

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
CÉSAR HENRIQUE YOKOMIZO

**ESTUDO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS
ORGANOTELÚRICOS (IV) RT07 SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

Mogi das Cruzes, SP
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
CÉSAR HENRIQUE YOKOMIZO

**ESTUDO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS
ORGANOTELÚRICOS (IV) RT07 SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

Dissertação apresentada ao curso de Biotecnologia da
Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre em Biotecnologia

Prof^a. Orientadora : Dr^a. Iseli Lourenço Nantes

Mogi das Cruzes, SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Yokomizo, César Henrique

Estudo da ação dos compostos organotelúricos (IV)
RT-07 sobre a bioenergética mitocondrial / César
Henrique Yokomizo – 2009.

57 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2009

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Profª Drª Iseli Lourenço Nantes

1. Mitocondria 2. Organotelúricos 3. Transição de
permeabilidade mitocondrial I. Nantes, Iseli Lourenço

CDD 660.6

ATAS
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

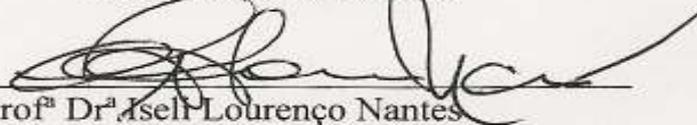
Às catorze horas do dia dezoito de dezembro de dois mil e nove, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Estudo da ação de compostos organotelúricos (IV) RT-07 sobre a bioenergética mitocondrial" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **César Henrique Yokomizo**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 49 (quarenta e nove), a saber: 25 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Iseli Lourenço Nantes, Regina Lucia Batista da Costa de Oliveira da Universidade de Mogi das Cruzes e Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira da Universidade Federal de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o candidato. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

A P R O V A D O por **U N A N I M I D A D E**
 (aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 18 de dezembro de 2009

Comissão Examinadora

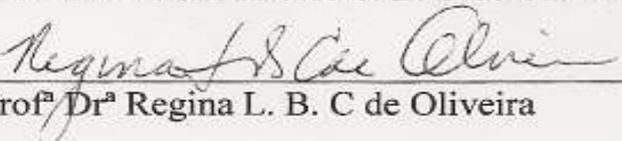
Julgamento


 Prof.ª Dr.ª Iseli Lourenço Nantes

A P R O V A D O
 (aprovado(a)/reprovado(a))


 Prof. Dr. Vitor Marcelo S. B. B de Oliveira

A P R O V A D O
 (aprovado(a)/reprovado(a))


 Prof.ª Dr.ª Regina L. B. C de Oliveira

aprovado
 (aprovado(a)/reprovado(a))

DEDICATÓRIAS

A minha mãe, Alice, e a meu pai, Toshiharu, por terem me dado a vida, o amor incondicional e a confiança para trilhar meu caminho com dignidade e integridade.

As minhas irmãs, minhas sobrinhas e sobrinhos.

A todos os amigos que passaram pela minha vida e me ensinaram a ter respeito, afeto, paciência e compreensão com o próximo.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Iseli Lourenço Nantes, pela confiança no meu trabalho e na minha capacidade, declaro minha admiração pelo seu imenso conhecimento e humildade.

Ao amigo, Felipe Samuel Pessoto, pela paciência, confiança e profissionalismo que foram imprescindíveis para realização do trabalho, agradeço de coração.

A amiga Priscila Afonso de Faria, a qual tenho grande admiração e respeito.

Ao Prof^º. Dr^º. Rodrigo L.O.R. Cunha, pelos compostos fornecidos para a realização deste trabalho.

Aos professores do Centro Interdisciplinar de Investigação Biquímica (CIIB), em especial aos professores doutores Ivarne L.S. Tersariol, Tiago Rodrigues e Antonio C.F. Caires.

A todos os amigos do CIIB : Roberto, Daniel, Cintia, Tatinha, Carolina, Juliana Mafra, Juliana Conrado, Juliana Casares, Vitor, Fabricio, Mariane, Érica, Keila, Natália, Joyce, Zaiane e Mayara.

Às instituições : Capes, Fapesp, Cnpq e FAEP-UMC pelo auxílio financeiro.

**"When the doors of
perception are cleansed,
things will appear to man as
they truly are...infinite."**

(William Blake)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos analisar a ação de compostos organotelúricos (IV) RT-07 sobre a bioenergética mitocondrial, focando na sua ação sobre o poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial, os resultados também serviram para comparação com outras teluranas, RT-03 e RT-04, que já haviam sido estudadas no nosso laboratório. Nos testes isolou-se mitocôndrias de fígado de ratos Wistar, para verificarmos a ação das teluranas RT-07 sobre a oxidação de grupos SH de proteínas, a alteração em potencial de membrana, o inchamento osmótico mitocondrial, consumo de oxigênio, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), oxidação de lipídios mitocondriais e alterações na fluidez de membranas. Os compostos foram capazes de oxidar grupos SH, causar o inchamento mitocondrial, a perda do potencial de membrana, e por consequência a abertura do PTP, porém, em comparação com RT-03 e RT-04 não apresentou atividade antioxidante para lipídios, provavelmente devido a diferenças entre suas estruturas, e a abertura do poro causada pelas teluranas RT-07 é regulada por CsA e dependente de Ca^{2+} .

Palavras-chave: mitocôndria, organotelúricos e transição de permeabilidade mitocondrial.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the action of organotelluranes (IV) RT-07 on mitochondrial bioenergetics, focusing on its action on the pore permeability transition (PTP) mitochondrial results also served for comparison with other telluranes, RT-03 and RT-04, which had already been studied in our laboratory. In tests isolated liver mitochondria of rats to verify the action of telluranes RT-07 on the oxidation of SH groups of proteins, change in membrane potential, the osmotic swelling of mitochondria oxygen consumption, generation of reactive oxygen species (ROS), oxidation of lipids and changes in mitochondrial membrane fluidity. The compounds were able to oxidize SH groups cause swelling mitochondrial loss of membrane potential, and hence the opening of PTP, however, compared with RT-03 RT-04 and did not show antioxidant for lipids, probably due to differences between their structures, and the opening of the pore caused by telluranes RT-07 is regulated by CsA and dependent Ca^{2+} .

Key words: mitochondria, organotelluranes and mitochondrial permeability transition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1A-B.....	14
Esquema 1.....	15
Figura 2.....	18
Figura 3.....	19
Figura 4A-D.....	29
Figura 5A-B.....	30
Figura 5C-D.....	31
Figura 6A-B.....	33
Figura 6C-D.....	34
Figura 7A-B.....	35
Figura 7C-D.....	36
Figura 8.....	37
Figura 9.....	38
Figura 10.....	39
Figura 11.....	40
Figura 12.....	40
Figura 13.....	41
Figura 14 A-C.....	42
Figura 15A-D.....	44
Figura 16A-D.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina 5'-difosfato
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
ANT	Translocador de nucleotídios de adenina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Soro albumina bovina
CCCP	Carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona
CypD	Ciclofilina D
CsA	Ciclosporina A
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
GSH-px	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
mA	Miliamper

MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP ⁻	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NEM	<i>n</i> -etilamaleimida
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
•OH	radical hidroxil
OPT	Oftalaldeído
PAGE	Gel de poliacrilamida
PhAsO	Oxidofenilarsina
PTP	Poros de transição de permeabilidade
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SH	Grupos sulfidril
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -Butil hidroperóxido
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
u.a.f.	Unidades arbitrárias de fluorescência
VDAC	Canais de ânions voltagem-dependente
ΔΨ	Diferença de potencial elétrico de membrana

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
1.1.Mitocôndria.....	12
1.2. Transição de permeabilidade mitocondrial.....	13
1.3.Organotelúricos (Teluranas).....	17
2.OBJETIVOS.....	19
2.1.Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos	20
3.METÓDOS.....	21
3.1.Compostos organotelúricos (IV) RT-07.....	21
3.2.Manutenção manipulação e eutanásia de animais.....	21
3.3.Isolamento de mitocôndrias hepáticas.....	21
3.4.Dosagem de proteínas mitocondriais totais.....	22
3.5.Meio padrão para ensaio com mitocôndrias.....	22
3.6.Oxidação de grupo tiólicos de proteínas mitocondriais.....	23
3.7.Medida do inchamento mitocondrial.....	23
3.8.Determinação do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) da membrana mitocondrial.....	24
3.9.Quantificação da GSH mitocondrial.....	24
3.10.Análise da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio.....	25
3.11.Dosagem de produtos de oxidação de lipídios de membrana.....	25
3.12.Medida de alterações da fluidez da bicamada lipídica mitocondrial.....	26
3.13.Controle respiratório ou consumo de oxigênio mitocondrial.....	26
3.14.Análise Estatística.....	27

4.RESULTADOS.....	28
5.DISSCUSSÃO.....	47
6.CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO A.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. MITOCONDRIA

Nas células eucarióticas a principal organela responsável pela manutenção dos níveis intracelulares de ATP é a mitocondria. A hipótese mais aceita é de que esta organela tenha surgido de um processo de simbiose entre bactérias aeróbias e células eucarióticas primitivas que aconteceu há milhões de anos. Na mitocondria o processo de produção de ATP é chamado de fosforilação oxidativa (HATEFI, 1985). O processo começa com a oxidação de combustíveis biológicos, como glicose e ácidos graxos, com a transferência de elétrons para as coenzimas NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo), um processo catalisado por desidrogenases específicas. No estado reduzido (NADH e FADH_2), essas coenzimas irão transferir os elétrons para as desidrogenases dos sítios I e II da cadeia respiratória, respectivamente. Os complexos I e II transferem os elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando sua forma reduzida (UQH_2). UQH_2 por sua vez será desprotonada resultando na espécie aniônica semiquinona ($\text{UQH}\cdot$). A $\text{UQH}\cdot$ doa seus elétrons a ubiquinona-citocromo *c* oxirredutase (complexo III). Do complexo III os elétrons são transferidos para o citocromo *c*, uma proteína periférica da membrana que se comporta como um carreador móvel de elétrons do complexo III até a citocromo *c* oxidase (complexo IV). O complexo IV é o responsável pela transferência dos elétrons para o O_2 , o acceptor final de elétrons da cadeia respiratória (VOET *et al.*, 1998; NELSON *et al.*, 2002). O transporte de elétrons na cadeia respiratória até seu acceptor final que é o O_2 é um processo exergônico e a energia liberada é utilizada para gerar um potencial eletroquímico transmembrana capaz de ser utilizado pela FoF_1 -ATP sintase para fosforilar ADP à ATP.

1.2. TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

Com o surgimento dos organismos aeróbios, combustíveis oxidáveis como a glicose, puderam ser melhor aproveitados para a geração de energia, assim como outras biomoléculas, por exemplo, os lipídios (NELSON et al., 2002). Porém a utilização de oxigênio gerou um efeito colateral indesejado para as células que foi a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BECHARA et al., 1995). Estas espécies são geradas quando elétrons “escapam” da cadeia respiratória antes de chegar ao complexo IV e são transferidos para o O_2 . São sítios comuns para o escape de elétrons a coenzima Q e o complexo I, após o escape estes elétrons irão gerar o ânion superóxido O_2^- (TURRENS, 1997; KOWALTOWSKI *et. al.*, 1999). O ânion superóxido é dismutado a $H_2O_2 + O_2$ pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Na presença de Fe^{2+} , H_2O_2 é clivado em $OH^\bullet + OH^-$, sendo que o radical hidroxil (OH^\bullet) é o mais reativo encontrado em sistemas biológicos (BOVERIS et al., 1973; BUXTON et al., 1988). As espécies radicalares, ao lado das espécies excitadas (tripleto e O_2 singleto) (CILENTO *et. al.*, 1995) e de agentes químicos (FAGIAN et al., 1990; CUNHA et al., 2005) são capazes de atacar grupos tiolatos (SH) de proteínas da membrana mitocondrial interna e externa causando a oxidação destas proteínas. Devido a alta concentração de proteínas na membrana mitocondrial interna, EROs gerados pela mitocôndria, principalmente o OH^\bullet , podem facilmente oxidar estas proteínas, causando a formação de pontes dissulfeto (S-S) e também de sulfóxido de metionona. O Ca^{2+} facilita este processo pois, uma vez ligado as proteínas aumenta a susceptibilidade desta ao ataque oxidativo de EROs levando a um evento dependente de Ca^{2+} , conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial ou TPM (GUNTER et al., 1994; ZORATTI & SZABÒ, 1995).

A TPM é caracterizada pela permeabilização da membrana interna da mitocôndria. Esta fica permeável a pequenos íons e moléculas com massa molecular de até 1500 Da. A TPM é mediada pela abertura de poros inespecíficos (figura 1A e 1B) conhecidos como poro de transição de permeabilidade (PTP).

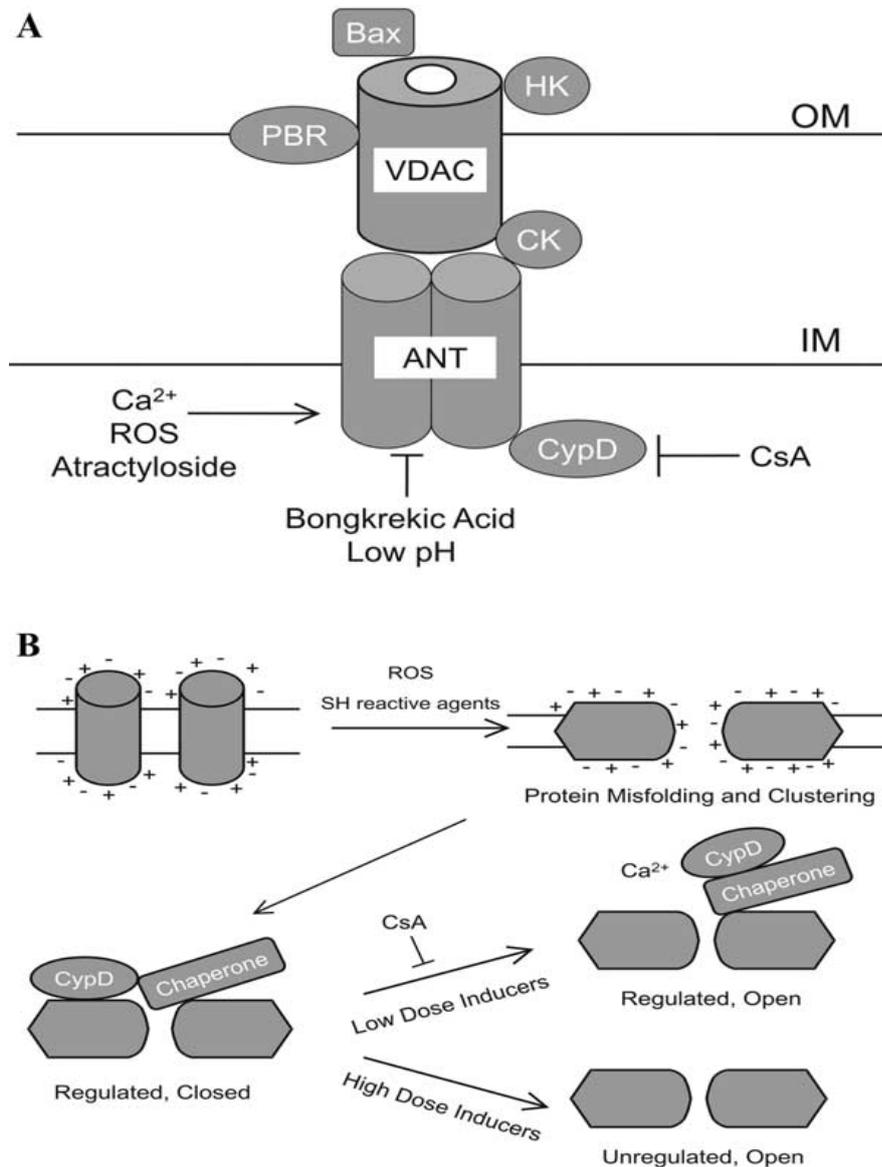


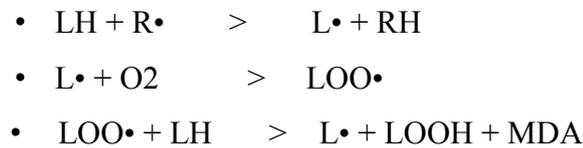
Figura 1A-B. Modelos de formação do poro de transição de permeabilidade (KIM *et. al.*, 2003).

O ataque oxidativo as proteínas que resulta na abertura do poro pode atingir também a fração lipídica da membrana.

O processo de lipoperoxidação tem início pela retirada de um átomo de hidrogênio de fosfolípídeos de membrana (LH) por um radical livre, tendo como resultado a formação do radical L^{\bullet} . O radical lipídico reage com O_2 formando o radical lipoperoxil LOO^{\bullet} , dando início a uma reação em cadeia (Esquema 1). A seqüência de reações geram diferentes subprodutos derivados de lipídeos, sendo os principais deles o malondialdeído (MDA) e peróxido de lipídio (LOOH). Os efeitos acima citados causados por EROs caracterizam o estresse oxidativo, que devido ao ataque às biomoléculas levam ao prejuízo de funções mitocondriais como a respiração e fosforilação oxidativa, aumentando de maneira descontrolado a produção

de espécies reativas de oxigênio levando à morte celular (LEMASTERS, 1998; KOWALTOWSKI, 1999).

Esquema 1. Geração de produtos de oxidação lipídica.



Entre os vários fatores celulares que podem gerar a abertura do PTP estão o estresse oxidativo, porém, como veremos adiante a abertura do PTP também pode ocorrer na ausência de EROs. A abertura de apenas um poro já é suficiente para gerar TPM que resultará em inchamento osmótico da mitocôndria, com ocorrência de perda de componentes intramitocondriais, liberação de intermediários metabólicos, desacoplamento da fosforilação oxidativa e perda do potencial eletroquímico da membrana (ZORATTI & SZABÒ, 1995; BERNARDI, 1996; VERCESI, 1984a). Estes eventos provocam a diminuição dos níveis de ATP e levam a morte celular.

O mecanismo e composição bioquímica do PTP ainda não está completamente descrito e tem sido foco de intensa pesquisa nos últimos anos. Diversos trabalhos postulam que PTP é um complexo protéico (figura 1A) constituído pelo translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) localizado na membrana mitocondrial interna, pelo canal de ânions voltagem-dependente (VDAC) localizado na membrana externa, hexoquinases e a pela ciclofilina D, uma peptidilprolil cis-trans-isomerase (KOWALTOWSKI et al., 2001; VERCESI, 1984b; HALESTRAP, 1999), tendo em vista que um complexo destas proteínas foi incorporado em lipossomos e resultou em um poro com características semelhantes as do PTP. Um importante inibidor do poro, a ciclosporina A, ajudou a reforçar esta teoria. A ciclosporina A liga-se a ciclofilina D e impede a ligação desta à membrana mitocondrial interna. Quando presente no meio, a ciclosporina A impede a abertura do PTP (CROMPTON et al., 1988). Além da CsA, outros compostos inibidores da TPM que foram estudados são : ADP, ATP, Mg^{2+} , EGTA (quelante de Ca^{2+}), acidificação da matriz mitocondrial, manutenção do potencial elétrico transmembrana e inibidores da enzima fosfolipase tais como dibucaina, trifluoperazina e quenacrina (BERNARDI et al., 1994).

No processo de abertura do PTP, resultando em TPM, o Ca^{2+} apresenta um papel fundamental, pois a maioria dos indutores clássicos de TPM (P_i , EROs, t-BuOOH) necessitam de sua presença para induzir TPM (ZORATTI & SZABÒ, 1995; FAGIAN et al.,

1990; KOWALTOWSKI et al., 1999; BERNARDI et al., 1998). A principal função do Ca^{2+} na TPM parece estar relacionada com sua ligação a proteínas específicas da membrana mitocondrial interna, esta forma regulando a abertura do PTP, porém, ele também estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mesmo sem a ocorrência de TPM (CASTILHO et al., 1995).

Embora muitas evidências apontem para a teoria de que o PTP pode ser formado exclusivamente pela agregação de proteínas específicas, pequenos peptídeos como alamethicin e mastoparan parecem capazes de formar um poro “per si”. Em baixas concentrações induzem TPM dependente de Ca^{2+} e sensível a CsA e em altas concentrações, TPM não regulado independente de Ca^{2+} e insensível a CsA (HE *et. al.*, 2002; PFEIFFER *et. al.*, 1995; KIM *et. al.*, 2003). Considerando que uma diversidade de agentes são capazes de induzir TPM, tendo porém em comum a capacidade de agir sobre proteínas da membrana mitocondrial interna, Kim e colaboradores (2003) propuseram um modelo para a formação do PTP (figura 1B) no qual sugerem que após um ataque químico, as proteínas da membrana sofrem um “misfolding” (perda de estrutura), e formam agregados que constituem um canal aquoso através da membrana. Como componente protéico deste canal estaria a ciclofilina D, uma chaperona que garante que o poro permaneça fechado até que o Ca^{2+} da matriz se eleve substancialmente. De acordo com este modelo, o PTP não regulado ocorreria quando o número de proteínas que perderam a estrutura excede o número de chaperonas existente para a regulação do poro. Desta forma, algumas substâncias induzem a abertura do poro regulado e não regulado por ciclosporina de uma forma dependente de concentração. Assim, acima de dadas concentrações de indutor, mesmo a ciclofilina D estando desligada pela ausência de Ca^{2+} ou presença de ciclosporina A, a concentração de droga é suficiente para induzir o misfolding de proteínas da membrana e abrir o poro que não responde a quelantes de Ca^{2+} e ciclosporina A. Considerando que o PTP é formado pela agregação de proteínas preexistentes na membrana mitocondrial interna, como mostra o trabalho do grupo do professor Vercesi e colaboradores (FAGIAN et al., 1990), o mecanismo responsável pela agregação destas proteínas surge como outra incerteza relativa ao PTP. Dados da literatura sugerem que o estresse oxidativo pode ser a ligação entre o acúmulo mitocondrial de Ca^{2+} e TPM (KOWALTOWSKI et al., 2001). De fato, a relação entre estado redox de NADPH e a ocorrência de TPM já foi descrita. O estado redox de NADPH está intimamente associado com GSH e o estado redox de grupos tiol de proteínas mitocondriais (HOEK et al., 1988). Portanto a TPM pode estar associada ao estresse oxidativo, exacerbando a produção de EROs

pela organela, depletando seu poder antioxidante ou promovendo a oxidação direta de grupos tióis de proteínas da membrana.

Diversas substâncias possuem potencial de atuação nas mitocôndrias, podendo contribuir para o aumento do estresse oxidativo ou protegendo a organela do ataque de radicais. Entre essas substâncias, compostos contendo telúrio tem sido descrito como possuidores destas características, se mostrando como bons modelos para estudos em bioenergética.

1.3. ORGANOTELÚRICOS (TELURANAS)

A química dos organocalcogênios (S, Se, Te) tem crescido muito nos últimos anos devido às propriedades destes elementos que se adequam às exigências da moderna síntese orgânica. Enquanto os compostos orgânicos contendo selênio têm sido descritos como possuidores de interessantes atividades biológicas como ação antitumoral, antiinflamatória e cardiovascular, os compostos orgânicos contendo telúrio têm despertado menos interesse. Algumas razões para o menor interesse são a instabilidade termodinâmica, fotosensibilidade e sua ausência em biomoléculas. Contudo, recentemente os organotelúricos despertaram maior interesse devido a sua atividade antitumoral e antiviral (NOGUEIRA, 2001).

A discussão a cerca da ação tóxica e da potencial ação terapêutica dos organocalcogênios gira em torno da reatividade destes compostos com grupos tiólicos de proteínas. Formas orgânicas de selênio e telúrio têm sido apontadas como possíveis agentes antioxidantes por exibirem atividade semelhante à glutathione peroxidase sobre tiol reduzido durante a redução de H_2O_2 . Estes compostos também têm mostrado capacidade de retardar lipoperoxidação induzida por uma variedade de oxidantes (SWEARINGEN, 2005).

Estudos relacionando organotelúricos (teluranas) e a bioenergética mitocondrial, mostraram que estes podem apresentar importantes efeitos tóxicos, tendo em vista que oxidaram grupos tiol, causaram esgotamento nos níveis de ATP intracelular, dissipação do gradiente de pH transmembrana (LOHMEIER-VOGEL, 2004; LITHGOW, 2004). Albeck e colaboradores descreveram em 1998 que estes compostos apresentaram inibição de proteases.

Recentemente o grupo do Prof. Dr. João Valdir Comasseto demonstrou que organotelúricos são potentes inibidores de cisteíno proteases em meio não redutor. O mecanismo de inibição baseia-se no deslocamento do cloro ligado ao telúrio que passa a ligar-

se com o enxofre de um grupo tiolato. A inibição pode ser revertida com agentes redutores como o DTT (CUNHA *et. al.*, 2005).

Esta capacidade de ligação em grupos tiólicos confere aos organotelúricos, um potencial para atuação na bioenergética mitocondrial. Sua ligação com sulfidrilas pode depletar a mitocondria de glutathiona, seu principal agente antioxidante contra o estresse oxidativo (ZAKOWSKI & TAPPEL, 1978). Esta depleção de glutathiona irá tornar a mitocondria vulnerável à ação de radicais livres capazes de induzir lipoperoxidação bem como a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial devido à oxidação de grupos tiol de proteínas mitocondriais.

Nosso grupo realizou recentemente um estudo em mitocondrias de fígado de ratos Wistar com duas teluranas, RT-03 e RT-04 (figura 2), demonstrando que estas possuem alta reatividade com grupos SH de proteínas, capacidade de abertura do PTP regulado e não regulado, sendo este último efeito dose-dependente, além de surpreendente ação antioxidante para lipídios (PESSOTO *et. al.*, 2007) quando usadas em concentrações nanomolares, o que denota a ausência de estresse oxidativo concomitante com ocorrência da TPM.

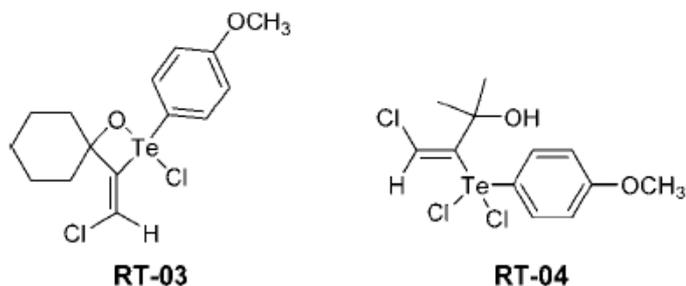


Figura 2. Estrutura molecular das teluranas RT-03 e RT-04

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Testar a ação dos compostos organotelúricos, RT-07A, B, C e D (figura 3), sobre a bioenergética mitocondrial.

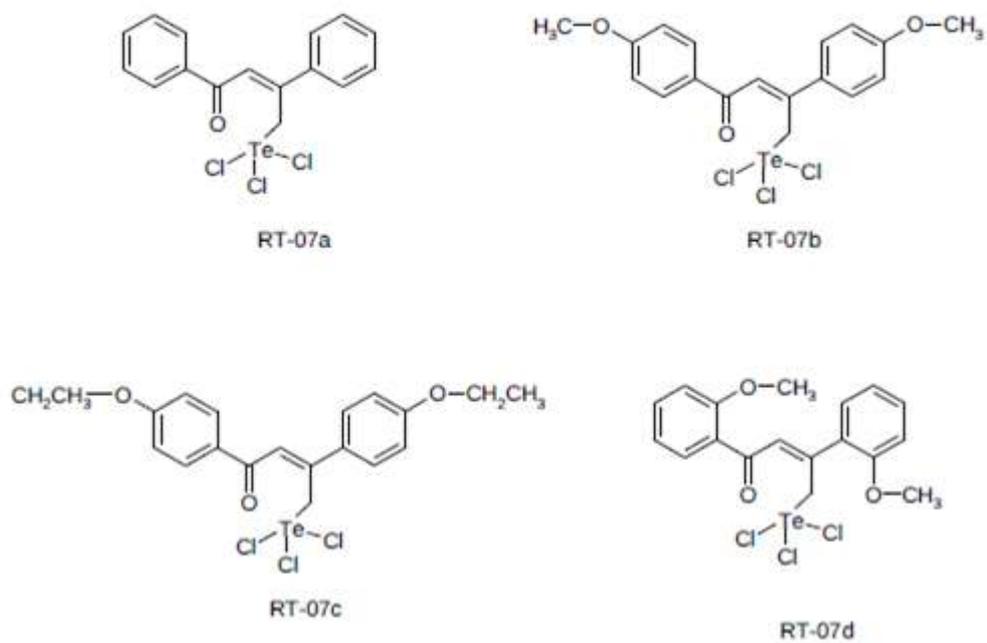


Figura 3. Estrutura molecular dos compostos organotelúricos (IV) RT-07.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a capacidade de abertura do poro de transição de permeabilidade pela oxidação de grupos tiólicos e ocorrência de inchamento mitocondrial dependente de Ca^{2+} e protegido por ciclosporina A (CsA) ou inibido por ditioneitol (DTT), redutor de grupos tiólicos, ou *n*-etilmaleimida (NEM), um composto que se liga a um grupo sulfidril;
- Estudar o efeito da concentração de organotelúricos sobre o potencial de membrana mitocondrial;
- Estabelecer a correlação entre possível abertura do poro de transição de permeabilidade induzido RT-07 e a ocorrência de estresse oxidativo mitocondrial;
- Estudar o efeito da concentração dos organotelúricos sobre fração lipídica da mitocôndria e sobre a fluidez da membrana mitocondrial;
- Estudar o efeito da concentração de organotelúricos sobre a respiração mitocondrial.
- Realizar comparação dos resultados gerados pela ação dos compostos organotelúricos (IV) RT-07 com os gerados por RT-03 e RT-04 (PESSOTO *et. al.*, 2007);

3. METÓDOS

3.1. Compostos organotelúricos (IV) RT-07.

Os compostos organotelúricos (IV) RT-07 utilizados neste estudo foram sintetizados e gentilmente cedidos ao nosso grupo pelo Prof. Dr. Rodrigo L.O.R. Cunha. A síntese foi realizada através de adição eletrofílica de tricloreto de p-metóxfenil telúrio a alcinos, chamados 1-etinil-1- ciclohexanol e 3-metil-3-hidroxi-butine, respectivamente (ZENI et al., 1999).

3.2. Manutenção, manipulação e eutanásia de animais

Durante o período de execução do projeto foram utilizados aproximadamente 80 ratos da linhagem Wistar, que foram fornecidos pelo biotério da Universidade de Mogi das Cruzes – UMC (Protocolo: 020/2009), que possui um comitê de ética interno registrado no COBEA, para fiscalizar todas as normas e princípios éticos na manutenção de animais, tais como: espaço, ventilação, temperatura, nutrição, hidratação e manipulação adequada. Apenas machos da linhagem Wistar, foram utilizados nesta pesquisa. O método de eutanásia utilizado foi o deslocamento cervical para ratos de até 200 gramas e o traumatismo craniano para animais com mais de 200 gramas. Estes métodos estão descritos em *Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Concil on Animal Care (CCAC), Cap. XII. Euthanasia..*

3.3. Isolamento de mitocôndrias hepáticas

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos Wistar machos de aproximadamente 200 g utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial (SCHNEIDER & HOGEBOM, 1950). Após a eutanásia do animal o fígado foi retirado, lavado em solução contendo sacarose 250

mM, tampão HEPES-KOH 10 mM e EGTA 1 mM em pH 7,4 a 4°C, fragmentado e homogeneizado em Potter-Elvehjen. A suspensão foi centrifugada a 580g por 5 minutos e o sobrenadante adquirido foi centrifugado a 10.300 g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado juntamente com a fase lipídica superior com pipeta Pasteur, e o sedimento resultante ressuspenso em aproximadamente 25 ml de meio contendo sacarose 250 mM, tampão HEPES-KOH 10 mM e EGTA 0,3 mM em pH 7,4 a 4°C, e centrifugado a 3400 g por 15 minutos. O sedimento final, ou fração mitocondrial foi ressuspenso em aproximadamente 1 mL de solução contendo sacarose 250 mM, tampão HEPES-KOH 10 mM em pH 7,4 a 4°C.

3.4. Dosagem de proteínas mitocondriais totais

A concentração de proteínas mitocôndrias totais foi determinada pelo método de Biureto, onde uma alíquota (10 µL) da amostra a ser determinada foi misturada a 100 µL de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e água q.s.p. 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL do reativo de biureto, composto por sulfato cúprico 0,15% (m/v), tartarato de sódio e potássio 0,6% (m/v) e NaOH 0,75 M. Após 10 minutos, a absorbância foi determinada em 540 nm contra um branco de reagentes e uma solução de BSA 10 % foi utilizada como padrão (CAIN & SKILLETER, 1987).

3.5. Meio padrão para ensaios com mitocôndria

Os ensaios foram realizados com mitocôndria de fígado de rato, em meio padrão contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e tampão HEPES-KOH 10 mM em pH 7,4. A concentração residual de Ca^{2+} foi estimada em aproximadamente 10 µM, portanto quando necessária adição de CaCl_2 levou-se em conta este valor ou adicionamos EGTA.

3.6. Oxidação de grupos tiólicos de proteínas mitocondriais

A oxidação de grupos tiólicos é um evento que precede a abertura do poro de transição de permeabilidade. Após indução da oxidação de grupos tiólicos de proteínas, foi feita a adição de ácido 5,5'ditio-bis (2-nitrobenzólico), (DTNB), que sofre perda significativa de absorvância, quando em solução com menor número de grupos tiólicos, sugerindo que os mesmos sofreram oxidação ou formaram ligações cruzadas (CASTILHO et al., 1996).

Ao meio padrão foi adicionado succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, CaCl_2 10 μ M e MFR 0,4 mg de proteína, em volume final de 1,5 ml, foi utilizado como pró-oxidante *t*-BuOOH 0,6 mM, e incubado a 30 °C por 15 minutos. Em seguida, foi tratado com o 300 μ l de ácido tricloro acético 30 % (v/v) e centrifugado a 3.400 g por 15 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 1,0 ml de tampão fosfato 100 mM pH 7,6, adicionado de DTNB 0,1 mM.

A absorvância foi determinada em 412 nm, sendo que a concentração de grupamentos tiólicos oxidados foi calculada utilizando-se $\epsilon = 13.600 \text{ (M)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (JOCELYN, 1987).

3.7. Medida do inchamento mitocondrial

As suspensões mitocondriais são turvas, por isso espalham luz incidente. A permeabilização da membrana mitocondrial interna torna possível a entrada de solutos, aumentando o volume da matriz mitocondrial e diminuindo o espalhamento de luz incidente (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). O inchamento inibido por ciclosporina A é um evento típico do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Mitocondria de fígado de rato (0,4 mg) foi incubada em meio padrão adicionado de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, CaCl_2 10 μ M no volume final de 1,5 ml. O inchamento mitocondrial foi avaliado espectrofotometricamente, pela diminuição da absorvância em 540 nm.

3.8. Determinação do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) da membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado espectrofluorimetricamente através das alterações de fluorescência da rodamina 123, um corante catiônico fluorescente que se distribui eletroforicamente pela matriz mitocondrial devido à carga negativa da membrana interna (LEMASTERS et al., 1987). Portanto, quando na matriz mitocondrial, a rodamina 123 emite baixa intensidade de fluorescência e esta intensidade aumenta à medida que rodamina 123 é liberada da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Mitocondria de fígado de rato (1mg/ml) foram incubadas em meio padrão acrescido de EGTA 0,5 mM, K_2HPO_4 10 mM, rotenona 2,5 μ M e rodamina 123 0,4 μ M a 30°C, succinato de potássio 5 mM foi adicionado para a formação do potencial, ao final do experimento 1 μ M do desacoplador CCCP foi adicionado para a dissipação do potencial formado. Para excitação e emissão da rodamina 123, foram utilizados os comprimentos de onda 505 e 525nm respectivamente (ÅKERMAN E WIKSTRÖM, 1976; EMAUS et al., 1986).

3.9. Quantificação da GSH mitocondrial

Após 15 minutos de incubação nas condições utilizadas para medir o inchamento mitocondrial (subitem 3.7.), as mitocôndrias foram tratadas com 0,5 ml de ácido tricloroacético 13 % e centrifugadas a 900 g por 3 min. Ao sobrenadante, (100 μ l), foi adicionado 2 ml de tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 8.0, contendo EGTA 5 mM. Cem microlitros de oftalaldeído (OPT) a 1 mg/ml foram adicionados. Após 15 minutos a fluorescência foi mensurada usando os comprimentos de onda de 350 nm para excitação e 420 nm para emissão em espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) (HISSIN et al., 1976). Deve-se observar que a dosagem de GSH das amostras corresponde ao conteúdo total da mesma, o que exclui a possibilidade de que a redução do conteúdo de GSH observado decorra de perda de componentes mitocondriais devido ao inchamento da organela.

3.10. Análise da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio

O método é baseado na oxidação intramitocondrial dependente de peróxido do 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) que forma o composto fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Ao meio padrão foi adicionado succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, CaCl_2 10 μ M e mitocôndria de fígado de rato (1 mg de proteína/ml), em volume final de 2 ml a 30 °C, na presença de 1 μ M de H_2DCFDA . A produção relativa de EROs mitocondrial foi mensurada utilizando Espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) com excitação e emissão 503 e 529 nm, respectivamente (MACIEL *et. al.*, 2001; SULLIVAN *et. al.*, 2004).

3.11. Dosagem de produtos de oxidação de lipídios de membrana

A abertura do poro de transição de permeabilidade pode ou não envolver danos à fração lipídica da membrana, que foi avaliada pela formação de MDA. Para determinação do MDA foi adicionado o ácido tiobarbitúrico (TBA) que se liga ao MDA formando um complexo MDA-TBA, que passa a ter coloração, de acordo com a quantidade de complexo formado. MFR 1 mg de proteína foi incubada em meio padrão acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 μ M e citrato de sódio 2 mM por 15 minutos a 30 °C (volume final 1 ml). Para determinação do MDA, foi adicionado 1 ml de TBA 1% (m/v) diluído em NaOH 50 mM, 0,1 ml de NaOH 10 M e 0,5 ml de ácido fosfórico 20% (v/v), seguido por incubação durante 20 minutos, a 85°C. O complexo MDA-TBA foi extraído com 2 ml de *n*-butanol e a absorbância determinada em 535 nm. A concentração de MDA foi calculada a partir de um $\epsilon = 1,56 \times 10^5$ (moles/L)⁻¹ (BUEGE & AUST, 1978).

3.12. Medida de alterações da fluidez da bicamada lipídica mitocondrial

Mitocondrias (1 mg/ml) foram incubadas em meio padrão pH 7.4 a 30°C acrescido de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do desacoplador CCCP. Adicionou-se 75 μM da sonda fluorescente anilinaftaleno sulfonato (ANS), que aumenta sua fluorescência em resposta a alterações na fluidez da membrana mitocondrial. Durante os 15 minutos de experimento diferentes concentrações dos compostos foram acrescentadas. Alterações de fluorescência foram mensuradas com espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) calibrado na configuração de excitação em 380 nm e emissão em 485 nm (SLAVIK, 1982; LEE et al., 1999).

3.13. Controle respiratório ou consumo de oxigênio mitocondrial

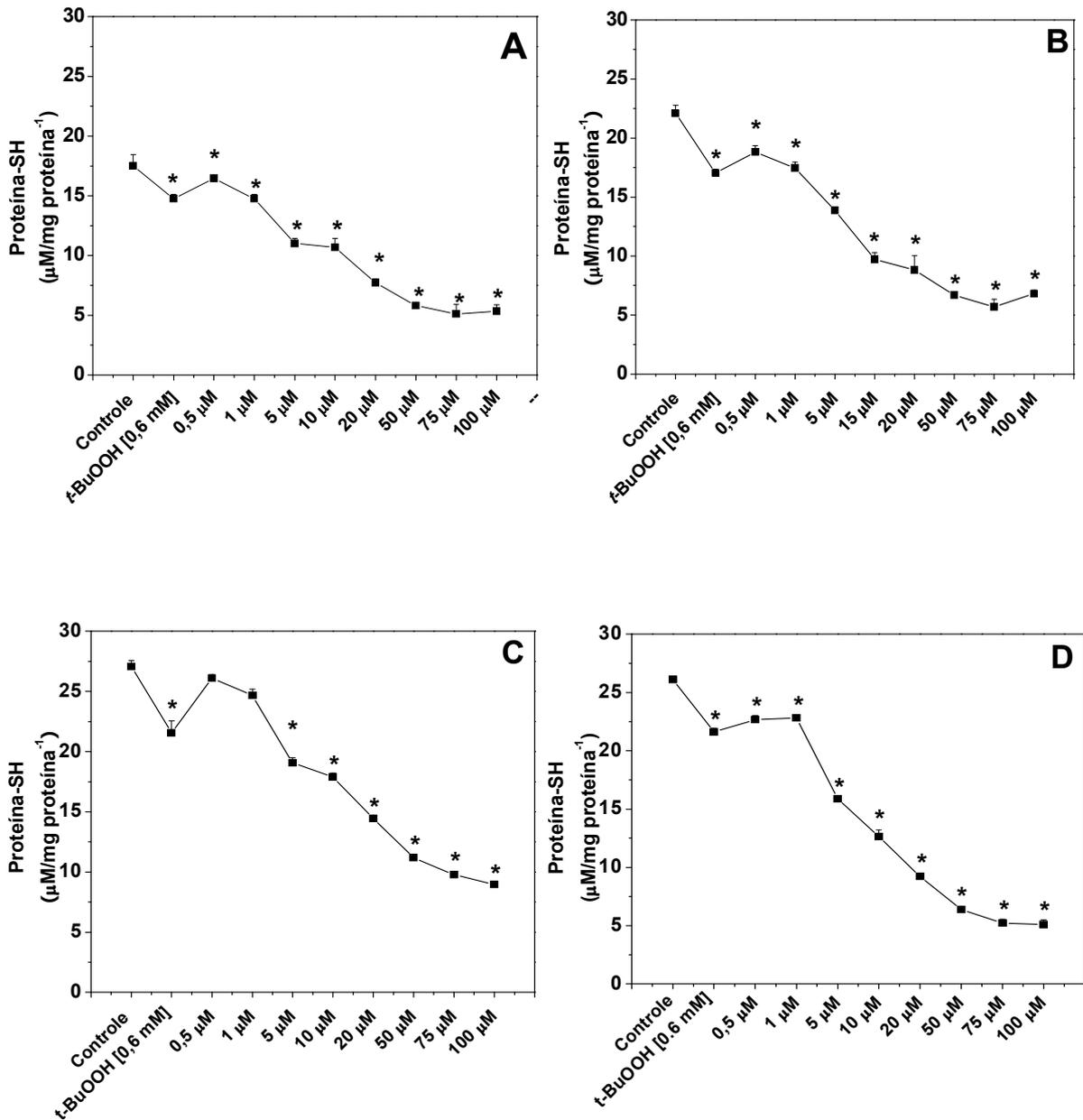
A diminuição da quantidade de oxigênio em meio padrão foi mensurada, como forma indireta de avaliar a fosforilação oxidativa. Danos às mitocôndrias podem resultar em inibição da respiração mitocondrial, diminuindo o consumo de oxigênio pela mitocôndria, ou aumento da velocidade de respiração decorrente de desacoplamento, nesta situação o consumo de oxigênio é aumentado. Dependendo do mecanismo de abertura do PTP, diferentes efeitos podem ser observados na respiração. O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi analisado polarograficamente, em oxígrafo equipado com um eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.), e os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com Chance & Willians, 1956. Mitocondrias (1mg/ml) foram incubadas em meio padrão acrescido de EGTA 0,5 mM, K_2HPO_4 10 mM, succinato de potássio 5 mM e rotenona 2,5 μM a 30 °C, para quantificar a velocidade de estado 3 da respiração foi adicionado 400 nmoles de ADP, neste estado mensuramos a velocidade máxima de consumo de oxigênio pela mitocôndria, enquanto que ao termino da fosforilação do ADP adicionado a mitocôndria volta a um estado basal de consumo que é chamado de estado 4 . A relação estado 3/estado 4 nos fornece uma taxa de consumo de oxigênio chamada de controle respiratório (CR), logo quanto maior, o CR, menores são os danos mitocondriais (CHANCE & WILLIANS, 1956).

3.14. Análise estatística

A análise estatística utilizada nesta dissertação foi realizada de acordo com o software GraphPad da GraphPad Software, Inc. Foi utilizado também o teste de post-hoc (Bonferroni correction) do software GraphPad.

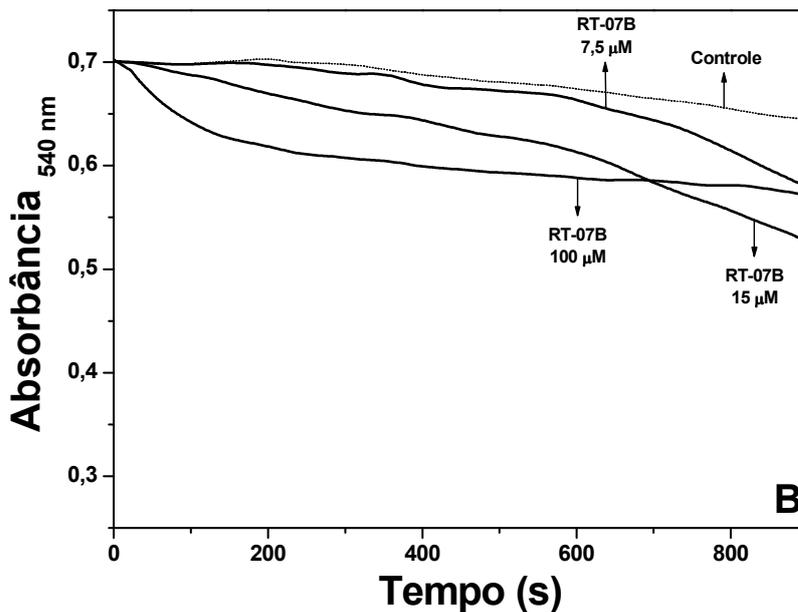
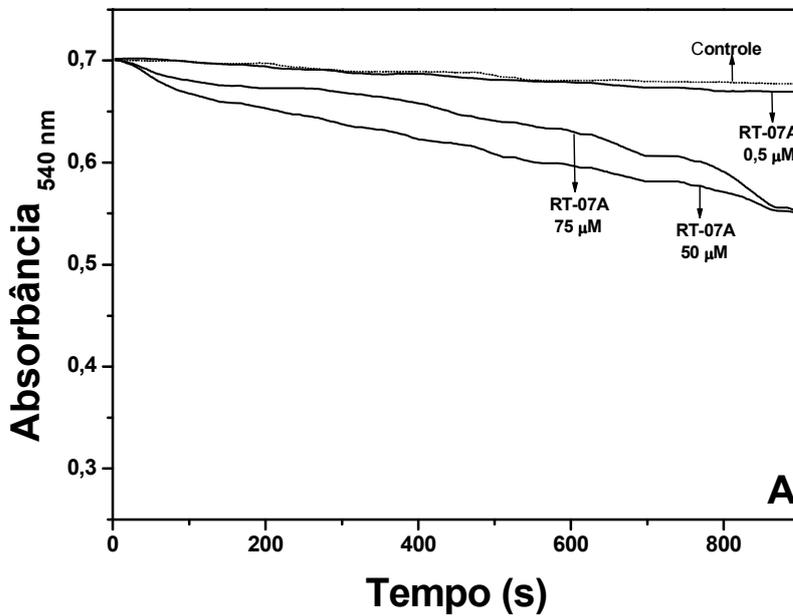
4. RESULTADOS

Para iniciarmos os testes com os compostos organotelúricos (IV) RT-07, realizamos a dosagem de grupos SH em proteínas mitocondriais. As mitocôndrias foram submetidas a incubação onde diferentes concentrações dos compostos estavam presentes. Os resultados gerados pelos experimentos são apresentados nas figuras 4A (RT-07A), 4B (RT-07B), 4C (RT-07C) e 4D (RT-07D). Como pode ser visto, todos os compostos causaram oxidação das sulfidrilas (SH), com exceção de RT-07C, os outros compostos foram capazes de oxidar grupos SH de maneira significativa em relação ao controle mesmo em concentrações nanomolares (500 nM) . Porém, as curvas de oxidação mostradas nos gráficos indicam que existe saturação do efeito quando as drogas são incubadas em altas concentrações, portanto, o efeito dos compostos não é linear.



Figuras 4A-D. Efeito de RT-07A, B, C ou D na oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas. Mitocôndrias de fígado de rato (0,4 mg de proteína) foram incubadas em meio padrão, em volume final de 1,5 ml, acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μM, CaCl₂ 10 μM a 30°C. RT-07A (figura 4A), B (figura 4B), C (figura 4C) e D (figura 4D) foram utilizadas nas concentrações de 500 nM, 1, 5, 10, 20, 50, 75 e 100 μM, como controle do experimento utilizou-se mitocôndria sem adição de droga e como controle positivo utilizou-se mitocôndria acrescida do pró-oxidante *t*-BuOOH na concentração de 0,6 mM. Os dados apresentados correspondem à média \pm d.p.m. de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.* Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Depois de constatarmos a ação oxidativa dos compostos sobre grupos SH tornava-se mais coerente realizar a medida do inchamento mitocondrial causado pelos compostos, tendo em vista que a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) ocorre em função da formação de ligações cruzadas entre grupos SH de proteínas. Com isso realizamos uma curva padrão para cada composto, buscando verificar em qual concentração ocorria o maior efeito de inchamento osmótico. Com isso, verificamos que, o efeito dos compostos atinge uma saturação. Para RT-07A a concentração onde observamos saturação de efeito é de aproximadamente 50 μM (figura 5A), para RT-07B é de 15 μM (figura 5B), para RT-07C é de 25 μM (figura 5C) e para RT-07D em torno de 25 μM (figura 5D).



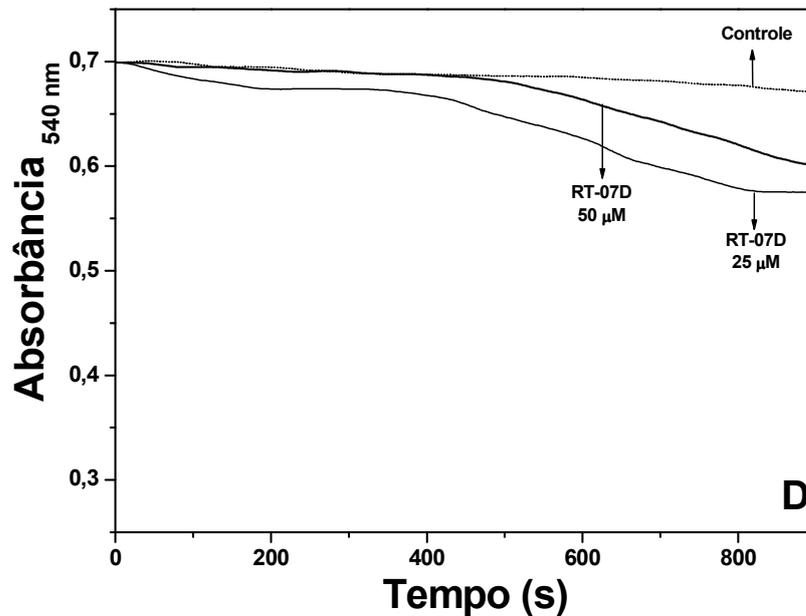
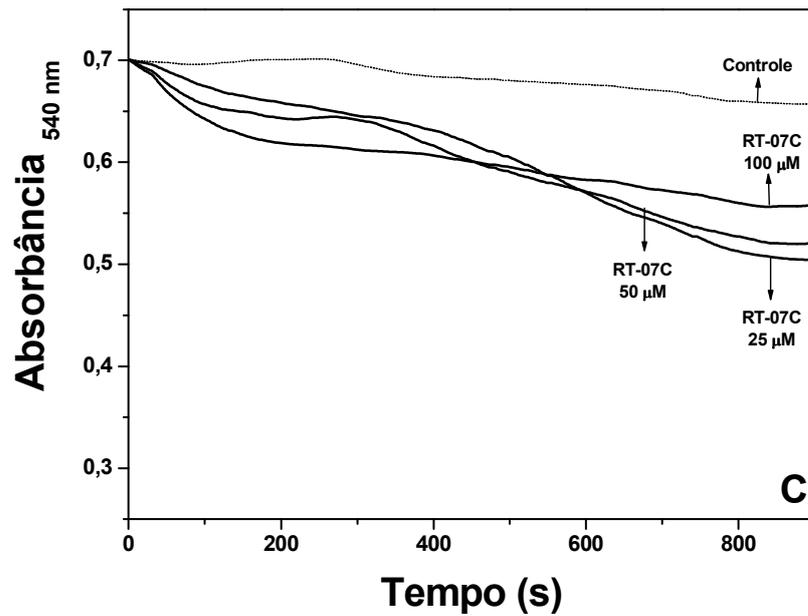
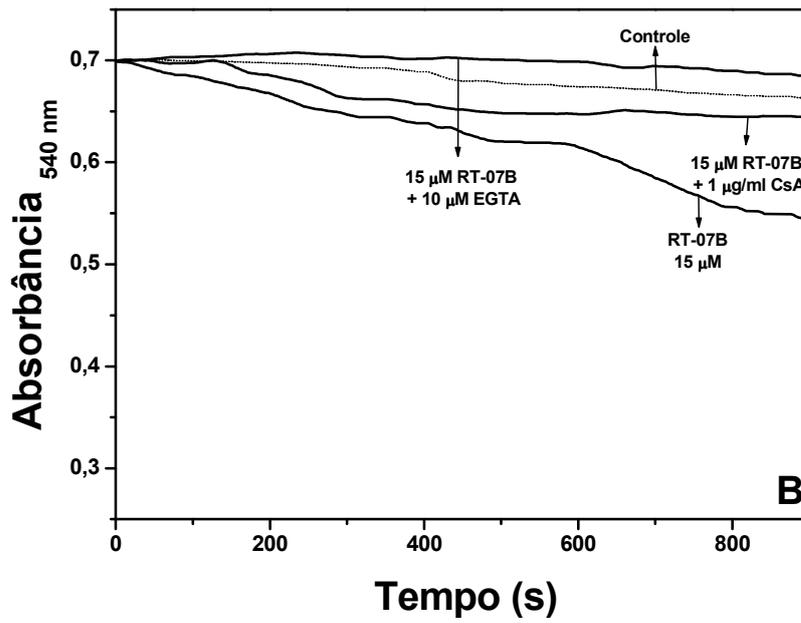
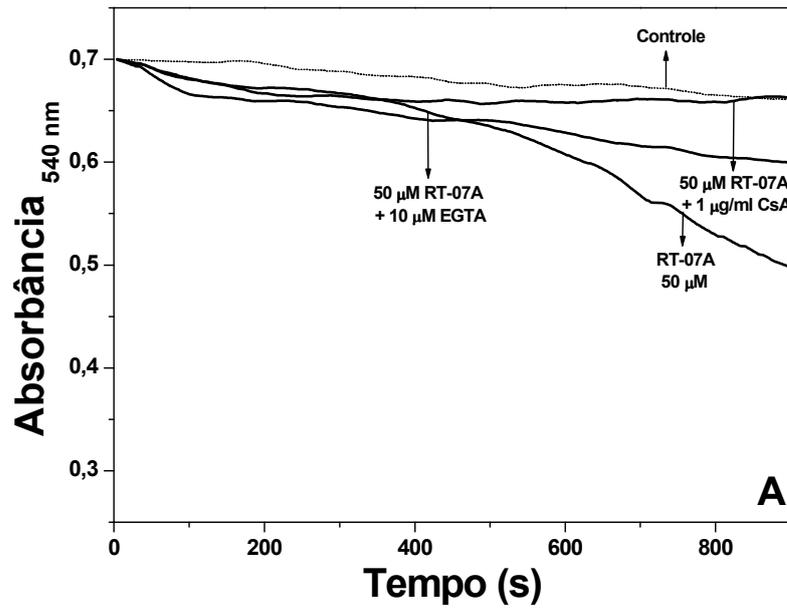


Figura 5A-D. **Inchamento mitocondrial induzido por diferentes concentrações de RT-07A, B, C ou D.** Mitocondrias de fígado de rato (0,4 mg de proteína) foram incubadas em meio padrão, volume final 1,5 ml, acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μM, CaCl₂ 10 μM a 30°C. RT-07A (figura 5A) foi utilizado nas concentrações de 0,5, 50 e 75 μM, RT-07B (figura 5B) nas concentrações de 7,5, 15 e 100 μM, RT-07C (figura 5C) nas concentrações de 25, 50 e 100 μM e RT-07D (figura 5D) nas concentrações de 25 e 50 μM. Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

Após a realização da curva padrão para verificar o inchamento, cabia investigar o mecanismo pelo qual a abertura do poro ocorre. Observamos então, se nas concentrações onde havia saturação do efeito de inchamento, havia reversão deste efeito pela adição de CsA ou através da retirada de Ca^{2+} do meio pela adição do quelante EGTA. Sabendo também da ação oxidativa sobre grupos SH, adicionamos ditioneitol (DTT), um composto redutor de dois grupos tiólicos, e também n-etilmaleimida (NEM) que se liga a um grupo tiólico, protegendo este de oxidação no intuito de verificarmos se seria possível conter o inchamento mitocondrial pela redução ou proteção das sulfidrilas. Nossos resultados mostraram que a ação dos compostos para abertura do poro de transição pode ser regulada por CsA, presumindo assim participação de ciclofilina D na formação do poro, já que esta liga-se a CsA, impedindo que o poro se abra. Verificamos também que, para causarem a abertura do poro, todos os compostos dependem da presença de Ca^{2+} no meio. Com relação aos agentes redutores utilizados, observamos que estes também são eficientes inibidores do inchamento mitocondrial. As figuras 6A-D mostram os efeitos de RT-07A, B, C e D na presença de CsA ou EGTA, enquanto as figuras 7A-D mostram os efeitos de NEM ou DTT.



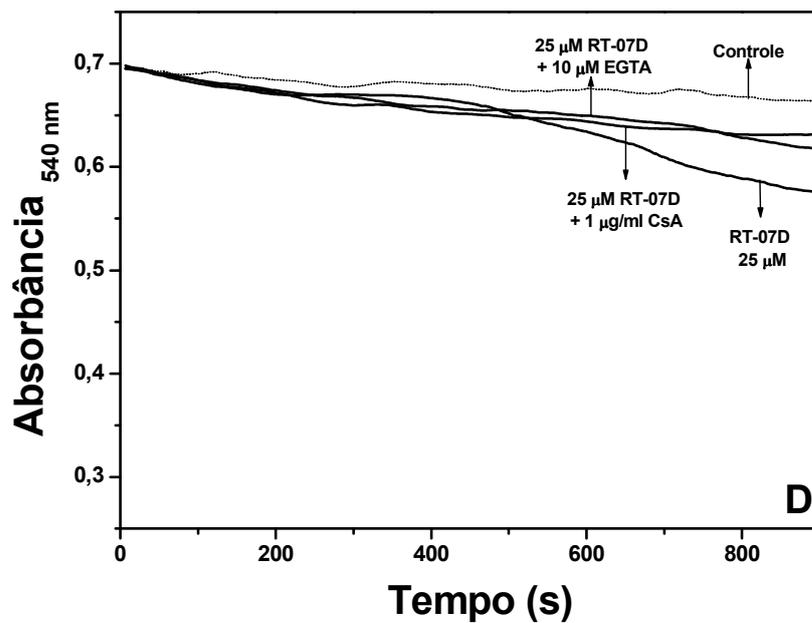
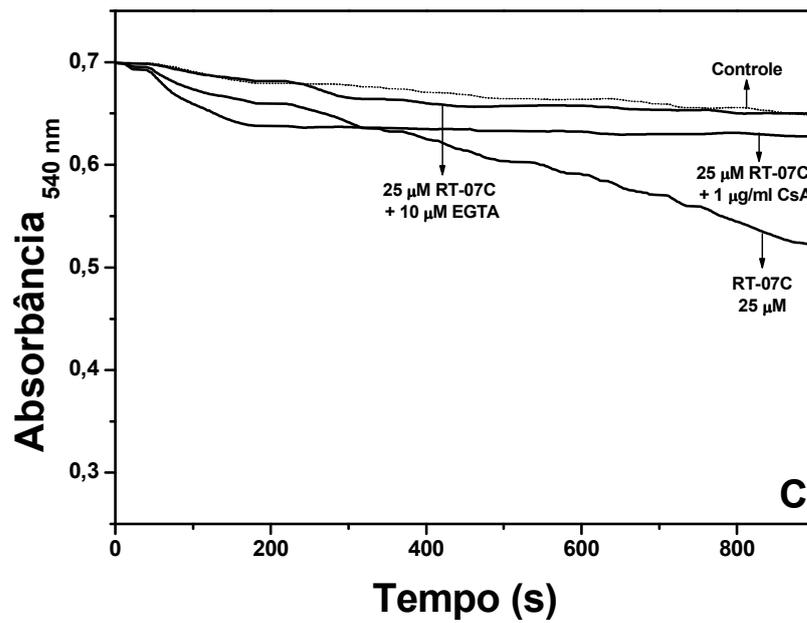
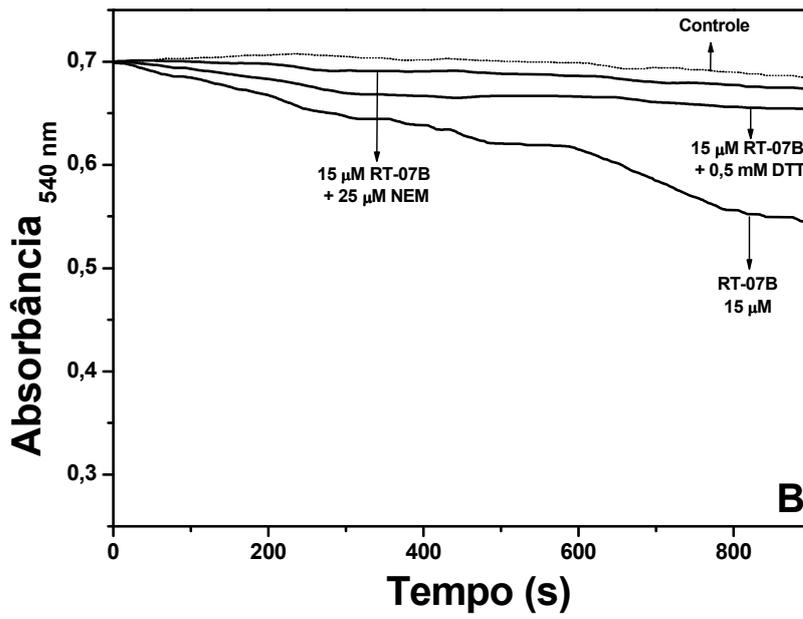
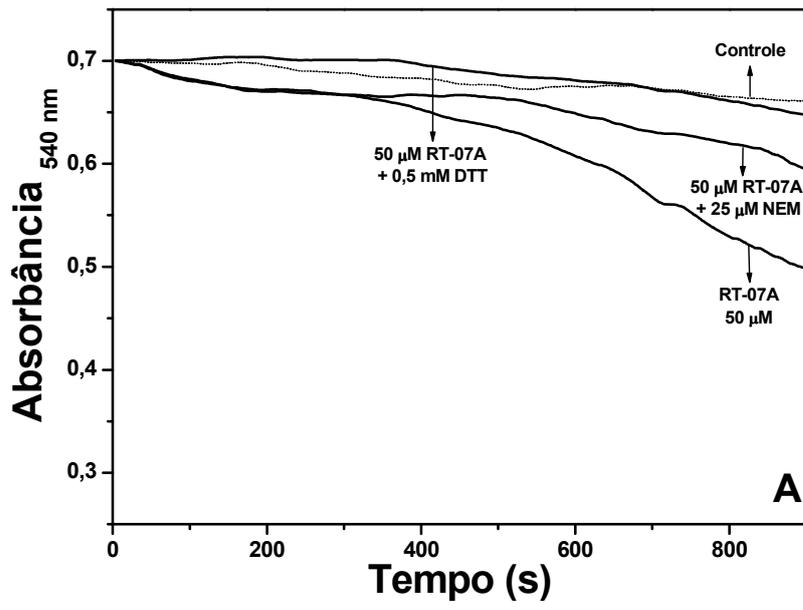


Figura 6A-D. **Inchamento mitocondrial induzido por RT-07A, B, C ou D e inibido por CsA ou EGTA.** Mitocondrias de fígado de rato (0,4 mg de proteína) foram incubadas em meio padrão, volume final 1,5 ml, acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μM, CaCl₂ 10 μM a 30°C. RT-07A (figura 6A) foi utilizada a 50 μM, RT-07B (figura 6B) a 15 μM, RT-07C (figura 6C) a 25 μM e RT-07D (figura 6D) a 25 μM. Para inibição da abertura do poro foi adicionada CsA a 1 μg/mL ou o quelante EGTA, para retirar o Ca²⁺ do meio, foi usado a 10 μM. Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.



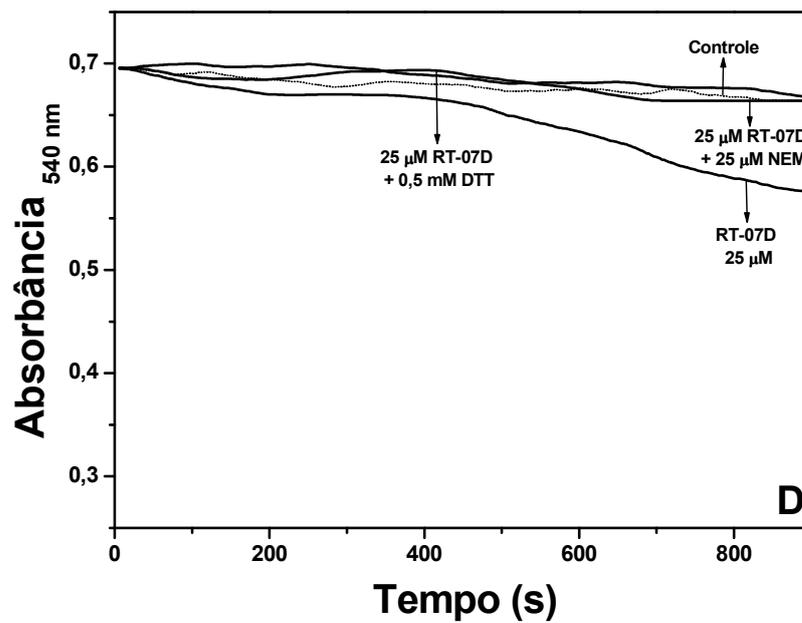
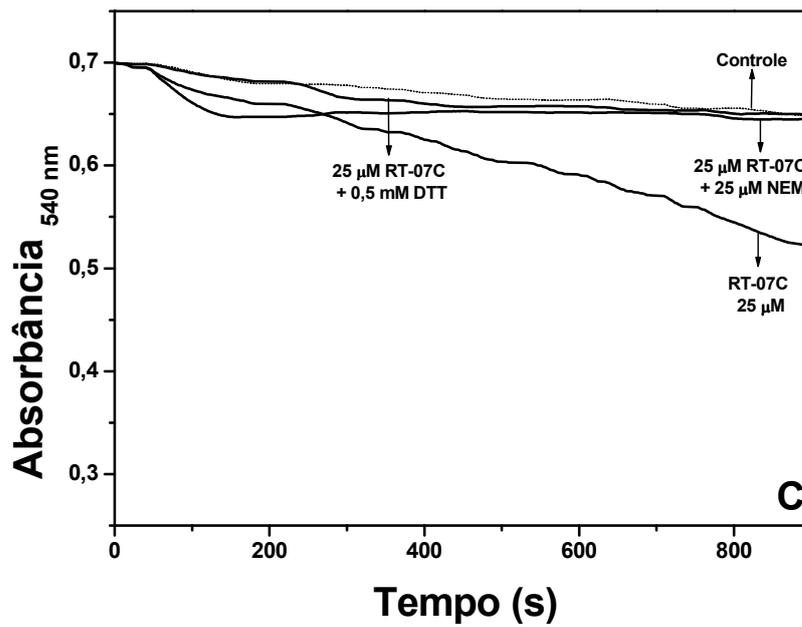


Figura 7A-D. **Inchamento mitocondrial induzido por RT-07A, B, C ou D e inibido por NEM ou DTT.** Mitocondrias de fígado de rato (0,4 mg de proteína) foram incubadas em meio padrão, volume final 1,5 ml, acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, CaCl_2 10 μ M a 30°C. RT-07A (figura 7A) foi utilizada a 50 μ M, RT-07B (figura 7B) a 15 μ M, RT-07C (figura 7C) a 25 μ M e RT-07D (figura 7D) a 25 μ M. NEM, quando presente, foi usado na concentração de 25 μ M e DTT, quando presente, na concentração de 0,5 mM. Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

Após a verificação do inchamento mitocondrial causado pelas organoteluranas tornou-se necessário verificarmos sua ação sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). De acordo com a literatura quando ocorre abertura do PTP, também temos uma queda do potencial de membrana mitocondrial. A figura 8 mostra que nas concentrações causadoras de inchamento também ocorre perda do potencial de membrana mitocondrial.

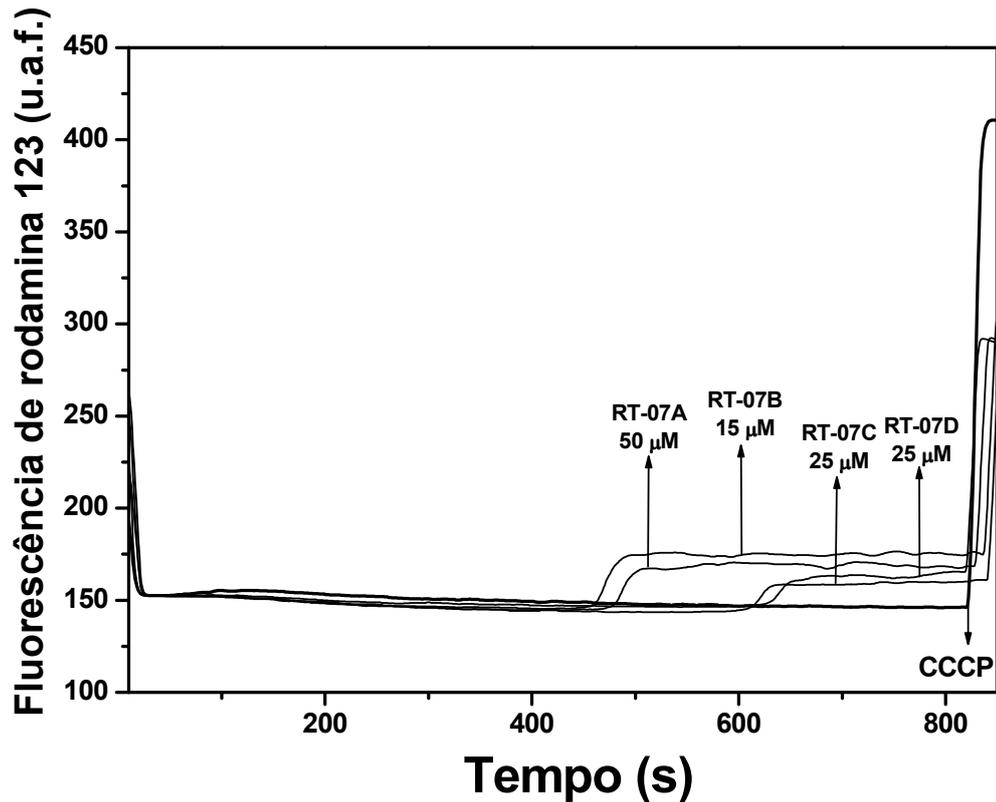


Figura 8. Perda do $\Delta\Psi$ mitocondrial induzidos por RT-07A, B, C ou D. Mitocôndrias de fígado de rato (1 mg/ml) foram incubadas em meio padrão acrescido de EGTA 0,5 mM, K_2HPO_4 10mM, rotenona 2,5 μ M e rodamina 123 0,4 μ M a 30°C, succinato de potássio 5 mM foi adicionado para a formação do potencial. Controle experimental do $\Delta\Psi$ sem adição de droga (linha grossa), 1 μ M de CCCP foi adicionada para a completa dissipação do potencial de membrana formado, RT-07A foi utilizado a 50 μ M, RT-07B a 15 μ M, RT-07C a 25 μ M e RT-07D a 25 μ M. Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

A figura 9 mostra o efeito das organoteluranas (IV) RT-07 sobre o glutathiona reduzida (GSH). Os compostos foram incubados em baixa concentração (500 nM) e na concentração onde o efeito de inchamento atingia a saturação. Podemos ver que os compostos não conseguem depletar a GSH de maneira significativa mesmo quando usados na maior concentração causadora de inchamento. Tendo em vista que RT-07A,B e D oxidam grupos SH de maneira significativa na concentração de 0,5 μM e RT-07C na concentração de 5 μM , podemos presumir um maior efeito dos compostos sobre as proteínas inseridas nas membranas mitocondriais em detrimento das proteínas da matriz mitocondrial, já que a maior parte da GSH mitocondrial encontra-se solúvel na matriz mitocondrial.

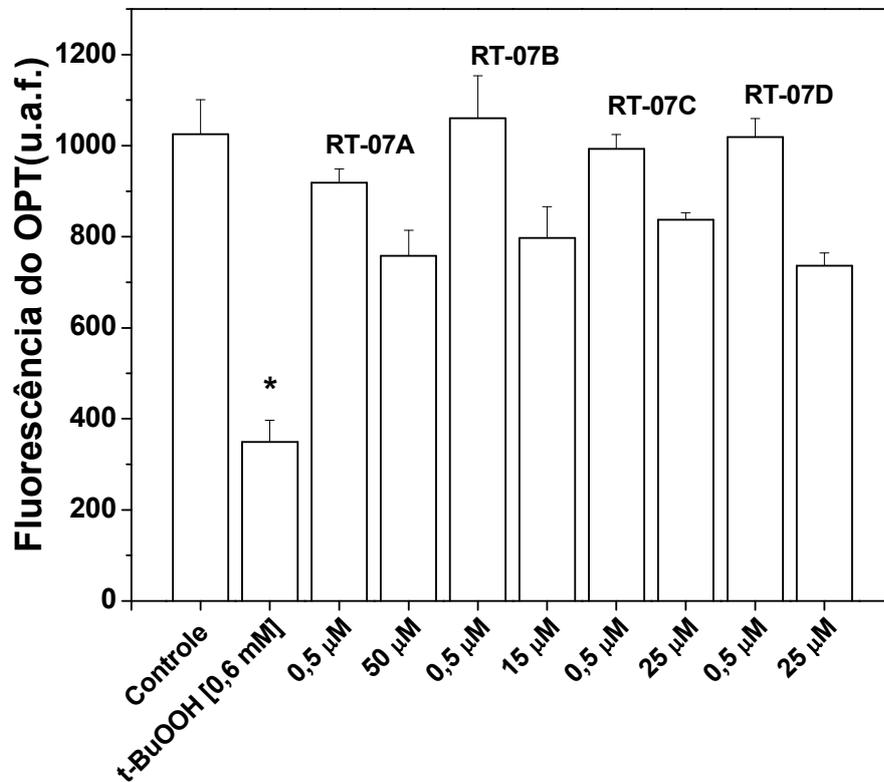


Figura 9. Efeito dos compostos organotelúricos (IV) RT-07 na depleção de GSH mitocondrial. Mitocondrias de fígado de rato (0,4 mg de proteína) foram incubadas nas condições de inchamento. Mitocondria sem adição de droga foi usada no controle. RT-07A foi utilizada nas concentrações de 500 nM e 50 μM , RT-07B a 500 nM e 15 μM , RT-07C a 500 nM e 25 μM , RT-07D a 500 nM e 25 μM . Como controle positivo utilizamos o pró-oxidante *t*-BuOOH na concentração de 0,6 mM. Os dados apresentados correspondem à média \pm d.p.m. de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Para confirmarmos a ocorrência de TPM independente de estresse oxidativo mitocondrial, verificamos a capacidade dos compostos de proteção contra a geração de EROs. Os compostos foram incubados em concentrações superiores as concentrações saturantes para o inchamento. Com exceção de RT-07B, os compostos parecem agir como seqüestradores de EROs, diminuindo a quantidade destas moléculas, ou seja, protegendo a organela contra danos oxidativos. Os resultados nos mostram que a abertura do PTP causada pelos compostos (IV) RT-07 pode ocorrer na ausência de estresse oxidativo como mostram as figuras 10, 11, 12 e 13.

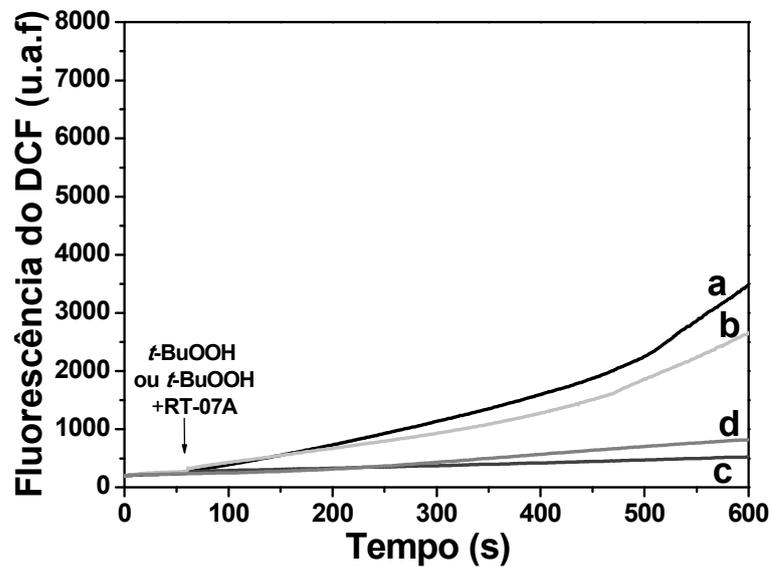


Figura 10. **Efeito de RT-07A na produção de EROs.** Mitocondrias de fígado de rato (1 mg/mL) foram incubadas em meio padrão acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, CaCl_2 10 μ M e H_2DCFDA 0,8 μ M à 30 °C. *t*-BuOOH a 0,6 mM foi adicionado em 50 s (linha a), *t*-BuOOH com concomitante adição de RT-07A 75 μ M em 50 s (linha b), RT-07A 75 μ M em 50 s (linha c) e controle (linha d). Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

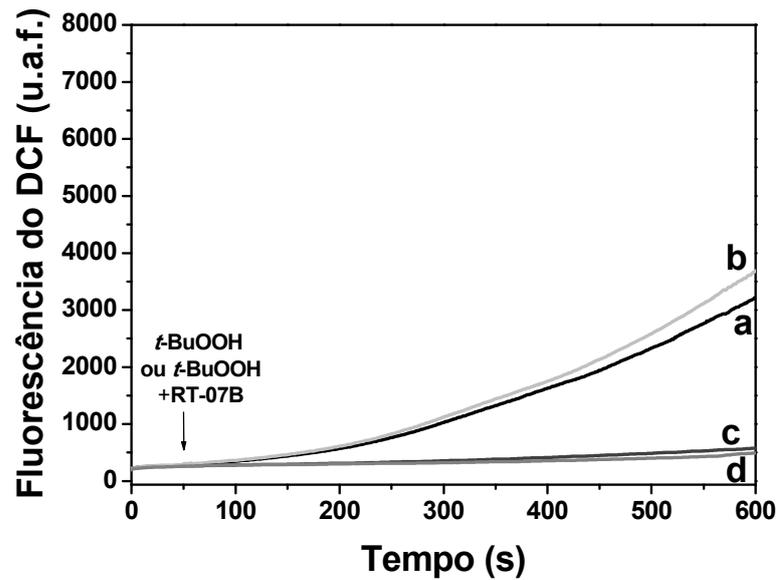


Figura 11. Efeito de RT-07B sobre a produção de EROs. Mitocondrias de fígado de rato (1 mg/mL) foram incubadas em meio padrão acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, CaCl_2 10 μ M e H_2DCFDA 0,8 μ M à 30 °C. *t*-BuOOH a 0,6 mM foi adicionado em 50 s (linha a), *t*-BuOOH com concomitante adição de RT-07B 50 μ M em 50 s (linha b), RT-07B 50 μ M em 50 s (linha c) e controle (linha d). Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

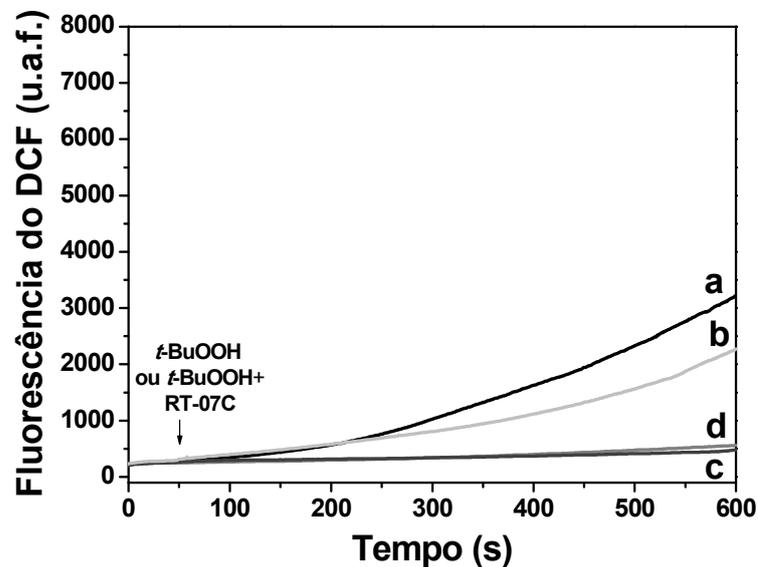


Figura 12. Efeito de RT-07C sobre a produção de EROs. Mitocondrias de fígado de rato (1 mg/mL) foram incubadas em meio padrão acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, CaCl_2 10 μ M e H_2DCFDA 0,8 μ M à 30 °C. *t*-BuOOH a 0,6 mM foi adicionado em 50 s (linha a), *t*-BuOOH com concomitante adição de RT-07C 50 μ M em 50 s (linha b), RT-07C 50 μ M em 50 s (linha c) e controle (linha d). Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

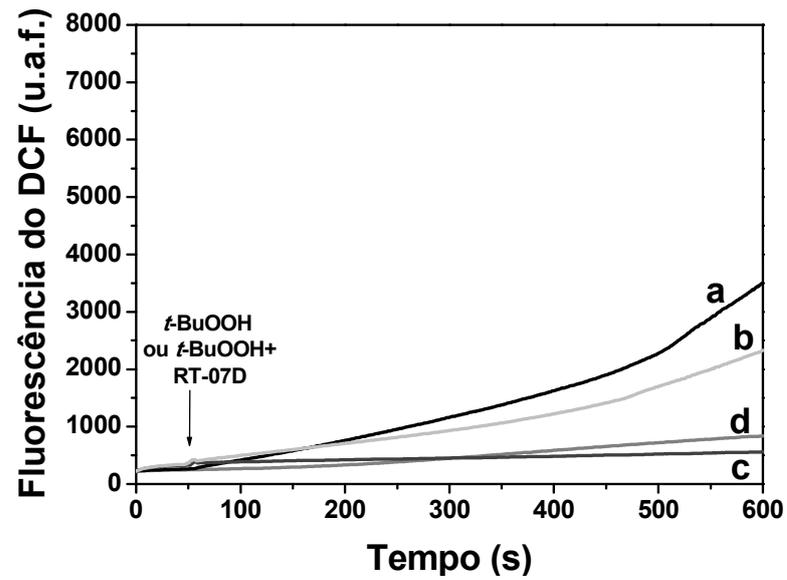


Figura 13. **Efeito de RT-07D sobre a produção de EROs.** Mitocôndrias de fígado de rato (1 mg/mL) foram incubadas em meio padrão acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μ M, CaCl_2 10 μ M e H_2DCFDA 0,8 μ M à 30 °C. *t*-BuOOH a 0,6 mM foi adicionado em 50 s (linha a), *t*-BuOOH com concomitante adição de RT-07D 75 μ M em 50 s (linha b), RT-07D 75 μ M em 50 s (linha c) e controle (linha d). Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

No que tange a fração lipídica mitocondrial, os compostos, quando incubados na presença dos pró-oxidantes $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ /citrato de sódio, mostraram-se inertes. RT-07A,B e D não protegeram e também não aumentaram o dano causado pelos pró-oxidantes (figuras 14A-C). O composto RT-07C não nos permitiu a visualização do efeito, pois este liga-se aos produtos de oxidação lipídica, em especial o MDA, nos fornecendo um resultado falso positivo. Os resultados reforçam a hipótese de que a abertura do PTP é causada principalmente pela oxidação de grupos SH de proteínas mitocondriais que os compostos realizam.

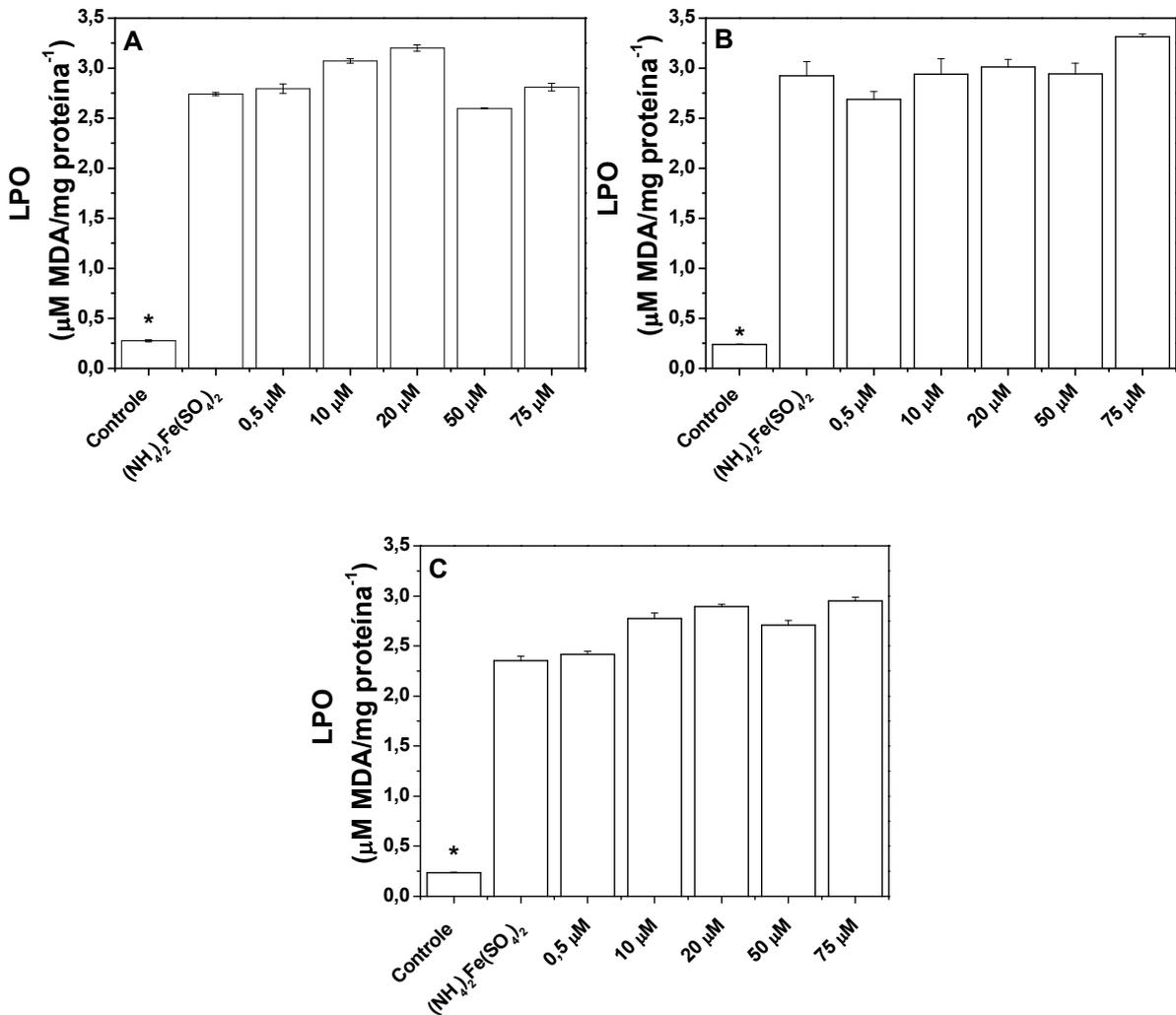


Figura 14A-C. Efeito de RT-07A, B ou D sobre a lipoperoxidação avaliada através da formação de MDA. Mitocondrias de fígado de rato (1 mg/ml) foram incubada em meio contendo KCl 130 mM e HEPES-KOH 10 mM pH 7,4 acrescido de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 µM por 15 minutos a 30 °C. RT-07A (figura 14A), RT-07B (figura 14B) e RT-07D (figura C) foram utilizados nas concentrações de 0,5, 10, 20, 50 e 75 µM com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ /Citrato de Sódio, nas concentrações de 50 µM e 2 mM, respectivamente. Os dados apresentados correspondem à média \pm d.p.m. de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. * Significativamente diferente do controle positivo, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$. ($p < 0,05$).

Corroborando com os resultados da dosagem de oxidação de lipídios, os testes para verificar se os compostos alteravam a fluidez de membrana mitocondrial mostraram que as teluranas são incapazes de causar qualquer efeito sobre a fração lipídica da membrana mitocondrial. Isto fica evidente pela falta de alteração na intensidade de fluorescência da sonda ANS após a adição dos compostos. Todos os organotelúricos (IV) RT-07 causaram a supressão da fluorescência da sonda, porém, após a queda na fluorescência, esta tende a se estabilizar denotando que não ocorreram alterações na fluidez na membrana mitocondrial. Os resultados podem ser vistos a seguir, nas figuras 15A-D.

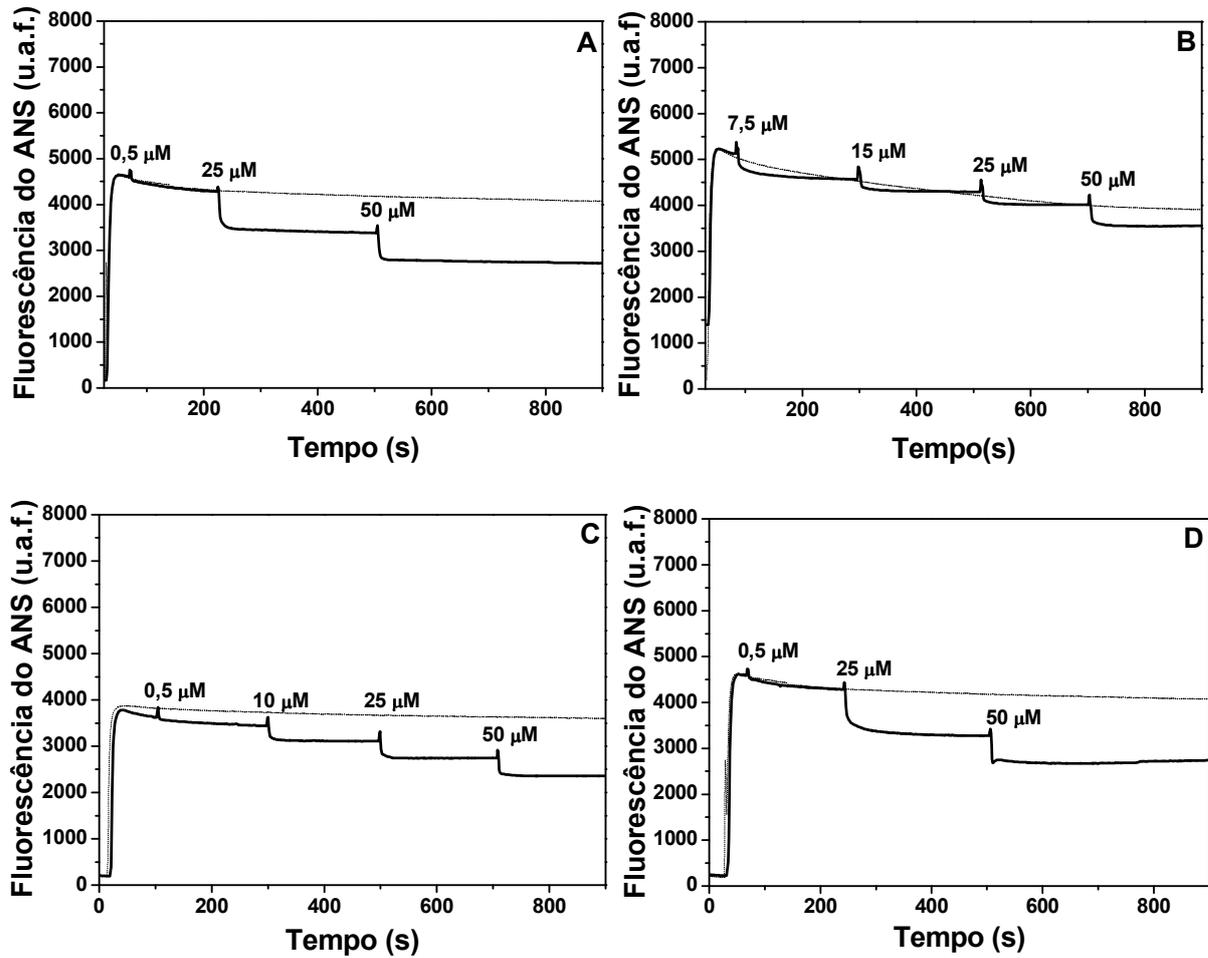


Figura 15A-D. Efeito de RT-07A, B, C ou D sobre a fluidez da membrana mitocondrial. Mitocôndrias (1 mg/ml) foram incubadas a 30°C em meio padrão contendo o desacoplador CCCP 1 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$, acrescido de ANS 75 μM . As figuras representam os efeitos de RT-07A (figura 15A), B (figura 15B), C (figura 15C) ou D (figura 15D), na fluorescência do ANS, em membrana mitocondrial: controle (linha tracejada), RT-07A nas concentrações de 0,5, 25 e 50 μM (linha cheia-figura 15A), RT-07B nas concentrações de 7,5, 15, 25 e 50 μM (linha cheia-figura 15B), RT-07C nas concentrações de 0,5, 10, 25 e 50 μM (linha cheia-figura 15C) e RT-07D nas concentrações de 0,5, 25 e 50 μM (linha cheia-figura 15D). Os dados apresentados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

Como teste final investigamos a possível toxicidade das teluranas para a mitocôndria, verificando se os compostos afetavam o controle respiratório mitocondrial. Tendo em vista a oxidação de grupos SH e o inchamento mitocondrial causado pelas teluranas, podíamos prever que as mesmas alterariam o controle respiratório mitocondrial, isto foi confirmado e verificamos que a ação dos compostos se concentra, quase completamente no estado 4 da respiração, aumentando de maneira significativa o consumo de oxigênio neste período da respiração e desta forma diminuindo o controle respiratório. Surpreendentemente para RT-07A e RT-07B a ação tóxica mostrou saturação em doses de telurana com a metade da concentração em que ocorreu a saturação do inchamento mitocondrial (figuras 16A e 16B, respectivamente), diferente do que ocorreu com RT-07C e RT-07D (figuras 16C e 16D, respectivamente).

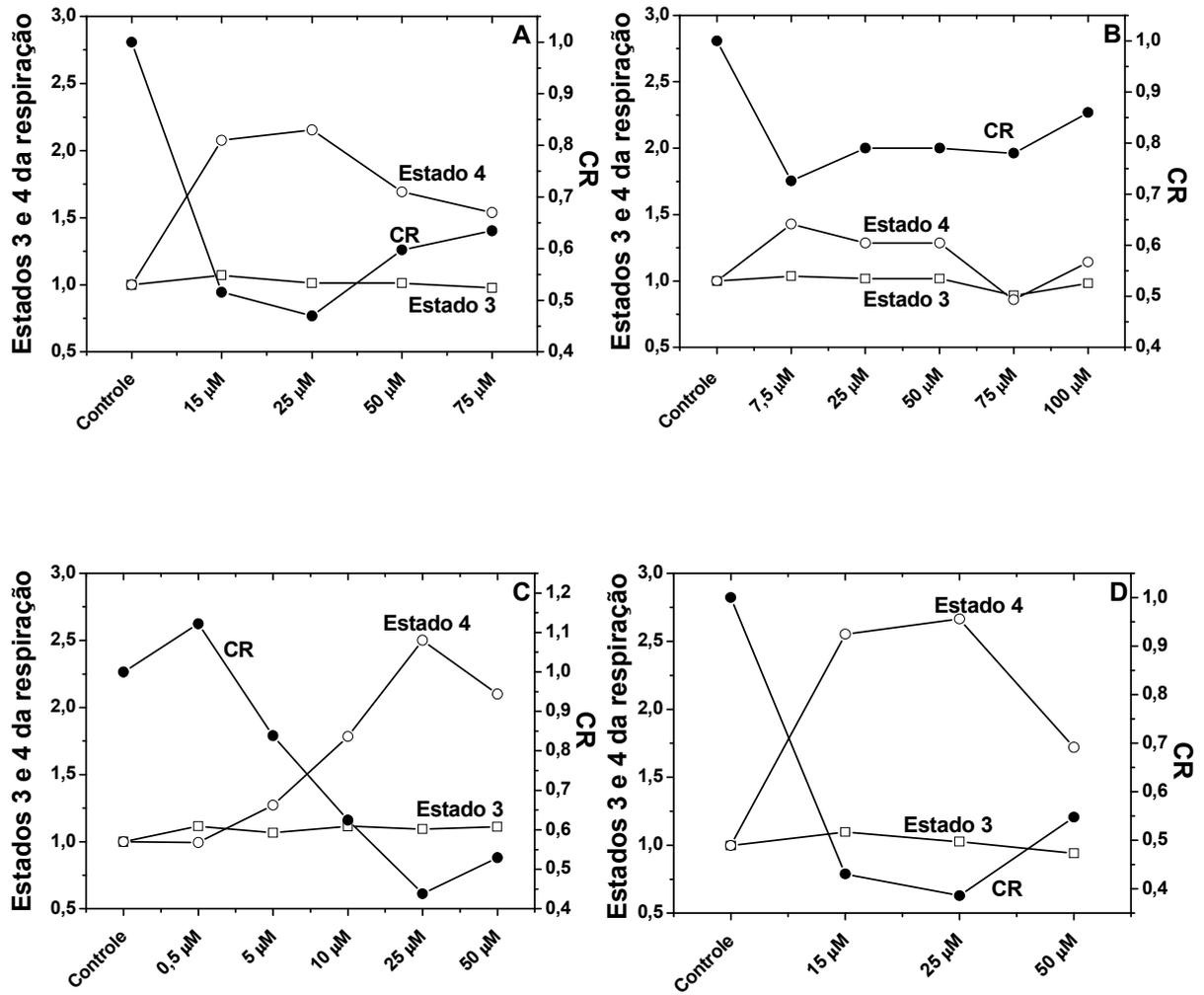


Figura 16A-D. Efeito da concentração de RT-07A, B, C ou D no CR de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Mitocôndrias de fígado de rato (1mg/ml) foram incubadas em meio padrão acrescido de EGTA 0,5 mM, K_2HPO_4 10 mM, succinato de potássio 5 mM e rotenona 2,5 μM a 30 °C. A velocidade do estado 3 (fosforilação) foi iniciada pela adição de ADP 400 nM, o estado 4 foi medido após o término da fosforilação. RT-07A foi usada a 15, 25, 50 e 75 μM (figura 16A), RT-07B a 7,5, 25, 50, 75 e 100 μM (figura 16B), RT-07C a 0,5, 5, 10, 25 e 50 μM (figura 16C) e RT-07D a 15, 25 e 50 μM (figura 16D). Os dados apresentados correspondem à média de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

5. DISCUSSÃO

Recentemente nosso grupo realizou estudo da ação de teluranas (RT-03 e RT-04) sobre a bioenergética mitocondrial, onde verificou-se a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) concomitante com uma atividade antioxidante (Pessoto *et. al.*, 2007). No trabalho mostrou-se que os compostos oxidavam proteínas mitocondriais formando agregados protéicos, porém, apresentavam poderosa atividade antioxidante para lipídios em concentrações nanomolares. No intuito de contribuirmos para a elucidação dos mecanismos de abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) e também de mostrarmos como as estruturas moleculares dos compostos podem modificar sua ação neste processo, utilizamos as teluranas (IV) RT-07, nomeadas de RT-07A, RT-07B, RT-07C e RT-07D. Para tanto uma comparação dos efeitos obtidos com RT-03 e RT-04 em relação aos efeitos obtidos com as teluranas RT-07 se faz necessário. As teluranas RT-07, foram capazes de causar a oxidação de grupos SH (figs.4A-D) em uma porcentagem de aproximadamente 60 % quando comparado ao controle, bem como a abertura do PTP como pode ser visto através do inchamento mitocondrial (figs. 5A-D) com concomitante queda no potencial de membrana da mitocondria (figura 8). As teluranas RT-07A/B/C/D mostraram saturação de efeito no inchamento mitocondrial nas respectivas concentrações: 50, 15, 25 e 25 μM . Podemos verificar que as teluranas (IV) RT-07 são menos eficientes na abertura do PTP quando fazemos a correlação dos resultados de oxidação de grupos SH, inchamento mitocondrial, perda de potencial de membrana e alteração do controle respiratório. Enquanto RT-03 e RT-04, em concentração de 20 μM , causa oxidação de aproximadamente 90 % do conteúdo total de grupos SH, como dito anteriormente, os compostos (IV) RT-07, nesta mesma concentração causaram somente 60 % de oxidação, o mesmo pode ser dito do inchamento mitocondrial, onde RT-03 e RT-04 causaram uma queda de aproximadamente 82 % da absorbância quando utilizados na concentração de 10 μM , enquanto a maior queda de absorbância observada para as teluranas (IV) RT-07 foi de 30% para RT-07C na concentração de 50 μM . RT-03 e RT-04 também causam maior perda de potencial de membrana e queda no controle respiratório quando comparados aos compostos (IV) RT-07. A abertura do poro causada pelas teluranas RT-07 acontece com a participação de ciclofilina D, pois a abertura realizada por estes compostos é inibida por CsA, esta última impede a abertura do poro ligando-se a CypD. A abertura é também dependente de Ca^{2+} em todos os casos, resultado que difere de RT-03 e

RT-04 que em concentrações acima de 10 μM são capazes de realizar a abertura de PTP não regulado, ou seja, que não é inibido por CsA e ocorre de forma independente de Ca^{2+} . Surpreendentemente, na ausência de Ca^{2+} , observamos queda de potencial de membrana, provavelmente a abertura do poro causada pelas teluranas (IV) RT-07 não seja totalmente dependente de Ca^{2+} . Postulamos que a reação das teluranas (IV) RT-07 com grupos tiólicos já seja suficiente para a abertura do poro causando a perda de potencial de membrana observada. Kowaltowski e Castilho (1997) demonstraram que na presença de Ca^{2+} extramitocondrial, a oxidofenilarsina (PhAsO), um reagente ditiol, aumentava sua reatividade com tíóis, causando maior inchamento mitocondrial e oxidação de grupos SH, como perspectiva futura iremos investigar de maneira mais minuciosa a participação do Ca^{2+} no mecanismo de abertura do PTP, verificando se diferentes concentrações de Ca^{2+} podem aumentar a reatividade dos compostos (IV) RT-07 sobre tíóis bem como causar maior inchamento mitocondrial, assim como investigar o papel do Ca^{2+} intramitocondrial na abertura de PTP. Cunha e colaboradores (2005) demonstraram inibição de cisteíno proteases por compostos de telúrio, em especial o composto organotelúrico (IV) 6, que possui apenas um átomo de cloro ligado ao átomo de telúrio. Neste estudo os resultados da cinética da enzima catepsina B condizem com uma reação bimolecular, onde a telurana reage com dois grupos SH, inibindo a ação da enzima. As teluranas RT-07 possuem em sua estrutura, ligadas aos átomo de telúrio, 3 átomos de cloro, estes quando em solução podem ser trocados por H_2O permitindo a reação do telúrio com grupos SH, nós postulamos que a menor reatividade dos compostos com SH, bem como a menor capacidade de causar inchamento da mitocôndria se deve a estas diferenças estruturais existentes entre os compostos, tendo em vista que RT-03 e RT-04 também possuem um menor número de átomos de cloro ligado ao telúrio, um para RT-03 e dois para RT-04, mesmo entre RT-03 e RT-04 podemos notar diferenças de reatividade, onde sendo RT-03 se mostrou mais reativo.

Posteriormente será realizado um gel de SDS-PAGE para verificar se as teluranas (IV) RT-07 são capazes de causar a formação de agregados protéicos, assim como RT-03 e RT-04 causaram. As teluranas (IV) RT-07 não causaram depleção de GSH mitocondrial de forma significativa (figura 9), isto nos indica que os compostos (IV) RT-07 atuam preferencialmente sobre grupos SH de proteínas de membrana preservando as proteínas solúveis da matriz. Diferente dos compostos RT-03 e RT-04, que causam significativa depleção de GSH mitocondrial, atuando como peroxidases quando incubadas na concentração de 10 μM (Pessoto *et. al.*, 2007). Com relação a geração de EROs (Figuras 10-13), deve-se observar que as teluranas (IV) RT-07 foram utilizadas em concentrações maiores que as de saturação para

inchamento mitocondrial, logo, devemos realizar novos estudos utilizando as concentrações saturantes de inchamento, tendo em vista que RT-03 e RT-04 causavam diminuição significativa na geração de EROS na concentração de 10 μM , concentração esta que causa significativo inchamento mitocondrial. Outro resultado importante é que os compostos RT-07 se mostraram inertes com relação a porção lipídica da membrana mitocondrial, tendo em vista que não protegem a mesma do ataque de pró-oxidantes (Figuras. 14A-D) bem como não aumentam a fluorescência da sonda ANS (Figuras. 15A-D). O efeito sobre o estado 4 da respiração mitocondrial (Figuras. 16A-D) pode ser explicado então, unicamente pela alteração causada na reação dos compostos com grupos SH de proteínas, que levam a formação do PTP e por consequência a perda do potencial de membrana e por fim o desacoplamento da cadeia respiratória com a fosforilação oxidativa, com isso aumenta o consumo de oxigênio pela mitocôndria, sendo este aumento visualizado pelo aumento do consumo no estado 4.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

As teluranas (IV) RT-07 causam oxidação de grupos SH, queda de potencial de membrana, inchamento mitocondrial e por consequência abertura do PTP, sendo esta abertura regulada por CsA e dependente de Ca^{2+} , bem como por agentes protetores ou redutores (NEM e DTT, respectivamente).

O papel do Ca^{2+} sobre a abertura do PTP causada pelos compostos (IV) RT-07 ainda não está bem esclarecida.

A abertura do PTP se dá exclusivamente pelos danos causados as proteínas mitocondriais, pois os compostos não causaram danos a fração lipídica da mitocondria.

Os compostos não afetaram GSH mitocondrial de maneira significativa, mostrando que estes atuam principalmente sobre proteínas de membrana.

Os compostos possuem menor reatividade com grupos SH quando comparados co RT-03 e RT-04, provavelmente em função da sua estrutura molecular causar um impedimento estérico, que inviabiliza a ligação do átomo de telúrio a um segundo grupo SH.

Os compostos RT-07 têm efeito sobre respiração mitocondrial, alterando quase que exclusivamente o consumo de oxigênio no estado 4 da respiração, causando uma queda no controle respiratório mitocondrial, decorrência da abertura do PTP.

REFERÊNCIAS

ÄKERMAN, K.E.O. & WIKSTRÖM, M.K.F. – Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.** v.68, p.191–197, 1976.

ALBECK A.; WEITMAN H.; SREDNI B.; ALBECK M.- Tellurium compounds: Selective inhibition of cysteine proteases and model reaction with thiols. **Inorg. Chem.** v.37, p.1704-1712, 1998.

BERNARDI, P.; BROEKEMEIER, K.M.; PFEITFER D.R. – Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v.26, p.509-517, 1994.

BERNARDI, P. – The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1275, p.5–9, 1996.

BERNARDI, P.; BASSO, E.; COLONNA, R.; COSTANTINI, P. Di LISA, F.; ERIKSSON, O.; FONTAINE, E.; FORTE, M.; INCHAS, F.; MASSARI, S.; NICOLLI, A., PETRONILLI, V.; SCORRANO, L. – Perspective on the mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1365. p. 200-206, 1998.

BOVERIS, A. & CHANCE, B. – The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v.134, p.707–716, 1973.

BUEGE, J.A. & AUST, S.D. – Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.** v.52C, p.302–310, 1978.

BUXTON, G.V.; GREENSTOCK, C.L.; HELMAN, W.P.; ROSS, A.B. – Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms, and hydroxyl radicals in aqueous solution. **J. Phys. Chem.**, v.17, p.513-886, 1988.

CAIN, K. & SKILLETER, D.N. – Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: Snell, K.; Mullock, B. (Ed.). **Biochemical Toxicology**, Oxford: IRL Press, p.217–254, 1987.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Cap. XII. **EUTHANASIA**. In: **Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Canadian Council on Animal Care (CCAC)**, v.1, 1993. (www.ccac.ca).

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. – Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondrial. **Free Rad. Biol. Med.**, v.18, p.479-486, 1995.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. – The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v.28, p.61–67, 1996.

CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. – The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.** 17: 65–134, 1956.

CILENTO, G.; ADAM, W. – From free radicals to electronically excited species. **Free Rad. Biol. Med.**, v.19, p.103-114, 1995.

CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. – Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem. J.**, v.255, p.357-360, 1988.

CUNHA, R.L.O.R.; URANO, M.E.; CHAGAS, J.R.; ALMEIDA, P.C.; BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I.L.S.; COMASSETO, J.V. - Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v.15, p.755–760, 2005.

EMAUS, R.K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J.J. – Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta**, v.850, p.436–448, 1986.

FAGIAN M.M.; PEREIRA-DA-SILVA L.; MARTINS I.S.; VERCESI A.E.- Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.19955–19960, 1990.

GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K.; SHEU, S.-S.; GAVIN, C. E. – Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, v.36, p.C313– C339, 1994.

HALESTRAP, A.P. – The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. **Biochem. Soc. Symp.**, v.66, p.181-203, 1999.

HATEFI, Y. – The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Ann. Rev. Biochem.**, v.54, p.1015–1069, 1985.

HE L. AND LEMASTERS J.J. – Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function. **FEBS Lett.**, v.512, p.1-7, 2002.

HISSIN, P .J.; HILF, R. – A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, v.74, p.214–226, 1976.

HOEK, J.B.; RYDSTROM, J. – Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochem. J.**, v.254, p.1-10, 1988.

JOCELYN, P.C. – Spectrophotometric assay of thiols. **Meth. Enzymol.**, v.143, p.44–67, 1987.

KIM J.S.; HE L.; LEMASTERS J.J. - Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.304, p.463–470, 2003.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F. – Ca^{2+} acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide. **Bioch. Et Bioph. Acta.**, v.1322, p.221-229, 1997.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. – Mitochondrial damage induce by conditions of oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.**, v.26, p.463–471, 1999.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F. AND VERCESI; A.E. – Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v.495, p.12-15, 2001.

LEE, J., YU, B.P. AND HERLIHY, J.T. – Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. **Free Radic. Biol. Med.**, v.26, p.260-265, 1999.

LEMASTERS, L.L.; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEN, A.L.; HERMAN, B. – Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death hepatocytes. **Nature**, v.325, p.78–81, 1987.

LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A.L.; QIAN, T.; TROST, L.C.; ELMORE, S.P.; NISHIMURA, Y.; CROWE, R.A.; CASCIO, W.E.; BRADHAM, C.A.; BRENNER, D.A.; HERMAN, N. – The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1366, p.177–196, 1998.

LITHGOW, J.K.; HAYHURST, E.J.; COHEN, G.; AHARONOWITZ, Y.; FOSTER, S.J. – Role of a cysteine synthase in staphylococcus aureus. **J. Bacter.**, v.186, p.1579–1590, 2004.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; UNG, S.; TURNER, R.J. – In vivo ^{31}P nuclear magnetic resonance investigation of tellurite toxicity in escherichia coli. **Appl. Environ. Microbi.**, v.70, p.7342–7347, 2004.

MACIEL, E. N.; VERCESI A. E. AND CASTILHO R. F. – Oxidative stress in Ca^{2+} -induced membrane permeability transition in brain mitochondria. **Journal of Neurochemistry**, v.79, p.1237-1245, 2001.

NELSON, D.L.; COX, M.M. – Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. (Ed.). **Lehninger Princípios de bioquímica**, 3 ed. New York: Worth Publishers, 2002, cap.19, p.515-539.

NICHOLLS, D.G. & ÄKERMAN, K.E.O. – Mitochondrial calcium transport. **Biochim. Biophys. Acta**, v.683, p.57–88, 1982.

NOGUEIRA C.W.; MACIEL E.N.; ZENI G.; GRAÇA D.; ROCHA J.B.T. - Biochemical toxicology of simple diorganyl chalcogenides. **Fifth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry**, <http://www.mdpi.org/ecsoc-5.htm>, 2001

PESSOTO, F. S.; FARIA, P. A.; CUNHA, R. L. O.R ; COMASSETO, J. V.; RODRIGUES, T. ; NANTES, I. L. Organotellurane-Promoted Mitochondrial Permeability Transition Concomitant with Membrane Lipid Protection against Oxidation. **Chemical Research in Toxicology**, v.1, p.1-9, 2007

PFEIFFER, D.R.; GUDZ, T.I.; NOVGORODOV, S.A.; ERDAHL, W.L. – The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.4923-4932, 1995.

SCHNEIDER, W.C. & HOGEBOOM, G.H. – Intracellular distribution of enzymes. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. **J. Biol. Chem.**, v.183, p.123–128, 1950.

SLAVIK, J. – Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v.694, p.1-25, 1982.

SULLIVAN, P. G.; DRAGICEVIC, N. B.; DENG, J.; BAI, Y.; DIMAYUGA, E.; DING, Q.; CHEN, Q.; BRUCE-KELLER, A. J.; AND KELLER, J. N.; - Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover. **J. Biological Chemistry**, v.279, p.20699-20707, 2004.

SWEARINGEN JR., J.W. - Identification of organo-tellurium and organo-selenium compounds in the headspace gases above genetically modified *Escherichia coli* amended with tellurium and selenium salts. **Thesis of the Master of Science (Chemistry)**, August, 2005, Sam Houston State University, Huntsville, Texas.

TURRENS, J.F. – Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosc. Rep.**, v.17, p.3–8, 1997.

VERCESI, A.E. – Dissociation of NAD(P)⁺-stimulated mitochondrial Ca²⁺ efflux from swelling and membrane damage. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.232, p.86-91, 1984a.

VERCESI, A.E. – Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)⁺-stimulated Ca²⁺ efflux from mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.119, p.305-310, 1984b.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. – Electron transport and oxidative phosphorylation. In: Voet, D.; Voet, J.G. (Ed.). **Biochemistry**, 2ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998, p.492-528.

ZAKOWSKI, J.J. & TAPPEL, A.L. – Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, v.526, p.65–76, 1978.

ZENI, G.; CHIEFFI, A.; CUNHA, R. L. O. R.; STEFANI, H. A.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; COMASSETO, J. V. – Addition reaction of p-methoxyphenyltellurium trichloride to 3- hydroxy alkynes. **Organometallics**, v.18, p.803-806, 1999.

ZORATTI, M. & SZABÓ, I. – The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1241, p.139–176, 1995.

<http://statpages.org/anova1sm.html>

<http://graphpad.com/quickcalcs/posttest1.cfm>

Anexo A

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – UMC

Título: "ESTUDO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS ORGANOTELÚRICOS (IV) RT-07 SOBRE A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL"

Protocolo: 020/2009

Natureza do Pedido: Pesquisa

Departamento: CIIB

Pesquisadora Responsável: Prof^a. Iseli Lourenço Nantes (Doutora)

Autor: César Henrique Yokomizo

Resumo

O projeto proposto tem como objetivo verificar a ação de compostos organotelúricos RT-07 (IV) sobre diversos parâmetros bioenergéticos, tais como, consumo de oxigênio mitocondrial, oxidação de grupos SH (Sulfidril) de proteínas, geração de radicais livres, etc, aferidos com administração dos compostos diretamente em mitocôndrias extraídas de fígado de ratos Winstar.

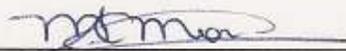
Parecer

A seleção, alojamento e manipulação estão adequados aos princípios bioéticos na utilização de animais em experimentação. O número de animais é adequado para o tipo de trabalho proposto.

Conclusão

Projeto aprovado *ad referendum*.

Mogi das Cruzes, 12 de novembro de 2009.



Prof^a. Maria Santina de Castro Morini
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade de Mogi das Cruzes - UMC

Título: "ESTUDO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS ORGANOTELÚRICOS (IV) RT-07 SOBRE A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL"

Protocolo: 020/2009

Natureza do Pedido: Pesquisa

Departamento: CIIB

Pesquisadora Responsável: Prof^a. Iseli Lourenço Nantes (Doutora)

Autor: César Henrique Yokomizo

Resumo

O projeto proposto tem como objetivo verificar a ação de compostos organotelúricos RT-07 (IV) sobre diversos parâmetros bioenergéticos, tais como, consumo de oxigênio mitocondrial, oxidação de grupos SH (Sulfidril) de proteínas, geração de radicais livres, etc, aferidos com administração dos compostos diretamente em mitocôndrias extraídas de fígado de ratos Wistar.

Parecer

A seleção, alojamento e manipulação estão adequados aos princípios bioéticos na utilização de animais em experimentação. O número de animais é adequado para o tipo de trabalho proposto.

Conclusão

Projeto aprovado.

Mogi das Cruzes, 23 de Novembro de 2009.



Prof^a. Maria Santina de Castro Morini
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade de Mogi das Cruzes - UMC

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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