com monitoramento do aumento da absorbância a 340 nm pela formação de NADPH vinculada à produção de Glc-6-P.

A solução de análise continha meio de Incubação (5 mM Tris-fosfato pH 7.2, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EGTA, 150 mM KCl) acrescido de 6.6 mM ATP; 1 unidade/mL G₆PDH, 5 mM glicose, 5 mM MgCl₂ e 0,5 mg/mL NADP em um volume final de 1 mL. A reação foi realizada a 25°C em um tempo total de 180 segundos.

5.8. Eletroforese Bi-Dimensional (2-DE)

5.8.1. Preparação da amostra e reidratação das tiras:

Foram utilizadas tiras de 13 cm com gradiente imobilizado de pH 3-10 linear com capacidade para absorver um volume final de 250 μ l (amostra em solução de reidratação).

Uma alíquota de mitocôndria contendo 900 μ g de proteína foi solubilizada em solução de reidratação (Solução “DeStreak”: 7 M Uréia, 2 M Thiouréia, 2% p/v CHAPS, 0,002% p/v azul de bromofenol - Amersham Biosciences) acrescida de 0,5% v/v de tampão de IPG pH 3-10 e 1% v/v inibidores de protease (Amersham Biosciences), perfazendo um volume final de 250 μ l. Essa solução protéica foi utilizada para uma reidratação passiva das tiras à temperatura ambiente por 14 horas no Immobiline Drystrip Reswelling Tray (GE Healthcare), cobertas com 1 mL de óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes durante a reidratação.

5.8.2. Primeira Dimensão – Focalização Isoelétrica:

A primeira dimensão (Focalização Isoelétrica – IEF) foi realizada no aparelho Ettan IPGphor II (GE Healthcare) à temperatura de 20°C por, aproximadamente, 5 horas. O programa de focalização estabelecido constituía das seguintes etapas: 500Vh, gradiente de 800 Vh, gradiente de 11300 Vh e por fim, 4400 Vh até atingir o produto total de tempo x voltagem de 17000 Vh. O limite de corrente aplicado foi de 50 μ A/tira.

Ao final da corrida, as tiras foram retiradas do aparelho, colocadas dentro de tubos de ensaio com tampa e congeladas em freezer convencional até a corrida da segunda dimensão.

5.8.3. Segunda dimensão - SDS-PAGE:

Para a segunda dimensão, as tiras foram equilibradas sob leve agitação por 15 minutos em tampão de equilíbrio I para reduzir as proteínas e 15 min em tampão de equilíbrio II para alquilá-las (tampão de equilíbrio I: 6M uréia, 75 mM tris-HCl pH 8.8, 29,3% v/v glicerol (87%), 2% p/v SDS, 0,002% p/v azul de bromofenol, acrescido de 10mg/mL de DTT; tampão de equilíbrio II: 6M uréia, 75 mM tris-HCl pH 8.8, 29,3% v/v glicerol (87%), 2% p/v SDS, 0,002% p/v azul de bromofenol, acrescido de 25mg/mL de iodoacetamida).

As tiras de IPG foram então sobrepostas ao gel de poliacrilamida (SDS - PAGE 12,5 % - nas medidas 18 x 16 x 0.15 cm) e o marcador de peso molecular (High-Range Rainbow Molecular Weight Markers – Amersham Biosciences) aplicado em pequenos retângulos (5 mm²) de papel de filtro para blotting (Hybond™ blotting paper – Amersham Biosciences – UK). Ambos foram fixados sobre o gel com uma solução selante de agarose (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% p/v SDS, 0,5% p/v agarose e 0,002% p/v de azul de bromofenol).

O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli (1970) 1x concentrado para o anodo (25 mM de Tris; 192 mM Glicina; 0,1% p/v SDS) e 3 x concentrado para o catodo.

Para a corrida eletroforética foi mantida uma corrente de 25 mA por gel a uma voltagem inicial de 90V por 30 minutos. Após as proteínas migrarem da tira para o gel, a voltagem foi aumentada para 250V por 5 horas e 25 minutos. Durante toda a corrida a temperatura foi mantida em 10 °C com um banho-maria termostático circulador (LKB Browma– Sweden).

Ao final da corrida, os géis foram corados por 1 h com azul de Coomassie (0,1% p/v coomassie blue R-250, 10% v/v ácido acético e 40% v/v metanol) e descorados por 12 h em solução descorante (40% v/v Metanol, 10% v/v Ácido Acético).

5.9. Análise do mapa “*In silico*”

As imagens dos géis 2-DE foram obtidas usando o ImageScanner PowerLook 1120 (Amersham Biosciences) a 200 dpi de resolução e analisados pelo software ImageMaster Platinum versão 6.0 (Amersham Biosciences). Os spots foram detectados e quantificados automaticamente definindo os parâmetros de saliência, área mínima e “smooth”. Para o estudo, um gel “master” foi definido pela maior quantidade de spots que apresentava, permitindo que comparações entre as espécies fossem realizadas através de percentuais da intensidade integrada do “spot” (% volume). Todos os géis analíticos (n=8 para espécie murina, n=10 para espécie aviar e n=12 para espécie bovina) foram comparados dentro e entre os grupos de imagens e as expressões relativas dos “spots” individuais foram analisadas.

5.10. Western Blotting

Após a eletroforese, os géis foram transferidos à 80V, 400 mA por 1:40h para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 μm (Bio-Rad) utilizando a unidade de transferência TE 62 (Amersham Biosciences) e o sistema de tampão de Towbin et al. (1979). As membranas foram bloqueadas pela incubação por 12 h a 4°C em TBS (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7.5) contendo 5% p/v de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) e 1% p/v gelatina (Sigma).

Após o bloqueio, cada membrana foi incubada por 3 horas com os anticorpos específicos das isoformas de VDAC, sendo 1:1000 para VDAC 1 (anti-VDAC 1 31HL Mouse mAb, nº cat. 529532, Calbiochem) e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para VDAC 2 (anti-VDAC 2 Rabbit pAb, nº cat. Ab47104, Abcam). Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora, sendo 1:15000 para Goat Anti-Mouse IgG (nº cat. 170-6516, Bio-Rad), 1:10000 Goat Anti-Rabbit IgG (nº cat. 170-6515, Bio-Rad), respectivamente. Ambos conjugados com peroxidase. Os anticorpos foram diluídos em TBS contendo 1% gelatina. Para a detecção da isoforma VDAC 3 foram

utilizados o anticorpo primário anti-VDAC 3 chicken pAb (nº cat. Ab37459, Abcam) diluído 1:125 e o secundário Goat Anti-chicken IgY (nº cat. Ab6877, Abcam) 1:10.000.

Entre as etapas de bloqueio e incubação com os anticorpos, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 10 min. com T-TBS (TBS contendo 0,1% de Tween 20) e 1 vez de 10 min. com TBS.

A ligação específica dos anticorpos foi visualizada pela incubação da membrana com os reagentes do sistema SuperSignal West Pico da Pierce Chemical (Rockford, IL) com subsequente exposição ao filme de raio-X (CL-X posure film - Pierce) e revelação do mesmo. Essa última etapa foi realizada no hospital veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - campus de Pirassununga.

5.11. Digestão Triptica dos spots em gel

Os spots de interesse foram recortados do gel em cubos de 1 mm² e colocados dentro de placas de poliestireno de 96 poços. A digestão foi realizada com o aparelho Mannifold (Millipore) e o “In-Gel Digest_{ZP} Kit” da Millipore, no qual os recortes de gel foram descorados, desidratados com acetonitrila, digeridos por tripsina para extração dos peptídeos e posteriormente, capturados pela coluna C18, lavados e eluídos em tampão compatível com a massa seguindo as recomendações do fabricante.

5.12. Caracterização de Proteínas por MALDI-QTOF MS/MS

Todas as amostras obtidas pela digestão triptica foram preparadas para as análises MALDI-QTOF MS/MS (matrix assisted laser desorption/ionization quadrupole time of flight mass spectrometry) usando o método “dried droplet”. As amostras foram acidificadas pela adição de dois volumes de amostra de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) e mantidas em temperatura ambiente por tempo

suficiente para reduzir o volume da gotícula via evaporação. A matriz [1% (m/v) α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)] foi preparada em solução de água/acetonitrila 1:1 (v/v) contendo 0,1% (v/v) TFA e a amostra foi deixada à temperatura ambiente para secar. Dados da espectrometria de massas foram coletados no modo positivo. O espectro de massas foi adquirido no espectrômetro de massas Premier (Waters-Micromass, Manchester, UK). Os espectros de massas foram obtidos em modo positivo (LDI+) com uma fonte de laser sólido usando os seguintes parâmetros principais: taxa de frequência do laser de 200 Hz, variação de massa entre 880 e 3000 Da, limiar de detecção de íons para MS/MS de 1500 Da, limiar de massa de 200 Da, tempo de varredura de 2s, multiplicador Np ajustado para 0.70, resolução de 10000 em modo "V", limiar de disparo de 700 mV, limiar de sinal de 80 mV e placa de detecção de microcanal (MCP) para 2100 V.

Cada espectro foi coletado acima de 2s de varredura, e o espectro foi acumulado acima de 10s de varredura, aproximadamente. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão e a energia de colisão típica usada foi na faixa de 34-161 eV dependendo da relação massa/carga. O instrumento foi controlado através do software MassLynx versão 4.1. Todos os espectros de massas foram processados e deram origem à arquivos de listas de íons com a extensão *.pkl e para tal foi utilizado a versão ProteinLynxGlobalServer 2.3 (Waters, Manchester, UK). A identificação da proteína foi realizada por uma pesquisa em banco de dados usando arquivos de intensidade e massa da lista de íons dos peptídeos protonados detectados pelo MALDI-QTOF após o processamento do espectro de massas através do ProteinLynxGlobalServer. A lista de íons monoisotópicos foi processada com os seguintes parâmetros de pesquisa: banco de dados NCBI 1.0, uma clivagem perdida, digestão por tripsina, carbamidometilação com uma modificação de cisteína. A tolerância para o erro de pesquisa foi 10 ppm para moléculas protonadas $[M + H]^+$.

5.13. Análises Estatísticas

Para a comparação da expressão protéica entre as espécies animais, as variações experimentais, como a intensidade de coloração dos spots, foram analisadas através da análise de scatter plot e foi realizada a normalização dos géis.

A intensidade óptica (OD) de cada spot foi mensurada pela somatória dos “pixels” dentro da área do spot (volume do spot) e convertida para uma porcentagem em relação a intensidade do total de spots do gel : $\%V = (\text{volume spot} / \Sigma \text{volumes de todos os spots presentes no gel})$. Esses dados foram comparados inter e intra espécies por meio de análises de variância, considerando um modelo estatístico hierárquico que contemplou os efeitos de *spots* e *spots* dentro das espécies. Em caso de resultados significativos nas análises de variância ($P < 0,05$), utilizou-se como procedimento de comparações múltiplas o Teste *t* de *Student*. Para os resultados das análises estatísticas foram apresentados as médias e erros padrão das estimativas dentro de cada espécie. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*[®], versão 9.1.3 (SAS, 1995).

VI. RESULTADOS

Para avaliar de forma quantitativa o nível de expressão das isoformas de VDAC nas mitocôndrias das espécies estudadas, todas as etapas do experimento foram padronizadas.

Com a finalidade de obter quantidades equivalentes de proteína para cada preparação, foi necessária a utilização de 5g da massa cinzenta para cérebro bovino ou 3 cérebros íntegros murinos e aviários. Essa discrepância no preparo das amostras deve-se ao fato de haver uma quantidade maior de massa branca nos cérebros de boi enquanto que em animais menores, como ave e rato, a massa cinzenta (rica em mitocôndrias) é predominante com relação à massa branca (pobre em mitocôndrias). As preparações mitocondriais resultaram em uma concentração protéica de $13,6 \pm 1,9$ mg/mL para murino; $11,1 \pm 3,7$ mg/mL para ave e $10,5 \pm 1,4$ mg/mL para bovino .

6.1. Caracterização da proporção de hexoquinase ligada aos sítios tipo A e tipo B em mitocôndrias cerebrais

A proporção de hexoquinase ligada ao sítio tipo A e sítio tipo B em mitocôndrias de células neurais de ratos, aves e bois estão descritas na tabela 1. O cérebro aviar apresentou proporções idênticas ao cérebro bovino, ou seja, 40% da hexoquinase ligada ao sítio tipo A e 60% ligada ao sítio tipo B, o que é extremamente interessante, por tratar-se de animais bastante distanciados filogeneticamente, e com metabolismos bastante diferenciados.

Tabela 1. Proporção da enzima hexoquinase ligada aos sítios tipo A e tipo B da mitocôndria cerebral, baseando-se na solubilização da mesma com Glc-6-P. Os valores correspondem à média e erro padrão (E.P.)

Espécies	Porcentagem de Hexoquinase ligada aos sítios			
	Tipo A		Tipo B	
	<i>Média</i>	<i>E. P.</i>	<i>Média</i>	<i>E. P.</i>
Murina (<i>n</i> =5)	89,96	1,77	10,04	1,77
Aviar (<i>n</i> =7)	36,63	1,49	63,37	1,49
Bovino (<i>n</i> =4)	38,11	1,77	61,89	1,77

n = número de experimentos realizados com diferentes preparações mitocondriais

6.2. Identificação das isoformas de VDAC em mitocôndrias cerebrais de bois, aves e ratos através de técnicas imunológicas e proteômicas

Para identificar as isoformas de VDAC foi necessária a separação das proteínas de mitocôndrias cerebrais de aves, bois e ratos por eletroforese bi-dimensional (2-DE), uma vez que as isoformas apresentam o mesmo peso molecular (P.M.), mas diferentes valores de ponto Isoelétrico (pI). De acordo com o banco de dados de proteínas, o peso molecular da isoforma de VDAC 1 é estimado de 30741 Daltons (Da) para bovino (P45879), 30756 Da para murino (Q9Z2L0) e 30575 Da (NP_001029041) para ave; para VDAC 2 é, respectivamente, de 31620 Da (P68002), 31746 Da (P81155) e 30198 Da (Q9I9D1).

As mitocôndrias isoladas de cada espécie foram submetidas a eletroforese bi-dimensional, sendo a primeira dimensão em tiras de 13 cm com gradiente de pH 3-10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%. As proteínas mitocondriais de cérebro de aves, bois e ratos foram separadas em aproximadamente 703 ± 207 ; 498 ± 160 ; 744 ± 175 spots, respectivamente. Estudos recentes de mitocôndrias isoladas de vários organismos/tecidos têm relatado de 400 – 600 proteínas por gel (LOPEZ et al, 2000) similar ao número de spots protéicos encontrados nesse estudo.

Os spots foram identificados automaticamente pelo software de análise ImageMaster padronizando os valores de saliência, smooth e área mínima. Para cada espécie foi criado um grupo de comparação, no qual um dos géis foi selecionado como referência (gel master) e os outros foram comparados a ele. Para a espécie bovina os matches foram de 326 ± 73 , para murina de 489 ± 115 e para aviar de 472 ± 110 , sendo uma equivalência de spots entre os géis de cada espécie superior a 35%, 41% e 40%, respectivamente.

Após o término da corrida eletroforética, as proteínas do gel foram imediatamente eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose para ser testada com anticorpos viáveis comercialmente, específicos para cada isoforma de VDAC. Todas as etapas como tempo de bloqueio, lavagem, incubações e diluições dos anticorpos foram padronizados.

As figuras 4, 5 e 6 mostram a imagem do gel 2-DE de proteínas mitocôndrias de tecido cerebral de ratos, aves e bois corado por coomassie blue (figura A) e o western blotting bi-dimensional com anticorpos anti-VDAC 1 e anti-VDAC 2 (figuras B e C). Na janela experimental analisada (pH 3-10, massa de 200 - 10 kDa) observamos no western blotting com o anticorpo anti-VDAC 1 dois spots imunorreativos para a espécie murina e bovina e três spots imunorreativos na espécie aviar. Para a detecção da isoforma VDAC 2 encontramos cinco spots imunorreativos ao anticorpo anti-VDAC 2 nas três espécies estudadas.

Embora tenhamos utilizado anticorpos específicos para cada isoforma de VDAC, foi possível observar que na espécie aviar os spots “a”, “b” e “d” foram reativos tanto para VDAC 1 quanto para VDAC 2 e na espécie murina os spots “a” e “b” também foram imunorreativos para ambos os anticorpos, com intensidade de sinal para o anti-VDAC 2 menor apenas nesta última espécie.

Os spots reconhecidos pelos anticorpos no western blotting estão indicados por setas e letras correspondentes no gel bi-dimensional para cada espécie (figura 4A, 5A e 6 A).

Os géis das três espécies foram comparados por match no software ImageMaster e os spots ilustrados nas figuras abaixo com a mesma letra são correspondentes nas três espécies, exceto o spot “d” em ave que não possui match com nenhuma outra espécie.

Com a finalidade de identificar a isoforma VDAC 3 nas proteínas mitocondriais das espécies estudadas foi realizado o western blotting com diferentes concentrações do anticorpo primário (1:125; 1:250; 1:500) e secundário (1:5000, 1:10000, 1:20000 e 1:30000), entretanto não detectamos essa isoforma nas condições experimentais utilizadas neste estudo.

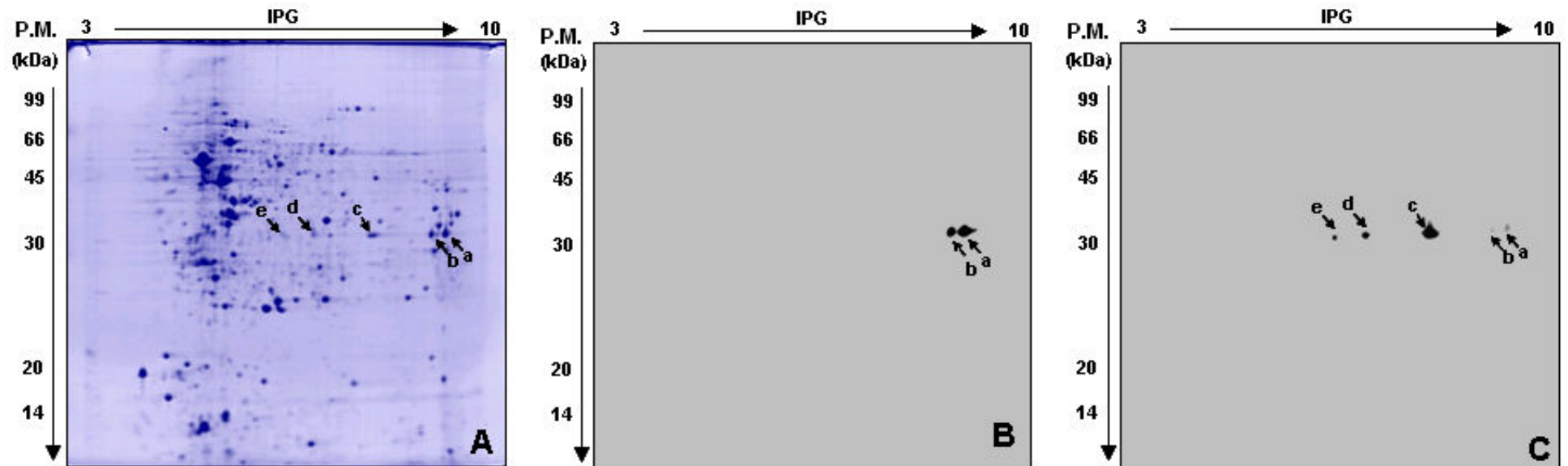


Figura 4. Gel de eletroforese Bi-dimensional de proteínas mitocondriais de tecido cerebral de ratos corado por coomassie-blue (A). Western blotting bi-dimensional com anticorpo anti-VDAC 1 (B) e anti-VDAC 2 (C). As setas no gel indicam os spots imunorreativos

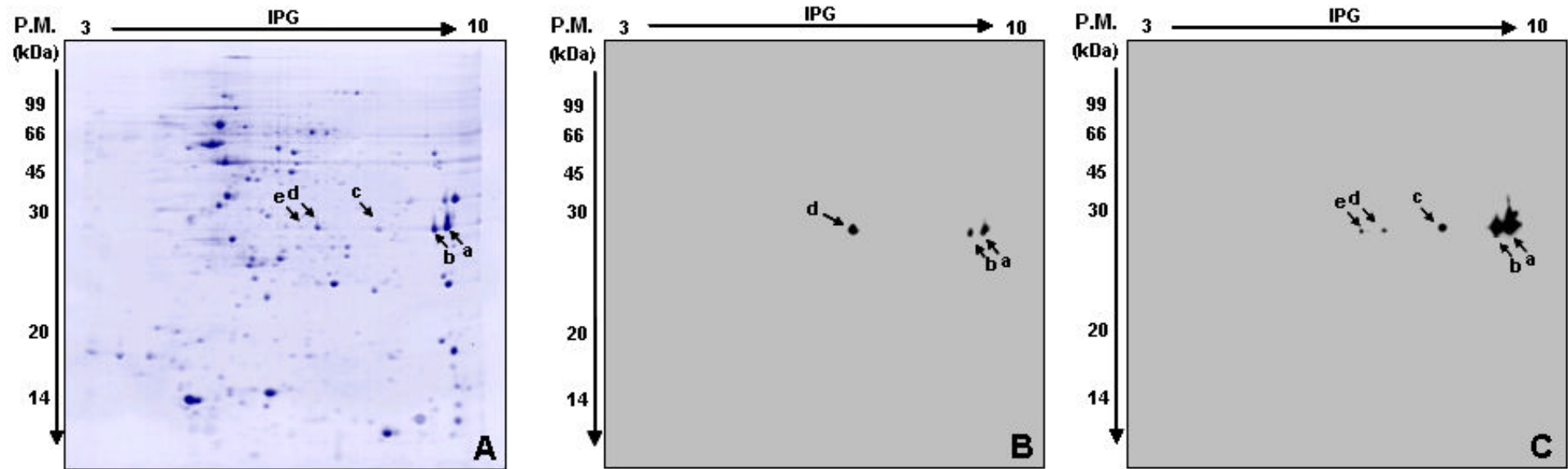


Figura 5. Gel de eletroforese Bi-dimensional de proteínas mitocondriais de tecido cerebral de aves corado por coomassie-blue (A). Western blotting bi-dimensional com anticorpo anti-VDAC 1 (B) e anti-VDAC 2 (C). As setas no gel indicam os spots imunorreativos

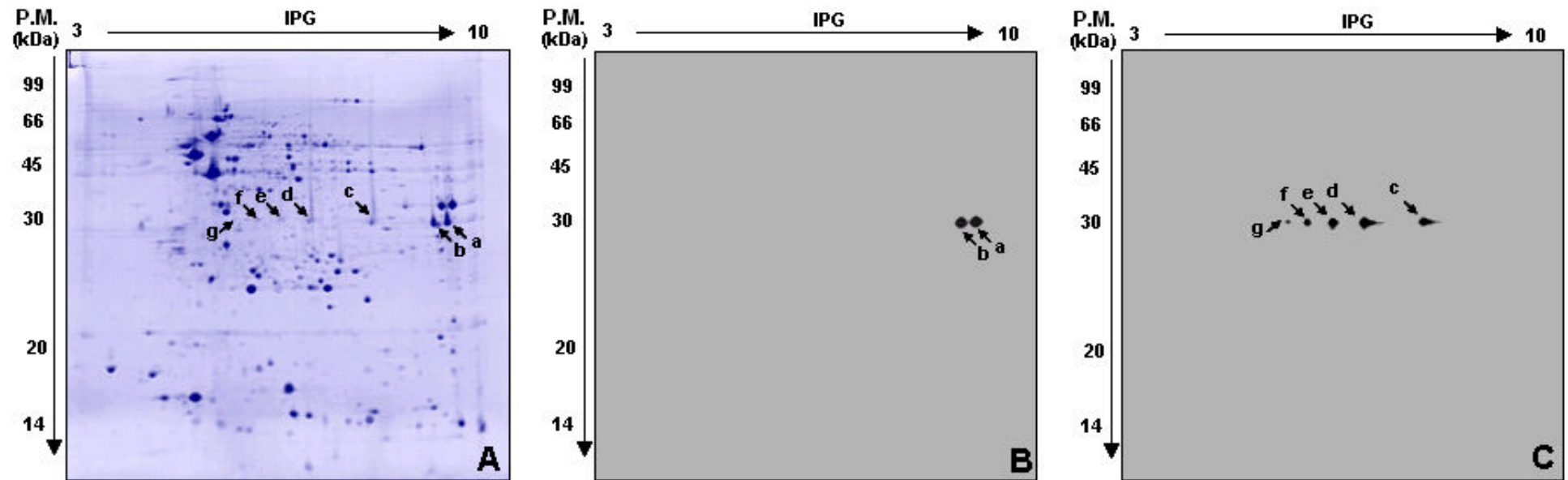


Figura 6. Gel de eletroforese Bi-dimensional de proteínas mitocondriais de tecido cerebral de bois corado por coomassie-blue (A). Western blotting bi-dimensional com anticorpo anti-VDAC 1 (B) e anti-VDAC 2 (C). As setas no gel indicam os spots imunorreativos

Todos os spots apresentaram, aproximadamente, o mesmo peso molecular (P.M.), mas diferentes valores de ponto isoelétrico (pI) como demonstrado na tabela 2 . A figura 7 ilustra os sete spots do gel bi-dimensional com níveis de expressão diferentes em murino, bovino e ave. Nota-se a forte expressão dos spots reconhecidos pelo anticorpo anti-VDAC 1 (a e b em todas as espécies e d na espécie aviar).

Tabela 2. Coordenadas experimentais (P.M. – peso molecular e pI – ponto isoelétrico) das isoformas da proteína VDAC identificados pelo western blotting e encontradas no gel bi-dimensional.

Spot	Murino		Aviar		Bovino	
	pI	P.M.	pI	P.M.	pI	P.M.
a	9.39	29 452	9.49	28 800	9.47	30 136
b	9.16	29 476	9.26	28 700	9.24	29 955
c	8.13	29 310	8.26	28 400	8.23	30 136
d	7.01	29 905	7.18	28 900	7.17	30 318
e	6.56	29 143	6.89	29 000	6.63	30 318
f	----	----	----	----	6.18	30 136
g	----	----	----	----	5.78	30 000

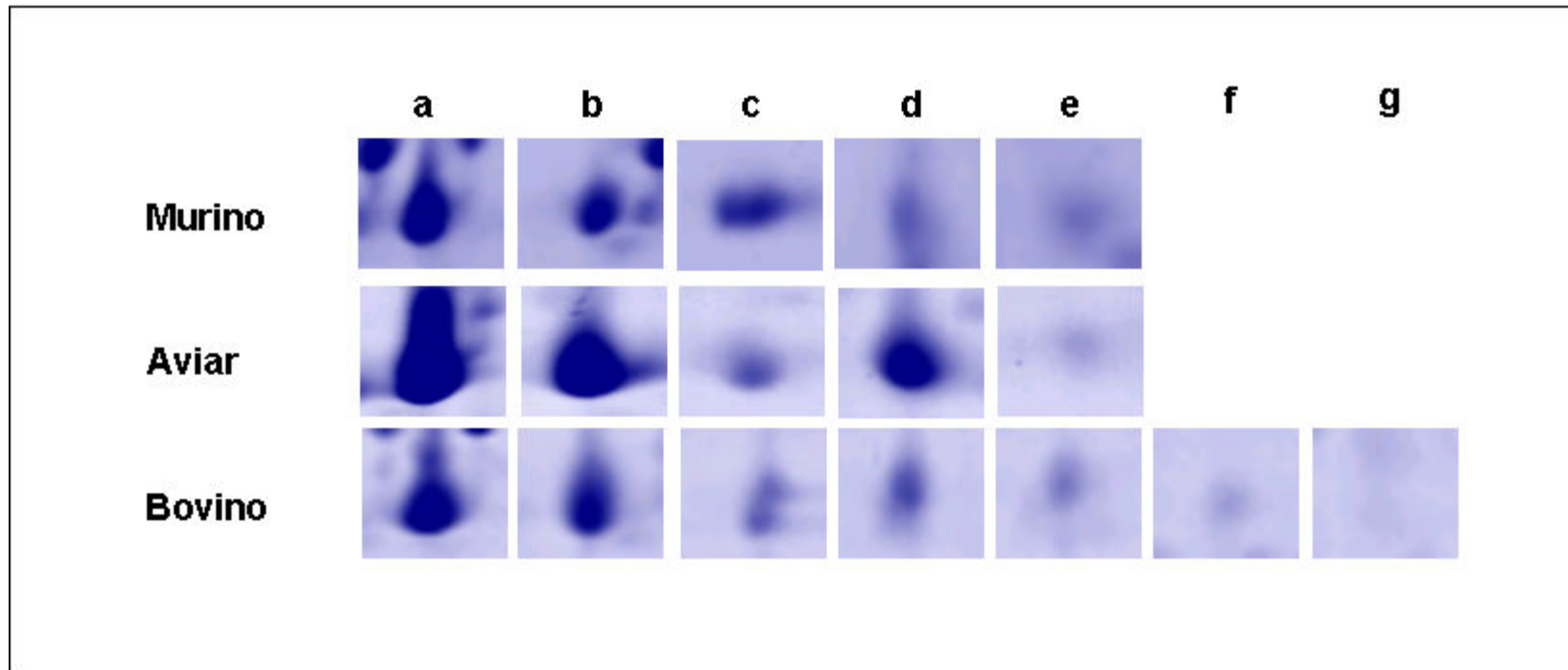


Figura 7. Representação esquemática evidenciando a expressão dos spots de VDAC 1 e VDAC 2 em géis de eletroforese bi-dimensional de mitocôndrias cerebrais murina, aviar e bovina corados por coomassie blue. As letras dos spots são correspondentes as apresentadas nas figuras 4, 5 e 6, sendo VDAC1 os spots “a”, “b” em todas as espécies e “d” em ave e VDAC2 os spots “c”, “e”, “f”, “g” em todas as espécies e “d” apenas em murino e bovino

Os spots nos géis bi-dimensionais correspondentes àqueles identificados pelo western blotting foram recortados do mesmo e digeridos por tripsina para posterior análise por MALDI-TOF seguido de pesquisa em bancos de dados, a fim de identificar a proteína correspondente em cada spot. Dessa maneira foi possível concluir que os spots “a” e “b” das espécies analisadas e o spot “d” da espécie aviar correspondem a isoforma VDAC 1. No entanto, o spot “d” em murino e bovino corresponde a isoforma VDAC 2, assim como, os spots “c”, “e”, “f” e “g” nas três espécies analisadas. A identificação da proteína foi positiva considerando uma probabilidade acima de 80%.

Os spots identificados como VDAC pela espectrometria de massa apresentaram, nos géis, aproximadamente, o mesmo peso molecular de 30 kDa e diferentes valores de ponto isoelétrico. Os valores de pI estimado da seqüência de aminoácidos foram em murino de 9.39 e 9.16 para VDAC 1 e 8.13, 7.01 e 6.56 para VDAC 2. Em bovino os valores de pI estimado foram de 9.47 e 9.24 para VDAC 1 e 8.23, 7.17, 6.63, 6.18 e 5.78 para VDAC 2. Em ave foi de 9.49, 9.26 e 7.18 para VDAC 1 e 8.26 e 6.89 para VDAC 2.

Dessa forma, podemos avaliar que o anticorpo anti-VDAC 1 reagiu apenas com a isoforma VDAC 1, mas o anti-VDAC 2 demonstrou imunorreação cruzada com a VDAC 1 nas espécies murina e aviar. Esses resultados mostram que o anticorpo anti-VDAC 1 utilizado nesse estudo foi específico para VDAC 1, mas que o anticorpo anti-VDAC 2 não foi específico, exceto na espécie bovina

Após a identificação e confirmação dos spots de VDAC, partimos para avaliação do perfil de expressão protéica das isoformas de VDAC em mitocôndrias isoladas do córtex cerebral de aves, ratos e bois. Para tal, as intensidades de sinais de cada spot foram mensuradas pela análise de imagem. A tabela 3 mostra os níveis relativos (%) de intensidade de sinal de cada spot e a intensidade total de cada isoforma dentro de cada espécie animal estudada e a figura 8 ilustra os valores do total da expressão (% volume) de cada isoforma. Esses resultados demonstram que as isoformas 1 e 2 estavam expressas em mitocôndrias de tecido cerebral de todas as espécies examinadas nesse estudo, mas que a VDAC1 é a isoforma expressa em maior quantidade. Quando comparada a isoforma VDAC1 com a VDAC2 dentro da mesma espécie, o cérebro aviar apresentou uma maior expressão da VDAC1 estatisticamente significativa em relação à VDAC 2.

Tabela 3. Valores Médios* de porcentagem de volume dos spots individuais das proteínas VDAC 1 e VDAC 2 identificados pelos anticorpos específicos e confirmados por MALDI-TOF nas mitocôndrias cerebrais aviar, murina e bovina

	VDAC 1				VDAC 2					
	a	b	d	a+b+d	c	d	e	f	g	c+d+e+f+g
Murino	0,6611	0,4472	----	1,1083 ^a	0,3999	0,2519	0,2071	----	----	0,8588 ^a
Bovino	1,1692	0,7875	----	1,9567 ^a	0,5640	0,4852	0,2803	0,1562	0,0802	1,5659 ^a
Aviar	1,1303	0,7586	0,5281	2,4170 ^a	0,2649	----	0,0698	----	----	0,3347 ^b

* Médias seguidas por letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si estatisticamente pelo teste F ($p < 0,01$).

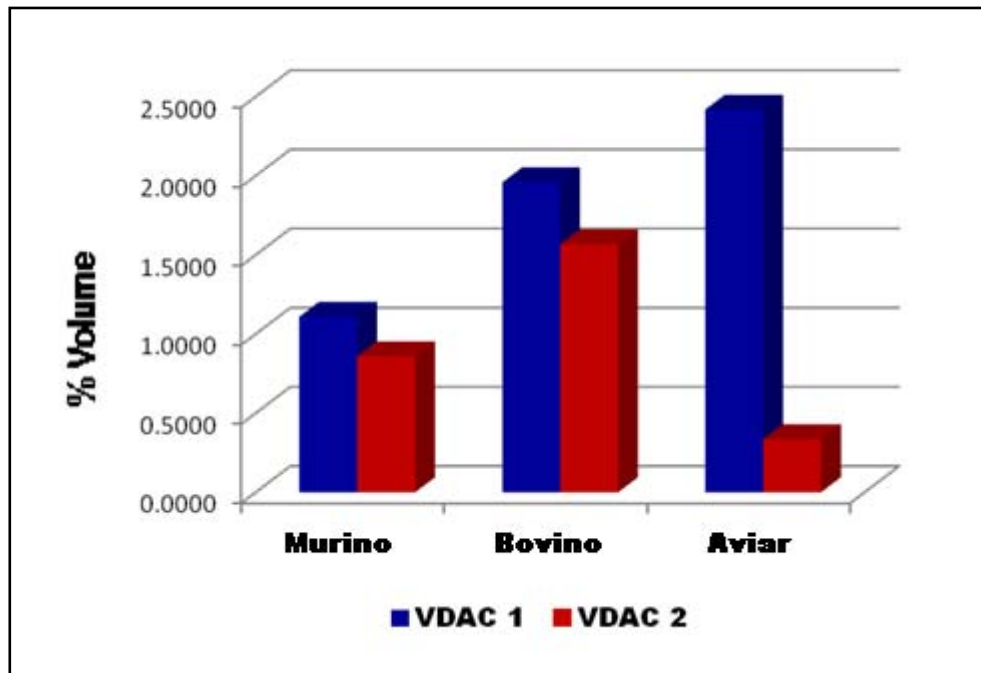


Figura 8. Análise da expressão das proteínas VDAC 1 e VDAC 2 em mitocôndrias cerebrais murina, bovina e aviar. O nível de expressão de cada spot foi mensurado pela somatória dos pixels dentro da área do spot (volume do spot) e convertida para uma porcentagem em relação à intensidade do total de spots do gel, são os valores de porcentagem de volume (% volume)

A VDAC 1 foi menos expressa em mitocôndrias de cérebro de ratos em relação as de cérebros de aves e bois, considerando que os valores para cérebro de bois foram intermediários porém menores que os encontrados para cérebro de aves. Já a VDAC 2 apresentou uma menor expressão em aves, se comparada aos bois, com valores medianos para cérebro de ratos (Tabela 4).

A expressão das VDACs (VDAC 1 + VDAC 2) foi menor em cérebros de ratos do que em cérebros de bois e aves, embora estatisticamente iguais para os cérebros de aves e ratos. As mitocôndrias de tecido cerebral bovino apresentaram a maior porcentagem de VDACs. A VDAC3 não foi expressa ou pouco expressa em células neuronais de ratos, aves e bois, pois não foi possível detectá-la e tão pouco quantificá-la.

A VDAC 1, que corresponde a aproximadamente 56% do total de VDACs em mitocôndrias de cérebro ratos e 55% em bois, foi muito mais expressa em cérebro de aves (aproximadamente 88%). A VDAC 2 demonstrou a menor expressão em cérebro de aves, comparado com as duas outras espécies.

Tabela 4. Valores médios e erro padrão (E.P.) da porcentagem de volume das proteínas VDAC 1 e VDAC 2, do total de VDACs e da relação VDAC1/VDAC2 nas mitocôndrias isoladas de tecido cerebral murino, bovino e aviar

Espécie	VDAC 1		VDAC 2		TOTAL (VDAC 1 + VDAC 2)		RELAÇÃO VDAC 1 / VDAC 2	
	<i>Média*</i>	<i>E.P.</i>	<i>Média*</i>	<i>E.P.</i>	<i>Média*</i>	<i>E.P.</i>	<i>Média*</i>	<i>E.P.</i>
Murino (n=8)	1,1083 ^B	0,1985	0,8588 ^{AB}	0,1985	1,9671 ^B	0,3057	1,2905 ^B	0,6638
Bovino (n=12)	1,9567 ^A	0,1584	1,5659 ^A	0,1584	3,5226 ^A	0,2439	1,2495 ^B	0,5295
Aviar (n=10)	2,4170 ^A	0,1661	0,3347 ^B	0,1661	2,7517 ^{AB}	0,2558	7,2213 ^A	0,5554

* Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste F (p<0,01).

VII. DISCUSSÃO

As isoformas I e II da hexoquinase ligam-se à membrana mitocondrial através de sua interação com a proteína VDAC na membrana externa, preferencialmente nos sítios de contato entre a membrana mitocondrial interna e externa (PASTORINO et al., 2008). Essa localização é importante para a integração da glicólise com o metabolismo de energia mitocondrial. Dessa forma, uma análise do perfil da expressão protéica da VDAC em espécies metabolicamente diferentes poderia ajudar a esclarecer e a correlacionar organismos distintos.

O presente estudo teve como objetivo correlacionar a expressão das diferentes isoformas de VDAC (1, 2 e 3) com a existência dos diferentes sítios de ligação da hexoquinase à membrana mitocondrial externa (A e B). Para isso foram utilizadas técnicas imunológicas e proteômicas a fim de identificar as isoformas de VDAC e quantificar os seus níveis de expressão e a proporção de hexoquinase ligada aos sítios tipo A e B em mitocôndrias isoladas de tecido cerebral de ratos, bois e aves.

Cerqueira César e Wilson (2002) encontraram que a proporção de hexoquinase ligada aos sítios Tipo A: Tipo B foi de 90:10 em cérebros de rato e 40:60 em cérebros boi, o quais corroboram os dados encontrados nesse trabalho. O cérebro aviar, nesse estudo, apresentou-se com a mesma proporção encontrada no cérebro bovino, ou seja, 40% da hexoquinase ligada ao sítio tipo A e 60% ligada ao sítio tipo B. Um dado interessante por tratar-se de animais filogeneticamente diferentes.

Azoulay-Zohar e Aflalo (1999) relataram que a hexoquinase liga-se à mitocôndria através de um pequeno peptídeo N-terminal hidrofóbico, o qual também é responsável pela ligação da Glc-6-P à hexoquinase e liberação da mesma da membrana mitocondrial.

Redkar e Kenkare (1972) sugeriram que mudanças conformacionais na hexoquinase podem estar relacionadas a mudanças na reatividade de resíduos sulfídricos. Mais recentemente, Skaff et al. (2005) reportaram que, quando a mitocôndria é submetida ao tratamento com Glc-6-P, a hexoquinase deixa a membrana mitocondrial devido a um aumento de energia livre provocado por

mudanças conformacionais na passagem do estado ligado a mitocôndria para o estado livre em solução.

No cérebro, cerca de 80% da atividade da hexoquinase está associada à mitocôndria (CRANE; SOLS, 1954). Em uma variedade de situações, foi observado que a taxa de glicólise depende do nível de hexoquinase ligada mitocondrialmente (ARORA; PEDERSEN, 1988).

Hutny e Wilson (2000) observaram que quanto maior a proporção de hexoquinase ligada ao sítio B na mitocôndria maior a resistência à solubilização da mesma com Triton X-100, Triton X-114 e digitonina. Mais tarde, Golestani et al. (2007) observaram que é possível apenas religar a hexoquinase desligada do sítio A. O sítio B é intrinsecamente incapaz de permitir que uma vez a hexoquinase liberada seja religada. O fato de não se realizar a re-ligação no sítio B suportaria a proposição que somente o sítio A é importante fisiologicamente na relação liberação-religação da enzima demonstrada acontecer em resposta à necessidade energética do cérebro. Ainda, os autores sugerem que o sítio B deva agir como reservatório de hexoquinase, liberando a enzima para o sítio A sob uma alta demanda energética da célula. Dessa maneira, pode-se supor que as aves e bois possuam um metabolismo cerebral mais baixo, no que diz respeito à hexoquinase ligada ao sítio tipo A, quando comparados aos ratos.

Sabe-se que um total superior a cinqüenta proteínas possivelmente interajam com a VDAC além da hexoquinase (ROMAN et al., 2006a). Dentre essas, estão inclusos a creatina quinase 3 (SCHLATTNER et al., 2001), citocromo c (MANELLA, 1998), receptor de benzodiazepina (MCENERY, 1992), translocador de nucleotídeo de adenina (VYSSOKIKH; BRDICZKA, 2003) e actina (ROMAN et al., 2006b). Durante a ação da hexoquinase há consumo de ATP na fosforilação da glicose, a hexoquinase-I ligada a VDAC permite o acesso preferencial ao ATP intramitocondrial (CERQUEIRA CÉSAR; WILSON, 1998).

A VDAC além de suas funções como proteína canal também é responsável por liberar o citocromo c durante a condição apoptótica, como exemplo, as proteínas pró-apoptóticas Bax e tBid quando ligam-se à ela aumentam o tamanho do seu poro e permitem a passagem de proteínas apoptogênicas (BANERJEE; GHOSH, 2004; 2006). A regulação desse canal tem uma função significativa no controle da morte celular.

A interação HXK I-VDAC1 tem uma função chave na prevenção da apoptose através do fechamento do canal e inibição da liberação do citocromo *c* (ABU-HAMAD et al., 2008; AZOULAY-ZOHAR et al., 2004; DA-SILVA et al., 2004). Machida et al. (2006) e Pastorino et al. (2002) observaram que a hexoquinase II também liga-se mitocondrialmente e possui efeito supressor da apoptose.

Apesar de aumentar as evidências sugerindo que a mitocôndria exerça um papel chave na apoptose, inclusive que a proteína VDAC tem uma importante função nesse processo, pouco é conhecido sobre os mecanismos de interação HXK-VDAC na involução desse processo de morte celular. Os níveis de hexoquinase ligada mitocondrialmente em células tumorais altamente glicolíticas excedem exacerbadamente aqueles de tecido normais (ARORA; PEDERSEN, 1988).

Nesse estudo, foram utilizadas três técnicas supracitadas a fim de obter dados bastante característicos da expressão das isoformas de VDAC na mitocôndria de tecido cerebral de aves, ratos e bois.

As análises de proteínas levaram à identificação dos spots de VDAC1 e VDAC2. A isoforma VDAC3 não foi encontrada nesse estudo. A VDAC1 e VDAC2 possuem funções mais importantes na determinação da permeabilidade da membrana mitocondrial externa do que a VDAC3 (XU et al., 1999). A atividade, em extratos cerebrais, da hexoquinase tipo I ligada mitocondrialmente não é alterada na ausência de VDAC3 (SAMPSON et al., 2001).

A VDAC3 também não foi encontrada em amostras de cérebro do trabalho de Liberatori et al. (2004) e Yoo et al. (2001). Esses dados sugerem que a VDAC3 é expressa em níveis muito baixos ou não é expressa em células neuronais.

Os resultados demonstraram que a VDAC 1 foi a isoforma mais expressa das três, os quais concordam com os descritos na literatura indicando que a VDAC 1 é a isoforma predominante (YAMAMOTO et al., 2006). A VDAC1 foi a mais expressa em mitocôndrias de cérebros de ave do que em cérebros de boi, sendo os valores para cérebros bovinos intermediários, porém maiores que os encontrados para cérebro de ratos. Em adição, a expressão VDAC1 mais VDAC2 foi muito maior em mitocôndrias de cérebros de aves e bois do que em cérebros de ratos. Isto é, um aumento na resistência a liberação da hexoquinase pela Glicose-6-fosfato pode estar correlacionada com aumento nos níveis de VDAC1 mais VDAC2.

Interessantemente, cérebros de ave têm um nível muito menor de VDAC2 do que em cérebros de boi. A VDAC2 tem uma função essencial na supressão da apoptose mitocondrial por inibir a ativação de BAK (CHENG et al., 2003).

Cerqueira César e Wilson (2004) detectaram uma maior predominância do RNAm para VDAC2 em cérebro de rato, boi e coelho. Sendo que os RNAm de VDAC1 e VDAC2 foram mais expressos em cérebros bovinos do que em cérebros de murino.

A separação das proteínas mitocondriais dos tecidos cerebrais das espécies estudadas apresentou um total aproximado de 703, 498 e 744 spots para mitocôndrias de cérebro de ave, bovino e murino, respectivamente, resultados esses que corroboram os dados de outros estudos de mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos/organismos (FUKADA et al., 2004; WITZMANN et al., 2005). Aproximadamente 300-500 proteínas foram detectadas em gel 2DE corado com coomassie blue coloidal de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Já em géis corados com prata foi possível a detecção de 1500 spots de proteínas, sendo que 819 proteínas desempenham funções relacionadas com o cálcio (LOPEZ et al., 2000).

As análises de western blotting evidenciaram que a VDAC1 aparecia dividida em dois spots nos géis 2-DE de mitocôndrias cerebrais de ratos e bois e em três spots para os de aves. A VDAC2 foi separada em cinco spots para as três espécies estudadas. As análises de MALDI-TOF confirmaram os spots reconhecidos pelo anticorpo anti-VDAC1 como sendo a proteína VDAC1 e para VDAC2 foram confirmados três spots para ratos, dois para aves e cinco para bois.

É difícil encontrar anticorpos específicos para cada isoforma de VDAC, pois elas possuem aproximadamente 70% de identidade em termos de seqüência de aminoácidos. Yamamoto e colaboradores (2006) produziram um anticorpo específico contra cada isoforma de VDAC individual e observaram que apenas o anticorpo anti-VDAC1 não apresentou reação cruzada com as outras isoformas.

No presente trabalho, foi utilizado um anticorpo bem-caracterizado contra VDAC1 o qual foi primeiramente testado por Thinnes e colaboradores, e é comercialmente viável pela Calbiochem (BABEL et al., 1991). Já para VDAC2 foi utilizado um anticorpo comercializado pela Abcam, o qual é preparado através de um peptídeo sintético correspondente a uma seqüência interna de 120-132 aminoácidos da VDAC2 humana como imunogênica. Entretanto, esse último

anticorpo, demonstrou reatividade cruzada com a VDAC1 em mitocôndrias cerebrais de aves e ratos. Daí pode-se concluir que há uma grande dificuldade na preparação de anticorpos específicos para as diferentes isoformas de VDAC devido à similaridade estrutural que existe entre elas.

Estudos realizados com cDNA que codificam a porina humana mostraram que o gene para VDAC 2 deve gerar pelo menos duas isoformas diferentes, com massas previstas de 32 e 36 kDa (HA et al., 1993). De Pinto et al. (1987) usando um método de purificação simples para porina mitocondrial observaram uma mobilidade eletroforética para porinas isoladas do coração, cérebro, fígado e rim de ratos correspondente a uma massa molecular de 35,5 kDa. No presente estudo, os valores de peso molecular para VDAC foram de 29.534 ± 626 Da.

Estudos recentes também identificaram em gel 2-DE que a proteína VDAC se divide em múltiplos spots, cada um com um pI diferente (LIBERATORI et al., 2004; REYMANN et al., 1999; YAMAMOTO et AL., 2006).

Yoo et al. (2001) reportaram a presença de três formas de VDAC1 com pontos isoelétricos diferentes em tecido cerebral *post-mortem* de pacientes com síndrome de Down e doença de Alzheimer. Da mesma forma, Liberatori et al. (2004) identificaram heterogeneidade de carga da VDAC1 (2 spots) e VDAC2 (3 spots) em sinaptossomos cerebrais de suínos. Ambas as isoformas continham tirosinas fosforiladas sob condições de hipóxia. De fato, mudanças no ponto isoelétrico de uma proteína são explicadas por modificações pós-traducionais ou por ligação de fosfolipídios à proteína (BERVEN et al., 2003).

Os resíduos fosforiláveis da VDAC são a Ser-136 e Ser-12 em VDAC1, sendo o primeiro um sitio consenso CAMKII/GSK3 e o segundo um sitio consenso PKC. Em VDAC2, identificou-se como fosforilável a Tyr-237 (DISTLER; KERNER, 2007).

Em todas as isoformas de VDAC, os resíduos de aminoácidos fosforiláveis são acessíveis para modificações das proteínas quinases e fosfatases localizadas no citosol e espaço intermembranas (DISTLER; KERNER, 2007) e poderia explicar as diferentes funções nas isoformas de VDAC no metabolismo.

Pastorino e Hoek (2005) identificaram que o resíduo fosforilável da VDAC1, treonina 51, quando fosforilado, resulta no desligamento da hexoquinase II. Nessa situação, a proteína pró-apoptótica Bax ganha acesso direto a VDAC (PASTORINO et al., 2002). Alternativamente, se a hexoquinase desligada permitir a ligação da

proteína Bcl-x_L à VDAC, isso prevenirá a ligação de Bax, deixando-a livre para interagir com Bak e formar uma estrutura de poro na membrana externa capaz de promover a liberação do citocromo *c* e outras proteínas apoptogênicas (PASTORINO, HOEK; 2008). Esse modelo corrobora os descobertos de que a super-expressão da VDAC1 induz apoptose independente do tipo celular (ABU-HAMAD et al., 2006). Bcl-x_L ligada à mitocôndria promove a configuração aberta da VDAC restaurando a troca de metabólitos através da membrana externa, sem induzir a liberação do citocromo *c* do espaço intermembranas (VANDER HEIDEN et al., 2001).

O aumento da VDAC1 e a diminuição da VDAC2 foi descrito em epilepsia fármaco-resistente, resultando na diminuição da produção e translocação de ATP (JIANG et al., 2007). Em cérebros, o ATP está envolvido em muitos processos fisiológicos, como manutenção das bombas celulares de íon, regulação da permeabilidade da membrana celular, biossíntese de neurotransmissores e proteínas, e excitose (HERRINGTON et al., 1996). Em células neuronais, a super-expressão da VDAC1 aumentou em três vezes a liberação do citocromo *c* (GHOSH et al., 2007). Entretanto, a super-expressão da VDAC1 não é somente relatada na apoptose de células neuronais, mas também em células cancerosas nas quais a super-expressão da VDAC1, aumentou a produção de H₂O₂ e a apoptose (SIMAMURA et al., 2006).

Dada a função da VDAC na produção de energia através do controle do tráfico de metabólito, é notável que uma diminuição na produção de energia observada pela inibição da expressão da VDAC 1 em células, é responsável pela inibição do seu crescimento, refletindo na forte relação entre nível de ATP e crescimento celular (ABU-HAMAD et al., 2006)

Lam et al. (2005) reportaram que o aumento moderado dos níveis de glicose hipotalâmica é suficiente para reduzir os níveis de glicose no sangue através da inibição da produção de glicose no fígado. A energia é transferida para o cérebro pela oxidação da glicose do sangue (MAGISTRETTI; PELLERIN, 1999).

A glicose no sangue ganha acesso ao Sistema Nervoso Central (SNC) devido ao um sistema de transporte facilitado (MAHER et al., 1994), e de fato, a concentração de glicose no cérebro é significativamente menor (~2 mM) do que sua concentração no sangue (~5 mM). Em nosso estudo, ave com níveis de glicose plasmática maior, em torno de 11-25 mM, demonstrou os maiores índices de

expressão da isoforma VDAC1 e os menores da VDAC2 e a mesma proporção de sítio de ligação da hexoquinase tipo A: tipo B encontrado em bovinos, os quais possuem níveis de glicose sanguínea muito inferior (3.19 ± 0.38 mM). Já os ratos com níveis intermediários de glicose em torno de 4.07 ± 1.01 mM, apresentaram os valores mais inferiores da expressão VDAC1+VDAC2.

Com base em nossos resultados, podemos inferir que as aves, as quais possuem concentração elevada de glicose sanguínea necessitam de uma via glicolítica mais ativa, e expressam 88% mais VDAC1 do que VDAC2 no tecido cerebral. Já nos animais que possuem concentrações inferiores de glicose plasmática, no caso bovinos e ratos, há uma expressão praticamente equitativa de ambas as isoformas da VDAC (1,29 para ratos e 1,24 para bois) revelando uma maior expressão da VDAC 2 quando comparada com a aves.

Com os resultados aqui apresentados surgiram novos questionamentos a respeito das VDACs: 1) Se o sítio tipo A é fisiologicamente o mais importante, a ave, que possui uma concentração maior de glicose sanguínea, também possui alta expressão da VDAC1 se comparada com a VDAC2, poderia ser a VDAC1 o sítio tipo A de ligação da hexoquinase? 2) Quais são as implicações para o metabolismo de glicose e susceptibilidade a apoptose em cérebros de ave que possuem a maior expressão de VDAC1 e os menores níveis de VDAC2 entre as três espécies estudadas? 3) Seriam essas células mais susceptíveis a apoptose? 4) Expressões diferenciais da VDAC1 e VDAC2 em cérebros de diferentes espécies implicariam na existência de diferentes mecanismos de morte celular neuronal?

VIII. CONCLUSÕES

1. A proporção de hexoquinase ligada ao sítio tipo A: tipo B em mitocôndrias de células neurais de ratos, bois e aves é de 90:10, 40:60 e 40:60, respectivamente;
2. A proteína VDAC se divide em múltiplos spots em gel de eletroforese bi-dimensional de mitocôndrias cerebrais demonstrando, aproximadamente, o mesmo peso molecular de 30 kDa, mas diferentes valores de ponto isoelétrico;
3. As isoformas VDAC1 e VDAC2 estão presentes em mitocôndrias de células neurais de ratos, bois e aves;
4. A isoforma VDAC3 é expressa em níveis muito baixos ou não é expressa em mitocôndrias isoladas de células neurais de aves, ratos e bois;
5. A VDAC 1 é a isoforma predominante nas mitocôndrias cerebrais das três espécies analisadas;
6. A maior expressão cerebral da VDAC1 foi detectada em aves, apresentando seu mais baixo nível de expressão em ratos e valor intermediário para bois;
7. A VDAC 2 apresentou uma menor expressão em mitocôndrias cerebrais de aves, com valores medianos para cérebro de ratos e maior expressão para cérebro de bois;
8. A expressão VDAC1 mais VDAC2 foi muito maior em cérebros de aves e bois do que em cérebros de ratos;
9. A espécie aviar, a qual possui maior concentração de glicose sanguínea, expressa 7 vezes mais VDAC 1 do que VDAC 2 no tecido cerebral;
10. Não foi possível correlacionar à predominância de determinada isoforma de VDAC (1, 2 ou 3) com a variação da proporção dos sítios de ligação da hexoquinase (tipo A e tipo B) na mitocôndria de células neurais de espécies metabolicamente diferentes, sendo necessários estudos mais detalhados para se obter resultados mais claros e precisos.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-HAMAD, S.; SIVAN, S.; SHOSHAN-BARMATZ, V. The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. **Cell Biology**, New York, v.103, p.5787-5792, 2006.

ABU-HAMAD, S. et al. Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.283, p.13482-13490, 2008.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein-family: arbiters of cell survival. **Science**, Washington, v.281, p.1322-1326, 1998.

ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S.B. An energy budget for signalling in the grey matter of the brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, Hagerstown, v.21, p.1133-1145, 2001.

ARORA, K.K.; PEDERSEN, P.L. Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.263, p. 17422-17428, 1988.

AZOULAY-ZOHAR, H.; AFLALO, C. Binding of rat brain hexokinase to recombinant yeast mitochondria: identification of necessary molecular determinants. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v.31, p.569-579, 1999.

AZOULAY-ZOHAR, H. et al. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. **Biochemical Journal**, Great Britain, v.377, p.347-355, 2004.

BABEL, D. et al. Studies on human porin. VI. production and characterization of eight monoclonal mouse antibodies against the human VDAC "Porin 31HL" and their application for histotopological studies in human skeletal muscle. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, Berlin, v.372, p.1027-1034, 1991.

BANERJEE, J.; GHOSH, S. Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.323, p.310-314, 2004.

BANERJEE, J.; GHOSH, S. Phosphorylation of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion as a potential tool to control leakage of cytochrome c. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v.98, p.670–676, 2006.

BENZ, R. et al. Inhibition of adenine nucleotide transport through the mitochondrial porin by a synthetic polyanion. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.231, p.75-80, 1988.

BERNARDI, P. et al. Mitochondria and cell death. Review Article. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.264, p.687-701, 1999.

BERNARDI, P. et al. A mitochondrial perspective on cell death. Review. **TRENDS in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.26, p.112-117, 2001.

BERVEN, F.S. et al. Multiple polypeptide forms observed in two-dimensional gels of *Methylococcus capsulatus* (Bath) polypeptides are generated during the separation procedure. **Electrophoresis**, Weinheim, v.24, p.757-61, 2003.

BLACHLY-DYSON, E.B.; Alteration of the selectivity of the VDAC ion channel by site-directed mutagenesis: Implications for the structure of a membrane ion channel. **Science**, Washington, v.247, p.1233-1236, 1990.

BLACHLY-DYSON, E.B. et al. Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.268, p.1835-1841, 1993.

CERQUEIRA CÉSAR, M.; WILSON, J.E. Further studies on the coupling of mitochondrially bound hexokinase to intramitochondrially compartmented ATP, generated by oxidative phosphorylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.350, p.109-117, 1998.

CERQUEIRA CÉSAR, M.; WILSON, J.E. Functional characteristics of hexokinase bound to the type A and type B site of bovine brain mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.397, p.106-112, 2002.

CERQUEIRA CÉSAR, M.; WILSON, J.E. All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.422, p.191-196, 2004.

CHENG, E.H.Y. et al. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. **Science**, Washington, v.301, p.513-517, 2003.

CHOU, A.C.; WILSON, J.E. Purification and properties of rat brain hexokinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.151, p.48-55, 1972.

COLOMBINI, M. VDAC: The channel at the interface between mitochondria and the cytosol. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v.256/257, p.107–115, 2004.

CRANE, R.K.; SOLS, A. The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate and related compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, p.597-606, 1954.

CROMPTON, M.; VIRJI, S.; WARD, J.M. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.258, p.729-735, 1998.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochemical Journal**, Great Britain, v.341, p.233-249, 1999.

CRUZ, S. et al. Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, p.41566-41571, 2003.

DA-SILVA, W.S. et al. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.279, p.39846-39855, 2004.

DE PINTO, V.; PREZIOSO, G.; PALMIERI, F. A simple and rapid method for the purification of the mitochondrial porin from mammalian tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.905, p.499-502, 1987.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Cell Biology**, New York, v.10, p.369-377, 2000.

DISTLER, A.M.; KERNER, J.; HOPPEL, C.L. Post-translational modifications of rat liver mitochondrial outer membrane proteins identified by mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1774, p.628–636, 2007.

FELGNER, P.L.; MESSER, J.L.; WILSON, J.E. Purification of a hexokinase binding protein from the outer mitochondrial membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.254, p.4946-4949, 1979.

FUKADA, K. et al. Mitochondrial proteomic analysis of a cell line model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Molecular and cellular Proteomics**, Stanford, v.3.12, p.1211-1223, 2004.

GINCEL, D.; SILBERBERG, S.D.; SHOSHAN-BARMATZ, V. Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by glutamate. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v.32, p.571-583, 2000.

GINCEL, D.; ZAID, H.; SHOSHAN-BARMATZ, V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. **Biochemical Journal**, Great Britain, v.358, p.147-155, 2001.

GHOSH, T.; PANDEY, N.; MAITRA, A.; BRAHMACHARI, S.K.; PILLAI, B. A role for voltage-dependent anion channel VDAC1 in polyglutamine-mediated neuronal cell death. **Plos One**, San Francisco, v. 2, p.1-10, 2007.

GOTTLIEB, R.A. Minireview: mitochondria: execution central. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.482, p.6-12, 2000.

GOLESTANI, A.; RAMSHINI, H.; NEMAT-GORGANI, M. A study on the two binding sites of hexokinase on brain mitochondria. **BMC Biochemistry**, London, v.8, p.1-6, 2007.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, Washington, v.281, p.1309-1312, 1998.

GROSSBARD, L.; SCHIMKE, R.T. Multiple hexokinases of rat tissues: purification and comparison of soluble forms. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.241, p.3546-3560, 1966.

HA, H. et al. A Mitochondrial porin cDNA predicts the existence of multiple human porins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.268, p.12143-12149, 1993.

HALESTRAP, A.P. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. **Biochemical Society Symposia**, London, v.66, p. 181–203, 1999.

HERRINGTON, J. et al. Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+} loads from rat adrenal chromaffin cells. **Neuron**, Cambridge, v.16, p. 219-228, 1996.

HODGE, T.; COLOMBINI, M. Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. **Journal of Membrane Biology**, New York, v.157, p.271-279, 1997.

HUTNY, J.; WILSON, J.E. Further studies on the role of phospholipids in determining the characteristics of mitochondrial binding sites for type I hexokinase. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.47, p.1045-1060, 2000.

JIANG, W. et al. Preliminary explorations of the role of mitochondrial proteins in refractory epilepsy: some findings from comparative proteomics. **Journal of Neuroscience Research**, New York, v. 85, p.3160-31701, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999.

KABIR, F.; WILSON, J.E. Mitochondrial hexokinase in brain of various species: differences in sensitivity to solubilization by glucose 6-phosphate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.300, p.641-650, 1993.

KATZEN, H.M.; SCHIMKE, R.T. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington v.54, p.1218-1225, 1965.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunology Today**, Cambridge, v.18, p.44-51, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LAM, T.K.T. et al. Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. **Science**, Washington, v.309, p.943-947, 2005.

LEE, A. et al. The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. **Journal of Membrane of Biology**, New York, v.161, p.173-181, 1998.

LENHINGER, A.B.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 2.ed. New York: Worth Publishers, 1994.

LIBERATORI, S. et al. Proteomic approach to the identification of voltage-dependent anion channel protein isoforms in guinea pig brain synaptosomes. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.1335-1340, 2004.

LOPEZ, M.F. et al. High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. **Electrophoresis**, Weinheim, v.21, p.3427-3440, 2000.

MACHIDA, K.; OHTA, Y.; OSADA, H. Suppression of apoptosis by cyclophilin D via stabilization of hexokinase II mitochondrial binding in cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.281, p.14314-14320, 2006.

MAGISTRETTI, P.J.; PELLERIN, L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v.354, p.1155-1163, 1999.

MANELLA, C.A. Minireview: On the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v.9, p.525-531, 1997.

MANNELLA, C. A. Conformational changes in the mitochondria channel protein, VDAC, and their functional implications. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v.121, p.207-218, 1998.

MAHER, F.; VANNUCCI, S.J.; SIMPSON, J.A. Glucose transporter protein in brain. **FASEB Journal**, Bethesda, v.8, p.1003-1011, 1994.

MATHUPALA, S.P.; REMPEL, A.; PEDERSEN, P.L. Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: A remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v.29, p.339-343, 1997.

MCENERY, M.W. The mitochondrial benzodiazepine receptor: Evidence for association with the voltage-dependent anion channel (VDAC). **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. New York, v. 24, p.63-69, 1992.

NAKASHIMA, R.A. et al. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. **Biochemistry**, Easton, v.25, p.1015-1021, 1986.

PARONE, P.A.; JAMES. D.; MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, Paris, v.84, p.105-111, 2002.

PASTORINO, J.G.; SHULGA, N.; HOEK, J.B. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.277, p.7610-7618, 2002.

PASTORINO, J.G.; HOEK, J.B. Hexokinase II: The integration of energy metabolism and control of apoptosis. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.10, p.1535-1551, 2003.

PASTORINO, J.G.; HOEK, J.B.; SHULGA, N. Activation of glycogen synthase kinase 3B disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. **Cancer Research**, Baltimore, v.65, p.10545-10554, 2005.

PASTORINO, J.G.; J. B. HOEK, Regulation of hexokinase binding to VDAC. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v.40, p.171-182, 2008.

QUTUB, A.A.; HUNT, C.A. Glucose transport to the brain: A systems model. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v.49, p.595-617, 2005.

REDKAR, V.D.; KENKARE, U.W. Bovine brain mitochondrial hexokinase: solubilization, purification and role of sulfhydryl residues. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 47, p.7576-7584, 1972.

REYMANN, S. et al. Purification procedure and monoclonal antibodies: two instruments for research on vertebrate porins. **Analytical Biochemistry**, New York, v.274, p.289-295, 1999.

ROMAN, I. et al. Hunting interactomes of a membrane protein. **Molecular and Cellular Proteomics**, Stanford, v.5, p.1667-1680, 2006a.

ROMAN, I. et al. Direct measurement of VDAC – actin interaction by surface plasmon resonance. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, Amsterdam, v.1758, p.479-486, 2006b.

ROSTOVTSEVA, T.K.; COLOMBINI, M. ATP Flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, p.28006-28008, 1996.

ROSTOVTSEVA, T.K. et al. Voltage gating of VDAC is regulated by nonlamellar lipids of mitochondrial membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, p.37496-37506, 2006.

RUSTUM, Y.M.; MASSARO, E.J.; BARNARD, E.A. Yeast hexokinase, subunit structure and hybridization of isoenzymes. **Biochemistry**, Easton, v.10, p.3509-3516, 1971.

SAMPSON, M.J.; LOVELL, R.S.; CRAIGEN, W.J. Isolation, characterization and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. **Genomics**, San Diego, v.33, p.277-284, 1996.

SAMPSON, M.J. et al. A novel isoform of the mitochondrial outer membrane protein VDAC 3 via alternative splicing of a 3-base exon. Functional characteristics and subcellular localization. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, p.30482-30486, 1998.

SAMPSON, M.J. et al. Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.276, p.39206-39212, 2001.

SAS INSTITUTE INC. **Statistical Analysis Software**. Version 8. Cary, 2000. 1 CD-ROM.

SCHLATTNER, U. et al. Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.276, p.48027-48030, 2001.

SHIMIZU, S., NARITA, M., TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, London, v.399, p.483-487, 1999.

SHINOHARA, Y. et al. Characterization of porin isoforms expressed in tumor cells. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.267, p.6067-6073, 2000.

SHOSHAN-BARMATZ, V.; GINCEL, D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Totowa, v.39, p.279-292, 2003.

SHOSHAN-BARMATZ, V. et al. Subcellular localization of VDAC in mitochondria and ER in the cerebellum. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1657, p.105-114, 2004.

SIMAMURA, E. et al. Furanonaphthoquinones cause apoptosis of cancer cells by inducing the production of reactive oxygen species by the mitochondrial voltage-dependent anion channel. **Cancer Biology & Therapy**, Georgetown, v.5, p.1523-1529, 2006.

SKAFF, D.A. et al. Glucose-6-phosphate release of wild-type and mutant human brain hexokinases from mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, p. 38403–38409, 2005.

SONG, J. et al. The topology of VDAC as probed by biotin modification. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, p.24406-24413, 1998.

SUI, D.; WILSON, J.E. Structural determinants for the intracellular localization of the isozymes of mammalian hexokinase: intracellular localization of fusion constructs incorporating structural elements from the hexokinase isozymes and the green fluorescent protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.345, p.111-125, 1997.

TOWBIN, H.; STAHELINT, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.

THOMAS, L. et al. Mapping of residues forming the voltage sensor of the VDAC ion channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.90, p.5446-5449, 1993.

TRAVIS, A.J. et al. A novel NH₂-terminal, nonhydrophobic motif targets a male germ cell-specific hexokinase to the endoplasmic reticulum and plasma membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, p.34467– 34475, 1999.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Bcl-2 family: life-or-death switch. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.466, p.6-10, 2000.

VANDER HEIDEN, M.G. et al. Bcl-X_L Promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrana. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.276, p.19414-19419, 2001.

VYSSOKIKH, M. Y.; BRDICZKA, D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.50, p.389-404, 2003.

XU, X. et al. Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. **Journal of Membrane Biology**, New York, v.170, p.89-102, 1999.

WEEBER, E.J. et al. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.277, p.18891-18897, 2002.

WILSON, J.E. Brain hexokinase, the prototype ambiquitous enzyme. **Current topics in cellular regulation**, New York, v.16, p.1-54, 1980.

WILSON, J.E. Hexokinases. **Reviews of Physiology, biochemistry and pharmacology**. Heidelberg, v.126, p.65-198, 1995.

WILSON, J.E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.206, p.2049-2057, 2003.

WITZMANN, F.A. et al. A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. **Proteomics**, Weinheim, v.5, p.2177-2201, 2005.

WU, S. et al. Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: Effects on cellular respiration. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1452, p.68-78, 1999.

YAMAMOTO, T. et al. VDAC1, Having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-Polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. **Journal of Proteome Research**, Washington, v.5, p. 3336-3344, 2006

YOO, B.C. et al. Changes of voltage-dependent anion-selective channel proteins VDAC1 and VDAC2 brain levels in patients with Alzheimer's disease and Down Syndrome. **Electrophoresis**, Weinheim, v.22, p.172-179, 2001.