



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Efeitos da Carbamazepina, Homocisteína e Homocisteína Tiolactona na Bioenergética e Permeabilidade Transitória Mitocondrial

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Petronila Rocha Pereira (Universidade da Beira Interior) e do Professor José B. A. Custódio (Universidade de Coimbra).

Tiago Costa Capote

Covilhã, 2009

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia e no Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNBC), da Universidade de Coimbra sob orientação do Professor Doutor José B. A. Custódio e da Professora Doutora Maria Petronila Rocha Pereira.

Publicações e comunicações científicas resultantes de trabalhos nos quais colaborou durante o período de realização do mestrado.

Artigos científicos

Custódio, J. B. A, Ribeiro, M. V., Silva, F. S. G., **Capote, T., C.**, Marques, R. J. F, Machado, M., Sousa M. C. (2009). Effects of p-cymene on bioenergetic functions of rat liver mitochondria. *Toxic. In Vitro*, "in press".

Marques, R. J. F., Fernandes, M. A. S., Vicente, J. A. F., Santos, M. S., **Capote, T. C.**, Moreno, A. J. M., Custódio, J. B. A. (2009). Ischemia and reperfusion-induced mitochondrial damage: Effects of sildenafil. *Mitochondrion*, "to be submitted".

Trabalhos apresentados em Congressos científicos:

Comunicações orais:

Capote, T. C., Silva, F. S. G., Marques, R. J. F., Rocha-Pereira, P., Custódio, J.B.A. *Effect of carbamazepine, homocysteine, homocysteine tiolactone in the mitochondrial permeability transition pore opening*. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, XXVI Reunião Anual de Farmacologia Clínica e VIII Reunião de Toxicologia. 3-5 December, 2008. Faculty of Medicine, University of Lisboa.

Marques, R. J.F., Fernandes, M. A. S, **Capote, T. C.**, Santos, M. S., Moreno, A. J. M., Custódio, J. B. A. *Sildenafil Citrate effects in cardiac reperfusion injury mitochondria*. Mitochondria: Between Life and Death - International Courses on Toxicology 2009. May 5-8, 2009. Center for Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra.

Comunicações em forma de poster:

Capote, T. C., Marques, R. J. F., Rocha-Pereira, P., Custódio, J.B.A. *Toxicological effects of carbamazepine and homocysteine in liver and heart mitochondria*. Mitochondria: Between Life and Death - International Courses on Toxicology 2009. May 5-8, 2009. Center for Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra.

Agradecimentos

Agradeço, ao Professor Doutor José B. A. Custódio pela orientação deste trabalho, forma como me acolheu, ensinou e transmitiu os seus conhecimentos ao longo deste mestrado e pelo modo crítico como efectuou a revisão do presente texto.

À Professora Doutora Maria Petronila Rocha Pereira agradeço toda a orientação, apoio, conselhos e amizade ao longo do trabalho.

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa por toda a alegria e entusiasmo que transmitiu em todos os momentos.

À Professora Doutora Leonor Almeida por toda a prontidão e disponibilidade.

Ao Ricardo, companheiro de escrita e discussão.

Aos colegas do grupo de toxicologia mitocondrial do CNBC, da Universidade de Coimbra, pela amizade e boa disposição durante as horas laboratoriais.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo companheirismo.

Aos amigos, aqueles amigos! Vocês sabem quem são!

E por fim, aos meus pais, irmã e família pelos conselhos e carinho a que sempre me habituaram. Tudo o que sou hoje é vossa obra! Muito, muito obrigado. Por tudo!

Índice

Abreviaturas	IX
Resumo	1
Abstract	3
Introdução	5
1. A carbamazepina e a hiperhomocisteinémia	6
2. Homocisteína	9
2.1. Metabolismo da homocisteína	9
2.1.1.O ciclo de metilação.....	9
2.1.2. A via da transsulfuração.....	13
2.2. A homocisteína e as doenças cardiovasculares	14
2.3. Derivados da homocisteína que ocorrem no organismo humano.....	14
3. A mitocôndria	18
3.1. Estrutura e bioenergética	18
3.2. Teoria quimiosmótica	23
4. A mitocôndria e a homeostase do cálcio	25
5. O stress oxidativo e a mitocôndria	27
6. A permeabilidade transitória mitocondrial	31
6.1. Regulação/Indução da permeabilidade transitória mitocondrial	33
6.1. 1. Consequências da abertura do poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial.....	33
6.1.2. Estrutura e regulação abertura/fecho do poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial.....	34
6.2. A permeabilidade transitória mitocondrial na morte celular.	36

Objectivo do trabalho	38
Materiais e Métodos	39
1. Reagentes	40
2. Isolamento d e mitocôndrias	40
2.1. Isolamento de mitocôndrias de fígado.....	41
2.1. Isolamento de mitocôndrias de coração.....	42
3. Determinação do conteúdo proteico na fracção mitocondrial pelo método do biureto.	43
4. Efeitos da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na bioenergética mitocondrial	44
4.1. Avaliação da actividade respiratória mitocondrial por determinação do consumo de oxigénio	44
4.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	46
5. Influência da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na permeabilidade transitória mitocondrial.	48
5.1. Avaliação da permeabilidade transitória mitocondrial por determinação do potencial de membrana mitocondrial.....	48
5.2. Avaliação da permeabilidade transitória mitocondrial por fluorimetria.....	49
6. Avaliação dos efeitos da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na fluidez membranar, por polarização de fluorescência	51
7. Estudo estatístico	53
Resultados	54

1. Efeitos da carbamazepina na bioenergética e na permeabilidade transitória de mitocôndrias hepáticas e cardíacas	55
2. Efeitos da DL-homocisteína na bioenergética e na permeabilidade transitória de mitocôndrias hepáticas e cardíacas	67
3. Efeitos da L-homocisteína tiolactona na bioenergética e na permeabilidade transitória de mitocôndrias hepáticas e cardíacas	78
4. Efeitos da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na fluidez membranar	89
Discussão e Conclusão	94
Bibliografia	99

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosina 5' - difosfato
ADP/O	Razão entre as nanomoles de ADP fosforiladas e os nanoátomos de oxigénio consumidos
AEDs	Fármacos anti-epilépticos (do inglês, <i>anti-epileptic drugs</i>)
AIF	Factor indutor de apoptose
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BHMT	Betaína homocisteína metiltransferase
BSA	Albumina bovina sérica
CBS	Cistationina β -sintase
CBZ	Carbamazepina
Cit. c	Citocromo <i>c</i>
CL	Cardiolipina
CyA	Ciclosporina A
Cyp-D	Ciclofilina D
Cys	Cisteína
DL-Hcy	Mistura racémica de homocisteína
$\Delta\Psi$	Potencial eléctrico transmembranar
Δp	Força protomotriz
$\Delta p\text{H}$	Gradiente de pH
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
Endo G	Endonuclease G
F₁	Subunidade catalítica da ATP sintase
FADH₂	Dinucleótido de flavina adenina (forma reduzida)

FCCP	Carbonildiciano- <i>p</i> -trifluoro-metoxifenil-hidrazona
F₀	Subunidade da ATP sintase
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona
Hcy	Homocisteína
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hepes	Ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanossulfónico
HK	Hexocinase
HTL	Homocisteína tiolactona
ICR	Índice de controlo respiratório
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
L-HTL	Isómero L da homocisteína tiolactona
Lys	Lisina
λ	Comprimento de onda
IMM	Membrana interna mitocondrial
MAO	Monoamina oxidase
MAT	Metionina adenosil-transferase
metil-THF	Metiltetrahidrofolato
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
MetRS	metionil-tARN sintetases
Mops	ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfónico
MS	Metionina sintase
MT	Metil transferase
MPT	Permeabilidade transitória mitocondrial
mtADN	ADN mitocondrial
MTHFR	Tetrahidrofolato redutase
mtPTP	Poros responsáveis pela permeabilidade transitória mitocondrial (do inglês, <i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma oxidada)

NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma reduzida)
NADP⁺	Dinucleótido de fosfato de nicotinamida adenina (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de fosfato de nicotinamida adenina (forma reduzida)
nAtg	Nano átomos grama
O₂⁻	Anião superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
OMM	Membrana externa mitocondrial
P	Polarização de fluorescência
PBR	Receptor de benzodiazepina periférico
P_i	Fosfato inorgânico
pmf	Força protomotriz
PN	Nucleótidos de piridina
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SAM	S-adenosilmetionina
SAH	S-adenosilhomocisteína
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Smac/Diablo	Proteína pro-apoptótica (do inglês, <i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>)
TH	Transhidrogenase
tHcy	Homocisteína total
TPx	Tioredoxina Peroxidase
TPP⁺	Catião tetrafenilfosfónio
Tris	Tris-hidroximetilaminoetano
TSH	Tioredoxina
Ub	Ubiquinona
UCPs	Proteínas dissociadoras (do inglês, <i>uncoupling proteins</i>)
VDAC	Canal aniónico dependente da voltagem

Resumo

A carbamazepina é dos fármacos mais prescritos no tratamento da epilepsia. Nos últimos anos diversos estudos têm demonstrado alguns efeitos secundários deste fármaco, nomeadamente hepatotoxicidade. Adicionalmente, as terapias com carbamazepina estão também associadas à hiperhomocisteinémia e a doenças cardiovasculares. No entanto, os mecanismos responsáveis por estes efeitos não estão completamente elucidados. Neste trabalho estudámos os efeitos toxicológicos da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona, um derivado da homocisteína potencialmente tóxico, em mitocôndrias de fígado e de coração de rato, no sentido de esclarecer os distúrbios hepáticos e cardiovasculares observados em doentes sujeitos à terapêutica com carbamazepina

Nas concentrações estudadas, a carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona não afectam os parâmetros da bioenergética de mitocôndrias hepáticas. No entanto, os estudos realizados no sentido de avaliar o efeito destas moléculas na indução da permeabilidade transitória mitocondrial dependente de Ca^{2+} demonstram que a carbamazepina (20 nmol/mg proteína), a homocisteína (1,2 $\mu\text{mol/mg}$ proteína) e a homocisteína tiolactona (0,8 $\mu\text{mol/mg}$ proteína) têm capacidade para induzir a abertura do poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial. Estudos idênticos foram realizados em mitocôndrias de coração de rato. À semelhança dos efeitos observados ao nível das mitocôndrias hepáticas, os compostos em estudo não afectam os parâmetros avaliados na bioenergética mitocondrial. Contudo, ao nível da permeabilidade transitória mitocondrial não parecem ter qualquer efeito indutor. Assim, os resultados demonstram que estas moléculas têm efeitos diferentes nas mitocôndrias de fígado e coração em termos de homeostase do Ca^{2+} , não afectando no entanto, os níveis energéticos.

No sentido de esclarecer os diferentes efeitos observados ao nível da permeabilidade transitória mitocondrial, avaliou-se ainda o efeito da interacção da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona com bicamadas de fosfolípidos. No entanto, os estudos efectuados em lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina não demonstram que os diferentes efeitos observados nos dois tipos de mitocôndrias estejam relacionados com a sua diferente composição fosfolipídicas.

Em conclusão, a carbamazepina, a homocisteína e a homocisteína tiolactona, mostram ter um efeito tóxico em mitocôndrias hepáticas, o que pode explicar em parte, o efeito hepatotóxico

associado à CBZ. No entanto, as moléculas não parecem exercer qualquer toxicidade em mitocôndrias cardíacas, pelo que os efeitos associados à hiperhomocisteinemia induzida por terapêuticas com este fármaco não parecem estar relacionados com a disfunção deste organelo nos cardiomiócitos.

Abstract

Carbamazepine is one of the most prescribed anti-epileptic drugs. Recently, several studies reported some side effects of this drug, including hepatotoxicity. Therapies with carbamazepine are also associated with hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. However, the mechanisms underlying this condition are poorly understood. In this work we studied the mitochondrial toxicological effects of carbamazepine, homocysteine and homocysteine-tiolactone, a potential toxic homocysteine metabolic derivate, in attempt to explain the hepatic and cardiovascular disturbs observed in patients under carbamazepine therapy.

The used concentrations of carbamazepine, homocysteine and homocysteine-tiolactone do not affect mitochondrial bioenergetics parameters of rat liver mitochondria. However studies in Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition demonstrated that carbamazepine (20 nmol/mg protein), homocysteine (1,2 $\mu\text{mol/mg}$ protein) and homocysteine-tiolactone (0,8 $\mu\text{mol/mg}$ protein) stimulates the MPT pore opening. Identical studies were performed in rat heart mitochondria and the different compounds do not affect the mitochondrial bioenergetics parameters. Moreover, those compounds were not able to promote mitochondrial permeability transition pore opening in contrast to the observed in rat liver mitochondria. Therefore, the results show that these compounds affect in different ways hepatic and heart mitochondria inducing mitochondrial pore opening in liver but not in heart mitochondria.

These findings demonstrate a different toxicological action of the compounds in liver mitochondria, suggesting that their interaction with the permeability transition pore and their distribution in mitochondrial membranes may be different. In attempt to explain these different effects in heart and liver rat mitochondria, we also initiate studies to evaluate the interaction of the compounds with phospholipid bilayers. However, the studies made in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes do not show that the different effects observed between the two types of mitochondria have been related with their different phospholipid composition.

In conclusion, carbamazepine, homocysteine and homocysteine-tiolactone demonstrate a toxicological effect in liver mitochondria. However, this effect is not observed in cardiac mitochondria. For this reason, the carbamazepine therapy and the associated

hyperhomocysteinemia may be involved in hepatotoxicity, although the cardiovascular effects seem to be not related with toxicological effects in heart mitochondria.

1. A carbamazepina e a hiperhomocisteinemia

A carbamazepina (CBZ) é um dos fármaco antiepilépticos mais utilizados no tratamento da epilepsia, tendo-se mostrado bastante eficaz no tratamento da primeira linha de crises parciais simples ou complexas, tónico-clónicas e ataques generalizados em crianças e adultos que sofrem desta patologia (Al-Waili *et al.*, 2006). A CBZ (Fig.1) é incluída na classe dos derivados da carboxamida e usada para tratar uma variedade de condições patológicas, desde a epilepsia a espasmos musculares e nevralgias do trigémeo, sendo também prescrita como calmante do sistema nervoso central devido às suas propriedades anti-colinérgicas (Al-Waili *et al.*, 2006; Staines *et al.*, 2004).

Este fármaco é um composto heterocíclico constituído por 3 anéis, derivado do iminostilbeno e possui um grupo carboxil no anel central, essencial para a sua acção antiepiléptica (Al-Waili *et al.*, 2006).

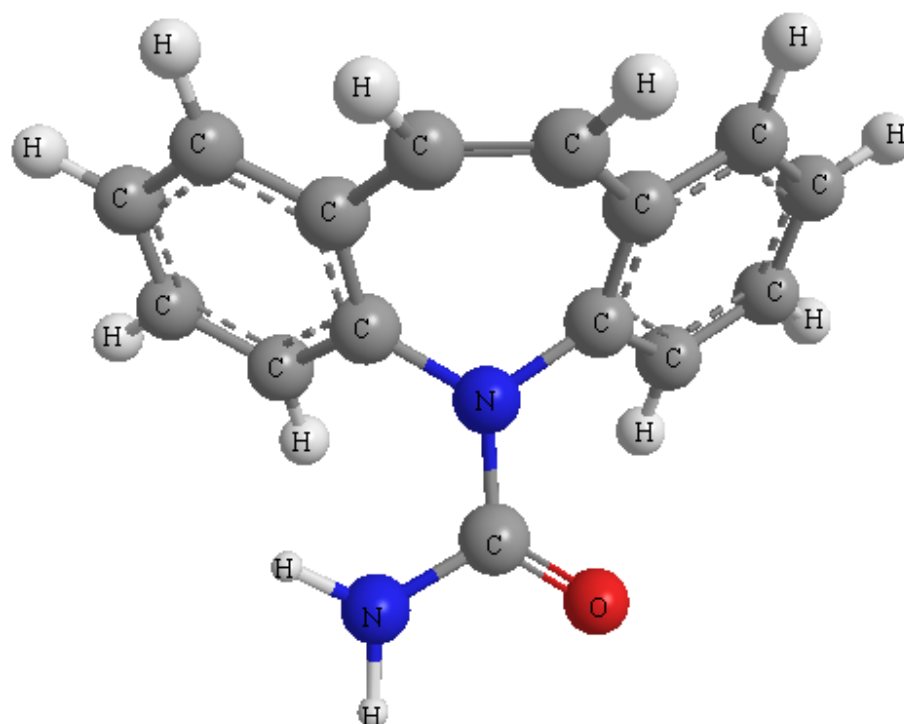


Fig. 1 – Estrutura química da carbamazepina geradas pelo software ChemBioDraw Ultra 11.0.

A carbamazepina induz a sua própria metabolização (auto-indução), que se inicia cerca de vinte e quatro horas após o início da terapia e é completada após três a cinco semanas de ter sido terminado o tratamento. Porém, quando a terapêutica é acompanhada por outros fármacos antiepilépticos estes também poderão induzir o seu metabolismo (hetero-indução) (Ahmed and Siddiqi, 2006). A metabolização da carbamazepina é complexa e tem sido amplamente estudada em modelos humanos e animais, tendo sido identificados mais de trinta metabolitos. Sendo metabolizada maioritariamente no fígado pelo citocromo P450 (CYP 3A4), o principal metabolito farmacologicamente activo é a carbamazepina-10,11-epóxido. Este metabolito sofre biotransformação dando origem ao derivado trans-10,11-dihidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina e ao respectivo glucoronídeo biologicamente inactivo que é eliminado na urina (Fagiolino *et al.*, 2006). Um dos metabolitos minoritários da carbamazepina é o 2-hidroxi-carbamazepina. Este pode ser metabolizado a iminoquinona que, devido ao seu potencial de reactividade, poderá ser o responsável pelo aparecimento de reacções idiossincráticas tais como, alterações a nível sanguíneo, erupções cutâneas e hepatite (Staines *et al.*, 2004).

O mecanismo de acção da CBZ não se encontra totalmente esclarecido e é atribuído à inibição dos canais de sódio dependentes de voltagem, podendo reduzir o fluxo de cálcio celular. Desta forma é importante estudar a acção deste anti-epiléptico ao nível dos mecanismos mitocondriais envolvidos na homeostase do Ca^{2+} . A carbamazepina é ainda um potenciador da acção do GABA, que é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro e inibe a geração de potenciais de acção, tornando os episódios epilépticos menos prováveis (Landmarck, 2007).

As características farmacocinéticas da CBZ são complexas e influenciadas pela sua baixa solubilidade em meio aquoso e pela capacidade de aumentar a sua conversão hepática em metabolitos activos. A carbamazepina é absorvida quase completamente a partir da administração oral, mas de forma relativamente lenta, obtendo-se concentrações plasmáticas máximas decorridas doze horas após a toma de doses orais únicas. As concentrações plasmáticas atingem um estado de equilíbrio dinâmico após uma a duas semanas, dependendo do nível de auto-indução, hetero-indução, posologia e duração da terapêutica. A semi-vida plasmática da CBZ é de aproximadamente trinta e seis horas após uma dose oral única, enquanto que numa terapêutica passa a ser de dezasseis a vinte e quatro horas, devido às suas propriedades auto-indutoras. No caso de indivíduos a receber tratamento concomitante com outros fármacos

indutores de enzimas hepáticas, o tempo de semi-vida é de nove a dez horas. A eliminação dá-se após biotransformação no fígado, embora possa ocorrer em menores proporções nos rins e em microsomas do intestino, sendo que 72% dos metabolitos inactivos são excretados na urina e 28% nas fezes (Kovacević, 2009; Shorvon, 2009).

Os doentes sob terapêutica com fármacos antiepilépticos (AEDs) possuem uma predisposição para apresentar concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína e valores baixos de folato e/ou vitamina B₆. Estes distúrbios metabólicos encontram-se principalmente associados a AEDs com capacidade indutora da sua metabolização, como é o caso da carbamazepina (Verrotti *et al.*, 2000; Apeland *et al.*, 2002; Karabiber *et al.*, 2003). Os valores baixos de ácido fólico, vitamina B₆ e as concentrações elevadas de homocisteína induzidas em doentes sob terapêutica antiepiléptica poderão constituir a causa para o risco de doenças hepáticas e cardiovasculares, bem como alterações hematológicas como anemia megaloblástica observadas nestes doentes (Apeland *et al.*, 2002; Karabiber *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2000).

A carbamazepina altera o perfil lipídico arteriosclerótico, conduzindo assim a um maior risco para doenças cardiovasculares. No entanto, verifica-se que após um ano de terminada a terapêutica aqueles parâmetros do perfil lipídico retornam aos valores normais (Verrotti *et al.*, 2000). Em adultos, a carbamazepina aumenta ainda os níveis de lipoproteínas aterogénicas e de lipoproteína (a) (Attilakos *et al.*, 2007; Brämsswig *et al.*, 2003; Tekgul, *et al.*, 2006).

A suplementação de ácido fólico na dieta reduz a hiperhomocisteinémia nos doentes com terapêutica antiepiléptica. Administrado durante um mês, este vai normalizar a eficiência da via de remetilação e melhorar, ainda que parcialmente, a via de transsulfuração do metabolismo da homocisteína (Fig. 5 – Via S) (Apeland *et al.*, 2002). No entanto, devido ao risco de “mascarar” a anemia megaloblástica e de causar danos neurológicos irreversíveis, doses altas de ácido fólico não devem ser administradas sem acompanhamento clínico-laboratorial (Stanger *et al.*, 2004).

2. Homocisteína

2.1. Metabolismo da homocisteína

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado ausente na dieta natural, constituindo um intermediário intracelular formado a partir de um aminoácido essencial, a metionina. A Hcy (Fig. 2) é metabolizada através de duas vias, a remetilação e a transsulfuração. Normalmente, cerca de 50% da Hcy é remetilada à original metionina. Os restantes 50% são convertidos pela via de transsulfuração a cisteína (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007).

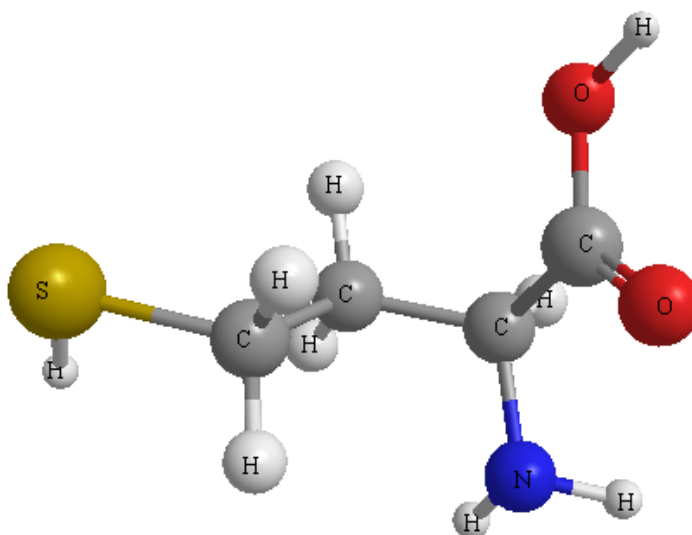


Fig. 2 – Estrutura química da homocisteína gerada pelo software ChemBioDraw Ultra 11.0.

2.1.1. O ciclo de metilação

A homocisteína é formada por desmetilação da metionina, no ciclo de metilação (Fig. 5 – Via M). A metionina é um aminoácido essencial obtido por degradação das proteínas da dieta e contém um grupo metilo, que pode ser activado para formar a S-adenosilmetionina (SAM). A SAM é formada por transferência de um grupo adenosilo do ATP para a metionina (Fig. 3), reacção que é catalisada por três isoenzimas da metionina adenosil-transferase (MAT), as MAT I, II e III (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007).

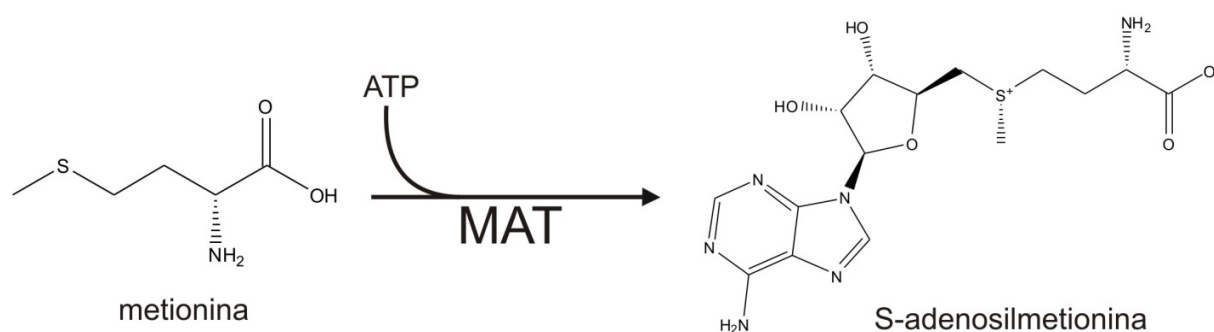


Fig. 3 – Reacção de conversão da metionina a S-adenosilmetionina pela metionina adenosil-transferase (MAT). As estruturas dos compostos foram geradas pelo software ChemBioDraw Ultra 11.0.

O grupo metilo adjacente ao átomo de enxofre da S-adenosilmetionina é activado pela carga positiva que este átomo pode adquirir. O grupo metilo torna-se assim muito reactivo e pode facilmente ser transferido para uma grande quantidade de aceitadores, nomeadamente ácidos nucleicos (ADN e ARN), proteínas, fosfolípidos, mielina, polissacarídeos, catecolaminas e uma grande variedade de moléculas de menor peso molecular. Estes grupos metilo são importantes para as reacções de metilação que ocorrem ao nível de vários tecidos estando identificadas cerca 100 reacções que envolvem a SAM como dador do grupo metilo. O produto de todas estas reacções de metilação por parte da SAM é a S-adenosilhomocisteína (SAH) (Fig. 4) e é catalisada pela metiltransferase (MT). A SAH é então hidrolisada a homocisteína por uma reacção reversível (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007).

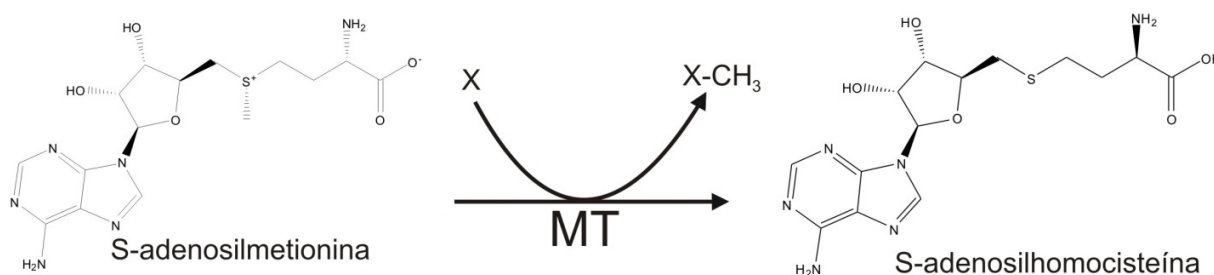


Fig. 4 – Reacção de desmetilação da S-adenosilmetionina (SAM) a S-adenosilhomocisteína (SAH), por acção da metiltransferase (MT). As estruturas dos compostos foram geradas pelo software ChemBioDraw Ultra 11.0.

Deste modo, os níveis de homocisteína e dos seus derivados no plasma aumentam por um aumento conjunto da Hcy e da S-adenosilhomocisteína (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007). Os aumentos crónicos de Hcy ao nível plasmático estão associados a deficiências vitamínicas ou polimorfismos genéticos ao nível de algumas enzimas do metabolismo da homocisteína (Fig. 5). Este aumento tem, em muitos casos, um efeito indirecto e negativo nas reacções celulares de metilação através de um aumento concomitante dos níveis de S-adenosilhomocisteína, a qual vai competir com a S-adenosilmetionina para vários locais de ligação (Yi *et al.*, 2000).

Considerando a importância das reacções de metilação em vários processos celulares, é perceptível que qualquer alteração na disponibilidade de SAM possa ter efeitos profundos no crescimento, diferenciação e função celular. A diminuição da remetilação de homocisteína a metionina pode deste modo comprometer as reacções de metilação necessárias para muitas funções biológicas, como a actividade cerebral normal ou o normal funcionamento vascular (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007).

Na maioria dos tecidos, a Hcy pode ser remetilada a metionina por meio da metionina sintase (MS). Alguns órgãos, especialmente o fígado e os rins expressam ainda a betaína homocisteína metiltransferase fornecendo uma via alternativa para a remetilação da Hcy a S-adenosilmetionina. No entanto, a maioria dos tecidos, incluindo o sistema nervoso central e o aparelho vascular, são totalmente dependentes da MS para a eliminação da Hcy (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007).

A inibição da MS pela carbamazepina pode também constituir um dos mecanismos de hiperhomocisteinémia originando danos hepáticos e cardíacos.

O metabolismo da homocisteína é regulado através de um complexo *feed-back*. Se, por exemplo, os níveis de metionina baixam e a concentração de SAM não se encontra elevada, a homocisteína é direccionada para a via de remetilação para formar metionina, através da reacção mediada pela MS. Esta reacção tem como cofactor a vitamina B₁₂ e o metiltetrahydrofolato (metil-THF) é o substrato desta reacção pelo que a disponibilidade da vitamina B₁₂ e consequentemente a dieta podem comprometer esta via (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007).

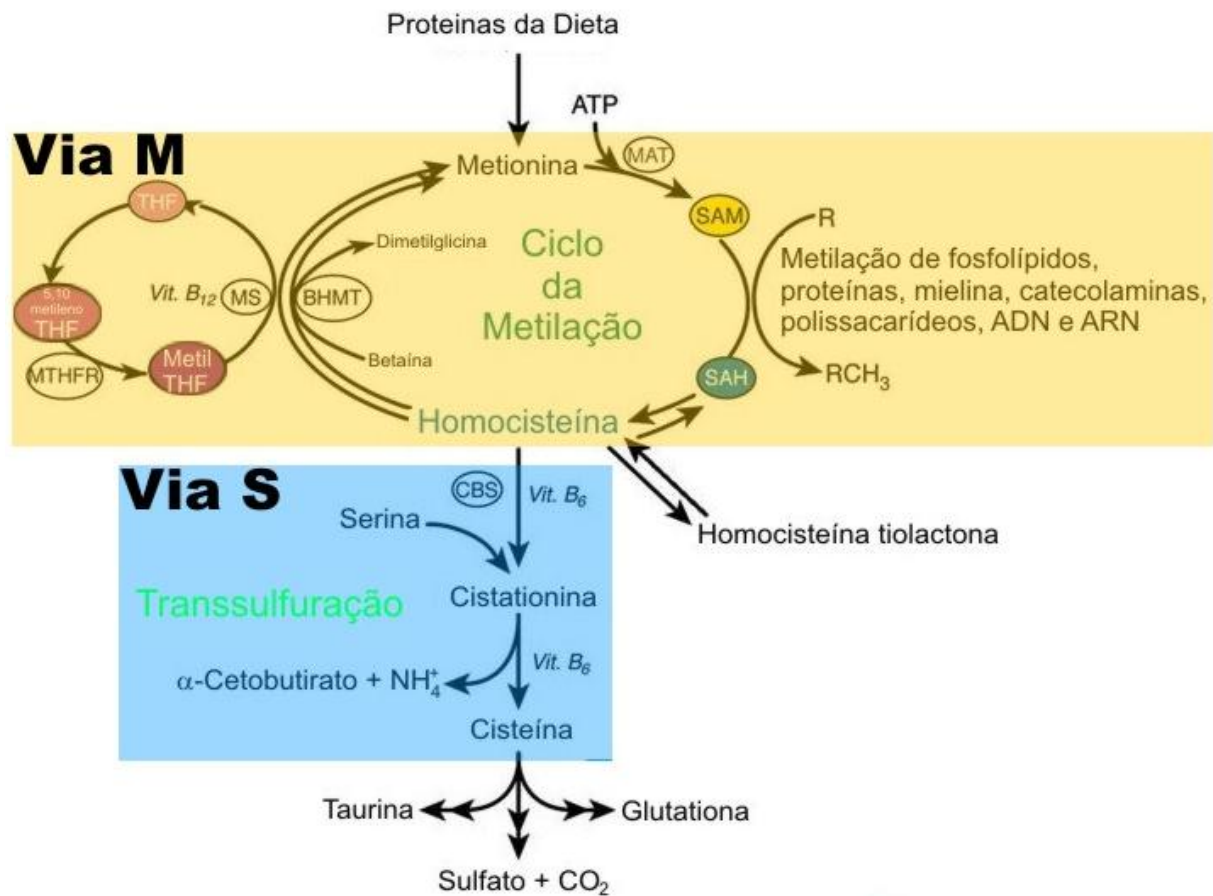


Fig. 5 – Metabolismo da homocisteína. A metionina proveniente das proteínas da dieta é essencial para vários processos fisiológicos, especificamente reacções que envolvem metilação. Após doação de um grupo metilo a metionina forma homocisteína. A homocisteína pode então seguir duas vias, a via da remetilação onde é convertida a metionina e a via de transsulfuração onde é convertida a cisteína dando origem a glutathiona, taurina e outras moléculas. CBS, cistationina β-sintase; MAT, metionina adenosina transferase; MS, metionina sintase; MTHFR, Metilenotetrahidrofolato redutase; BHMT, betaína homocisteína metiltransferase; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, adenosilhomocisteína; THF, tetrahidrofolato; MetilTHF, metiltetrahidrofolato; 5, 10 - metileno THF, 5,10 - metilenotetrahidrofolato. (Adaptado de Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007).

Quando os níveis de Hcy aumentam, os níveis de S-adenosilhomocisteína também se elevam. A SAH tem múltiplos efeitos metabólicos e compete com a S-adenosilmetionina em várias reacções e pode também inibir as reacções de metilação a vários níveis celulares. O metil-THF é formado numa reacção catalisada pela metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), na

qual o 5,10-metilenotetrahidrofolato é reduzido a 5-metiltetrahidrofolato. A reacção mediada pela MTHFR é um passo limitante na formação da metil-THF (Fig. 5) e é especialmente importante na reconversão de metionina a partir da Hcy, dado que o metil-THF é o substrato da MS. A MTHFR tem assim, também ela, uma forte influência na remetilação da homocisteína (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007; Engbersen *et al.*, 1995).

2.1.2. A via da transsulfuração

Se a S-adenosilmetionina atingir concentrações elevadas, a via da transsulfuração é favorecida e dá-se a condensação irreversível da Hcy com a serina para formar cistationina e cisteína. A formação destes metabolitos dá-se por meio de duas reacções dependentes da vitamina B₆, a primeira das quais catalisada pela cistationina β-sintase (CBS) (Fig. 5). Estudos em ratos têm mostrado que a inibição da via da transsulfuração causada pela depleção de vitamina B₆ pode resultar num aumento tanto de SAH como de SAM, que por sua vez leva ao aumento dos níveis de homocisteína (Nguyen *et al.*, 2001). A carbamazepina reduz os níveis de vitamina B₆ plasmáticos (Sener *et al.*, 2006; Vilaseca *et al.*, 2000) pelo que pode inibir a via da transsulfuração, por inibição da CBS e conduzir à hiperhomocisteinémia.

A cisteína é um precursor da glutatona (GSH), o maior tampão redox celular. Nas células hepáticas aproximadamente 50% do conteúdo em GSH parece ser derivado da homocisteína (Mosharov *et al.*, 2000). A glutatona protege muitos componentes celulares dos danos oxidativos que comprometem a vida celular. Pode, por exemplo, ter uma acção no sistema vascular, nomeadamente ao nível arterial (Kugiyama *et al.*, 2001). Existem no entanto tecidos nos quais não ocorre a via de transsulfuração. No caso dos neurónios, por exemplo, estes dependem da cisteína das células da glia para a síntese de glutatona. O sistema nervoso central é deste modo mais susceptível ao stress oxidativo do que outros tecidos (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007).

A via da transsulfuração é activada em primeiro lugar no fígado, rins, intestino delgado e no pâncreas e funciona desta forma como uma via de degradação da Hcy conjuntamente com a via da remetilação. Alterações ao nível das enzimas reguladoras destas duas vias levam ao aumento dos níveis de Hcy intracelulares e consequentemente ao aumento da Hcy plasmática. A

disponibilidade das vitaminas B₆, B₁₂ e de folatos pode também comprometer estas vias levando ao aumento dos níveis de Hcy. Elevadas concentrações plasmáticas de Hcy têm um efeito tóxico a vários níveis, impedindo as reacções de metilação, a síntese e reparação do ADN e ainda levando à oxidação de proteínas e a outros mecanismos de toxicidade que não estão completamente esclarecidos (Bolander-Gouaille and Bottiglieri, 2007). Concentrações elevadas de Hcy estão também correlacionadas com doenças degenerativas, neurológicas e cardiovasculares. No caso das doenças cardiovasculares a Hcy tem mesmo vindo a ser descrita como um novo factor de risco para estas doenças (Castro *et al.*, 2006). No entanto, não se conhecem especificamente os mecanismos pelos quais ocorrem essas alterações. A seguir referem-se alguns estudos e hipóteses que tentam explicar os efeitos da Hcy nas doenças cardiovasculares.

2.2. A homocisteína e as doenças cardiovasculares

A disfunção do endotélio arterial é um dos eventos que precede às manifestações, propriamente ditas, das doenças cardiovasculares. Vários estudos *in vivo* abrangendo diferentes espécies, nomeadamente macacos, ratos, ratinhos e humanos, têm evidenciado que a disfunção endotelial ocorre em condições de hiperhomocisteinémia. Para além disso, a hiperhomocisteinémia conduz à proliferação do músculo vascular liso, com o aumento da agregação plaquetar e actua sobre a cascata da coagulação, convertendo o endotélio normal a um endotélio com fenótipo protrombótico. No entanto, o mecanismo pelo qual a Hcy causa a disfunção endotelial, a aterosclerose e a ocorrência de doenças vasculares não está esclarecido (Perna *et al.*, 2001).

2.3. Derivados da homocisteína que ocorrem no organismo humano

A homocisteína ocorre no organismo humano sob várias espécies químicas, reage com proteínas e pode sofrer conjugação com outros aminoácidos (Fig. 6). Como exemplo, para além

da forma tiólica (Hcy, Fig. 6-A), podem ocorrer no plasma humano formas oxidadas como dissulfetos de Hcy (Hcy-Hcy, Fig. 6-G), dissulfetos mistos por conjugação com cisteína (Cys-Hcy, Fig. 6-F) e formas conjugadas a proteínas (Hcy-S-S-proteína, Fig. 6-C, D e E), principalmente a albumina e a globulinas. O somatório destas espécies de Hcy é denominado homocisteína total (tHcy). O pH alcalino da maioria dos métodos utilizados na determinação da tHcy na rotina laboratorial levam à hidrólise de uma outra espécie, a homocisteína tiolactona (HTL, Fig. 6-B) e esta é também quantificada na tHcy. Em indivíduos saudáveis a concentração de tHcy plasmática é 5-15 μM (Perla-Kaján *et al.*, 2005) enquanto que na urina são cerca de 2 vezes superiores (Jakubowski, 2006). A Hcy-S-S-proteína representa 80% da tHcy, enquanto que a Hcy-Hcy e Cys-Hcy representam cerca de 20%. Por sua vez a Hcy na sua forma tiólica só representa cerca de 1% da tHcy.

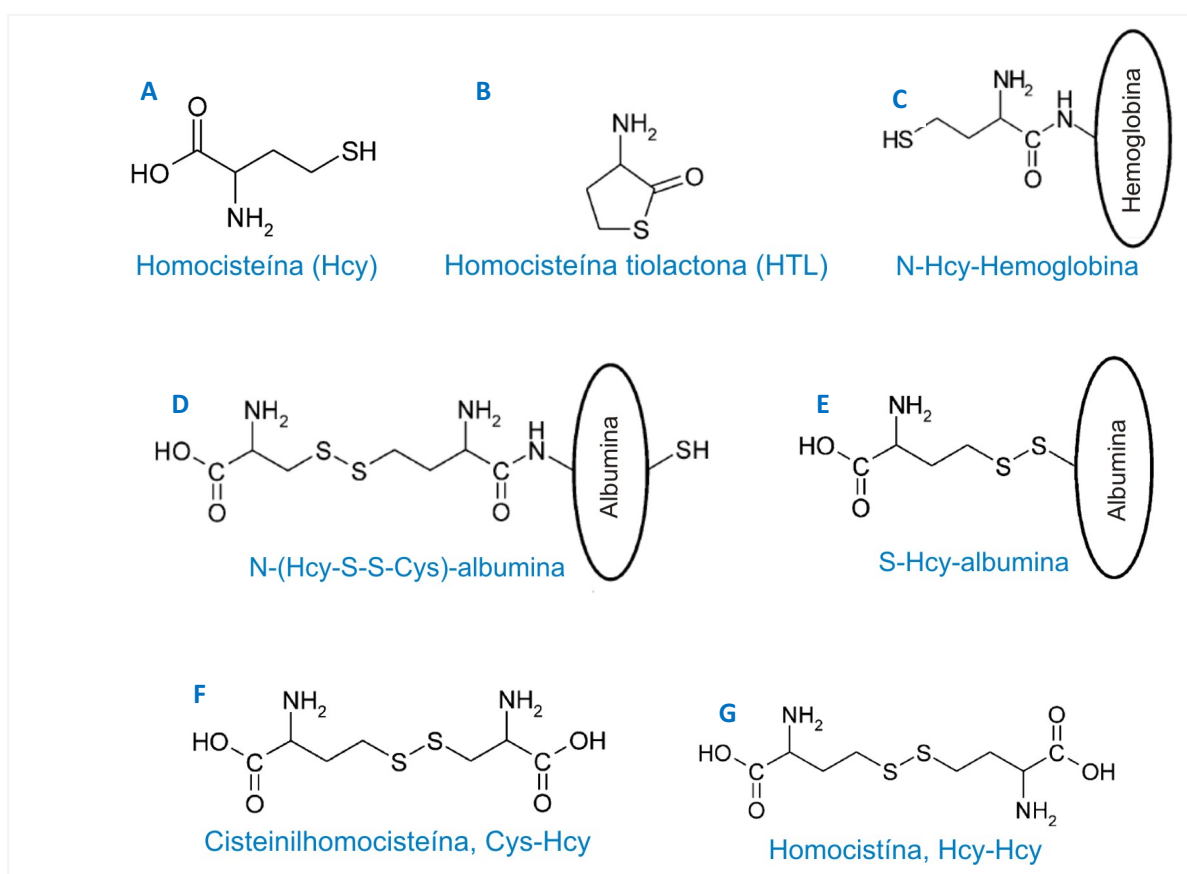


Fig. 6 – Algumas espécies de homocisteína que ocorrem no organismo humano (Adaptado de Perla-Kaján *et al.*, 2007).

A homocisteína tiolactona e as proteínas N-homocisteíladas também estão presentes no plasma e no organismo humano, embora não se conheçam os valores normais de concentração plasmáticas destas espécies (Perla-Kaján *et al.*, 2007).

Existem várias evidências que sugerem a homocisteína tióica como um metabolito potencialmente mais tóxico do que as suas formas oxidadas. A toxicidade da Hcy parece estar ligada à sua capacidade de incorporar proteínas danificando-as. Para além do referido, esta pode ainda ser metabolizada a um metabolito ainda mais tóxico, a homocisteína tiolactona (Fig. 7) (Perla-Kaján *et al.*, 2007). Está também demonstrado que a HTL é mais eficiente a induzir a apoptose do que a Hcy e que a primeira induz níveis de stress mais acentuados no retículo endoplasmático (Jakubowski, 2003), podendo assim constituir ou contribuir para os mecanismos de toxicidade da Hcy.

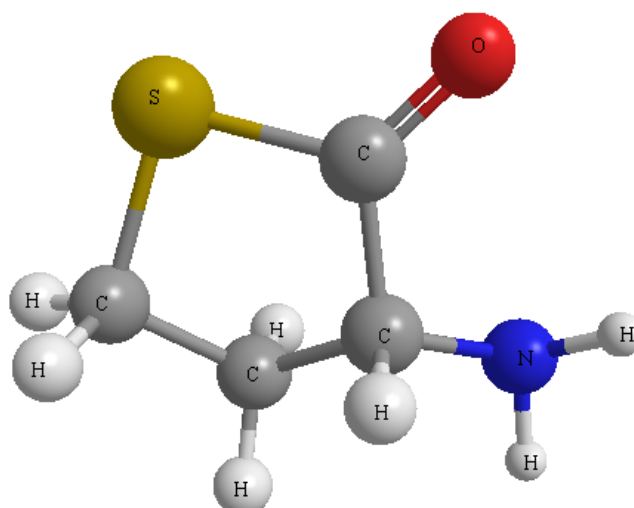


Fig. 7 – Estrutura química da homocisteína tiolactona gerada pelo software ChemBioDraw Ultra 11.0.

A homocisteína é metabolizada a homocisteína tiolactona por metionil-tARN sintetases (MetRS). No primeiro passo da reacção, dá-se a formação de adenilato de homocisteína. No passo seguinte o grupo tiol da Hcy reage com o grupo carboxilo e dá-se a formação de um composto cíclico, a HTL (Perla-Kaján *et al.*, 2007).

O organismo humano contém enzimas que hidrolisam a HTL. Uma delas é uma proteína de 45 kDa componente das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Perla-Kaján *et al.*, 2007). A

nível intracelular também já foram identificadas enzimas deste tipo (Perdziak *et al.*, 2005). Desta forma, a eliminação da HTL a nível renal conjuntamente com a hidrólise da HTL por acção enzimática, no meio extracelular e intracelular, originam níveis relativamente baixos de HTL no plasma de indivíduos saudáveis (Perla-Kaján *et al.*, 2007). No entanto, se os níveis de homocisteína aumentarem, a formação de homocisteína tiolactona será favorecida e irá acumular-se quer no sangue quer a nível celular. A HTL formada a nível celular pode ser secretada, hidrolisada ou incorporada em proteínas quer no meio intracelular quer no meio extracelular. A ligação intramolecular tioéster da HTL confere-lhe a capacidade para reagir com nucleófilos, especialmente com os grupos amina livres dos resíduos de lisina (Lys) das proteínas. A reacção de incorporação de uma molécula de homocisteína em proteínas (N-homocisteílação) envolve a acilação do grupo ϵ -amina do resíduo de Lys por parte do grupo carboxilo da HTL e representa um importante mecanismo de acção toxicológica deste derivado da homocisteína ao nível de um vasto espectro de proteínas (Fig. 8) (Perla-Kaján *et al.*, 2007).

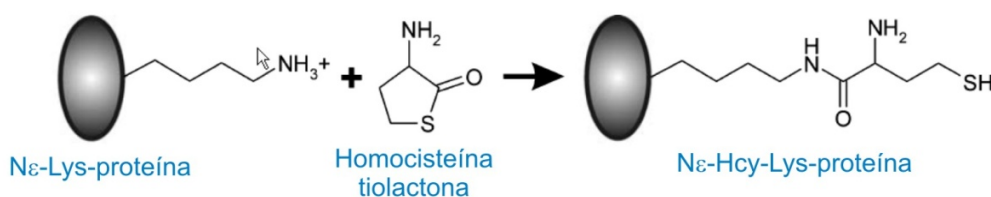


Fig. 8 – N-homocisteílação de proteínas pelo grupo amina (Adaptado de Perla-Kaján *et al.*, 2007).

Em células endoteliais a intensidade da N-homocisteílação aumenta com altas concentrações de Hcy e decresce com altos níveis de folatos e HDL o que sugere uma associação dos efeitos da homocisteína com os níveis de metionina, ácido fólico e colesterol (Perla-Kaján *et al.*, 2007).

A maioria dos danos causados pela HTL são ao nível da hemoglobina, albumina e γ -globulinas, mas outras proteínas do sangue como as HDL, LDL, antitripsina, transferrina e fibrinogénio também são danificados (Jakubowski *et al.*, 2002). Com base nas alterações induzidas pela Hcy e pela HTL em diferentes proteínas, estes compostos são susceptíveis de

alterar a função mitocondrial. Assim, neste trabalho estudámos o efeito destas moléculas ao nível da mitocôndria no sentido de contribuir para o esclarecimento do seu mecanismo de toxicidade hepática e cardíaca (Perla-Kaján *et al.*, 2007).

3. A mitocôndria

3.1. Estrutura e bioenergética

A mitocôndria é um organelo intracelular constituído por uma dupla membrana e a sua função celular principal, considerada ao longo de muitos anos, foi a de produzir energia na forma de ATP (Marín-García and Goldenthal, 2004). Contudo, a mitocôndria desempenha múltiplas actividades, estando envolvida em outras funções celulares para além do metabolismo energético. Desempenha, nomeadamente um papel crucial no transporte iónico, na regulação do equilíbrio osmótico, controlo genético, homeostase do cálcio, sinalização e morte celular (Báthori *et al.*, 2006; O'Rourke, 2007; Rasola and Bernardi, 2007).

Este organelo apresenta uma estrutura altamente dinâmica, composta por uma membrana externa lisa que envolve uma membrana interna (Logan, 2006). A membrana interna forma estruturas idênticas a vilosidades, denominadas por cristas que se estendem ao longo da membrana mitocondrial interna (IMM) para delimitar a matriz mitocondrial. O número de cristas aumenta de um modo significativo consoante as necessidades respiratórias de cada célula. Nos cardiomiócitos, dada a elevada necessidade energética, as mitocôndrias podem apresentar até três vezes mais cristas que as mitocôndrias de hepatócitos. A matriz é um compartimento mitocondrial delimitado pela membrana interna que contém ADN mitocondrial, ribossomas e uma variedade de enzimas necessárias à oxidação do piruvato, ácidos gordos e metabolitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. As primeiras imagens da estrutura interna da mitocôndria foram obtidas há mais de cinquenta anos por microscopia electrónica de transmissão. Desde então, a visão da estrutura mitocondrial (Fig. 10) tem evoluído muito mostrando que a mitocôndria tem uma estrutura diferente da inicialmente proposta, tanto ao nível das suas cristas reticuladas como à forma que pode adoptar (Fig. 9) (Frey and Mannella, 2000).

Esta estrutura da mitocôndria é responsável pelo transporte de electrões ao nível da cadeia respiratória mitocondrial e pelo gradiente electroquímico associado à síntese de ATP e (Marín-García and Goldenthal, 2004).

A produção de energia pela fosforilação oxidativa é um processo que ocorre por transferência de electrões entre várias proteínas transportadoras. Esta transferência dá-se através dos componentes individuais da cadeia respiratória, nomeadamente pelos complexos I, II, III e IV, que conduzem os electrões até ao oxigénio molecular (O_2) para formar H_2O . Os electrões são gerados a partir do NADH e $FADH_2$ fornecido pela oxidação de metabolitos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e pela β -oxidação dos ácidos gordos. (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Nelson and Cox, 2005).

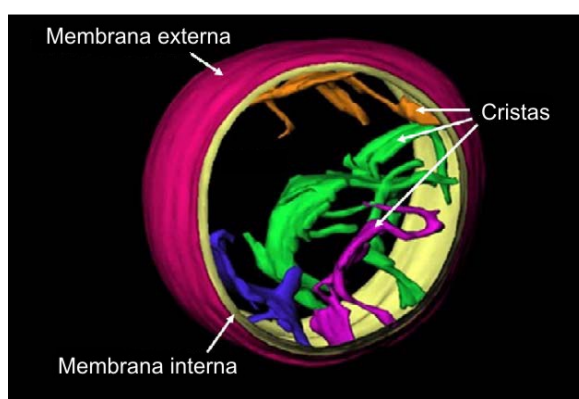


Fig. 9 – Modelo actual da estrutura das membranas mitocondriais, obtida por tomografia electrónica, a partir de mitocôndrias intactas de fígado de rato. É de notar a diferença ao nível das cristas entre este modelo e o inicialmente proposto, representado na Fig. 10 (adaptado de Mannella, 2006).

A cadeia respiratória é constituída por estes quatro complexos enzimáticos, pelo complexo V, ubiquinona e citocromo *c*. O complexo I, normalmente designado por NADH-ubiquinona oxidoreductase ou NADH desidrogenase, é o maior complexo enzimático dos três responsáveis pelo transporte de protões ao longo da membrana interna (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Lenaz *et al.*, 2006; Saraste, 1999). Este complexo encontra-se exposto em ambos os lados da IMM (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006) e é constituído por 42 a 43 polipéptidos diferentes, incluindo a flavoproteína FMN e 6 centros de Fe-S (Navarro and Boveris, 2007). Após a oxidação de NADH pelo complexo I, a coenzima Q ou ubiquinol, é

utilizada como um aceitador de electrões (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Lenaz *et al.*, 2006) e efectua o transporte destes até ao complexo III (Das, 2006). O complexo I é inibido por mais de sessenta diferentes famílias de compostos, sendo a rotenona o mais utilizado devido à sua rápida acção inibitória (Lenaz *et al.*, 2006).

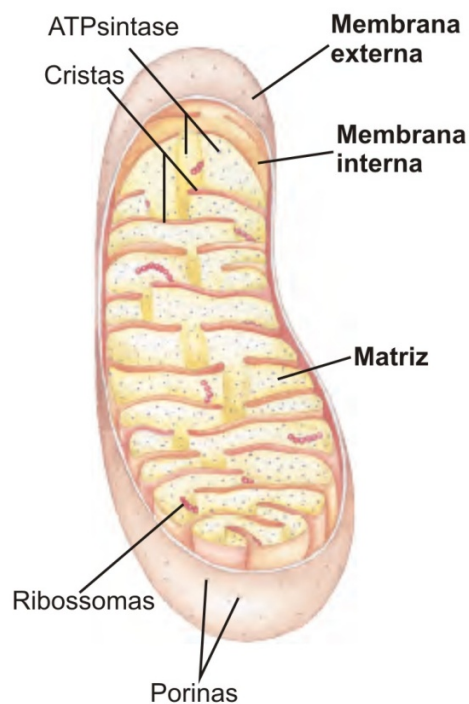


Fig. 10 – Modelo inicialmente proposto para a representação da estrutura mitocondrial. As cristas conferem uma grande área à membrana interna. Uma mitocôndria do fígado pode conter mais de 10000 cadeias respiratórias e moléculas de ATP sintase. O conteúdo enzimático e em metabolitos encontra-se na matriz e está separado do citosol pela dupla membrana mitocondrial. A mitocôndria pode assumir várias formas, tamanhos e graus de evaginação (cristas) para além das representadas (adaptado de Nelson and Cox, 2005).

O complexo II, conhecido como succinato-ubiquinona oxidoreductase ou succinato desidrogenase é uma flavoproteína que se encontra localizada na superfície da membrana interna, adjacente à matriz. Este complexo oxida o succinato a fumarato e os electrões são captados pela coenzima Q. A coenzima Q, como aceitador e transportador de electrões que é,

efectua a transferência de electrões até ao citocromo bc_1 ou complexo III (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Navarro and Boveris, 2007).

O complexo III, ubiquinol-citocromo c ou complexo bc_1 , é constituído por 9 a 10 polipéptidos, entre os quais três estão associados a centros redox (Navarro and Boveris, 2007). O complexo III é o mais estudado dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória. Neste complexo ocorre a oxidação da coenzima Q. Posteriormente, o citocromo c aceita os electrões transportando-os até ao complexo IV (Das, 2006). A oxidação da coenzima Q ocorre num conjunto de reacções conhecidas como ciclo Q, o qual se encontra associado à translocação de protões para fora da matriz permitindo a formação do potencial eléctrico transmembranar ($\Delta\Psi$) (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Das, 2006). O ciclo Q tem dois centros activos, um para a oxidação do ubiquinol e libertação de protões na superfície externa da membrana (Q_o) e outro para redução da ubiquinona associado ao aporte de protões presentes no interior da membrana (Q_i) (Fig. 11). Este mecanismo requer transferência de electrões do centro Q_o para o centro Q_i , o que permite a translocação de dois protões por cada electrão transferido para o citocromo c (Fig. 11 – C) (Saraste, 1999).

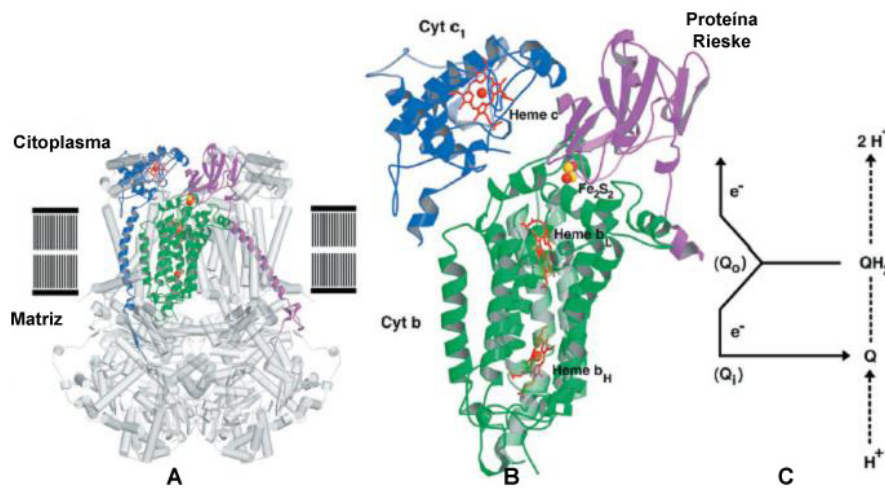


Fig. 11 – Citocromo bc_1 e o ciclo Q. A) estrutura do citocromo bc_1 obtida por cristalografia; B) núcleo funcional do complexo enzimático, constituído pelo citocromo c , pela proteína de Rieske (roxo) e pelo citocromo c_1 (azul). O centro Fe-S localiza-se perto do sítio Q_o o qual se move em direcção ao citocromo c_1 após redução; C) Mecanismo de transferência dos electrões e protões no ciclo Q (adaptado de Saraste, 1999).

O complexo V, também denominado F_1F_0 ATPase ou ainda ATP sintase é constituído por duas subunidades. A subunidade F_1 , constituindo uma zona esférica do complexo ao nível da matriz, possui uma função catalítica na síntese de ATP. Por sua vez, a subunidade F_0 é uma proteína membranar da IMM e funciona como um canal a protões (Navarro and Boveris, 2007).

Deste modo, no decurso da fosforilação oxidativa, os protões são bombeados da matriz ao longo da IMM, através dos complexos I, III e IV originando um gradiente electroquímico e reentram na matriz mitocondrial ao nível do complexo V, o qual sintetiza ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i). O transporte de protões requer a transferência de electrões ao longo da cadeia respiratória o que ocorre por diminuição do potencial redox ao nível dos sucessivos componentes da cadeia transportadora de electrões. A diminuição do potencial redox permite gerar uma força protomotriz (pmf ou Δp) da ordem dos 200-220 mV, a qual é disponibilizada para a síntese de ATP pela F_1F_0 ATP sintase. A força protomotriz é constituída por dois componentes: um componente eléctrico, o potencial eléctrico transmembranar e um componente químico, o gradiente de pH (ΔpH). No entanto, na maioria das vezes, o $\Delta \Psi$ é denominado por força protomotriz, por ser o componente maioritário desta força, contribuindo com cerca de 150 a 180mV (negativo na matriz) de um total de 200 a 220 mV desenvolvidos. O Δp constitui a energia para fosforilar o ADP e impede o fluxo de electrões na ausência de ADP, o que por sua vez influencia teoricamente todas as funções da mitocôndria. Para além disso, é um parâmetro importantíssimo na avaliação da capacidade respiratória mitocondrial, na medida em que ao ser alterado, reflecte modificações ao nível da cadeia respiratória (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Navarro and Boveris, 2007).

A respiração mitocondrial depende assim da disponibilidade de ADP para a fracção F_1 da ATP sintase. Os gradientes de ADP e ATP ao longo da IMM são mantidos pela actividade do translocador de nucleótidos de adenina (ANT). Estes transportadores têm a função de disponibilizar ADP à matriz e ATP para os processos dependentes de energia no citosol. O potencial de membrana fornece ainda a força impulsional para o transporte de catiões como o Ca^{2+} ou o K^+ (Navarro and Boveris, 2007).

3.2. Teoria quimiosmótica

A associação entre a oxidação de substratos pela cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa designa-se por teoria quimiosmótica (Fig. 12) e foi proposta em 1961 por Peter Mitchell. Um dos postulados básicos da teoria quimiosmótica é o de a IMM ser impermeável a iões, excepto a H^+ . Esta impermeabilidade é necessária para que a translocação de protões possa gerar a força protomotriz necessária para a síntese de ATP através da F_1F_0 ATP sintase. Contudo, a teoria quimiosmótica é bem mais complexa, baseando-se em quatro postulados principais. O primeiro refere-se à translocação de H^+ através da IMM, o que gera o gradiente electroquímico utilizado na fosforilação de ATP através da ATP sintase. O segundo postulado refere que o fluxo de electrões ao longo da cadeia respiratória se encontra associado ao bombeamento de protões da matriz, para o espaço intermembranar, de modo a estabelecer a força protomotriz. O terceiro postulado refere-se à existência de proteínas na IMM responsáveis pelo transporte, troca e difusão de metabolitos e de iões orgânicos específicos para a matriz. Por fim o último postulado, como já foi referido, sugere que a membrana interna mitocondrial é quase totalmente impermeável a iões excepto a H^+ (O'Rourke, 2007).

A passagem de protões para a matriz mitocondrial ocorre usualmente pela fracção F_0 da ATP sintase, no entanto, existem outras vias de passagem dos H^+ para além do complexo V. A fuga a protões (“proton leak”), é possível dada a existência de proteínas dissociadoras (UCPs) na membrana da mitocôndria. Estas proteínas são membros da superfamília dos transportadores mitocondriais e fazem o transporte de moléculas através da IMM, o que resulta na dissipação do gradiente de protões gerado pela cadeia respiratória. Este mecanismo é fundamental, dado que as UCPs são importantes na termogénese, para a manutenção do equilíbrio redox e na redução da produção de espécies reactivas de oxigénio (Jezek and Garland, 1998; Klingenberg, 2001).

O aumento da permeabilidade da IMM a iões pode ser induzido pela utilização de dissociadores químicos, designados protonóferos. O carbonildiciano-*p*-tri-fluorometoxifenilhidrazona (FCCP), por exemplo, é um translocador de protões muito utilizado na prática laboratorial e apresenta na sua estrutura protões dissociáveis, o que o torna um óptimo permeabilizador da IMM, tanto na sua forma protonada (FCCPH) como na forma de base conjugada (FCCP⁻). Esta permeabilidade a protões ao nível da membrana interna, deve-se ao

facto do FCCP possuir um extenso sistema de orbitais π , o que leva a uma deslocalização da carga molecular de forma a manter a solubilidade na bicamada lipídica da IMM. Quando se estabelece o Δp , o FCCP transporta protões para a matriz mitocondrial que é mais alcalina. Este aumento da condutância de protões através da IMM extingue então o $\Delta\Psi$ e o ΔpH , levando à dissociação mitocondrial e consequente a uma situação de incapacidade fosforilativa, isto é, incapacidade para sintetizar ATP (Nicholls and Ferguson, 2002).

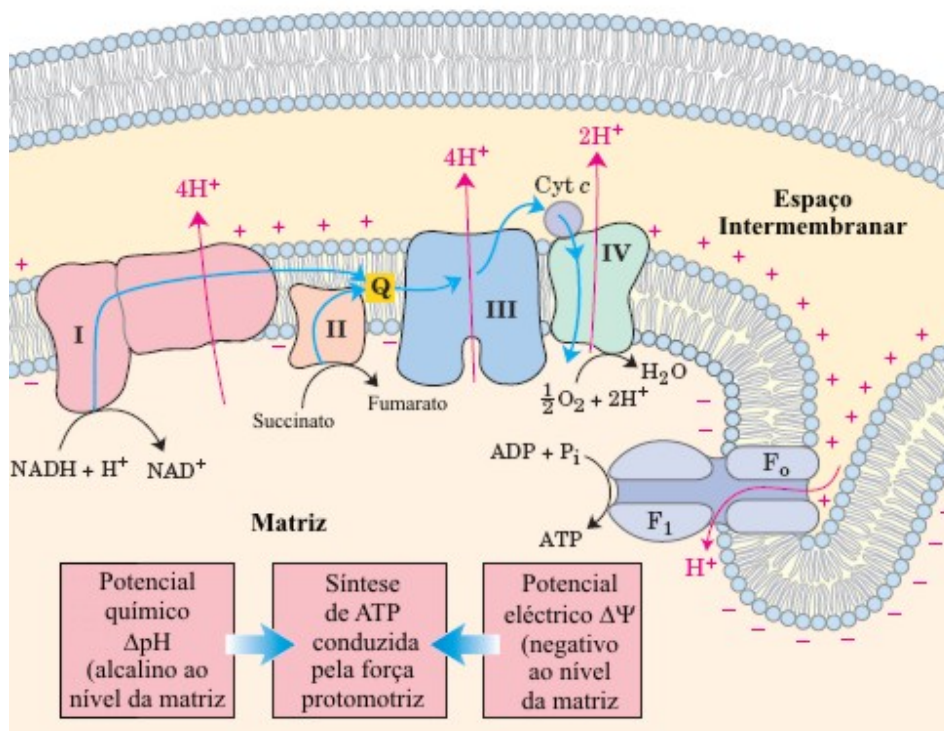


Fig. 12 – Modelo quimiosmótico proposto por Peter Mitchell. Representação simples da teoria quimiosmótica. Os electrões provenientes do NADH e de outros substratos que sofrem oxidação são transportados pelos complexos I, III e IV ao nível da membrana interna. O fluxo de electrões é acompanhado pela translocação de protões ao longo da membrana, produzido um gradiente químico (ΔpH) e um gradiente electroquímico ($\Delta\Psi$). Os protões reentram para a matriz através de canais específicos a protões, como a fracção F_0 . A força protomotriz que leva os protões a entrar para a matriz fornece energia para a síntese de ATP, catalisada pelo complexo F_1 associado à fracção F_0 (Adaptado de Nelson and Cox, 2005).

4. A mitocôndria e a homeostase do cálcio

A entrada, saída e acumulação de Ca^{2+} , por parte da mitocôndria, é essencial para a homeostase celular deste íon. O fluxo de cálcio para a matriz mitocondrial é efectuado através do uniporta de Ca^{2+} localizado na IMM com gasto de $\Delta\Psi$. Por esta razão, o influxo de cálcio para a mitocôndria é afectado por factores que alteram os níveis energéticos mitocôndriais como é o caso dos dissociadores e inibidores da cadeia respiratória (Dykens and Will, 2008).

O processo de entrada e saída de Ca^{2+} na mitocôndria é um processo dinâmico em equilíbrio, sendo o influxo de Ca^{2+} contrabalançado pelo efluxo de outros íões e mantido pelo circuito de prótons na membrana interna mitocondrial, o qual consegue gerar uma grande força termodinâmica possível de ser utilizada pelos vários transportadores iónicos envolvidos (Giorgi *et al.*, 2008).

O Ca^{2+} é acumulado pela mitocôndria através do uniporta de Ca^{2+} é libertado para o citosol por troca de H^+ e Na^+ através de dois canais antiporta. A mitocôndria tem assim a capacidade de trocar e acumular Ca^{2+} presente no citosol, o que lhe confere uma actividade tamponizante do Ca^{2+} citosólico e um importante papel na regulação de vários processos celulares dependentes de cálcio, particularmente na modulação de sinais de Ca^{2+} provenientes quer do retículo endoplasmático, quer do espaço extracelular. Nesta perspectiva a mitocôndria pode controlar as oscilações e as ondas de Ca^{2+} que ocorrem ao nível de células musculares, por exemplo (Berridge *et al.*, 2003).

O processo de acumulação de Ca^{2+} pela mitocôndria é realizado por proteínas, nucleótidos e fosfato que têm a capacidade de queletar o cálcio na matriz mitocondrial. Quando a concentração de Ca^{2+} citosólico retorna aos valores basais o cálcio acumulado é rapidamente libertado no citosol. O ligeiro aumento da concentração de Ca^{2+} na mitocôndria estimula também o metabolismo energético, pois o Ca^{2+} activa a piruvato desidrogenase e outras duas desidrogenases do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, a isocitrato desidrogenase e a oxaloacetato desidrogenase. Por outro lado, a acumulação de grandes quantidades de Ca^{2+} pela mitocôndria leva à activação do poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial o que pode comprometer a funcionalidade da mitocôndria e a viabilidade da célula. O poro pode, no entanto, funcionar como um canal que permite à mitocôndria libertar o excesso de cálcio, reduzindo

assim o risco dos danos mitocondriais e a dissipação de $\Delta\Psi$, que por sua vez também irá reduzir a formação de espécies reactivas de oxigénio. O poro pode então, neste caso, prevenir eventos mitocondriais que resultaria em morte celular (Dyken and Will, 2008).

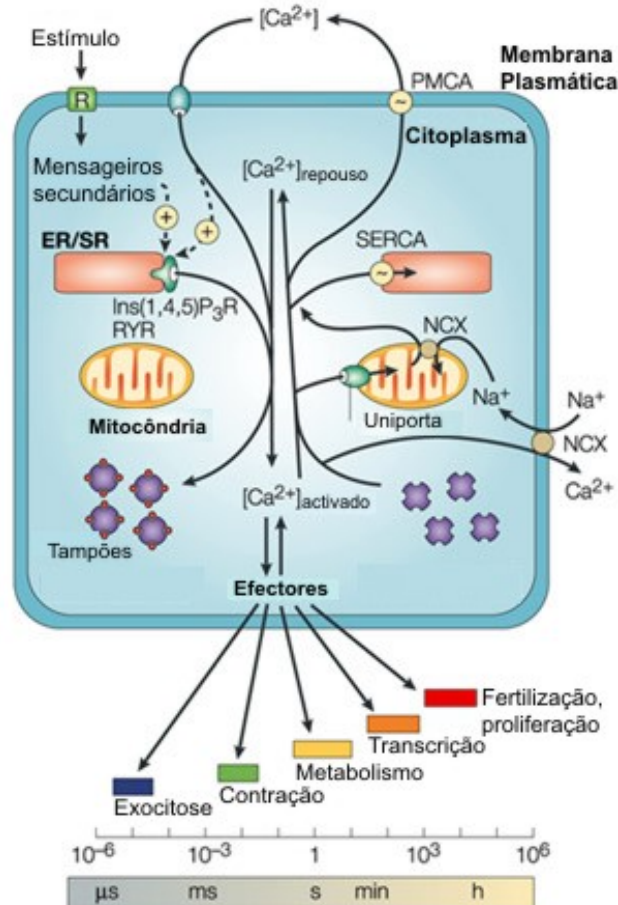


Fig. 13 – Dinâmica e homeostase do Ca^{2+} na célula. Nas reacções representadas na região esquerda, um estímulo leva à entrada de Ca^{2+} na célula e à libertação de um segundo mensageiro para que ocorra libertação de Ca^{2+} intracelular armazenado no retículo endo/sarcoplasmático (ER/SR). A maioria deste Ca^{2+} (círculos vermelhos) liga-se a moléculas que queletam o cálcio (tampões), enquanto uma pequena proporção se liga a efectores para activar vários processos celulares, os quais operam segundo um vasto espectro temporal. Nas reacções da direita, o Ca^{2+} é libertado dos efectores e tampões, e removido do citosol através de trocadores e bombas de cálcio, nomeadamente através do trocador Na^+/Ca^+ (NCX) e da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) que conduzem o Ca^{2+} para o meio extracelular. Por sua vez, as Ca^{2+} -ATPases do retículo endo/sarcoplasmático (SERCA) bombeiam o Ca^{2+} de volta ao retículo endoplasmático. A mitocôndria tem um papel activo fundamental durante este processo de remoção na medida em que sequestra rapidamente o Ca^{2+} através do uniporta e liberta-o depois, lentamente de volta ao citosol conduzindo-o às PMCA e SERCA. Ins(1,4,5) P_3 R, receptor inositol-1,4,5-trifosfato; RYR, receptor de rianodina (Adaptado Berridge *et al.*, 2003).

Dado que a vida celular é altamente dependente da homeostase do Ca^{2+} (Fig. 13), alterações a nível mitocondrial poderão comprometer o ciclo de vida celular e levar a célula à morte da célula (Berridge *et al.*, 2003). Desta forma, neste estudo deu-se especial importância ao estudo de um evento celular intimamente relacionado com a homeostase do Ca^{2+} , a permeabilidade transitória mitocondrial induzida por Ca^{2+} .

5. O stress oxidativo e a mitocôndria

A mitocôndria tem um papel importante no metabolismo energético e é essencial à vida celular. No seu metabolismo pode ocorrer a formação de espécie reactivas de oxigénio (ROS), que estão directamente relacionadas com a mutação do ADN mitocondrial, morte celular e envelhecimento (Orrenius *et al.*, 2007). A nível patológico o stress oxidativo pode estar associado a diferentes patologias como é o caso da aterosclerose, hipertensão, cancro, diabetes tipo II e doenças neurodegenerativas (Di Lisa *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Tatara *et al.*, 2009).

A produção de ROS dá-se maioritariamente na cadeia respiratória mitocondrial. Do oxigénio consumido pela mitocôndria, aproximadamente 1 a 2% é convertido a radicais superóxido, em situações fisiológicas normais. A formação de radicais superóxido dá-se por transferência de electrões da cadeia respiratória para o oxigénio disponível na matriz, formando-se o anião superóxido (O_2^-), que pode ser considerado o maior precursor das ROS a nível celular (Orrenius *et al.*, 2007). A produção de O_2^- na mitocôndria é realizada, na sua grande maioria, ao nível dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial (Fig. 14). A ubiquinona é também uma proteína da cadeia respiratória envolvida na produção de O_2^- . Nesta proteína transportadora de electrões, a transferência de electrões do complexo I e II para o complexo III da cadeia respiratória ocorre com a formação de uma semiquinona instável, responsável pela formação de O_2^- por transferência de um electrão para o O_2 (Feissner *et al.*, 2009; Orrenius *et al.*, 2007). Desta forma a ubiquinona tem também um importante relevo na produção de ROS ao nível da mitocôndria.

A maior fonte intracelular de ROS é a mitocôndria, onde se podem atingir concentrações 5 a 10 vezes superiores relativamente ao citosol (Cadenas and Davies, 2000). Para além da cadeia respiratória, a monoamina oxidase (MAO), é também uma importante fonte de ROS na mitocôndria. Esta flavoproteína da membrana externa mitocondrial catalisa várias reacções de desaminação dando origem a uma considerável quantidade de H_2O_2 (Feissner *et al.*, 2009). O H_2O_2 produzido pode reagir com o O_2^- , por meio de reacções de Fenton e de Haber-Weiss originando radicais hidroxilo altamente reactivos e tóxicos (Koppenol, 2001).

As ROS geradas na mitocôndria têm como alvo biomoléculas celulares, como é o caso dos ácidos nucleicos, fosfolípidos e proteínas pelo que um aumento de ROS pode ter consequências devastadoras na mitocôndria e na célula (Orrenius *et al.*, 2007). A mitocôndria possui no entanto vários sistemas antioxidantes que a protegem das ROS, como é o caso da Mn-superóxido dismutase, da glutatona peroxidase e da tioredoxina peroxidase (Kowaltowski *et al.*, 2001). Para além de enzimas, as vitaminas solúveis em meio aquoso como a vitamina C e as vitaminas solúveis em meio lipídico, como a vitamina E, têm também uma acção antioxidante na mitocôndria protegendo-a do stress oxidativo.

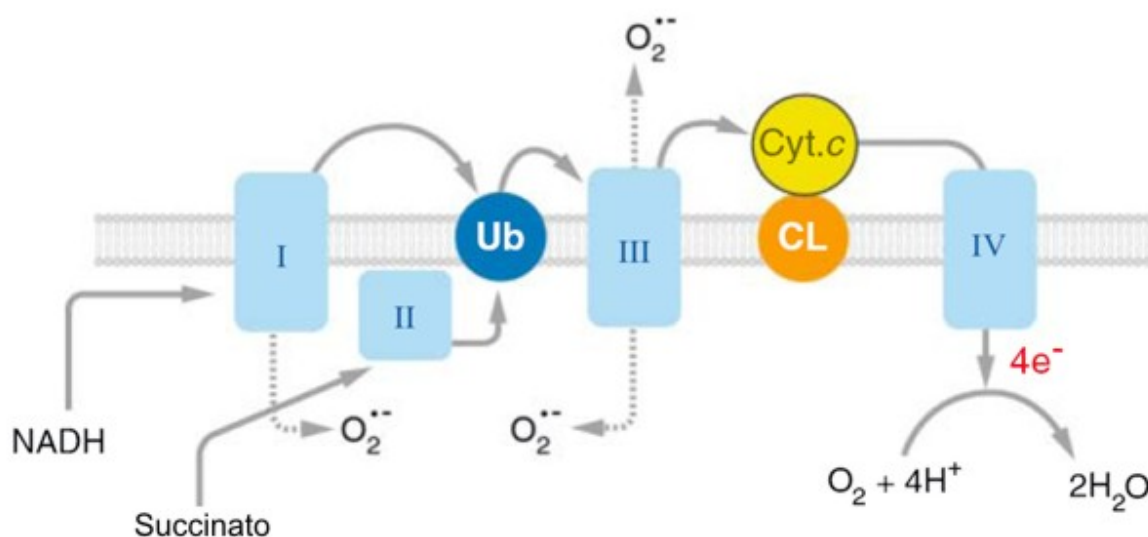


Fig. 14 – Formação de espécies reactivas de oxigénio na cadeia respiratória mitocondrial. Ub, ubiquinona; CL, cardiolipina; Cyt. c, citocromo c; I, II, III, IV, complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial (adaptado de Orrenius *et al.*, 2007).

No entanto a produção de ROS na mitocôndria pode ultrapassar a capacidade dos sistemas antioxidantes. Quando isto se verifica as ROS danificam várias biomoléculas mitocondriais. Um desses alvos é o ADN mitocondrial (mtADN) que codifica 13 polipéptidos, 22 ARNs de transferência e 2 ARNs ribossomais indispensáveis para que ocorra o transporte de electrões e a produção de ATP na fosforilação oxidativa (Anderson *et al.*, 1981). O mtADN representa desta forma um alvo crítico para o ROS, podendo levar a danos celulares através da perda da cadeia transportadora de electrões, do potencial de membrana e da capacidade da mitocôndria produzir ATP para a célula (Ma *et al.*, 2009).

O O_2^- inactiva proteínas com centros Fe-S, levando à libertação do Fe destes centros. A libertação de Fe conjuntamente com a formação de O_2^- e H_2O_2 leva à ocorrência de reacções de Haber-Weiss e de Fenton, originando radicais hidroxilo (OH^\bullet) altamente reactivos. Os OH^\bullet têm a capacidade de oxidar proteínas, ADN e lípidos, amplificando desta forma os danos oxidativos iniciados pelo O_2^- (Orrenius *et al.*, 2007).

Os ROS têm também como principal alvo os lípidos da membrana interna mitocondrial, os quais são danificados por peroxidação lipídica através dos radicais OH^\bullet (Fig. 15). Na mitocôndria os efeitos da peroxidação lipídica são devastadores dado que vão alterar todo o funcionamento mitocondrial, suprimindo a respiração e a oxidação fosforilativa, alterando as propriedades físicas da membrana interna mitocondrial, dissipando o potencial de membrana e afectando a capacidade tamponizante das mitocôndrias para o Ca^{2+} (Kowaltowski *et al.*, 2001; Orrenius *et al.*, 2007).

A mitocôndria tem, como referido no ponto 4 do presente capítulo, um papel importante na regulação da homeostase do Ca^{2+} intracelular. Este organelo consegue acumular uma certa quantidade de Ca^{2+} , no entanto a sua capacidade é limitada. O stress oxidativo conjuntamente com a depleção de ATP altera a capacidade das mitocôndrias para acumular o Ca^{2+} por abertura de um poro ao nível das membranas interna e externa da mitocôndria. Este fenómeno, chamado permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) leva a que a mitocôndria perca o Ca^{2+} e outros solutos da matriz, assim como o $\Delta\Psi$ necessário para acumular o Ca^{2+} . Deste modo as ROS têm também a capacidade de induzir a MPT (Fig. 15), fenómeno que poderá levar à morte celular, por apoptose e necrose (Jaeschke *et al.*, 2002; Orrenius *et al.*, 2007).

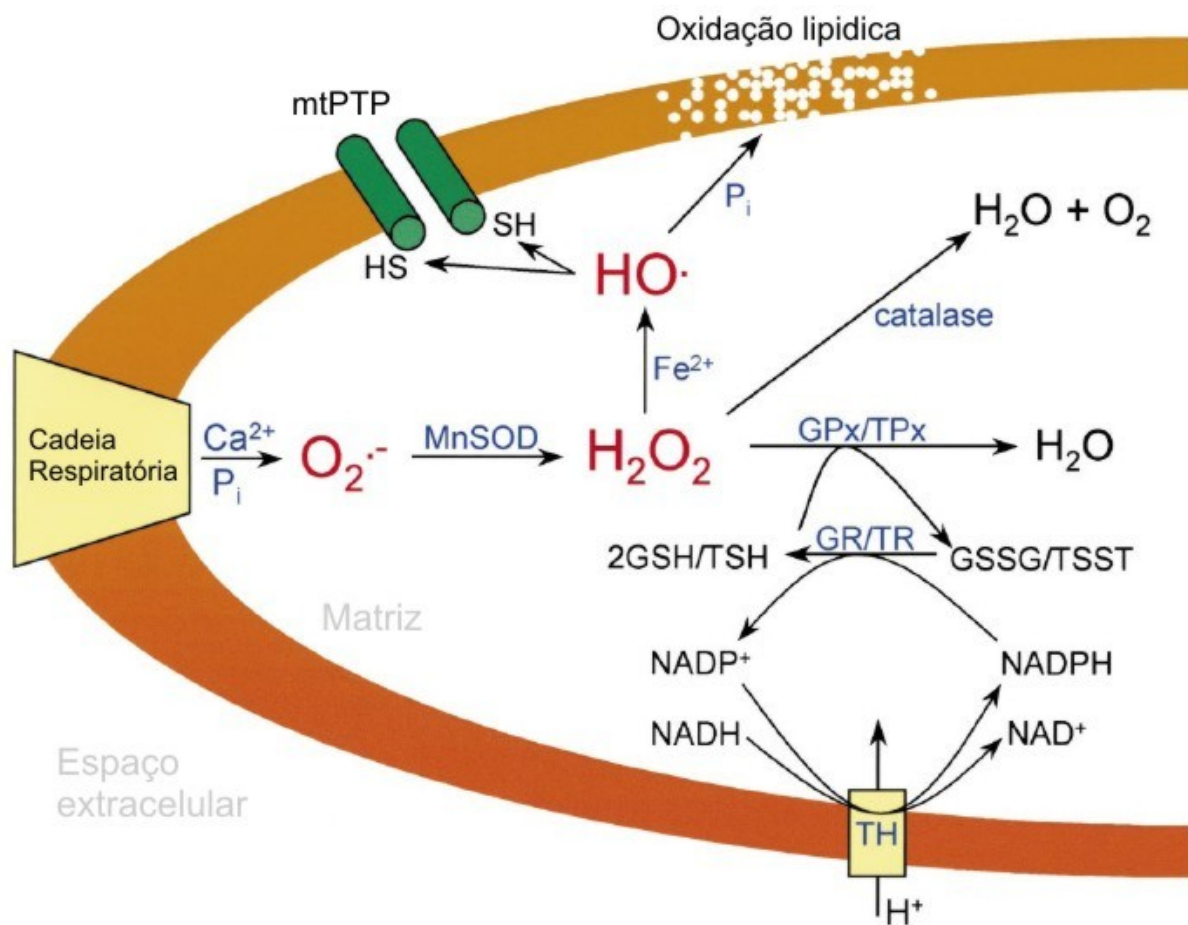


Fig. 15 – Oxidação lipídica e indução da permeabilidade transitória mitocondrial promovida por ROS. Os radicais $O_2^{\cdot-}$ produzidos na cadeia respiratória mitocondrial são normalmente eliminados pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD) que leva à formação de H_2O_2 . O H_2O_2 é então reduzido a H_2O pela glutatona peroxidase (GPx), tioredoxina peroxidase (TPx) ou pela catalase. A glutatona (GSH) e a tioredoxina (TSH) oxidadas são depois regeneradas pela glutatona redutase (GR) e tioredoxina redutase (TR) usando o NADPH como doador de electrões. Quando a produção de $O_2^{\cdot-}$ aumenta, na presença de Ca^{2+} , P_i e H_2O_2 , as vias de eliminação são inativadas levando à acumulação de H_2O_2 . Na presença de Fe^{2+} , o H_2O_2 forma o radical OH^{\cdot} extremamente reactivo. O OH^{\cdot} tem a capacidade de oxidar os grupos tiol (SH) do poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial (mtPTP), levando à abertura do mesmo. Por sua vez o OH^{\cdot} também pode levar à permeabilização da membrana interna através da oxidação lipídica, um processo fortemente estimulado pelo P_i . TH, transhidrogenase. (Adaptado de Kowaltowski *et al.*, 2001).

6. A permeabilidade transitória mitocondrial

A permeabilidade transitória mitocondrial tem sido descrita como um aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial a solutos com massa molecular até aproximadamente 1500 Da. Segundo as condições utilizadas na maioria dos estudos *in vitro*, a MPT é acompanhada pela despolarização da membrana interna mitocondrial, intumescência ou *swelling* da matriz, depleção de nucleótidos de piridina (PN) matriciais, ruptura da membrana externa e libertação de proteínas intermembranares da mitocôndria, nomeadamente do citocromo *c*, para o citosol. A ocorrência do *swelling* em mitocôndrias isoladas é estimulada pelo Ca^{2+} , P_i e ácidos gordos e é inibida pelo Mg^{2+} , nucleótidos de adenina e pela baixa acidez do meio. A nível energético, verifica-se uma alteração do potencial de membrana mitocondrial aquando da indução da MPT (Bernardi *et al.*, 2006).

Nos finais da década de 90, foi avançada a hipótese de que o poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial (mtPTP) poderia ser um factor importante na morte celular. Surgiram então estudos em modelos *in vitro*, nomeadamente em hepatócitos sujeitos a stress oxidativo, anoxia, ou tratados com ATP, e em corações isolados expostos a isquémia/reperfusão, que forneceram evidências experimentais acerca do envolvimento do MPT no controlo da apoptose como mecanismo de morte celular (Bernardi *et al.*, 2006).

A permeabilidade transitória mitocondrial é um processo mitocondrial que leva à morte celular programada ou apoptose, no entanto os mecanismos de indução da MPT e as suas consequências continuam por esclarecer, constituindo assim esta área um interessante desafio. Para além do facto do mtPTP estar envolvido na morte celular, especula-se também que o poro poderá ter outras funções, nomeadamente funcionar como um canal de cálcio envolvido na homeostase do Ca^{2+} celular (Bernardi *et al.*, 2006).

O estudo da MPT tem-se realizado na maioria dos casos, por meios indirectos, de forma que, a interpretação e a discussão dos resultados experimentais obtidos dão lugar a hipóteses de trabalho que não chegam muitas vezes a ser comprovadas. Como exemplo temos o facto da regulação intrínseca do mtPTP não estar totalmente esclarecida ou o facto de não existir um modelo definitivo que descreva estruturalmente o mtPTP. O estudo da MPT tem evoluído, desta forma, com base na caracterização do poro responsável pela permeabilidade transitória, o qual

tem sido estudado a partir de possíveis proteínas constituintes (Fig. 16), nomeadamente o translocador de nucleótidos de adenina, o canal aniónico dependente de voltagem (VDAC), a ciclofilina D (CyP-D) e o receptor membranar de benzodiazepina (PBR) (Bernardi *et al.*, 2006).

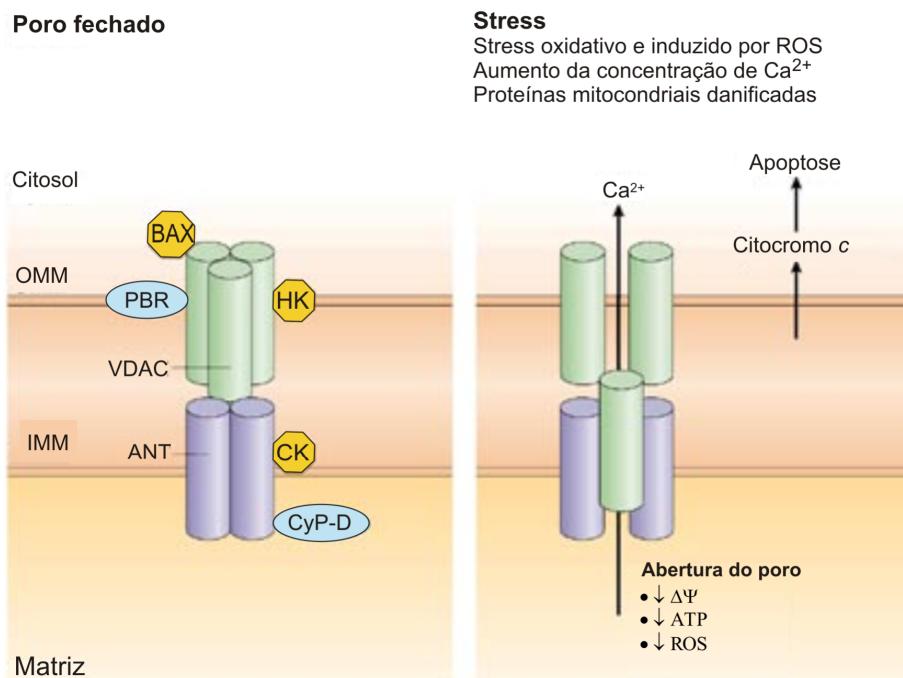


Fig. 16 – Poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial. O poro é um complexo proteico inserido na membrana interna (IMM) e na membrana externa mitocondrial (OMM). É constituído pelo canal aniónico dependente de voltagem (VDAC) e pelo receptor de benzodiazepina periférico (PBR) ao nível da OMM, pelo translocador de nucleótidos de adenina (ANT) da IMM e pela ciclofilina D (CyP-D) na matriz mitocondrial. Pensa-se que a hexocinase (HK), a creatina cinase (CK) e a proteína pro-apoptótica Bax, também estão associadas ao mtPTP. Em certas circunstâncias, como altas concentrações de Ca^{2+} , aumento de stress oxidativo, baixos níveis de ATP e despolarização mitocondrial, o complexo forma um poro permitindo a livre difusão de solutos através das membranas. A abertura do mtPTP resulta no *swelling* da mitocôndria, no efluxo de Ca^{2+} mitocondrial e na libertação de proteínas indutoras de apoptose, do espaço intermembranar. $\Delta\Psi$, potencial de membrana mitocondrial; ROS, espécies reactivas de oxigénio (Adaptado de Abou-Sleiman *et al.*, 2006).

6.1. Regulação/Indução da permeabilidade transitória mitocondrial

A permeabilidade transitória mitocondrial, em mitocôndrias isoladas, pode ocorrer depois da acumulação de Ca^{2+} ao nível da matriz mitocondrial e parece ser consequência da abertura de um canal ou poro regulador da MPT, o poro responsável pela permeabilidade transitória. O poro pode ser definido como um poro dependente do gradiente da membrana interna, sensível a ciclosporina A (CyA) e altamente condutor de solutos. No estado completamente aberto, o seu diâmetro aparente é de cerca 3 nm, e a transição abertura/fecho é altamente regulada por compostos que parecem actuar em vários locais de regulação (Bernardi *et al.*, 2006).

6.1.1. Consequências da abertura do poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial

A primeira consequência mensurável após a abertura do mtPTP é o abaixamento do $\Delta\Psi$, designado por despolarização mitocondrial. No entanto, o poro pode abrir e fechar num espaço de tempo tão curto que este fenómeno se torna praticamente indetectável, a não ser que se faça a monitorização de outros canais. Nesta situação, a seguir à consequente despolarização provocada pela abertura do poro, dá-se uma repolarização da membrana mitocondrial (Bernardi *et al.*, 2001).

A despolarização mitocondrial pode facilmente ser detectada, tanto em mitocôndrias isoladas, como em células intactas e tem várias consequências na respiração celular consoante o substrato respiratório mitocondrial utilizado nos ensaios de indução da MPT. No caso dos ensaios em que se utilizam substratos do complexo I, a abertura do mtPTP é seguida pela inibição da cadeia respiratória conduzindo a uma perda de nucleótidos de piridina da matriz. Com substratos do complexo II da cadeia respiratória a MPT leva mais frequentemente ao *uncoupling* mitocondrial (Bernardi *et al.*, 2006). Não estando relacionado com a ocorrência da inibição ou estimulação da cadeia, verifica-se também o colapso da Δp , que leva à diminuição dos níveis de ATP enquanto o poro permanece aberto (Bernardi *et al.*, 2006). Esta diminuição é consequência de uma inibição da ATP sintase mitocondrial e depleção dos níveis de ATP que em

conjunto com a alteração da homeostase do Ca^{2+} , representam um factor chave em vários paradigmas da morte celular por necrose (Bernardi *et al.*, 2001).

A abertura do mtPTP, por períodos longos, é seguida do equilíbrio de gradientes das espécies iónicas com uma massa molecular menor que 1500 Da, o que pode provocar o *swelling* mitocondrial, o *unfolding* das cristas da matriz e a ruptura da membrana externa, com consequente libertação do citocromo *c* e outros factores pró-apoptóticos (Bernardi *et al.*, 2006).

6.1.2. Estrutura e regulação abertura/fecho do poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial

He e Lemasters (2002) propuseram um modelo para a formação e abertura/fecho do poro. Neste modelo, o poro forma-se por agregação de proteínas integrais da membrana, as quais são danificadas por agentes oxidantes ou outro tipo de mecanismo de stress oxidativo. O modelo sugere que a MPT não é uma consequência da abertura de um poro já existente, mas sim o resultado do dano oxidativo de algumas proteínas membranares mitocondriais. Neste modelo a passagem de solutos através deste aglomerado de proteínas danificadas é bloqueada por proteínas *chaperones*, nomeadamente a CyP-D, que é regulada pelo Ca^{2+} e sensível à CyA. Quando os níveis de aglomerados proteicos danificados excedem os níveis de *chaperones* disponíveis para bloquear a passagem de solutos, a abertura de poros não regulados pode ocorrer e estes deixam de ser sensíveis à CyA (He and Lemasters, 2002). O modelo, não explica no entanto, a forma pela qual o mtPTP é regulado pelo potencial e pelo pH da matriz mitocondrial (Bernardi *et al.*, 2006).

Independentemente da natureza molecular do poro, existe o consenso de que o mtPTP é formado por locais de contacto entre a membrana interna e externa da mitocôndria e que este ocupa o espaço entre as mesmas. Convém, no entanto, salientar que a ideia do mtPTP ser formado a partir destes locais de contacto se apoia num conjunto de suposições e não em factos propriamente estabelecidos (Bernardi *et al.*, 2006).

A MPT parece ser, numa fase inicial, um evento ao nível da membrana interna que leva a consequências secundárias, ao nível da membrana externa. Em condições *in vivo* a membrana

externa pode afectar a probabilidade de abertura do poro através das interacções proteína/proteína como esquematizado na Fig. 17. As interacções entre uma proteína da membrana externa e o mtPTP podem depender de uma conformação específica conferida por factores citosólicos que regulam o poro. A ligação destes reguladores deve então ter como consequência uma modificação conformacional que permite a interacção com o mtPTP e a sua estabilização na conformação fechada (Fig. 17-1). É de notar que a alteração mediada pelo ligando pode em vez do representado, favorecer a conformação aberta do mtPTP.

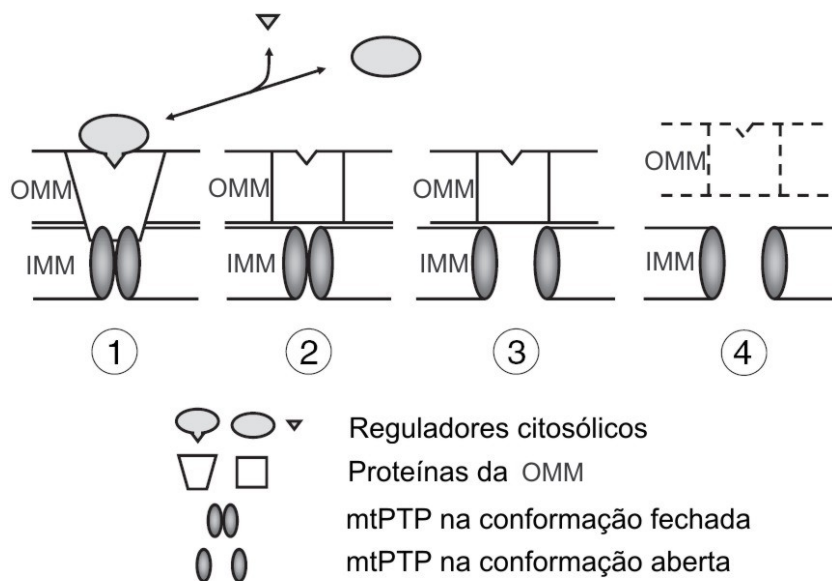


Fig. 17 – Modelo de regulação do poro responsável pela permeabilidade transitória mitocondrial (mtPTP) através de proteínas da membrana externa mitocondrial (OMM). Neste modelo a modelação do mtPTP da membrana interna mitocondrial (IMM) ocorre por interacção com proteínas da OMM. Estas proteínas podem ser alvo de reguladores citosólicos. A linha a tracejado representa a ruptura da OMM após a abertura do mtPTP (Adaptado de Bernardi *et al.*, 2006).

Na ausência de interacções por parte da membrana externa, o mtPTP pode transitar do estado fechado (Fig. 17-2) para o estado aberto (Fig. 17-3) e vice-versa, sob efeito de modeladores da membrana interna e da matriz, como é o caso do $\Delta\Psi$, pH, CyP-D, Ca^{2+} ou dos PN. A estabilização na conformação aberta pode levar a rearranjos da estrutura das cristas e

eventualmente à ruptura da membrana externa (Fig. 17-4). A Fig. 17 mostra como a membrana externa pode ter propriedades reguladoras no mtPTP, sem necessariamente fornecer uma via de permeabilização da membrana interna para a difusão de solutos. Contudo o modelo não pode ser, em caso algum, visto como um processo específico e estático na ocorrência da MPT, isto porque independentemente do conhecimento acerca da regulação do mtPTP, é actualmente impossível identificar um local de acção de um efector no poro, à excepção da CyA (Bernardi *et al.*, 2006).

6.2 . A permeabilidade transitória mitocondrial na morte celular

O papel da mitocôndria na morte celular é abrangente, sendo que muitas das reacções participantes ocorrem ao nível deste organelo. A mitocôndria participa intrinsecamente nas vias de sinalização apoptótica, tem um papel importante na apoptose mediada por receptores e está envolvida em várias formas de morte celular para além da apoptose (Rasola and Bernardi, 2007). Quando há um desequilíbrio entre a viabilidade e a morte celular, o ciclo celular normal é interrompido observando-se várias alterações ao nível da fisiologia e estrutura mitocondrial (Scorrano and Korsmeyer, 2003; Heath-Engel and Shore, 2006). Estas alterações dependem da intensidade e persistência do estímulo e podem levar a que a célula atinja um ponto sem retorno, ao nível dos mecanismos que levam à morte celular. Pode então ocorrer a libertação de proteínas indutoras de apoptose como o citocromo *c*, o factor indutor de apoptose (AIF), a endonuclease G (endo G) ou a proteína Smac/Diablo (Rasola and Bernardi, 2007). Dado que o tamanho destes factores excede o diâmetro do poro dos canais da membrana externa, tem sido proposto que é necessário ocorrer a permeabilização da membrana externa para que haja libertação destes factores para o citosol (Rasola and Bernardi, 2007).

Actualmente existem alguns modelos que tentam explicar a permeabilização da membrana externa mitocondrial (OMM). Estes modelos não são necessariamente independentes e não excluem a possibilidade de diferentes mecanismos levarem à libertação das mesmas proteínas apoptóticas, em diferentes condições apoptóticas ou em diferentes tipos celulares. De um modo geral, os principais mecanismos podem ser resumidos a partir de um modelo de permeabilização directa da OMM e pelo modelo da permeabilidade transitória mitocondrial. No primeiro, algumas proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como a Bax ou a Bak promovem,

directa ou indirectamente, a abertura de poros na OMM e dado estes poros possuírem dimensões suficientes para conduzir proteínas indutoras de apoptose ao citosol, desencadeia-se a morte celular programada. No último, dá-se a abertura de um poro ao nível da membrana interna designado por mtPTP, que leva à ruptura da OMM e à libertação do citocromo *c* do espaço intermembranar. Isto verifica-se porque quando o poro permanece aberto por períodos prolongados, dá-se a despolarização da membrana interna e o *swelling* da matriz, o que por sua vez leva ao *unfolding* das cristas mitocondriais e subsequentemente à ruptura da OMM (Rasola and Bernardi, 2007).

O poro responsável pela permeabilidade transitória é assim responsável por diversas alterações a nível mitocondrial e celular levando, em alguns casos, à morte celular, pelo que surge actualmente como modelo em estudos toxicológicos, o qual foi utilizado neste trabalho.

Objectivo do trabalho

A carbamazepina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento da epilepsia. Este anti-epiléptico é metabolizado principalmente no fígado, pelo que pode induzir alguma toxicidade ao nível deste órgão. Existem também evidências de que a carbamazepina leva a hiperhomocisteinémia, o que por sua vez está correlacionado com a ocorrência de doenças cardiovasculares. Actualmente estão descritas algumas explicações que tentam elucidar o mecanismo patológico da homocisteína nas doenças cardiovasculares, no entanto este não está esclarecido. Na tentativa de avaliar os mecanismos de hepatotoxicidade e cardiotoxicidade associados à terapia com carbamazepina estudámos os efeitos da própria carbamazepina e da homocisteína na bioenergética mitocondrial e na permeabilidade transitória mitocondrial de mitocôndrias hepáticas e cardíacas, testando a hipótese de que os efeitos hepatotóxicos e cardiotóxicos fossem o resultado de uma acção destes compostos a nível da mitocôndria o que poderia resultar numa disfunção tecidular e do respectivo órgão. Dado que a homocisteína ocorre no organismo humano sob diferentes formas, estudámos os efeitos toxicológicos da homocisteína, através de uma mistura racémica, a DL-homocisteína (DL-Hcy) e de um dos seus derivados, a homocisteína tiolactona, mais especificamente o isómero L (L-HTL).

No sentido de completar este estudo avaliaram-se também os efeitos dos compostos na organização dinâmica dos lípidos com o propósito de entender a distribuição e as alterações destas moléculas ao nível da bicamada fosfolipídica das membranas biológicas.

Materials e Métodos

1. Reagentes

Albumina bovina sérica (BSA), ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanosulfónico (Hepes), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfónico (Mops), carbamazepina, ciclosporina A, DL-homocisteína, L-homocisteína tiolactona, oligomicina, rotenona e protease tipo VIII, obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). O fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), Tris-maleato e 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). O ácido etilenoglicol-tetraacético (EGTA), o tetrafenilfosfónio, o Tris-hidroximetilaminoetano (Tris), o dodecilsulfato de sódio (SDS), o cloreto de potássio, o cloreto de magnésio, o dihidrogenofosfato de potássio e a sacarose foram comprados à Merck (Darmstadt, Alemanha). O Cálcio GreenTM foi fornecido pela Molecular Probes (Leiden, Holanda). O derivado propiônico do DPH, ácido 3-[p-(6 fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenilpropiónico (DPH-PA), foi obtido da Molecular Probes (Junction City, OR).

2. Isolamento de mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a partir de fígado de ratos da estirpe Wistar, com cerca de 200 a 300g de peso corporal utilizando um processo de centrifugação diferencial (Gazzotti *et al.*, 1979). Os órgãos foram retirados após a morte dos animais por deslocamento cervical e colocados em meio de homogeneização a uma temperatura de 4° C. O meio de homogeneização utilizado no isolamento continha 250 mM sacarose, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA a pH 7,4. Foi ainda adicionada ao meio de homogeneização BSA 0,1%, momentos antes da sua utilização. O meio de lavagem utilizado no isolamento era constituído por 250 mM sacarose, 10 mM Hepes a pH 7,2 (Cardoso *et al.*, 2001).

A BSA deslipidificada foi utilizada para eliminar ou limitar a acção dissociadora dos ácidos gordos livres durante o processo de isolamento. Assim, a BSA é usada na rotina dos isolamentos com o objectivo de se obterem mitocôndrias com um elevado grau de integridade funcional (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006).

O EGTA foi usado como agente quelante de cálcio de modo a minimizar os efeitos do cálcio na activação de proteases e fosfolipases libertadas durante o processo de isolamento. Desta forma, a alteração da integridade física das membranas mitocondriais é evitada e conseguem-se obter mitocôndrias de elevada actividade funcional.

2.1. Isolamento de mitocôndrias de fígado

Após remoção do fígado dos animais, este foi colocado em meio de homogeneização e as mitocôndrias foram isoladas pelo método de centrifugação diferencial descrito por Gazzotti e colaboradores em 1979, sujeito a ligeiras modificações.

O processo foi iniciado com o corte do órgão, em pequenos pedaços. Efectuaram-se então algumas lavagens, com meio de homogeneização de modo a remover o sangue presente e transferiu-se o conteúdo para um homogeneizador de vidro tipo potter Elvehjem com cerca de 60 mL de meio de homogeneização. Após a homogeneização com um pistão de teflon a 200 r.p.m, associado a um berbequim, o homogeneizado foi dividido por dois tubos e centrifugado a 2500 r.p.m. durante 10 minutos numa centrífuga Damon IEC B-20A, refrigerada a uma temperatura de 4 °C. De seguida, as partículas de gordura foram cuidadosamente aspiradas e o sobrenadante decantado para dois novos tubos de centrifuga. Após acerto do volume com meio de homogeneização, a mistura foi submetida a uma centrifugação a 10000 r.p.m. durante 10 minutos e o sedimento obtido, contendo a fracção mitocondrial, foi ressuspenso em 1 mL de meio de lavagem. Transferiu-se a suspensão para novos tubos de centrífuga e perfez-se o volume com meio de lavagem, submetendo-a novamente a uma centrifugação a 10000 r.p.m. durante 10 minutos. Este passo de lavagem foi repetido de modo a purificar o conteúdo mitocondrial. Por último, o pellet final foi ressuspenso em cerca de 3 mL de meio de lavagem e guardado em gelo ao longo dos ensaios experimentais.

2.2. Isolamento de mitocôndrias de coração

As mitocôndrias de coração foram isoladas de acordo com o método descrito por Rickwood e colaboradores (1987), com algumas alterações. O coração inicialmente isolado foi colocado em meio de homogeneização a uma temperatura de 4 °C. Após ter sido triturado numa placa de Petri, foi transferido para um homogeneizador de vidro tipo potter Elvehjem e homogeneizado em 20 mL de meio de homogeneização (250 mM sacarose, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, pH 7,4 e 0,1% BSA), utilizando um pistão de teflon a 200 r.p.m adaptado a um berbequim. Adicionalmente, foi efectuada uma adição de 15 µL de protease tipo VIII (0,5 mg/g de coração) ao homogeneizado e cerca de 20 mL de meio de homogeneização, deixando actuar a enzima durante cerca de 1 minuto, e voltando a homogeneizar a mistura com o pistão. A protease permite um melhor isolamento das mitocôndrias dos cardiomiócitos digerindo o tecido altamente fibroso e com um elevado conteúdo proteico constituinte destas células, levando a uma melhor libertação da fracção mitocondrial.

A suspensão obtida foi então dividida por dois tubos de centrífuga e o volume foi ajustado com meio de homogeneização ao qual se seguiu uma centrifugação a 11000 r.p.m durante 10 minutos, numa centrífuga Damon IEC B-20A à temperatura de 4 °C. Esta primeira centrifugação permite sedimentar todo o homogeneizado constituído por células fragmentadas, células íntegras, eritrócitos e organelos intracelulares entre os quais as mitocôndrias, os núcleos e lisossomas, separando noutra fase a protease. A protease é então removida, de modo a evitar a destruição dos componentes proteicos mitocondriais. Após a centrifugação, o sobrenadante é assim decantado e o sedimento ressuspense em 1 mL de meio homogeneização. Os volumes foram ajustados com meio de homogeneização, efectuando de seguida nova centrifugação a 2500 r.p.m durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi cuidadosamente decantado para dois tubos os quais foram centrifugados, após acerto de volume, a 10000 r.p.m durante 10 minutos. O sedimento resultante, contendo as mitocôndrias, foi ressuspense em 1 mL de meio de lavagem (250 mM sacarose, 10 mM Hepes e pH 7,2) e transferido para um mesmo tubo, ao qual foi adicionado aproximadamente 40 mL de meio de lavagem e centrifugado a 10000 r.p.m durante 10 minutos. Este passo pode ser realizado uma vez mais, de modo a obter mitocôndrias mais

puras. O sedimento final foi ressuspensão num volume de meio de lavagem de 400 μL e transferido para um eppendorf tendo permanecido em gelo ao longo da realização dos ensaios.

3. Determinação do conteúdo proteico na fracção mitocondrial pelo método do biureto

A concentração proteica presente na fracção mitocondrial isolada foi determinada pelo método do biureto (Gornall *et al.*, 1949). A reacção do biureto permite a determinação quantitativa de proteínas dada a formação de um quelato de cobre com as ligações peptídicas, a pH alcalino. Este quelato apresenta cor violeta e absorve preferencialmente aos 540-560 nm. A estrutura do complexo formado entre o reagente do biureto e as proteínas não é conhecida mas envolve a coordenação dos iões cobre com o hidrogénio adjacente ao grupo amina das ligações peptídicas. A redução do Cu(II) a Cu(I) é acompanhada por uma mudança de cor, consoante o conteúdo proteico da amostra. A concentração da proteína é então quantificada através de uma curva de calibração construída a partir de padrões de BSA ou outra proteína (Whitford, 2005).

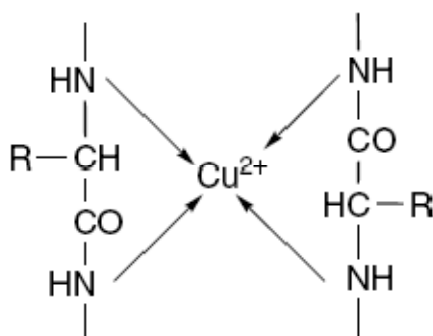


Fig. 18 – Complexo formado entre os iões cobre e as ligações peptídicas no método do biureto (Whitford, 2005).

As amostras de suspensão mitocondrial (25 μL de mitocôndrias de fígado ou coração) e os padrões de albumina foram colocados em tubos de ensaio com 25 μL de SDS a 20% e fez-se o volume até 1 mL, com NaCl a 0,9%. Posteriormente, a cada um dos tubos de ensaio foram adicionados 1,5 mL de reagente alcalino de cobre (reagente do biureto) e após agitação foram

incubados a 37°C durante 30 minutos. As absorvências das amostras e dos padrões foram lidas a 550 nm, num espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/VIS.

A solução stock do biureto foi preparada dissolvendo 15g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em cerca de 80 mL de água ultra-pura (miliQ). Foi preparada uma solução contendo 45g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado em cerca de 700 mL de diluente e adicionou-se esta solução à solução de CuSO_4 perfazendo os 1000 mL com solução diluente. A solução diluente era composta por 5 g de KI num litro de NaOH 0,25M.

O tartarato é utilizado como um agente complexante para manter o cobre em solução e o KI actua na prevenção da oxidação do cobre.

A solução de trabalho do reagente do biureto foi preparada diluindo 5 vezes a solução stock do biureto com o diluente.

4. Efeitos da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na bioenergética mitocondrial

4.1. Avaliação da actividade respiratória mitocondrial por determinação do consumo de oxigénio

O consumo de oxigénio mitocondrial foi avaliado polarograficamente por meio de um eléctrodo de oxigénio do tipo Clark (SI Model 5331, Yellow Spring Instruments) ligado a um registador Kipp & Zonen (Type BD111). Os ensaios foram realizados numa câmara de reacção de 1 mL, fechada e termostaticada a 30 °C, mantendo-se a suspensão mitocondrial sob agitação magnética constante (Cardoso *et al.*, 2003). A calibração do eléctrodo foi feita de acordo com o método descrito por Rickwood e colaboradores (1987).

Os ensaios com mitocôndrias hepáticas foram realizadas com 1 mg de proteína e por sua vez os ensaios com mitocôndrias cardíacas foram realizados com 0,5 mg de proteína, em 1 mL de meio de reacção “respiração” contendo 130 mM sacarose, 50 mM HCl, 2,5 mM MgCl_2 , 0,1 mM EGTA, 2,5 mM KH_2PO_4 e 5 mM HEPES a pH 7,4 (Cardoso *et al.*, 2004). As reacções foram

iniciadas pela adição do substrato glutamato/malato (10 mM/5 mM) tendo-se verificado um ligeiro consumo de oxigénio designado por estado 2 (Fig. 19-1) da respiração, segundo a convenção proposta por Chance e Williams em 1956. O ligeiro consumo de O_2 mantém-se ao longo do tempo, facto que também pode ser consequência da existência de alguma permeabilidade membranar a H^+ , quer por danos ao nível da integridade da membrana interna, quer por trocas iónicas efectuadas por transportadores (Du *et al.*, 1998). A posterior adição de 200 nmoles de ADP/mg proteína originam um substancial aumento no consumo de oxigénio (Fig. 19-2), resultante da fosforilação de ADP a ATP (estado 3 da respiração). Após fosforilação de todo o ADP adicionado, o potencial é restabelecido e a velocidade de consumo de oxigénio retoma à velocidade de consumo inicial estabelecendo-se o designado estado 2 após a fosforilação ou estado 4 (Fig. 19-3) (Du *et al.*, 1998).

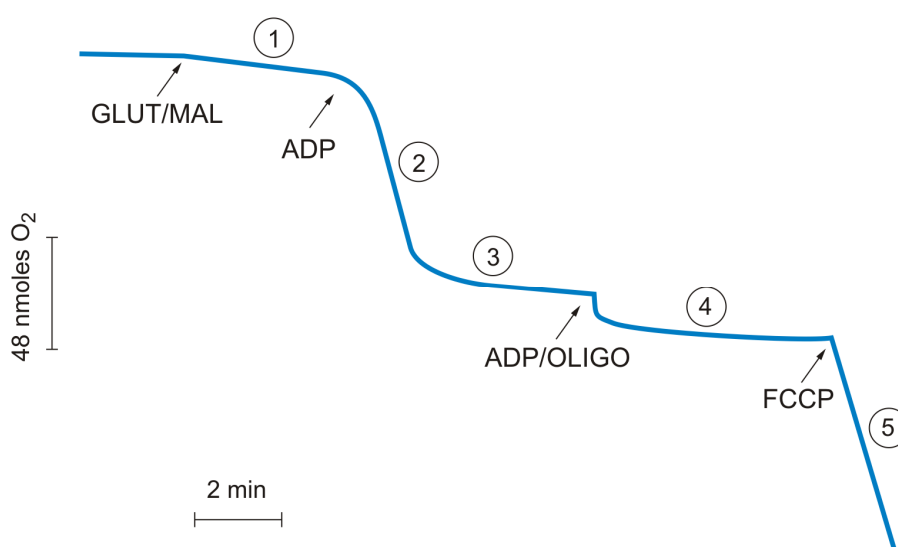


Fig. 19 – Registo típico da avaliação da actividade respiratória mitocondrial por determinação do consumo de oxigénio. (1) estado 2 da respiração, atingido depois da energização mitocondrial com glutamato/malato (GLUT/MAL); (2) estado 3 da respiração, verificado depois da adição de ADP; (3) estado 2 após fosforilação ou estado 4, atingido após fosforilação do ADP adicionado, a ATP; (4) respiração mitocondrial após adição de ADP conjuntamente com oligomicina (ADP/OLIGO), designada por estado 4 oligomicina; (5) respiração após estimulação da cadeia respiratória com FCCP (estado 4 FCCP).

As velocidades de consumo de oxigénio foram calculadas a partir da calibração do eléctrodo fazendo corresponder uma concentração de oxigénio de 240 nmoles O₂/mL de meio de reacção a uma temperatura constante de 30°C, com a escala milimétrica do papel do registador (300 mm). O índice de controlo respiratório foi determinado como o quociente entre a velocidade de consumo de O₂ na presença de ADP (estado 3 da respiração) e a velocidade de consumo de O₂ após o consumo do ADP adicionado (estado 4 da respiração), sendo utilizado como critério de integridade mitocondrial. A eficiência fosforilativa foi determinada pelo quociente ADP/O, ou seja, razão entre o número de nmoles de ADP adicionado e a quantidade de O₂ (expresso em nAtg) consumido para fosforilar todo o ADP.

4.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana ($\Delta\Psi$) foi determinado indirectamente por meio de um eléctrodo de tetrafenilfosfónio (TPP⁺), o qual é selectivo ao catião lipofílico TPP⁺. Como eléctrodo de referência foi utilizado um eléctrodo de Ag/AgCl₂ (modelo MI 402; microeléctrodos, Inc., Bedford, NH). Os eléctrodos foram ligados a um aparelho de pH (pH meter 3305, Jenway) e o sinal correspondente à diferença de potencial gerada entre os eléctrodos foi debitado num registador Kipp & Zonen (Type BD111), após ter passado por um circuito de compensação de voltagem basal (Madeira, 1975).

O potencial membranar mitocondrial pode ser calculado a partir da acumulação de TPP⁺ ao nível da matriz mitocondrial, quando um potencial é gerado, por aplicação da equação 1,

$$\Delta\Psi(\text{mV}) = 59 \log (v/V) - 59 \log (10^{\Delta E/59} - 1) \quad [\text{Eq. 1}]$$

de acordo com o método descrito por Kamo e colaboradores em 1979. Respeitando a equação de Nernst, v , V e ΔE representam, o volume mitocondrial, o volume do meio de incubação e a deflexão do potencial de eléctrodo desde a linha basal, respectivamente. Para o volume da matriz mitocondrial tomou-se o valor de 1,1 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de proteína (Massini *et al.*, 1984). Não foram efectuadas correcções devidas à contribuição da ligação “passiva” de TPP⁺, uma vez que a finalidade destes ensaios não consistia em determinar os valores absolutos do potencial

mitocondrial mas sim avaliar as alterações relativas nos potenciais induzidos pelo composto em estudo.

A determinação do potencial foi efectuada numa câmara de reacção aberta, termostaticada a 30 °C, em 2 mL de meio de reacção “intumescimento” contendo 130 mM sacarose, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 2,5 mM KH₂PO₄ e 5 mM Hepes a um pH de 7,4 (Cardoso

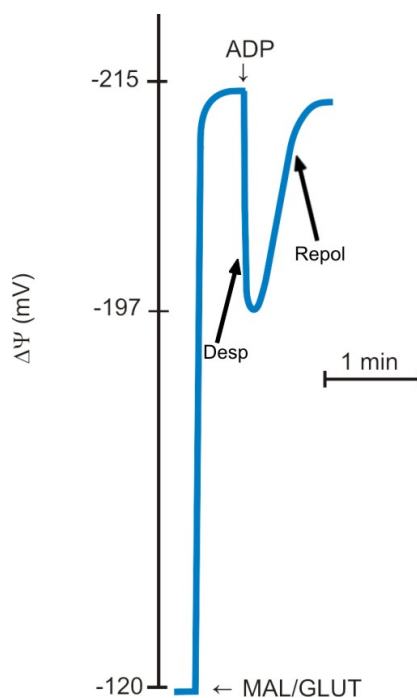


Fig. 20 – Representação típica de um registo de avaliação de potencial por meio de um eléctrodo de TPP⁺. Após adição do substrato respiratório malato/glutamato (MAL/GLUT), é desenvolvido o $\Delta\Psi$. A adição de ADP leva a uma despolarização reversível (Desp), seguida da repolarização (Repol) para valores de $\Delta\Psi$ idênticos aos inicialmente desenvolvidos.

et al., 2004) suplementado com 4 μM TPP⁺ e 10 mM glutamato/5 mM malato. As reacções foram iniciadas por adição de mitocôndrias hepáticas (1 mg de proteína) ou cardíacas (0,5 mg de proteína) ao meio, o que permitiu o desenvolvimento do potencial. A adição de 200 nmoles de ADP induz a uma despolarização correspondente ao gasto de $\Delta\Psi$ necessário para fosforilar a quantidade de ADP adicionada. Após a fosforilação de todo o ADP adicionado dá-se uma

repolarização da membrana mitocondrial interna e o potencial membranar é restabelecido (Fig. 20).

5. Influência da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na permeabilidade transitória mitocondrial.

5.1. Avaliação da permeabilidade transitória mitocondrial por determinação do potencial de membrana mitocondrial

A influência da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na indução da MPT foi avaliada em mitocôndrias de fígado e de coração pela determinação do $\Delta\Psi$ com um eléctrodo de TPP⁺. As reacções foram efectuadas numa câmara aberta, a uma temperatura constante de 30°C em 2 mL de meio reacção contendo 200 mM sacarose, 1 mM KH₂PO₄, 10 µM EGTA e 10 mM Tris-Mops, a pH 7,4. O meio foi ainda suplementado com 2 µM TPP⁺, 1 µM rotenona (Custódio *et al.*, 1998) e 0,5 µM oligomicina. A rotenona é adicionada com o intuito de inibir o complexo I. Deste modo, despreza-se a metabolização de substratos endógenos como o glutamato/malato ao nível do complexo I, dado que este tipo de experiência funciona adequadamente com a adição ao meio de substratos metabolizados ao nível do complexo II (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006).

As reacções foram iniciadas com a adição de 5 mM do substrato respiratório succinato à suspensão mitocondrial e quando a distribuição do TPP⁺ atingiu o equilíbrio adicionou-se uma determinada quantidade de cálcio que induz a uma despolarização da membrana interna devido à entrada de Ca²⁺ para a matriz mitocondrial através do uniporta de cálcio, o que por sua vez se traduz numa perda de potencial (Fig. 21). A perda de potencial é, no entanto, parcialmente recuperada (repolarização) e mantida no caso da despolarização membranar não ser muito acentuada. Para grandes concentrações de cálcio ou para uma situação em que o potencial de membrana é afectado verifica-se uma incapacidade mitocondrial para a repolarização e uma

consequente despolarização que leva à abertura do complexo proteico responsável pela permeabilidade transitória e à indução da permeabilidade transitória mitocondrial.

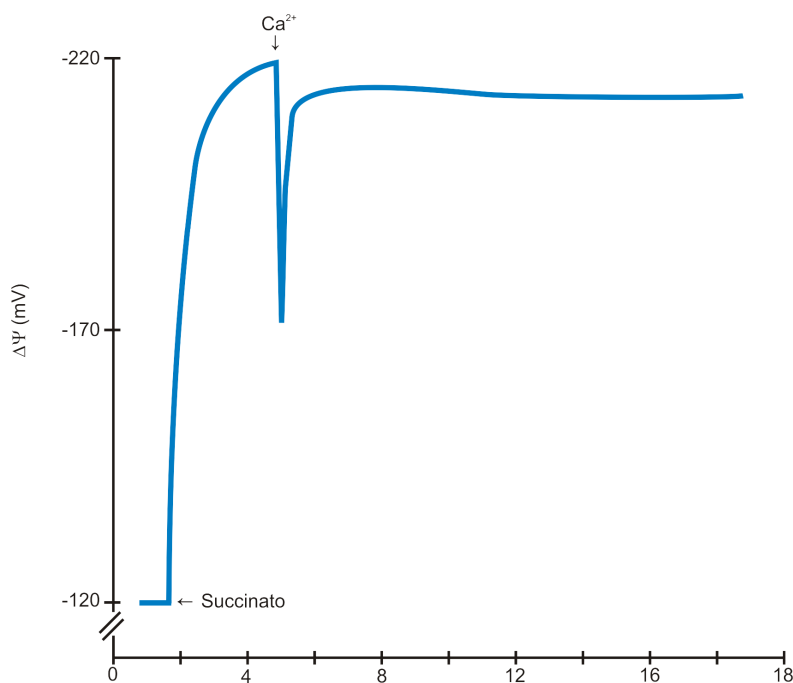


Fig. 21 – Representação típica de um registo de avaliação de potencial por meio de um eléctrodo de TPP^+ .

5.2. Avaliação da permeabilidade transitória mitocondrial por fluorimetria

O efeito da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na MPT foi ainda avaliado através dos fluxos de Ca^{2+} a nível mitocondrial. A distribuição de cálcio foi avaliada através da distribuição da sonda fluorescente Calcium GreenTM no meio, excitando a amostra a 506 nm e lendo a intensidade da luz emitida a 532 nm com fendas de excitação e emissão de 6 e 8 nm, respectivamente. A intensidade de fluorescência foi determinada num fluorimetria Perkin-Elmer LS 50B. As reacções tiveram lugar em cuvetes de quartzo, a uma temperatura constante de 37 °C e em 2 mL de meio de reacção contendo 200 mM sacarose, 1 mM KH_2PO_4 , 10 μM EGTA e 10 mM Tris-Mops a pH 7,4. Ao meio foram ainda previamente adicionados 2 μM de rotenona e 0,5 μM de oligomicina (Custódio *et al.*, 1998).

As reacções foram iniciadas com a adição de 0,5 mg de proteína e 100 μM de Cálcio Green™, iniciando-se o registo dos níveis de fluorescência. Passados 60 segundos foi adicionado Ca^{2+} ao meio, que ao ligar-se à sonda faz com esta emita fluorescência e deste modo os níveis de fluorescência subam. Aos 120 segundos adicionou-se o substrato respiratório succinato e é gerado $\Delta\Psi$ utilizado pelo uniporta de cálcio para acumular o cálcio presente no meio. Deste modo, a concentração de cálcio presente no meio desce e, conseqüentemente, a fluorescência diminui podendo-se acompanhar a distribuição de cálcio no meio ao longo do tempo como representado na Fig. 22.

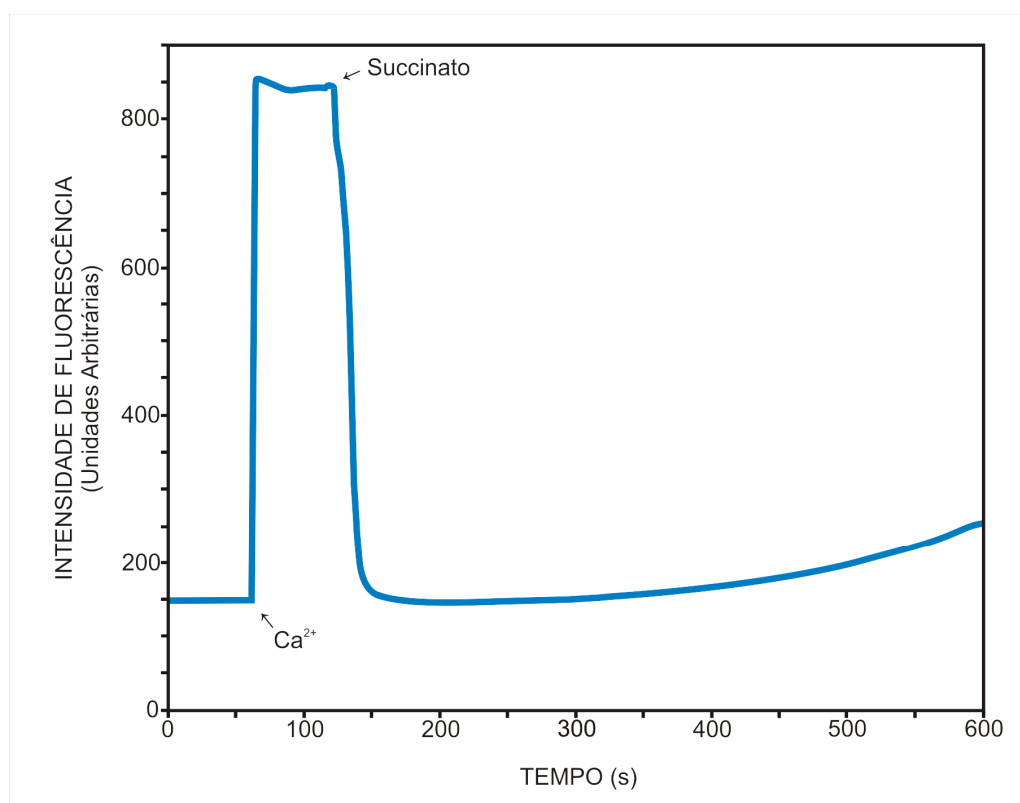


Fig. 22 – Representação típica de um registo de avaliação da distribuição de Ca^{2+} por fluorimetria.

6. Avaliação dos efeitos da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na fluidez membranar, por polarização de fluorescência

Os efeitos da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona na organização dinâmica dos lípidos foram avaliados a partir de um sistema membranar de lipossomas multilamelares de DPPC por polarização de fluorescência do DPH e do seu derivado propiônico, DPH-PA.

A polarização de fluorescência (P) reflecte a difusão rotacional da sonda fluorescente em causa, dependendo da organização do meio circundante. Um elevado grau de polarização representa uma ordem estrutural elevada, ou seja, uma certa rigidez do meio membranar circundante em que a sonda tem menor liberdade rotacional. Por sua vez, um grau de polarização mais baixo é indicativo de uma maior liberdade rotacional no meio membranar envolvente correspondendo a um meio membranar mais fluído (Shinitzky e Barenholz, 1978).

Os lipossomas multilamelares de DPPC foram preparados a partir de uma solução clorofórmica de DPPC 6,9 mM. O clorofórmio foi evaporado sob corrente de azoto, de modo a distribuir o lípido numa camada fina, pelas paredes de um balão esmerilado. O resíduo lipídico seco foi ressuspenso em tampão contendo Tris-maleato 10 mM, KCl 50 mM a pH = 7,4, por agitação vigorosa em vortéx, intercalando com 4 períodos de 1 minuto de sonificação, em banho de água. A solução de lipossomas foi então dividida por dois balões com uma concentração nominal de 345 μ M em fosfolípido e as sondas DPH e DPH-PA foram adicionadas à solução de forma a obter um quociente molar fosfolípido/sonda de 400. A solução de lipossomas foi então guardada durante a noite na ausência de luz, à temperatura ambiente e sob agitação constante de modo a que as sondas incorporassem totalmente os lipossomas (Custódio *et al.*, 1993).

Após o período de incorporação das sondas adicionaram-se ao meio os respectivos compostos em estudo (carbamazepina, homocisteína ou homocisteína tiolactona) deixando incubar durante um período de 30 minutos e iniciaram-se as medições espectrofluorimétricas.

Os registos espectrofluorimétricos foram realizadas num espectrofluorímetro computadorizado Perkin-Elmer, modelo LS 50, equipado com bloco para termostatização de cuvetes e sistema automático de agitação magnética.

As medições de polarização de fluorescência do DPH e DPH-PA foram efectuadas com excitação a 336 nm, pela componente vertical da luz monocromática polarizada (polarizador na posição vertical) e lidas as intensidades de luz emitida a 450 nm, quando o polarizador colocado entre a amostra e o detector estava orientado paralela (I_{\parallel}) e perpendicularmente (I_{\perp}) ao sentido de polarização da luz de excitação (Litman e Barenholz, 1982). As aberturas de fenda de excitação e de emissão usadas foram de 6 e 8 nm, respectivamente. Os valores de P, determinados automaticamente pelo computador, foram calculados pelo quociente:

$$P = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp})}{(I_{\parallel} + I_{\perp})}$$

(Litman e Barenholz, 1982)

após determinação automática dum factor de correcção (G)

$$G = (I_{\parallel}^* - I_{\perp}^*)$$

dado pela razão dos componentes vertical e horizontal da luz emitida quando o polarizador colocado entre o feixe de excitação e a amostra se orienta horizontalmente (Toplack *et al.*, 1990).

O valor corrigido de P foi calculado automaticamente por computador, segundo a equação:

$$P = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp}G)}{(I_{\parallel} + I_{\perp}G)}$$

7. Estudo estatístico

Todas as determinações efectuadas nos estudos de avaliação da actividade respiratória e potencial mitocondrial foram efectuados em triplicado e com ensaios independentes (n=3). A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism 4. O significado estatístico entre os ensaios foi avaliado pelo teste ANOVA (não paramétrico) seguido do teste de Tukey, para efectuar comparações entre grupos. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão (média \pm SD).

Resultados

O efeito toxicológico da carbamazepina, homocisteína e homocisteína tiolactona foi avaliado ao nível da bioenergética e da permeabilidade transitória mitocondrial de mitocôndrias de fígado e coração. Potenciais efeitos na bioenergética mitocondrial foram avaliados pelo estudo do consumo de oxigénio e do potencial de membrana mitocondrial. Por sua vez a acção dos compostos a nível da permeabilidade transitória mitocondrial foi avaliada pelo potencial de membrana e pelo fluxo de Ca^{2+} mitocondrial associado à permeabilidade transitória mitocondrial induzida por Ca^{2+} .

1. Efeitos da carbamazepina na bioenergética e na permeabilidade transitória de mitocôndrias hepáticas e cardíacas

O estudo dos efeitos da CBZ no consumo de oxigénio demonstra que este fármaco não altera o estado 2 da respiração, resultante da adição do substrato respiratório para o complexo I - glutamato/malato - quer em mitocôndrias de fígado (Fig. 23A), quer em mitocôndrias cardíacas (Fig. 24A). Após a adição de ADP verifica-se um aumento abrupto no consumo de oxigénio desenvolvendo-se o estado 3 da respiração, o qual é resultado do gasto do potencial de membrana na fosforilação de ADP a ATP e do potencial dispendido no transporte de ADP para a matriz mitocondrial. Esta função mitocondrial não é alterada em mitocôndrias de fígado (Fig. 23B), nem em mitocôndrias cardíacas (Fig. 24B) nas concentrações de carbamazepina estudadas. Terminada a fosforilação de todo o ADP a ATP, a cadeia respiratória restabelece o $\Delta\Psi$ e o consumo de oxigénio toma valores idênticos aos iniciais, atingindo-se o estado 2 após a fosforilação ou estado 4. As concentrações de carbamazepina estudadas não alteram significativamente o estado 4 da respiração, em relação ao controlo (ausência de CBZ) (Fig. 23C e 24C). Os índices de controlo respiratório (ICR) das mitocôndrias hepáticas (Fig. 23D) e cardíacas (Fig. 24D) foram calculados pelo quociente entre o estado 3 e o estado 4 da respiração, permitindo controlar a integridade das preparações mitocondriais. Foi ainda avaliada a eficiência fosforilativa da cadeia respiratória das mitocôndrias hepáticas (Fig.23E) e cardíacas (Fig.24E) através do coeficiente ADP/O, definido pela razão entre o ADP adicionado ao meio (expresso em nmol) e a quantidade de O_2 consumido (expresso em nAtg) necessária para fosforilar todo o

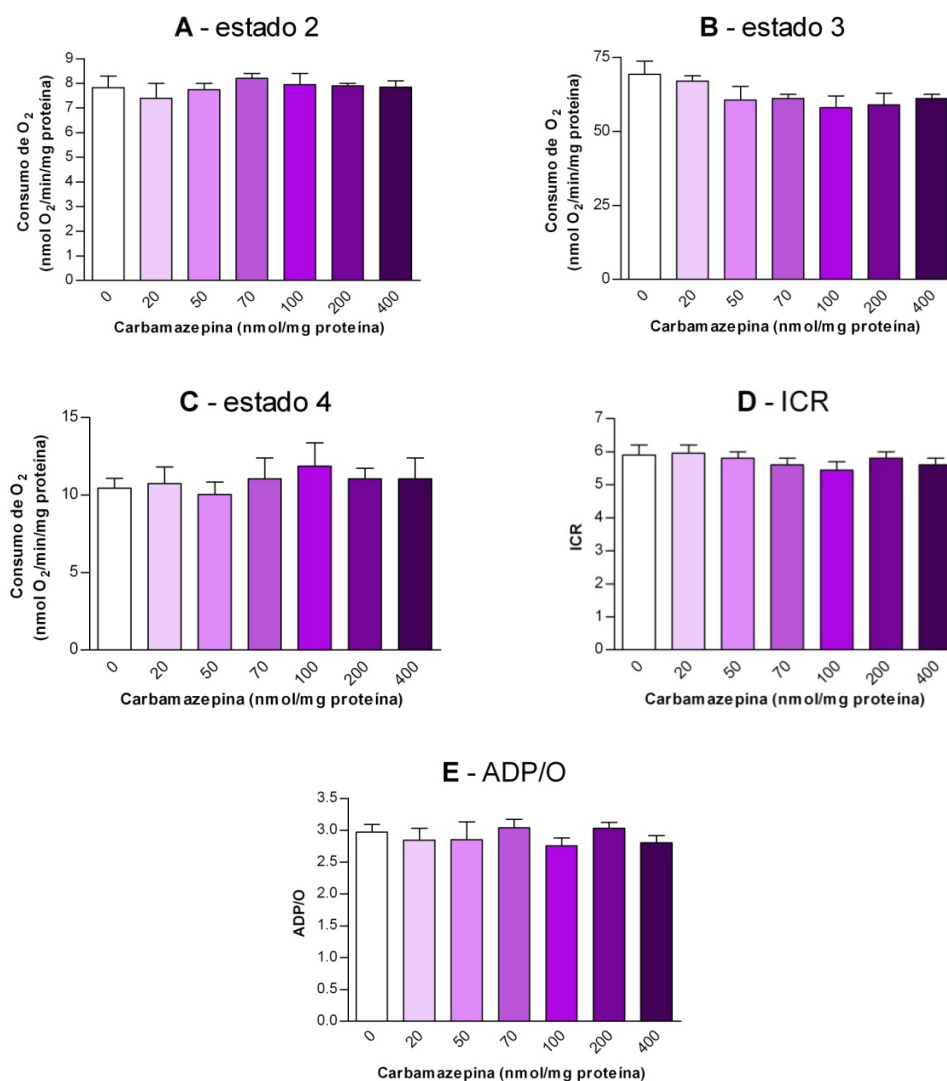


Fig. 23 – Efeitos da carbamazepina na cadeia respiratória de mitocôndrias hepáticas. Os estudos foram realizados com 1 mg proteína, a 30° C e em 1 mL de meio de reacção respiração (ver materiais e métodos) na ausência e na presença de 20, 50, 70, 100, 200 e 400 nmol de carbamazepina/mg proteína, após 3 minutos de incubação. O consumo de oxigénio foi determinado com um eléctrodo de O₂ tipo Clark. A adição de 10 mM glutamato/5 mM malato gerou o estado 2 da respiração (A). O estado 3 da respiração (B) foi induzido por adição de 200 nmol de ADP, atingindo-se o estado 4 (C) após fosforilação do ADP. O ICR (D) foi determinado pela razão entre o estado 3 e o estado 4 da respiração e o quociente ADP/O pela razão entre o número de moles de ADP adicionado e o número de nAtg de oxigénio consumido. Os valores das velocidades de respiração mitocondrial são expressos em nmol O₂/min/mg de proteína e os resultados apresentados correspondem à média ± SD de 3 experiências independentes (n=3).

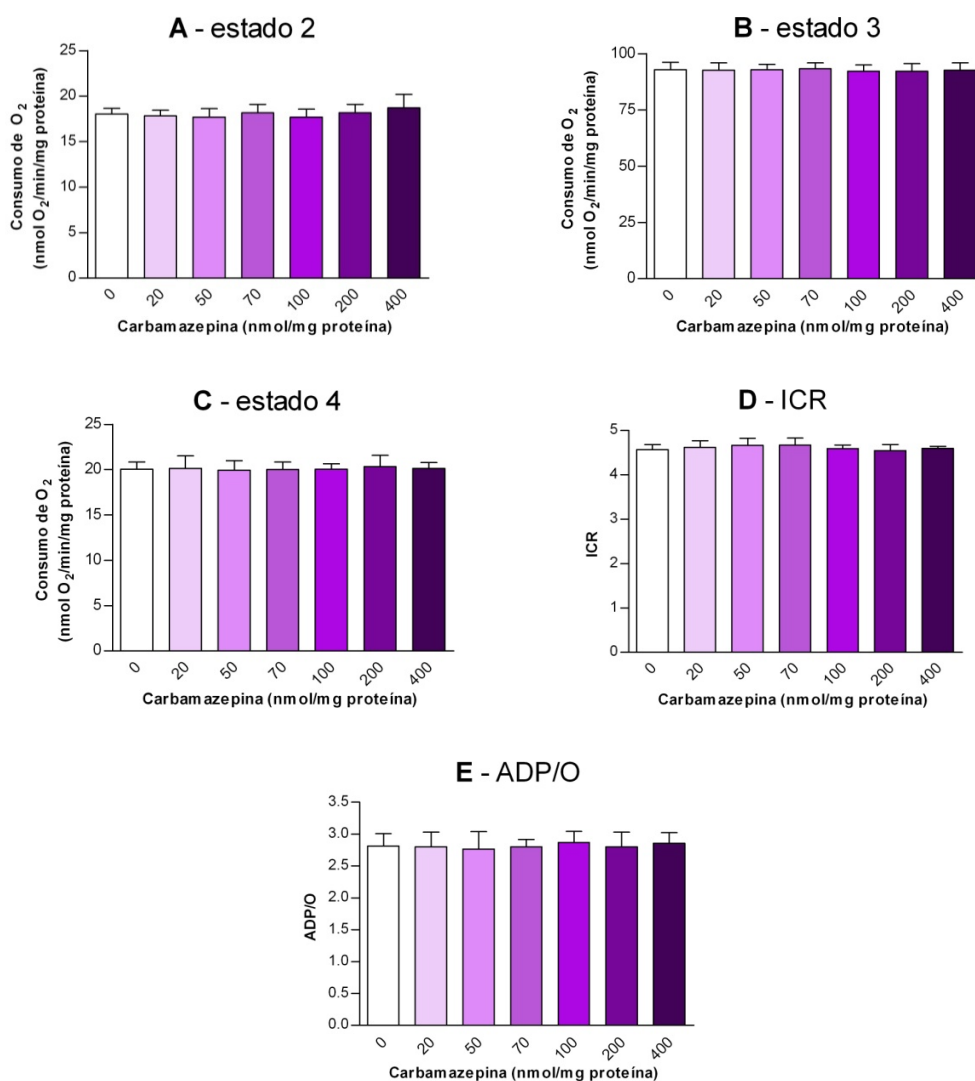


Fig. 24 – Efeitos da carbamazepina na cadeia respiratória de mitocôndrias cardíacas. Os estudos foram realizados com 0,5 mg proteína, a 30° C e em 1 mL de meio de reacção respiração (ver nos materiais e métodos) na ausência e na presença de 20, 50, 70, 100, 200 e 400 nmol de carbamazepina/mg proteína, após 3 minutos de incubação. O consumo de oxigénio foi determinado com um eléctrodo de O₂ tipo Clark. A adição de 10 mM glutamato/5 mM malato gerou o estado 2 da respiração (A). O estado 3 da respiração (B) foi induzido por adição de 200 nmol de ADP, atingindo-se o estado 4 (C) após fosforilação do ADP. O ICR (D) foi calculado pela razão entre o estado 3 e o estado 4 da respiração e o quociente ADP/O pela razão entre o número de moles de ADP adicionado e o número nAtg de oxigénio consumido. Os valores das velocidades de respiração mitocondrial são expressos em nmol O₂/min/mg de proteína e os resultados apresentados correspondem à média ± SD de 3 experiências independentes (n=3).

ADP adicionado. Como se verifica, e de acordo com os efeitos no estado 3 da respiração não existem alterações significativas nestes parâmetros, na presença de concentrações crescentes de CBZ.

Assim, o consumo de oxigénio pelas mitocôndrias hepáticas e cardíacas nos vários estados respiratórios, na presença de diferentes concentrações de CBZ (20, 50, 70, 100, 200 e 400 nmol/mg proteína), não é afectado pelo fármaco dado que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos respectivos controlos, isto é, na ausência de carbamazepina, o que demonstra que este fármaco não afecta a respiração mitocondrial e a fosforilação oxidativa em mitocôndrias hepáticas e cardíacas.

Ensaio realizados com diferentes tempos de incubação também não apresentaram alterações nas velocidades de consumo de oxigénio, pelo que o tempo de incubação não parece ser um factor relevante para a acção da carbamazepina nas mitocôndrias em estudo (resultados não apresentados).

No sentido de completar o estudo do efeito da carbamazepina na bioenergética mitocondrial foram também avaliados potenciais alterações da carbamazepina no potencial de membrana mitocondrial. Como se pode observar, as mitocôndrias hepáticas (Fig. 25A) e cardíacas (Fig. 26A) desenvolvem um potencial próximo dos -210 mV após adição do substrato respiratório glutamato/malato. A adição de ADP ao meio induz o estado 3 da respiração que em conjunto com o translocador de ADP/ATP consome $\Delta\Psi$ levando à despolarização do mesmo (Figs. 25B e 26B). Após a fosforilação do ADP pela ATP sintase ocorre a repolarização do $\Delta\Psi$ para valores idênticos aos iniciais (Figs. 25C e 26C). O tempo que decorre desde a adição do ADP, até à sua total fosforilação é designado por tempo de fosforilação e é expresso em segundos (Figs. 25D e 26D).

A incubação das mitocôndrias com a CBZ nas concentrações de 20, 50, 70, 100, 200 e 400 nmol/mg proteína não alterou o potencial de membrana desenvolvido pelas mitocôndrias hepáticas (Fig. 25A) e cardíacas (Fig. 26A). A despolarização induzida pelo ADP (Figs. 25B e 26B) e a velocidade de repolarização do $\Delta\Psi$ (Figs. 25C e 26C) também não são alteradas na presença de CBZ nas concentrações estudadas nos dois tipos de mitocôndrias. Por sua vez, o tempo de fosforilação também não se encontra alterado indicando que a capacidade fosforilativa das mitocôndrias hepáticas (Fig. 25D) e cardíacas (Fig. 26D) não é afectada pela CBZ, o que em

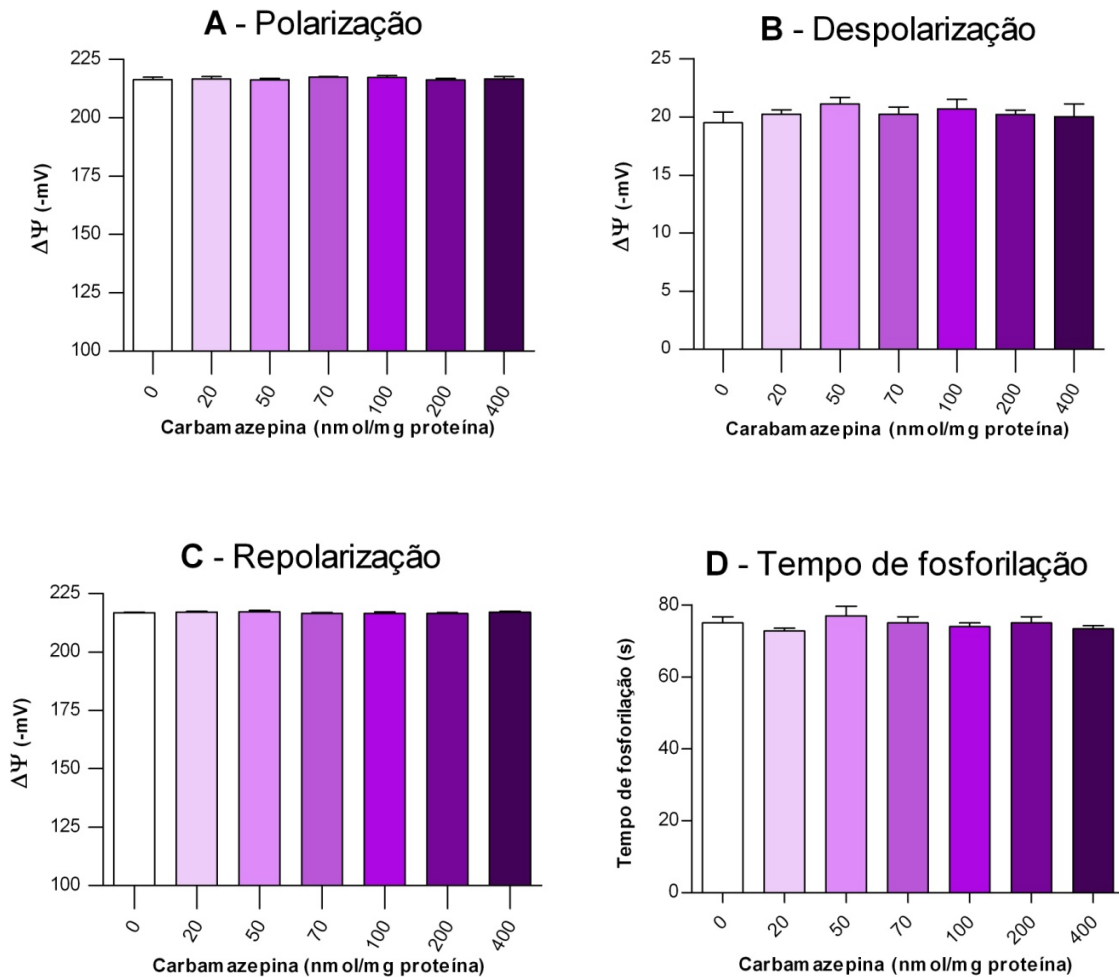


Fig. 25 – Efeito da carbamazepina no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias hepáticas. Os ensaios decorreram com 1 mg de proteína a 30°C, em 2 mL de meio de reacção respiração suplementado com 2 μM TPP^+ . (A), (B) e (C) traduzem, respectivamente, os valores dos potenciais desenvolvidos após a adição de 5 mM glutamato/2,5 mM malato, 200 nmol de ADP e na fase de recuperação do potencial, na presença de 0, 20, 50, 70, 100, 200 e 400 nmol de carbamazepina/mg proteína, após 3 minutos de incubação. (D) representa o tempo de fosforilação e é expresso em segundos. Os valores dos potenciais foram determinados com um eléctrodo de TPP^+ e são expressos em milivoltes (-mV) representando 3 experiências independentes ($n=3$).

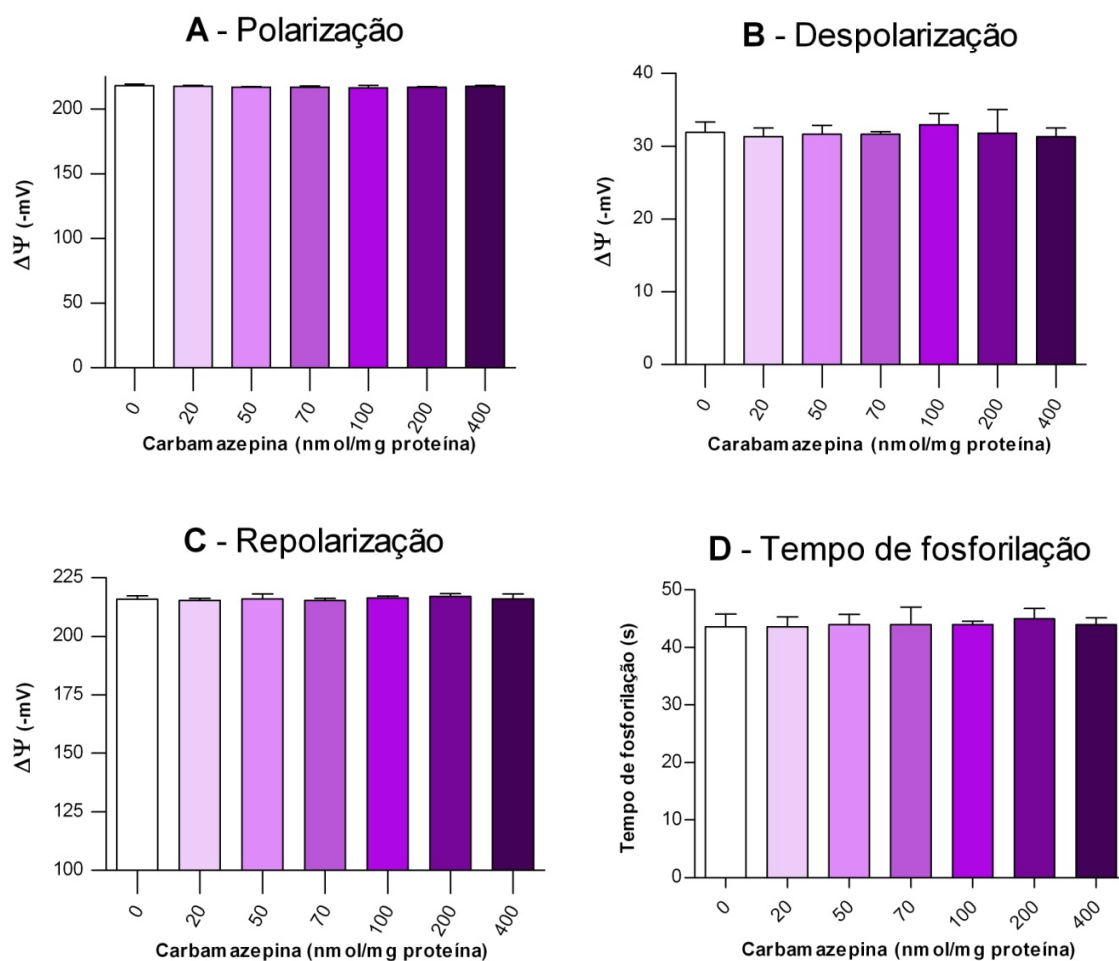


Fig. 26 – Efeito da carbamazepina no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias cardíacas. Os ensaios decorreram com 1 mg de proteína a 30°C, em 2 mL de meio de reacção respiração suplementado com 2 μM TPP^+ . (A), (B) e (C) traduzem, respectivamente, os valores dos potenciais desenvolvidos após a adição de 5 mM glutamato/2,5 mM malato, 200 nmol de ADP e na fase de recuperação do potencial, na presença de 0, 20, 50, 70, 100, 200 e 400 nmol de carbamazepina/mg proteína, após 3 minutos de incubação. (D) representa o tempo de fosforilação e é expresso em segundos. Os valores dos potenciais foram determinados com um eléctrodo de TPP^+ e são expressos em milivoltes (-mV) representando 3 experiências independentes (n=3).

conjunto com o ADP/O (Figs. 23E e 24E) indicam que a molécula não tem efeitos na bioenergética mitocondrial de mitocôndrias de fígado e coração.

A acção da CBZ na permeabilidade transitória mitocondrial foi avaliada pela determinação do potencial membranar em mitocôndria hepáticas. As mitocôndrias têm a capacidade de acumular Ca^{2+} na sua matriz, mas quando esta capacidade é modificada ocorre uma despolarização completa do potencial de membrana por indução da MPT. Desta forma, consegue-se avaliar o efeito de um dado composto na MPT fazendo o registo do $\Delta\Psi$, utilizando concentrações de Ca^{2+} que uma população de mitocôndrias consegue acumular.

A CBZ (20 nmol/mg proteína), individualmente, não altera o potencial de membrana desenvolvido por mitocôndrias hepáticas após adição do succinato como substrato respiratório (Figs. 27A e B – CBZ). Os ensaios realizados com uma concentração de Ca^{2+} (120 nmol/mg proteína) nos quais as mitocôndrias hepáticas conseguiam acumular todo o Ca^{2+} disponibilizado (Figs. 27A e B – Ca^{2+}) mostram um perfil típico da manutenção do potencial de membrana ao longo do tempo, indicativo de que não ocorre indução da MPT.

Após incubação das mitocôndrias hepáticas, durante 6 minutos com carbamazepina e de a estas ter sido adicionado o substrato respiratório succinato (Figs. 27A e B – Succinato), registou-se um desenvolvimento do $\Delta\Psi$. Dada a estabilização do $\Delta\Psi$ desenvolvido, adicionaram-se 120 nmoles Ca^{2+} /mg proteína ao meio (Figs. 27A e B – seta Ca^{2+}) provocando uma despolarização reversível, consequência do consumo do $\Delta\Psi$ pelo uniporta de cálcio para acumular este ião. O potencial de membrana foi restabelecido após breves segundos (repolarização), no entanto foi-se gradualmente dissipando ao longo do tempo (Figs. 27A e B – CBZ + Ca^{2+}). Como as concentrações de Ca^{2+} utilizadas neste ensaio foram as mesmas das utilizadas no ensaio anterior os resultados demonstram que o cálcio adicionado não é responsável pela despolarização observada, sugerindo que a CBZ é uma molécula indutora da permeabilidade transitória mitocondrial. Este efeito de indução da MPT pela CBZ é comprovado quando se efectuam ensaios nas mesmas condições (Figs. 27A e B – CBZ + Ca^{2+}), mas com a adição prévia de CyA às mitocôndrias (Fig. 27A – CyA) ou na altura da despolarização do potencial (Fig. 27B – CyA), nos quais se verifica uma total repolarização do potencial de membrana após adição deste inibidor da MPT. Desta forma, pode-se afirmar que a despolarização observada pela carbamazepina no potencial de membrana após adição de Ca^{2+} ocorre por indução da MPT.

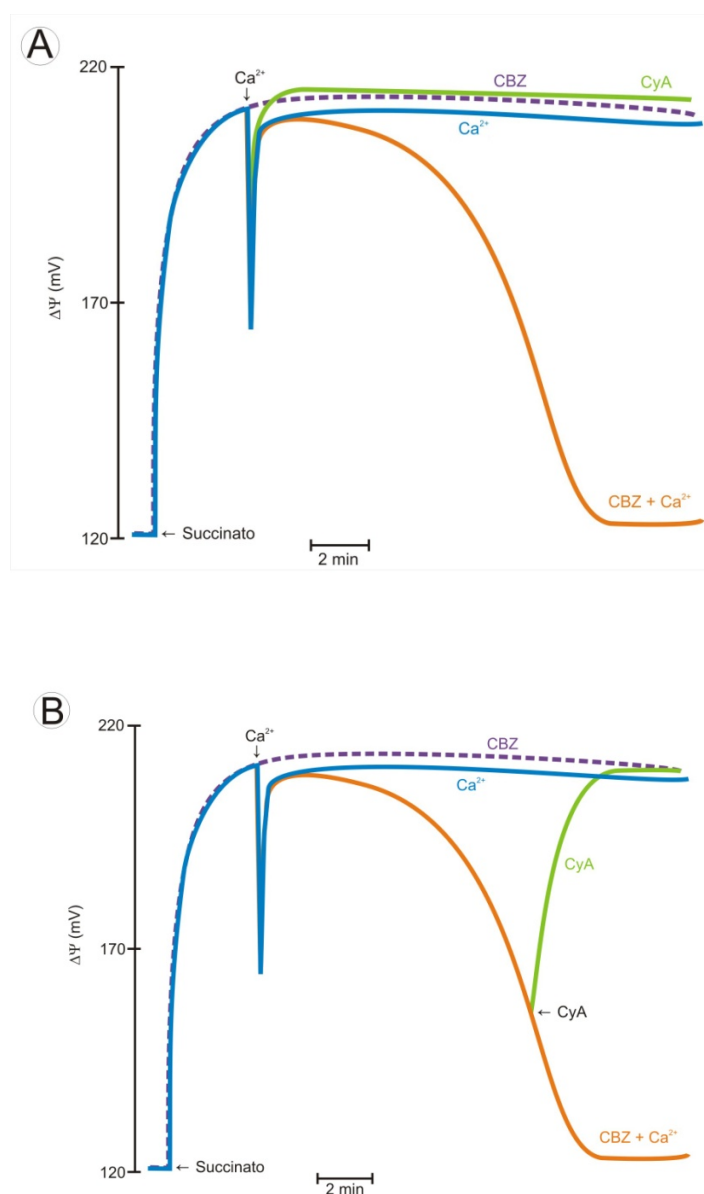


Fig. 27 – Efeito da carbamazepina no $\Delta\Psi$ associado à indução da MPT em mitocôndrias hepáticas. As mitocôndrias (0,5 mg proteína) foram incubadas em meio de reacção de intumescência (ver materiais e métodos), suplementado com 2 μM rotenona, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ oligomicina e 2 μM TPP^+ . As reacções foram iniciadas com succinato 5 mM e o Ca^{2+} (120 nmol Ca^{2+}/mg proteína) foi adicionado após o $\Delta\Psi$ ter estabilizado (Ca^{2+}). A CBZ (20-400 nmol/mg proteína) foi incubada durante 6 minutos com as mitocôndrias antes da adição de succinato e Ca^{2+} , conforme indicado pelas setas (CBZ + Ca^{2+}). A CyA foi incubada antes do início das reacções (A – CyA) e no decorrer destas (B – CyA). O traço descontínuo (CBZ) representa um ensaio sem a adição de Ca^{2+} . Os valores dos potenciais são expressos em milivoltes (-mV) e foram determinados com um eléctrodo de TPP^+ .

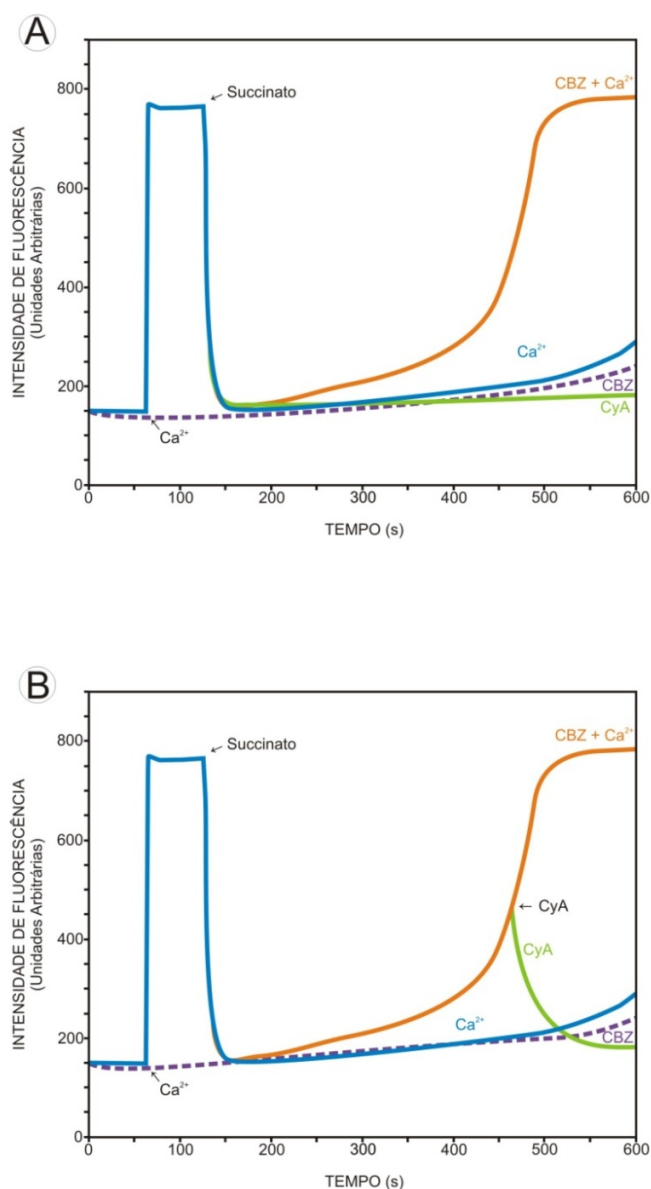


Fig. 28 – Efeitos da carbamazepina nos fluxos de Ca^{2+} associados à indução da MPT em mitocôndrias hepáticas. As mitocôndrias (0,5 mg proteína) foram incubadas em meio de reação de intumescência (ver materiais e métodos), suplementado com 2 μM rotenona, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ oligomicina e 100 μM da sonda Cálcio GreenTM. A intensidade de fluorescência do Cálcio GreenTM foi determinada com o λ de excitação a 506 nm e absorção a 532 nm e fendas de excitação e absorção a 6 e 8 nm, respectivamente. Os ensaios decorreram na presença de 20-400 nmol CBZ/mg proteína (CBZ + Ca^{2+}) e na sua ausência (Ca^{2+}), tendo sido adicionado às mitocôndrias 120 nmol Ca^{2+} /mg proteína e succinato 5 mM. A CyA foi pré-incubada com as mitocôndrias na presença de CBZ (A – CyA) e adicionada na fase de libertação do Ca^{2+} (B – CyA). As mitocôndrias foram também pré-incubadas com a CBZ na ausência de Ca^{2+} (CBZ). A intensidade de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias.

Os efeitos indutores da carbamazepina foram também demonstrados pelo facto deste fármaco levar à libertação de Ca^{2+} em consequência da indução da MPT. Como se pode observar na Fig. 28, a adição de succinato ao meio reduz a intensidade de fluorescência, devido à acumulação de Ca^{2+} (120 nmol/mg proteína) para a matriz mitocondrial (Fig. 28 A e B – Ca^{2+}). No entanto, em mitocôndrias hepáticas incubadas com CBZ (20-400 nmol/mg proteína), após a acumulação do Ca^{2+} é seguido um aumento dos níveis de fluorescência (Fig. 28 A e B – CBZ + Ca^{2+}), indicando que o Ca^{2+} é libertado para o meio de reacção. Este efeito é inibido pela pré-incubação das mitocôndrias com CyA (Fig. 28 A – CyA). A adição de CyA no decorrer da libertação do Ca^{2+} confere às mitocôndrias a capacidade de o reacumular (Fig. 28 B – CyA), indicando que a libertação de Ca^{2+} está associada à indução da MPT. Assim, o estudo dos fluxos de Ca^{2+} em mitocôndrias hepáticas permite-nos afirmar que a CBZ induz a MPT. Desta forma, de acordo com os resultados obtidos no estudo do potencial de membrana associado à MPT, pode-se afirmar que a CBZ tem uma forte acção indutora na permeabilidade transitória mitocondrial, em mitocôndrias hepáticas.

Os efeitos da CBZ na MPT foram também avaliados em mitocôndrias cardíacas. As mitocôndrias cardíacas acumulam significativamente mais Ca^{2+} quando comparadas com as hepáticas pelo que se começou por determinar a concentração de Ca^{2+} (240 nmol/mg proteína) acumulada pela população de mitocôndrias. Posteriormente, foram efectuados ensaios na presença de CBZ de modo a estudar o seu efeito da CBZ no potencial de membrana associado à MPT. Nas concentrações estudadas, a CBZ (20-400 nmol/mg proteína) não altera o potencial de membrana após a adição de Ca^{2+} (Fig. 29 CBZ + Ca^{2+}), o que se pode inferir pela semelhança entre o ensaio na ausência de CBZ (Fig. 29 - Ca^{2+}). Desta forma, ao contrário do observado em mitocôndrias hepáticas, a CBZ não tem a capacidade de induzir a despolarização associada à indução da MPT. Por sua vez, a adição de uma concentração de Ca^{2+} mais elevada (270 nmol/mg proteína) induz a despolarização das mitocôndrias (Fig. 29 – [Ca^{2+}] alta). No entanto a inibição deste efeito pela pré-incubação das mitocôndrias cardíacas com CyA (Fig. 29 – CyA), confirma a possível indução da MPT, em mitocôndrias cardíacas na presença de elevadas concentrações de Ca^{2+} .

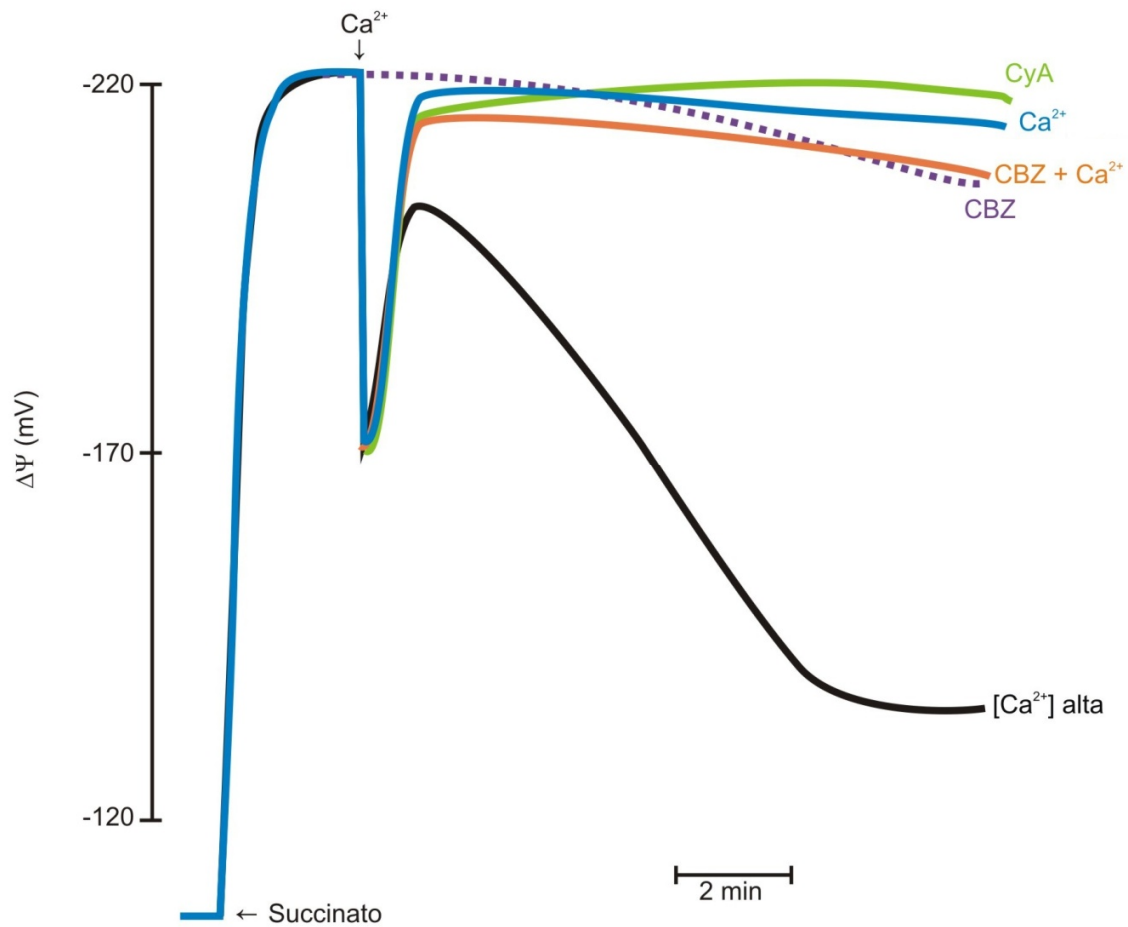


Fig. 29 – Efeito da carbamazepina no $\Delta\Psi$ associado à indução da MPT em mitocôndrias cardíacas. As mitocôndrias (0,5 mg proteína) foram incubadas nas condições descritas na legenda da Fig. 27. As reacções foram iniciadas com succinato 5 mM e o Ca^{2+} (240 nmol Ca^{2+} /mg proteína) foi adicionado após o $\Delta\Psi$ ter estabilizado (Ca^{2+}). A CBZ (20-400 nmol/mg proteína) foi incubada durante 6 minutos com as mitocôndrias antes da adição de succinato e Ca^{2+} (CBZ + Ca^{2+}). As mitocôndrias foram ainda sujeitas à adição 270 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína sem ($[\text{Ca}^{2+}]$ alta) e com a pré-incubação de CyA (CyA). O traçado descontinuo (CBZ) representa um ensaio sem a adição de Ca^{2+} . O valor dos potenciais é expresso em milivoltes (-mV) e foi determinado com um eléctrodo de TPP^+ .

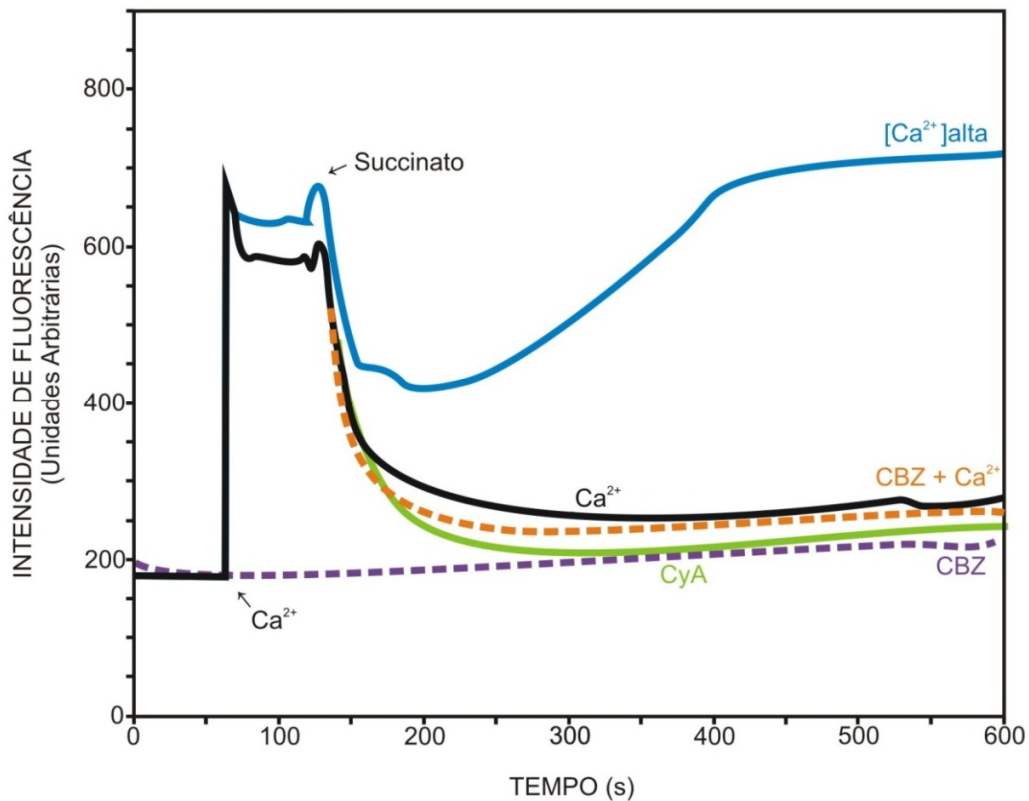


Fig. 30 – Efeitos da carbamazepina nos fluxos de Ca^{2+} associados à indução da MPT em mitocôndrias cardíacas. As mitocôndrias (0,5 mg proteína) foram incubadas em meio de reação de intumescência como descrito na legenda da Fig. 28. A intensidade de fluorescência do Cálcio GreenTM, foi determinada com o λ de excitação a 506 nm, absorção a 532 nm e fendas de excitação e absorção a 6 e 8 nm, respectivamente. Os ensaios decorreram na presença de 20-400 nmol CBZ/mg proteína (CBZ + Ca^{2+}) e na ausência sua ausência (Ca^{2+}), tendo sido adicionado às mitocôndrias 240 nmol Ca^{2+} /mg proteína e succinato 5 mM. As mitocôndrias foram ainda incubadas com CyA adicionando-se 270 nmol de Ca^{2+} /mg proteína (CyA) e sujeitas à adição da mesma concentração de Ca^{2+} , sem a adição de CyA ($[\text{Ca}^{2+}]$ alta). O traçado descontínuo representa um ensaio em que as mitocôndrias foram incubadas com CBZ não havendo adição de Ca^{2+} (CBZ). A intensidade de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias.

O efeito da CBZ na MPT foi também confirmado na acumulação e libertação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias cardíacas. De facto, as mitocôndrias cardíacas pré-incubadas com CBZ (20-400 nmol/mg proteína) conseguem acumular e sustentar o Ca^{2+} (240 nmol/mg proteína) na matriz mitocondrial (Fig. 30 – CBZ + Ca^{2+}), após energização com succinato. Assim, em conjunto com o estudo do potencial de membrana associado à MPT, verifica-se que a CBZ na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} não induz à MPT. Porém, a adição de 270 nmol Ca^{2+} /mg proteína permite-nos verificar que as mitocôndrias cardíacas não conseguem sustentar uma concentração de Ca^{2+} elevada, efeito que é inibido pela CyA (Fig. 30 – CyA).

2. Efeitos da DL-homocisteína na bioenergética e na permeabilidade transitória de mitocôndrias hepáticas e cardíacas

Na tentativa de esclarecer os mecanismos de hepatotoxicidade e cardiotoxicidade observado em doentes hiperhomocisteinémicos avaliou-se também o efeito de uma mistura racémica de homocisteína, a DL-Hcy, na bioenergética e na permeabilidade transitória de mitocôndrias hepáticas e cardíacas.

O estudo dos efeitos da DL-Hcy na bioenergética mitocondrial foi efectuado pela avaliação do consumo de oxigénio e do potencial de membrana mitocondrial, à semelhança do que foi feito para a carbamazepina. Todavia, este aminoácido atinge valores sanguíneos mais elevados, pelo que as concentrações utilizadas nos estudos com DL-Hcy são superiores às da CBZ.

Os resultados obtidos demonstram que o consumo de oxigénio observado com mitocôndrias hepáticas (Fig. 31) e cardíacas (Fig. 32), ao longo dos diferentes estados respiratórios na presença de DL-Hcy (1,2-2 μmol /mg proteína), não parece ser afectado dado não se registarem alterações significativas em relação aos respectivos controlos (na ausência de DL-Hcy). Por sua vez, a DL-Hcy também não tem efeitos no ICR e o ADP/O das mitocôndrias hepáticas e cardíacas, indicativo de que este aminoácido não afecta a cadeia respiratória mitocondrial e a eficiência fosforilativa dos tipos de mitocôndria.

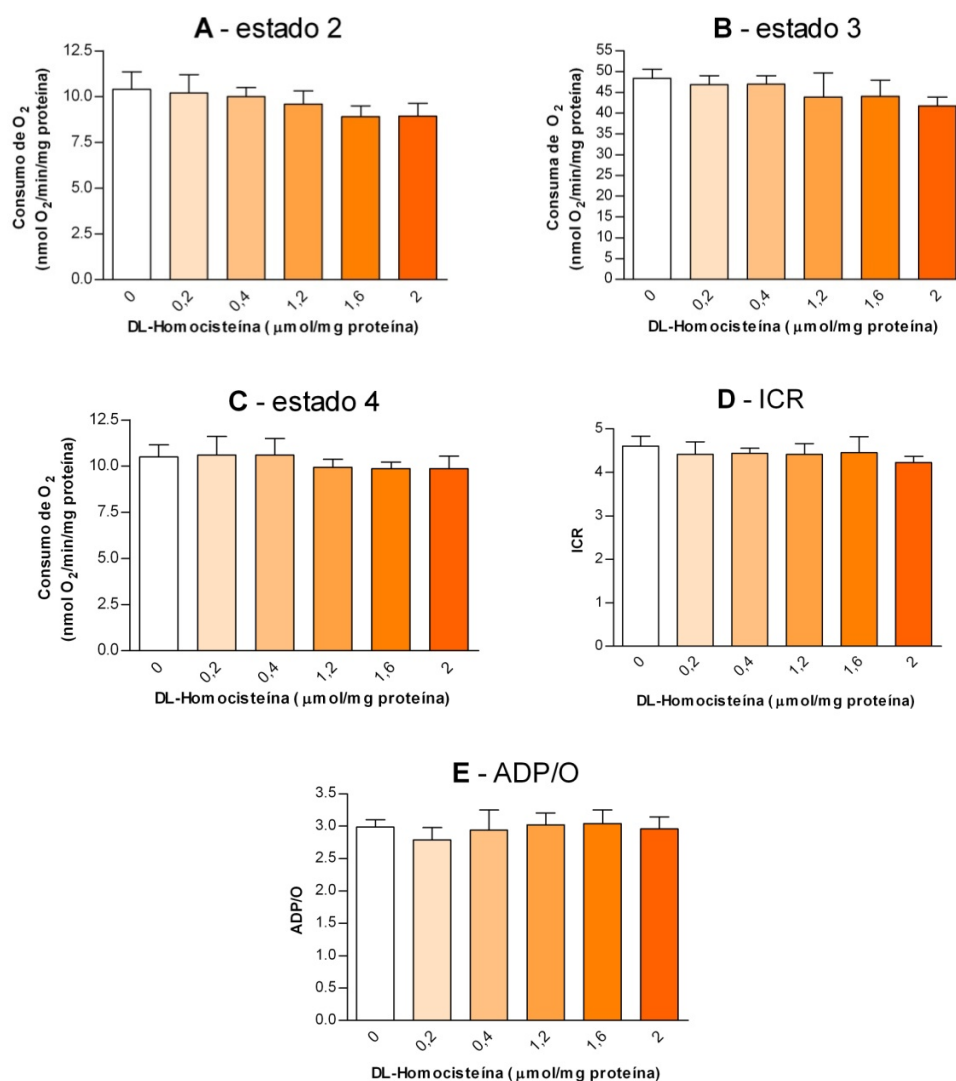


Fig. 31 – Efeitos da DL-homocisteína na cadeia respiratória mitocondrial de mitocôndrias hepáticas. Os ensaios foram realizados na ausência e na presença de 0,2, 0,4, 1,2, 1,6 e 2 μmol de DL-homocisteína/mg proteína, nas condições descritas na legenda da Fig. 23. Os valores das velocidades de respiração mitocondrial correspondentes ao estado 2 (A), estado 3 (B) e estado 4 (C) da respiração foram determinados com um eléctrodo de O₂ tipo Clark e são expressos em nmol O₂/min/mg de proteína. O ICR (D) foi determinado pela razão entre o estado 3 e o estado 4 da respiração e o quociente ADP/O (E) pela razão entre o número de moles de ADP adicionado e o número de nAtg de oxigénio consumido. Os resultados apresentados correspondem à média ± SD de 3 experiências independentes (n=3).

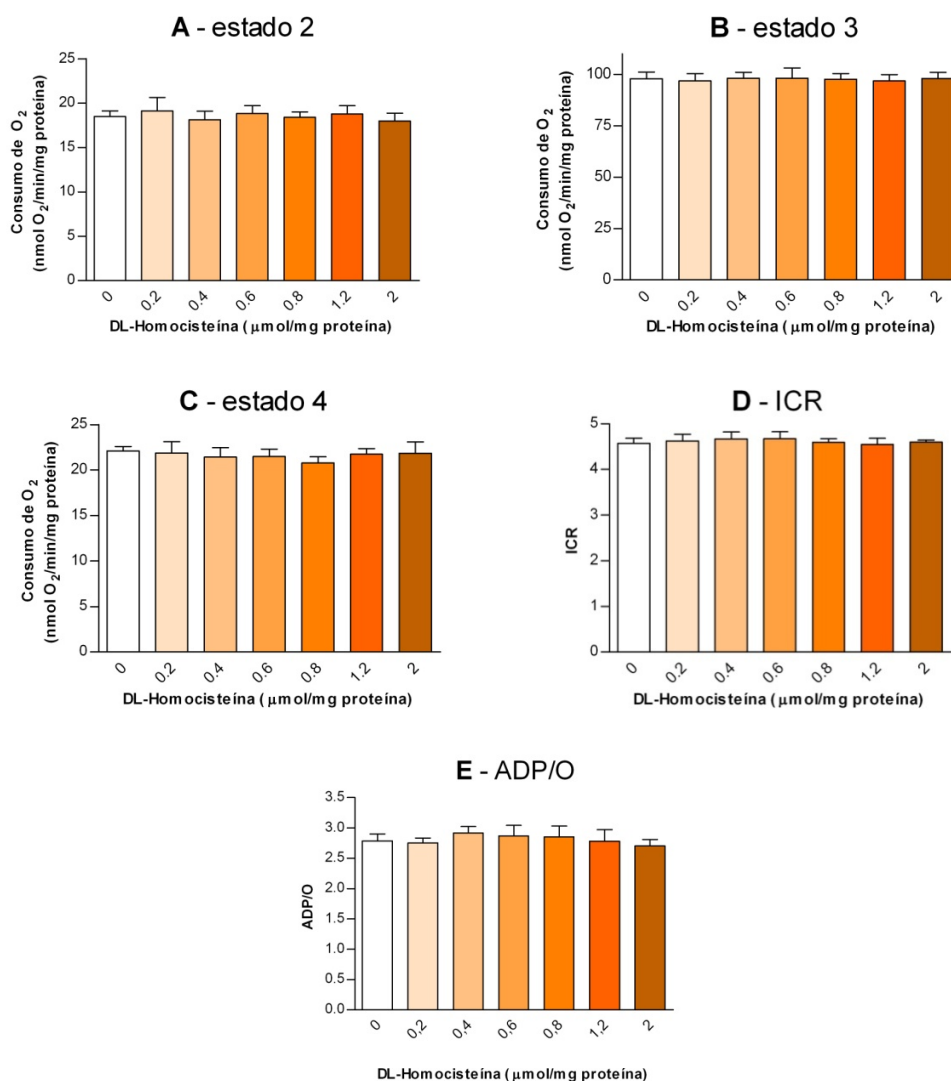


Fig. 32 – Efeitos da DL-homocisteína na cadeia respiratória de mitocôndrias cardíacas. Os ensaios foram realizados na ausência e na presença de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2 e 2 μmol de DL-homocisteína/mg proteína, nas condições descritas na legenda da Fig. 24. Os valores das velocidades de respiração mitocondrial referentes ao estado 2 (A), estado 3 (B) e estado 4 (C) da respiração foram determinados com um eléctrodo de O₂ tipo Clark e são expressos em nmol O₂/min/mg de proteína. O ICR (D) foi calculado pela razão entre o estado 3 e o estado 4 da respiração e o ADP/O pela razão entre o número de moles de ADP adicionado e o número de nAtg de oxigénio consumido. Os resultados apresentados correspondem à média ± SD de 3 experiências independentes (n=3).

Os efeitos da DL-Hcy na bioenergética mitocondrial foram ainda avaliados por determinação do $\Delta\Psi$. O desenvolvimento do potencial após a adição do substrato glutamato/malato às preparações mitocondriais, não sofreu alteração significativa na presença de DL-Hcy, tanto em mitocôndrias hepáticas (Fig. 33A) como em mitocôndrias cardíacas (Fig. 34A). Por sua vez, a despolarização induzida pelo ADP (Fig. 33B e 34B), a velocidade de repolarização do $\Delta\Psi$ (Fig. 33C e 34C), bem como o tempo de fosforilação também não são alterados na presença de DL-Hcy. Assim, e em conjunto com os resultados referentes ao consumo de oxigênio, a DL-Hcy não parece afectar a bioenergética de mitocôndrias de fígado e coração.

Na sequência dos estudos realizados para avaliar potenciais efeitos da DL-Hcy a nível mitocondrial estudámos também os efeitos deste aminoácido na indução da MPT, no sentido de clarificar os seus mecanismos de toxicidade.

Os efeitos da DL-Hcy na indução da MPT foram avaliados pela determinação do potencial de membrana mitocondrial. Como se observa na Fig. 35, a adição do substrato succinato conduz ao desenvolvimento de um $\Delta\Psi$ próximo de -220 mV, em mitocôndrias hepáticas. A adição de 110 nmol de Ca^{2+} /mg proteína causa uma despolarização temporária do $\Delta\Psi$, resultado da sua acumulação pelo uniporta de cálcio, que após cerca de 1 minuto retorna ao seu valor inicial. A repolarização do $\Delta\Psi$ ocorre após acumulação do Ca^{2+} sugerindo a não ocorrência da MPT (Fig. 35 – Ca^{2+}). Contudo, a pré-incubação das mitocôndrias com DL-Hcy (1,2-2 μmol /mg proteína) induz a uma despolarização irreversível do $\Delta\Psi$, após a adição do Ca^{2+} (Fig. 35 – DL-Hcy + Ca^{2+}), característica da indução da MPT. A pré-incubação das mitocôndrias com CyA previne a despolarização irreversível do $\Delta\Psi$ induzida por CBZ e Ca^{2+} (Fig. 35A – CyA). Nestas condições, a adição de Ca^{2+} também provoca uma despolarização temporária do $\Delta\Psi$, mas após a repolarização, as mitocôndrias recuperam a capacidade de manter o $\Delta\Psi$, sugerindo que a despolarização do $\Delta\Psi$ provocada pela DL-Hcy ocorre devido à indução da MPT. A adição de CyA na fase de despolarização (Fig. 35B – CyA) reverte este efeito conferindo às mitocôndrias hepáticas a capacidade de repolarização do $\Delta\Psi$, o que confirma os efeitos da DL-Hcy na indução da MPT.

O estudo dos fluxos de Ca^{2+} associado à indução da MPT, são concordantes com os efeitos obtidos no $\Delta\Psi$. Após adição do succinato, as mitocôndrias acumulam o Ca^{2+} adicionado,

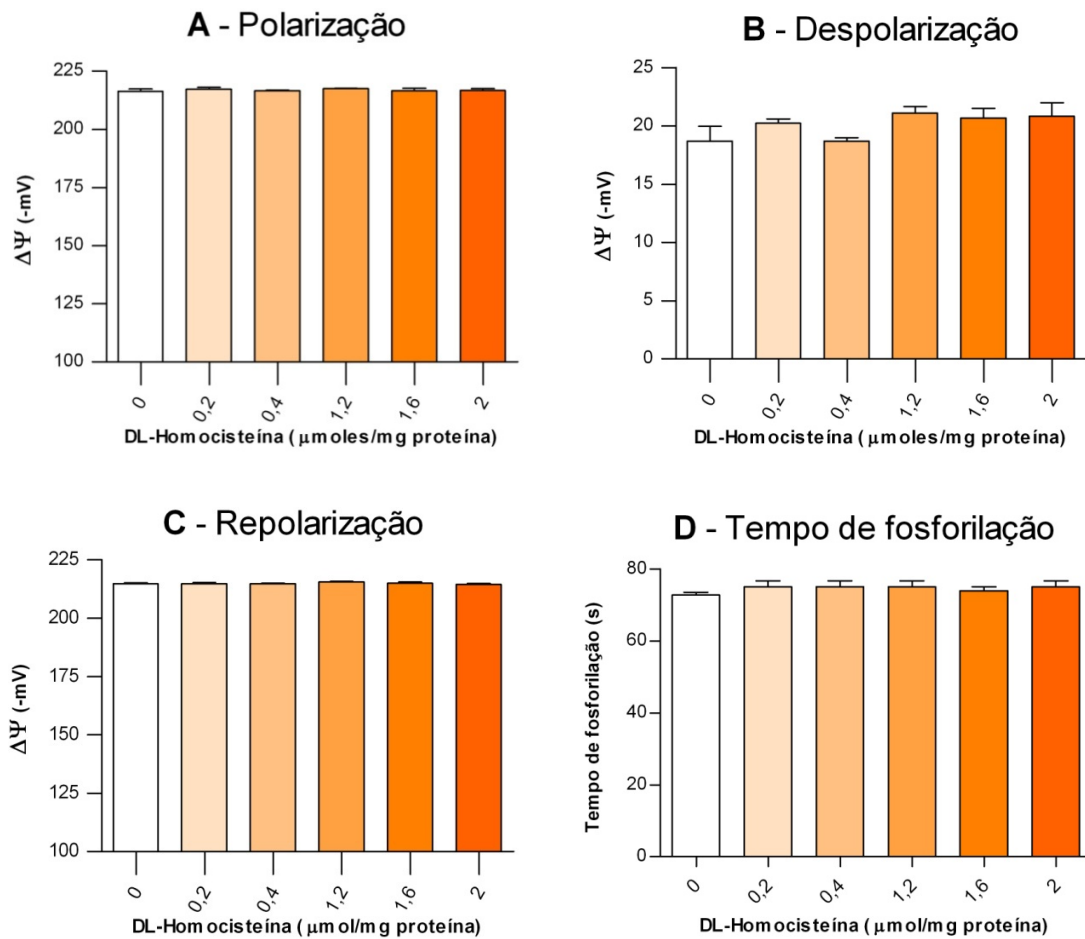


Fig. 33 – Efeito da DL-homocisteína no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias hepáticas. As experiências decorreram nas condições referidas na legenda da Fig. 25. Os valores dos potenciais de polarização (A), despolarização (B) e repolarização (C) e o tempo de fosforilação (D) foram determinados na ausência e na presença de 0,2, 0,4, 1,2, 1,6 e 2 μmol de DL-homocisteína/mg proteína e são expressos em milivoltes (-mV). A determinação dos potenciais foi efectuada com um eléctrodo de TPP^+ e os resultados representam 3 experiências independentes ($n=3$).

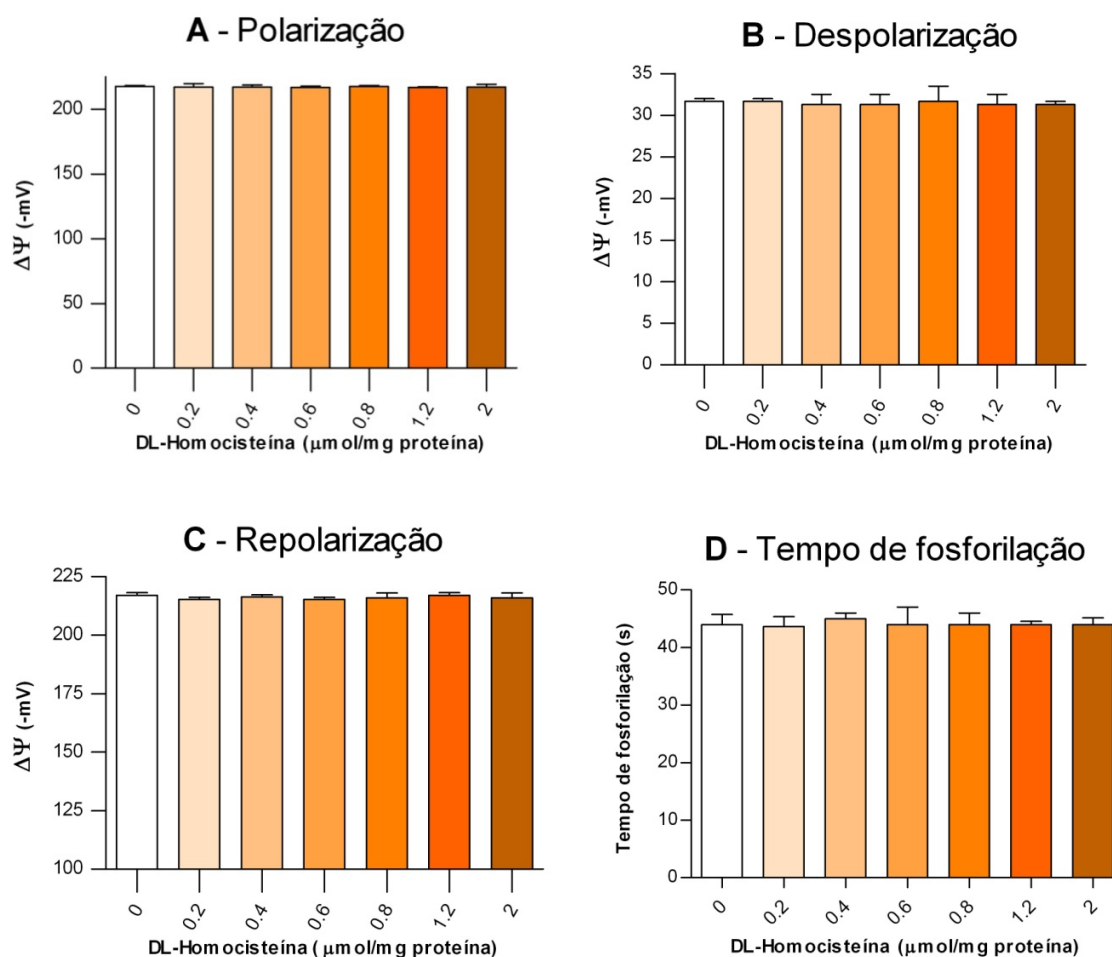


Fig. 34 – Efeito da DL-homocisteína no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias cardíacas. Os ensaios decorreram nas condições descritas na Fig. 26. (A), (B), (C) e (D) representam respectivamente os valores dos potenciais referentes à polarização, despolarização e repolarização bem como os tempos de fosforilação na ausência e na presença de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 1,2 e 2 μmol de DL-homocisteína/mg proteína. O tempo de fosforilação é expresso em segundos. Os valores dos potenciais, determinados com um eléctrodo de TPP^+ são expressos em milivoltes (-mV) e representam a média \pm SD de 3 experiências independentes ($n=3$).

mantendo-o no seu interior ao longo do tempo (Fig. 36 – Ca^{2+}). No entanto, a pré-incubação com DL-Hcy (1,2-2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) induz à libertação do Ca^{2+} acumulado (Fig. 36 – DL-Hcy + Ca^{2+}), como se verifica pelo aumento de fluorescência.

Todavia, a CyA previne a libertação do Ca^{2+} acumulado (Fig. 36A – CyA) e confere às mitocôndrias hepáticas a capacidade para o reacumularem (Fig. 36B – CyA), o que sugere que o efeito da DL-Hcy na libertação de Ca^{2+} esteja relacionado com a capacidade desta molécula para induzir a MPT.

A DL-homocisteína tem assim uma capacidade de induzir a MPT em mitocôndrias de fígado. Contudo a concentração mínima necessária para que este efeito se verifique (1,2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) é superior relativamente à CBZ (20 nmol/mg proteína), pelo que se pode dizer que a DL-Hcy tem menor capacidade para induzir a MPT e, conseqüentemente, alterar a homeostase do Ca^{2+} .

No sentido de explicar os distúrbios cardiovasculares induzidos pela DL-Hcy foi ainda estudado o efeito da DL-Hcy indução da MPT em mitocôndrias cardíacas. A adição do substrato succinato, às mitocôndrias cardíacas, permite que estas desenvolvam rapidamente um $\Delta\Psi$ de cerca de -220 mV. Após a adição de 230 nmol de Ca^{2+}/mg de proteína, uma concentração relativamente superior à adicionada na mitocôndrias de fígado, estas mitocôndrias têm a capacidade de recuperar o $\Delta\Psi$, mantendo-o ao longo do tempo (Fig. 37 – Ca^{2+}). Contudo, a incubação das mitocôndrias com DL-Hcy não induziu qualquer efeito no $\Delta\Psi$ após a adição de Ca^{2+} (Fig. 37 – DL-Hcy + Ca^{2+}). Assim, a DL-Hcy parece não ter efeitos ao nível do $\Delta\Psi$ associado à indução da MPT, o que é comprovado por ensaios realizados com a pré-incubação das mitocôndrias com CyA (Fig. 37 – CyA). Adicionalmente, estes efeitos foram comprovados pelo estudo do fluxo de Ca^{2+} associado à MPT. Após a adição do succinato as mitocôndrias acumularam o Ca^{2+} previamente adicionando ao meio (230 nmol de Ca^{2+}/mg de proteína) sem o libertarem ao longo do tempo (Fig. 38 – Ca^{2+}). Contrariamente, nas mitocôndrias cardíacas a incubação com DL-Hcy não leva à libertação do Ca^{2+} acumulado na matriz mitocondrial (Fig. 38 – DL-Hcy + Ca^{2+}). Desta forma e pela semelhança dos resultados obtidos com a pré-incubação de CyA (Fig. 38 – CyA), podemos afirmar que a DL-Hcy não promove a libertação de Ca^{2+} associado à indução da MPT em mitocôndrias de coração o que é verificado quando se eleva a concentração de Ca^{2+} adicionado ao meio (260 nmol/mg proteína) (Fig. 38 – [Ca^{2+}] alta).

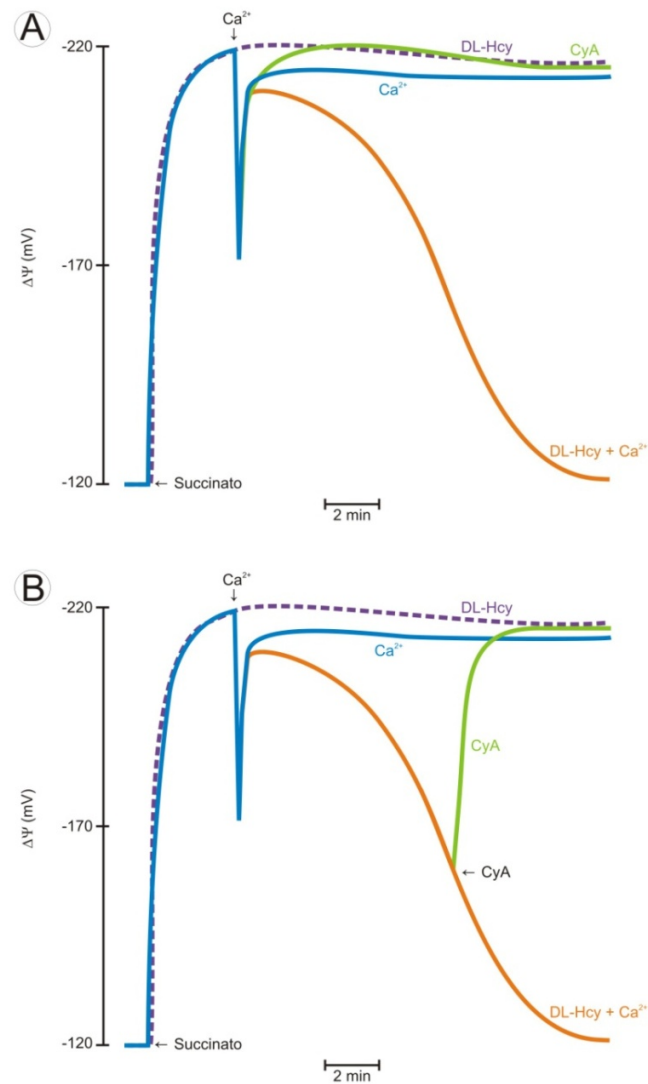


Fig. 35 – Efeito da DL-homocisteína no $\Delta\Psi$ associado à indução da MPT em mitocôndrias hepáticas. Os ensaios foram realizados nas condições descritas na legenda da Fig. 27. As reacções foram iniciadas com succinato 5 mM e o Ca^{2+} (110 nmol Ca^{2+} /mg proteína) foi adicionado após o $\Delta\Psi$ ter atingido o equilíbrio (Ca^{2+}). As mitocôndrias foram incubadas com DL-Hcy (1,2-2 μmol /mg proteína) durante 6 minutos, antes da adição de succinato e Ca^{2+} (DL-Hcy + Ca^{2+}). A CyA foi incubada antes do início das reacções (A – CyA) e no ensaio com DL-Hcy (B – CyA). O traço descontinuo (DL-Hcy) traduz o $\Delta\Psi$ desenvolvido após incubação da DL-Hcy sem a adição de Ca^{2+} . Os valores dos potenciais são expressos em milivoltes (-mV) e foram determinados com um eléctrodo de TPP^+ .

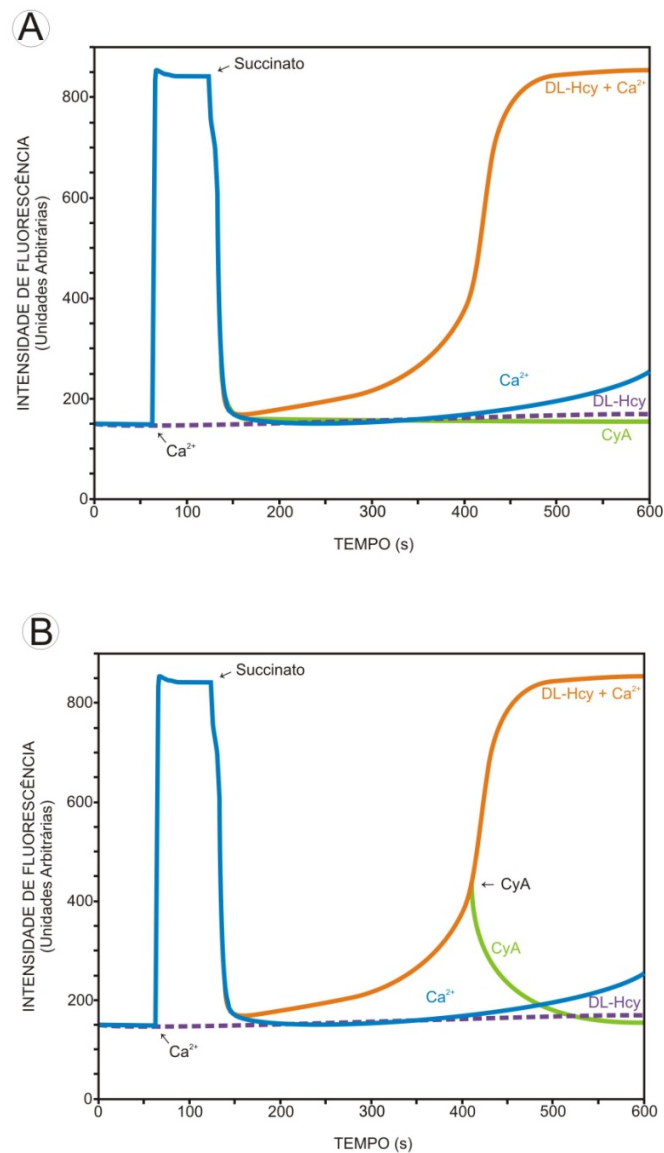


Fig. 36 – Efeitos da DL-homocisteína nos fluxos de Ca^{2+} associados à indução da MPT em mitocôndrias hepáticas. As experiências representadas decorreram segundo as condições referidas na legenda da Fig. 28. Os ensaios decorreram na presença ($\text{DL-Hcy} + \text{Ca}^{2+}$) e na ausência de DL-Hcy (Ca^{2+}), tendo sido adicionado às mitocôndrias 110 nmol Ca^{2+} /mg proteína e succinato 5 mM. A CyA foi também pré-incubada com as mitocôndrias na presença de DL-Hcy (A – CyA) e adicionada na fase de libertação do Ca^{2+} (B – CyA). As mitocôndrias foram ainda pré-incubadas com DL-Hcy na ausência da adição de Ca^{2+} (CBZ). A intensidade de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias.

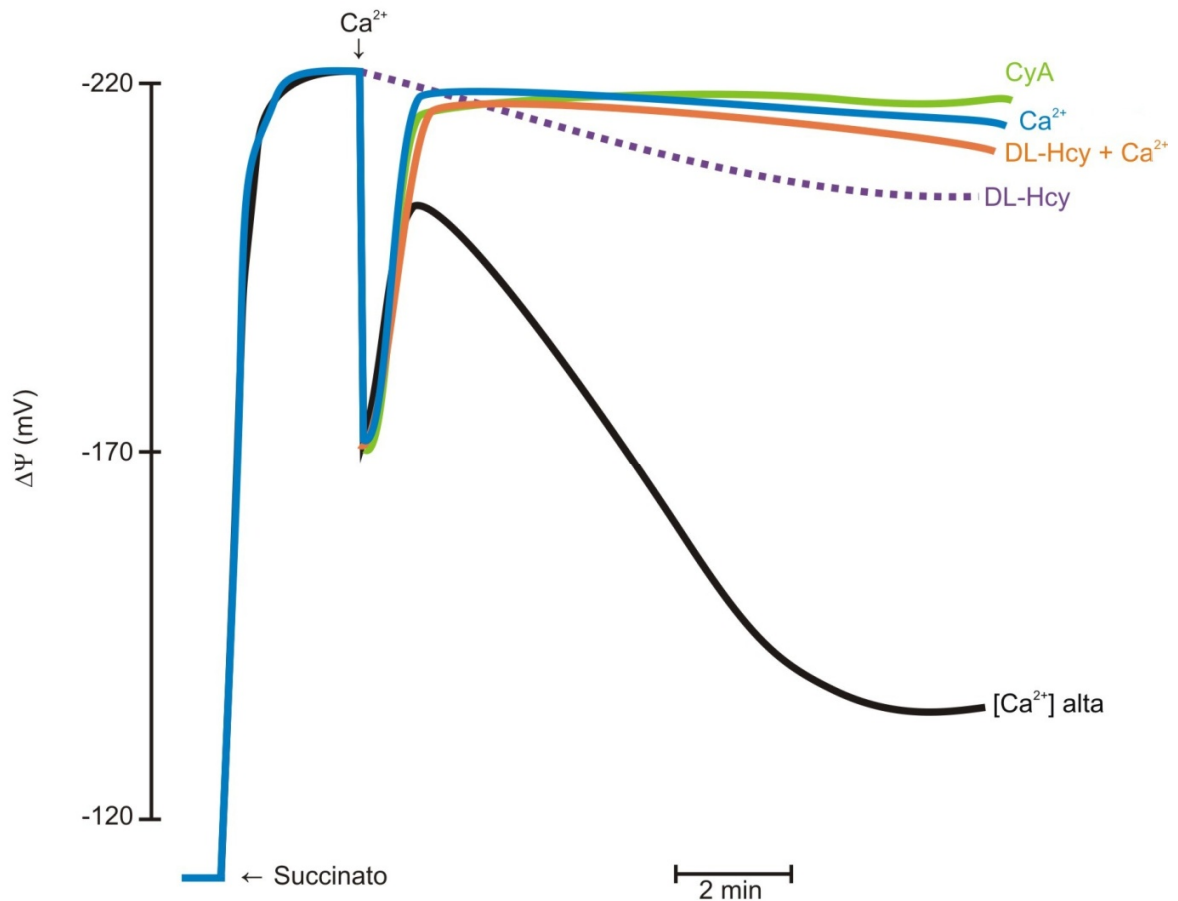


Fig. 37 – Efeito da DL-homocisteína no $\Delta\Psi$ associado à indução da MPT em mitocôndrias cardíacas. As mitocôndrias (0,5 mg proteína) foram incubadas nas condições descritas na Fig. 27. Os ensaios foram iniciados com a adição de 230 nmol Ca^{2+} /mg proteína e succinato às suspensões mitocondriais pré-incubadas com DL-Hcy (1,2-2 μmol /mg proteína) (DL-Hcy + Ca^{2+}) e na sua ausência (Ca^{2+}). As mitocôndrias foram ainda incubadas com (CyA) e sem CyA ($[\text{Ca}^{2+}]$ alta) durante 6 minutos adicionando-se 260 nmol Ca^{2+} /mg proteína antes da adição de succinato. O traçado descontínuo representa o potencial desenvolvido após adição de succinato sem a adição de Ca^{2+} (DL-Hcy). O valor dos potenciais é expresso em milivoltes (-mV) e foi determinado com um eléctrodo de TPP^+ .

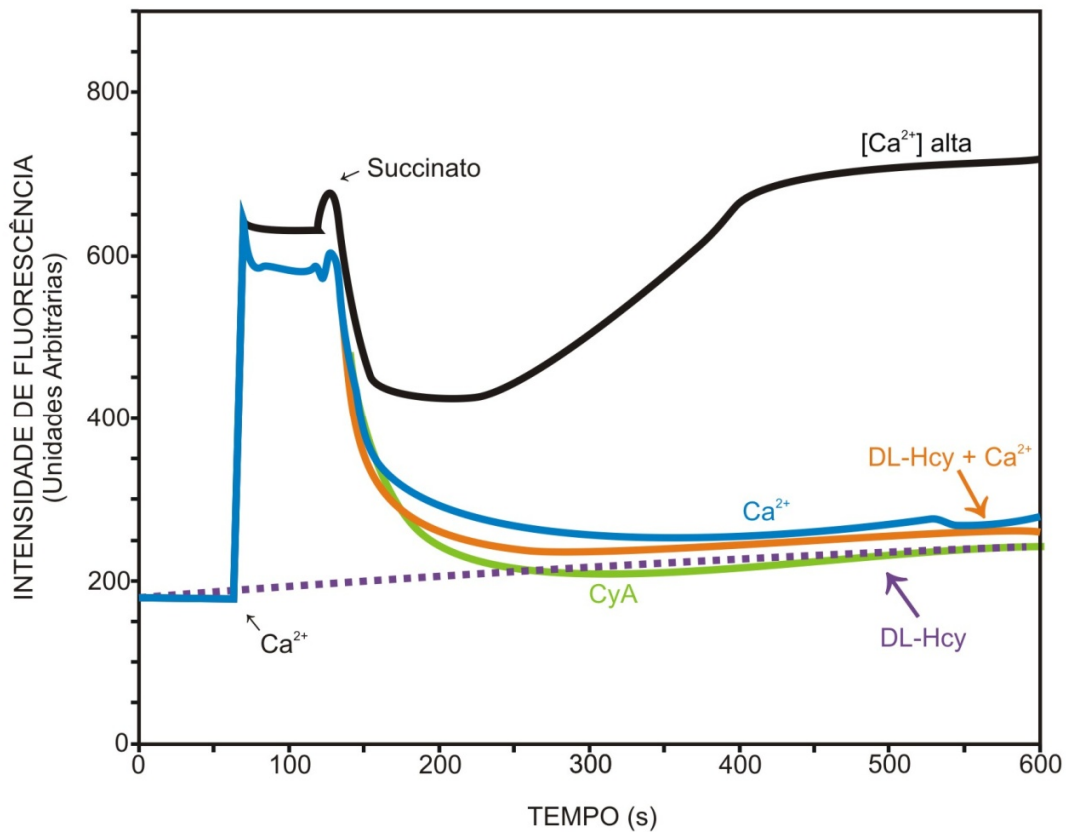


Fig. 38 – Efeitos da DL-homocisteína nos fluxos de Ca^{2+} associados à indução da MPT em mitocôndrias cardíacas. A determinação da intensidade de fluorescência do Cálcio GreenTM e as condições das reações processaram-se de acordo com o descrito na legenda Fig. 28. Os ensaios foram efectuados na presença 1,2-2 μmol DL-Hcy/mg proteína (DL-Hcy + Ca^{2+}) e na ausência de DL-Hcy (Ca^{2+}), tendo sido adicionado às mitocôndrias 230 nmol Ca^{2+} /mg proteína e succinato 5 mM. As mitocôndrias foram ainda incubadas com CyA adicionando-se 260 nmol de Ca^{2+} /mg proteína (CyA) e sujeitas à adição da mesma concentração de Ca^{2+} , sem a adição de CyA ($[\text{Ca}^{2+}]$ alta). O traçado descontínuo representa um ensaio em que as mitocôndrias foram incubadas com DL-Hcy não havendo adição de Ca^{2+} (CBZ). A intensidade de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias.

3. Efeitos da L-homocisteína tiolactona na bioenergética e na permeabilidade transitória de mitocôndrias hepáticas e cardíacas

A homocisteína pode formar vários derivados ou conjugar-se com proteínas. Um desses derivados é a homocisteína tiolactona que se forma a partir da ciclização da homocisteína. A HTL é potencialmente tóxica e parece exercer a sua acção ao nível do ADN e de proteínas. Deste modo, efectuou-se também o estudo deste derivado da homocisteína ao nível da bioenergética mitocondrial de mitocôndrias de fígado e coração, utilizando o isómero L da HTL.

De modo semelhante à CBZ e à DL-Hcy, a L-HTL as concentrações utilizadas (0,2-2 μmol L-HTL/mg proteína) não alteram significativamente as velocidades de consumo de oxigénio do estado 2 (Fig. 39 – A), estado 3 (Fig. 39 – B) e estado 4 (Fig. 39 – C) das mitocôndrias hepáticas. Por sua vez, o ICR e o ADP/O, parâmetros que permitem controlar a integridade das mitocôndrias e a eficiência fosforilativa, também não são alterados significativamente nas concentrações de L-HTL estudadas. Em mitocôndrias cardíacas os consumos de oxigénio referentes ao estado 2 (Fig. 40 – A), estado 3 (Fig. 40 – B) e estado 4 (Fig. 40 – C) também não apresentam diferenças significativas em relação aos controlos (na ausência de L-HTL). De igual modo, a L-HTL, não tem efeitos ao nível do ICR e do ADP/O. Desta forma este composto, para as concentrações estudadas, não apresenta qualquer efeito no consumo de oxigénio de mitocôndrias de fígado e coração.

O efeito deste derivado da Hcy foi também estudado no $\Delta\Psi$ de mitocôndrias hepáticas (Fig. 41A) e cardíacas (Fig. 42B). Os resultados demonstram que a L-HTL não afecta o $\Delta\Psi$ após adição de glutamato/malato. Após o $\Delta\Psi$ ter atingido o equilíbrio adicionaram-se 200 nmol de ADP, levando a uma consequente despolarização (Figs. 41B e 42B). O $\Delta\Psi$ registado após a fosforilação do ADP a ATP constitui o potencial de repolarização. As figuras 41C e 42C demonstram que este parâmetro não é afectado na presença de concentrações crescentes de L-HTL, quer em mitocôndrias de fígado quer de coração, respectivamente. Por sua vez, o tempo de fosforilação também não sofre alterações significativas na presença de L-HTL, nos dois tipos de mitocôndrias (Fig. 41D e 42D). Este resultados em conjunto com o estudo efectuado ao nível do

consumo de oxigénio permitem assim verificar que a L-HTL não afecta a fosforilação oxidativa nem o funcionamento da cadeia respiratória de mitocôndrias hepáticas e cardíacas.

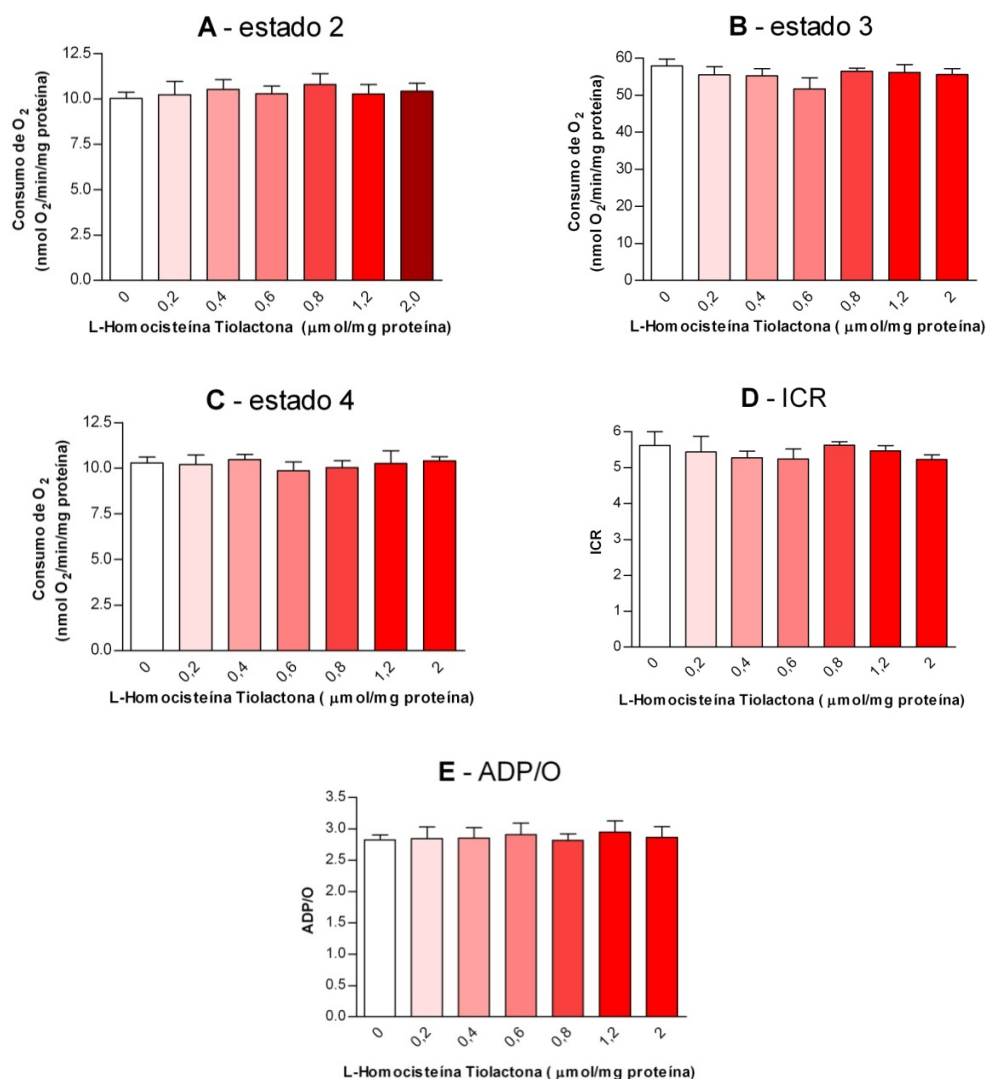


Fig. 39 – Efeitos da L-homocisteína tiolactona na cadeia respiratória de mitocôndrias hepáticas. As experiências foram realizadas na ausência e na presença de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 1,2 e 2 μmol de L-homocisteína tiolactona/mg proteína, nas condições descritas na legenda da Fig. 23. O consumo de O_2 foi efectuado com um eléctrodo de O_2 tipo Clark e permitiu determinar o estado 2 (A), estado 3 (B) e estado 4 (C) da respiração expressos em nmol $\text{O}_2/\text{min/mg}$ de proteína. O ICR (D) foi determinado pela razão entre o estado 3 e o estado 4 da respiração e o ADP/O pela razão entre o número de moles de ADP adicionado e o número nAtg de oxigénio consumido. Os resultados apresentados correspondem à média \pm SD de 3 experiências independentes (n=3).

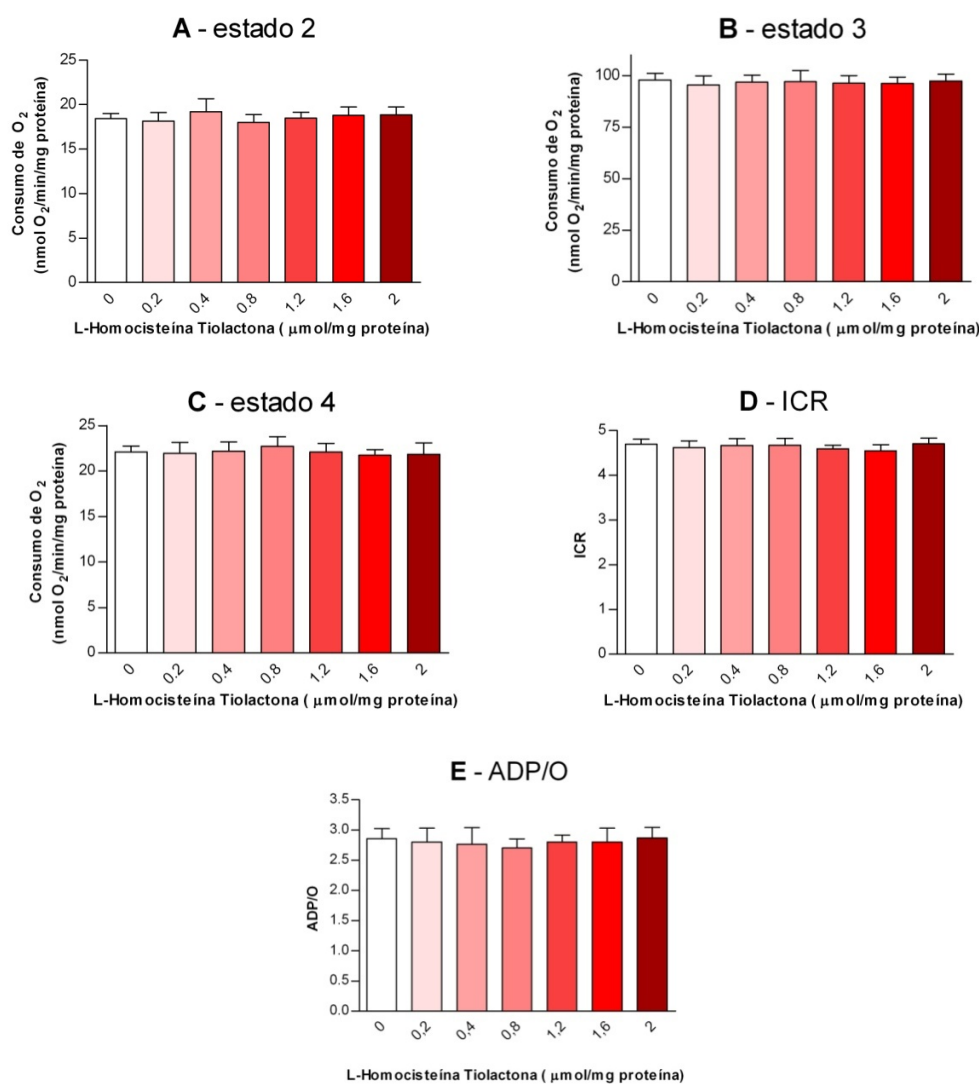


Fig. 40 – Efeito da L-homocisteína tiolactona na cadeia respiratória de mitocôndrias cardíacas. Os ensaios foram realizados na ausência e na presença de 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 e 2 μmol de L-homocisteína tiolactona/mg proteína, segundo as condições descritas na legenda da Fig. 24, determinando-se o consumo de O₂ com um eléctrodo de O₂ tipo Clark. As velocidades de respiração mitocondrial correspondentes ao estado 2 (A), estado 3 (B) e estado 4 (C) da respiração apresentam-se expressas em nmol O₂/min/mg de proteína. O ICR (D) foi determinado pela razão entre o estado 3 e o estado 4 da respiração e o quociente ADP/O representa a razão entre o número de moles de ADP adicionado e o número de nAtg de oxigénio consumido para fosforilar todo o ADP adicionado. Os resultados correspondem à média ± SD de 3 experiências independentes (n=3).

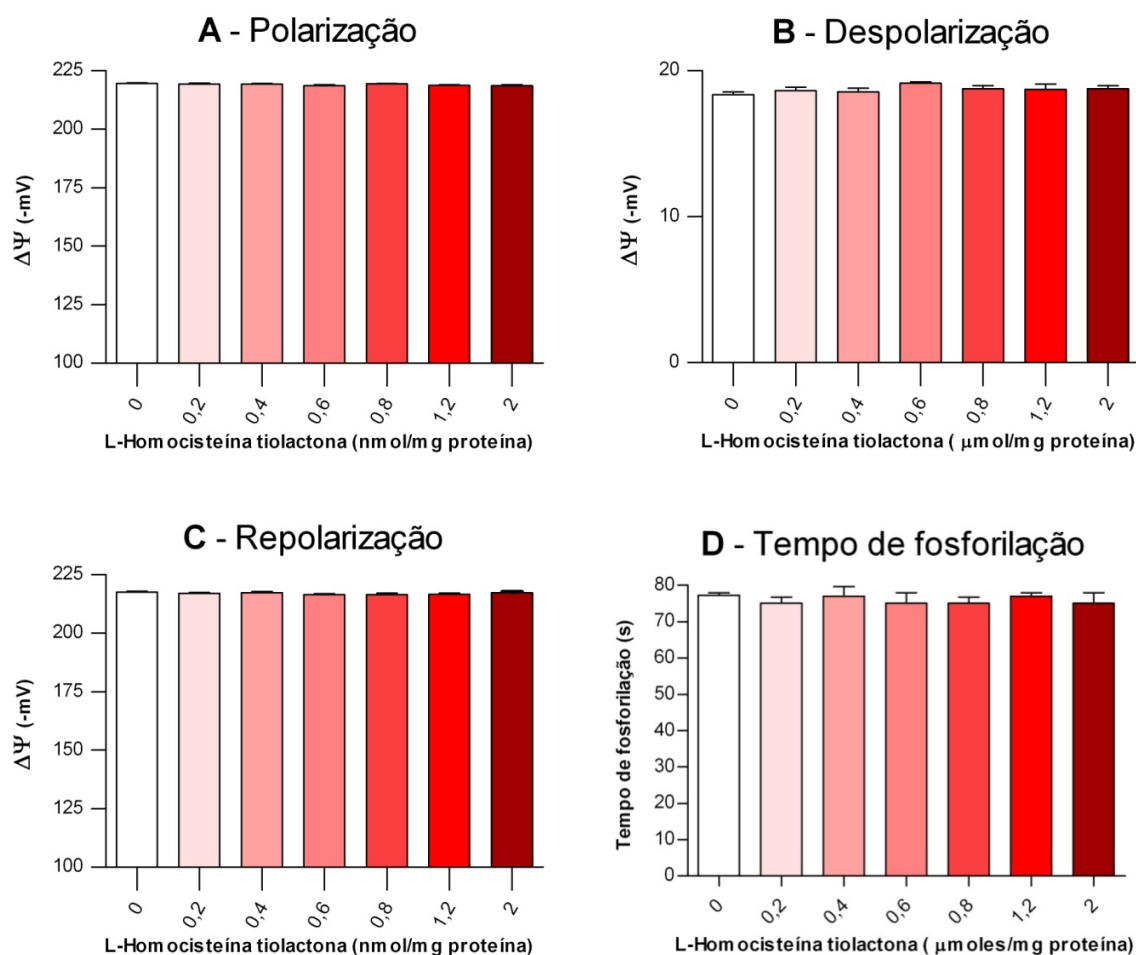


Fig. 41 – Efeito da L-homocisteína tioractona no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias hepáticas. Os ensaios decorreram conforme descrito na legenda da Fig. 25, determinando-se o $\Delta\Psi$ com um eléctrodo de TPP^+ na ausência e na presença de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2 e 2 μmol de L-homocisteína tioractona/mg proteína. (A), (B) e (C) representam respectivamente os valores dos potenciais obtidos na polarização, despolarização e repolarização e (D) os tempos de fosforilação resultantes dos ensaios efectuados. O tempo de fosforilação representa o tempo necessário para fosforilação do ADP a ATP e foi calculado pelo período, em segundos, desde do início da despolarização até ao fim da repolarização. Os valores dos potenciais são expressos em milivoltes (-mV) e representam a média \pm SD de 3 experiências independentes ($n=3$).

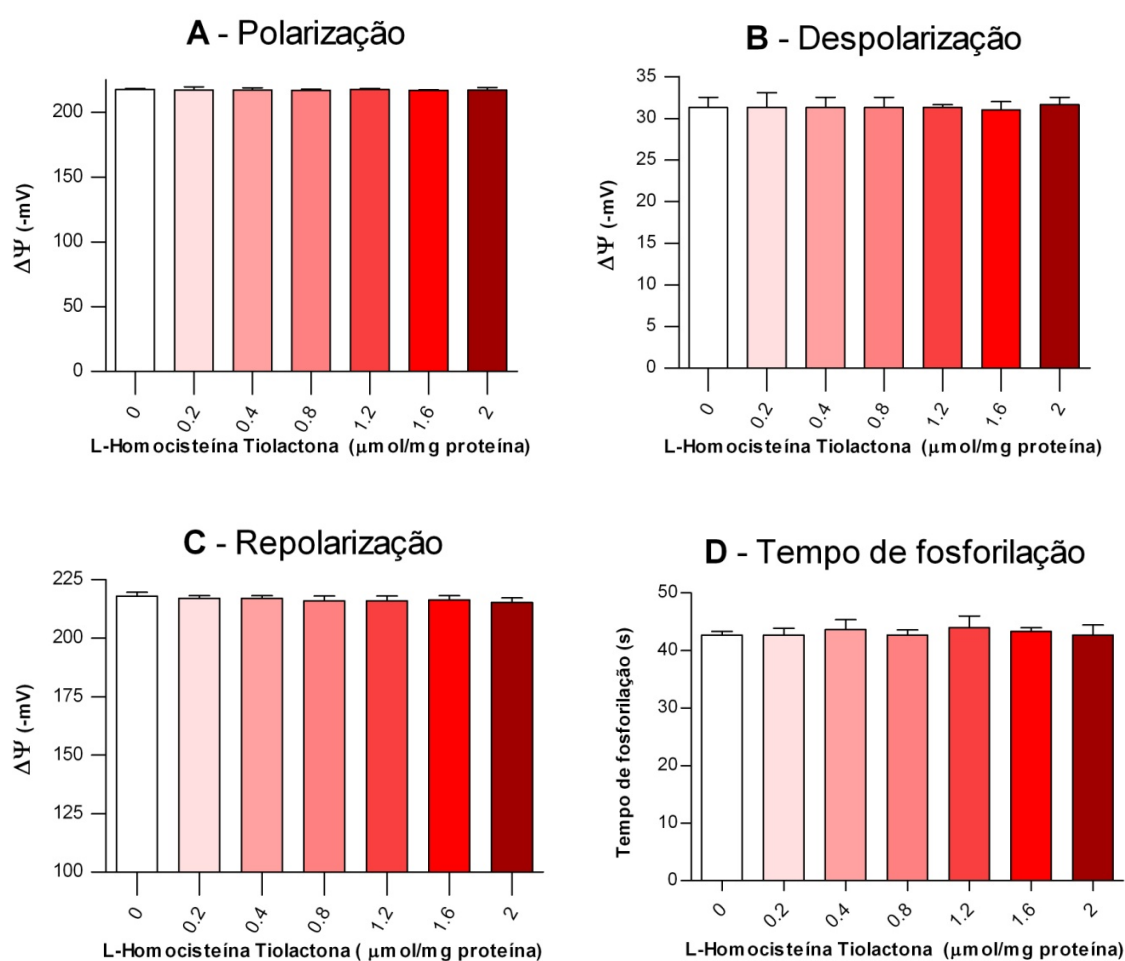


Fig. 42 – Efeito da L-homocisteína tiolactona no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias cardíacas. Os ensaios decorreram conforme descrito na legenda da Fig. 26. Os valores da polarização (A), despolarização (B) e repolarização (C) foram determinados com um eléctrodo de TPP^+ , na ausência e na presença de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2 e 2 μmol de L-homocisteína tiolactona/mg proteína. O tempo de fosforilação (D) é expresso em segundos sendo calculado pelo período entre o início da despolarização e o fim da repolarização. Os valores dos potenciais são expressos em milivoltes (-mV) e representam a média \pm SD de 3 experiências independentes ($n=3$).

A L-HTL está descrita como sendo um composto susceptível de danificar proteínas a nível celular conjugando-se a estas e alterando a sua função (Perla-Kaján *et al.*, 2007). Com base na estrutura proteica do poro responsável pela MPT, é possível que a L-HTL tenha um efeito directo na MPT. Desta forma estudou-se também o efeito da L-HTL na indução da MPT dependente de Ca^{2+} . Como se observa na Fig. 43, a adição de succinato às mitocôndrias hepáticas permite que estas desenvolvam um $\Delta\Psi$ de cerca de -220 mV. A adição de 120 nmol de Ca^{2+} /mg proteína vai resultar no gasto de parte desse $\Delta\Psi$, utilizado pelo uniporta de Ca^{2+} para acumular este ião. No entanto, após a acumulação de todo o Ca^{2+} adicionado, as mitocôndrias restabelecem o potencial para valores idênticos aos iniciais (Fig. 43 – Ca^{2+}). A incubação de L-HTL (0,8-2 μmol /mg proteína) com as mitocôndrias provocou uma incapacidade destas reporem e susterem o $\Delta\Psi$ ao longo do tempo, resultando numa consequente despolarização irreversível do mesmo (Fig. 43 – L-HTL + Ca^{2+}). Por sua vez ao pré-incubarmos as mitocôndrias com CyA, este inibidor da MPT previne a despolarização causada pela L-HTL (Fig. 43A- CyA). Para além disso, a adição de CyA na fase de despolarização reverte o efeito da L-HTL, levando à repolarização do $\Delta\Psi$ (Fig. 43A- CyA). Assim, os resultados mostram que a CyA tem a capacidade de prevenir e reverter os efeitos provocados pela L-HTL no potencial de membrana, o que sugere que a L-HTL tem um efeito indutor na MPT induzida por Ca^{2+} .

De forma a comprovar os efeitos da L-HTL na indução da MPT em mitocôndrias hepáticas foi estudado o efeito destas moléculas nos fluxos de Ca^{2+} associados à indução da MPT. Por observação da Fig. 44 a adição de Ca^{2+} à suspensão mitocondrial provoca um aumento dos níveis de fluorescência da sonda Calcium GreenTM. Consequentemente, após a adição de succinato às mitocôndrias estas acumulam o Ca^{2+} previamente adicionado (Fig. 44 – Ca^{2+}), observando-se uma diminuição dos níveis de fluorescência. A incubação das mitocôndrias com L-HTL induz o aumento dos níveis de fluorescência, logo após acumulação do Ca^{2+} (L-HTL + Ca^{2+}). Este efeito é inibido pela pré-incubação de CyA, mantendo os níveis de fluorescência baixos (Fig. 44A – CyA), o que sugere uma acumulação do Ca^{2+} pelas mitocôndrias mesmo na presença de L-HTL. A adição de CyA na altura da libertação do Ca^{2+} (Fig. 44A- CyA), isto é, quando os níveis de fluorescência aumentam, provoca uma diminuição repentina da fluorescência, o que sugere que as mitocôndrias voltam a ter a capacidade de acumular o Ca^{2+} na presença de L-HTL. Assim, dado a CyA ser um potente inibidor da MPT e inibir o efeito da L-

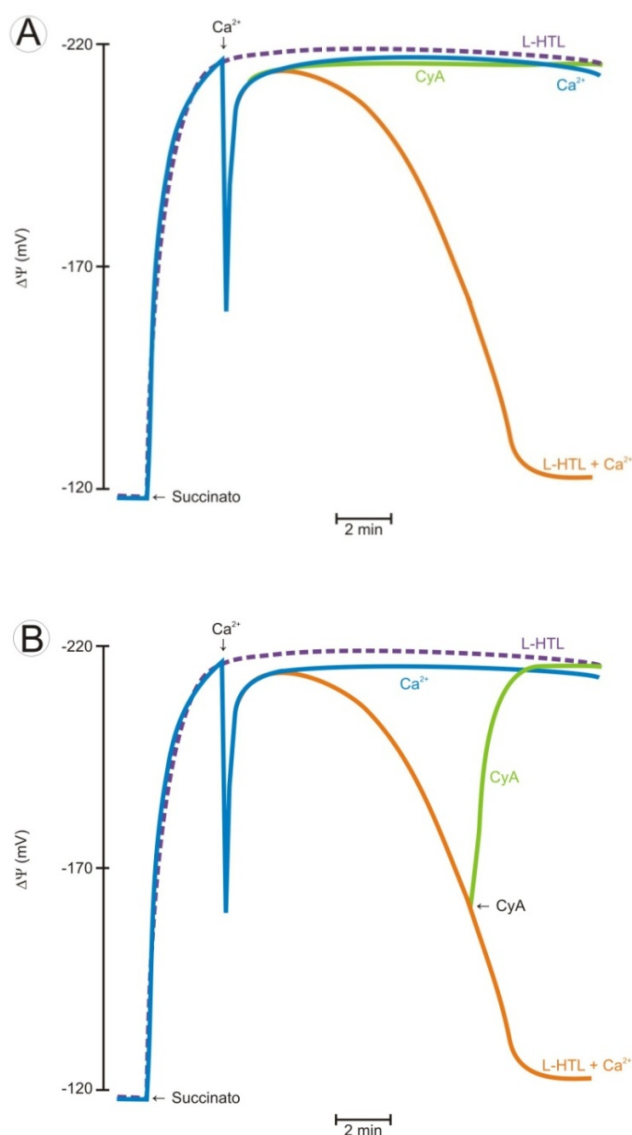


Fig. 43 – Efeito da L-homocisteína tiolactona no $\Delta\Psi$ associado à indução da MPT em mitocôndrias hepáticas. Os ensaios decorreram nas condições descritas na legenda da Fig. 27. As reacções foram iniciadas com succinato 5 mM e o Ca^{2+} (120 nmol Ca^{2+} /mg proteína) foi adicionado após o $\Delta\Psi$ ter atingido o equilíbrio. As reacções foram efectuadas na ausência (Ca^{2+}) e presença de L-HTL (0,8-2 μmol /mg proteína) (L-HTL+ Ca^{2+}), após incubação durante 6 minutos. A CyA foi também incubada antes do início das reacções (A – CyA) e adicionada no decorrer do ensaio com L-HTL (B – CyA). O traço descontínuo (L-HTL) traduz o $\Delta\Psi$ desenvolvido após incubação da L-HTL sem a adição de Ca^{2+} . Os valores dos potenciais são expressos em milivoltes (-mV) e foram determinados com um eléctrodo de TPP^+ .

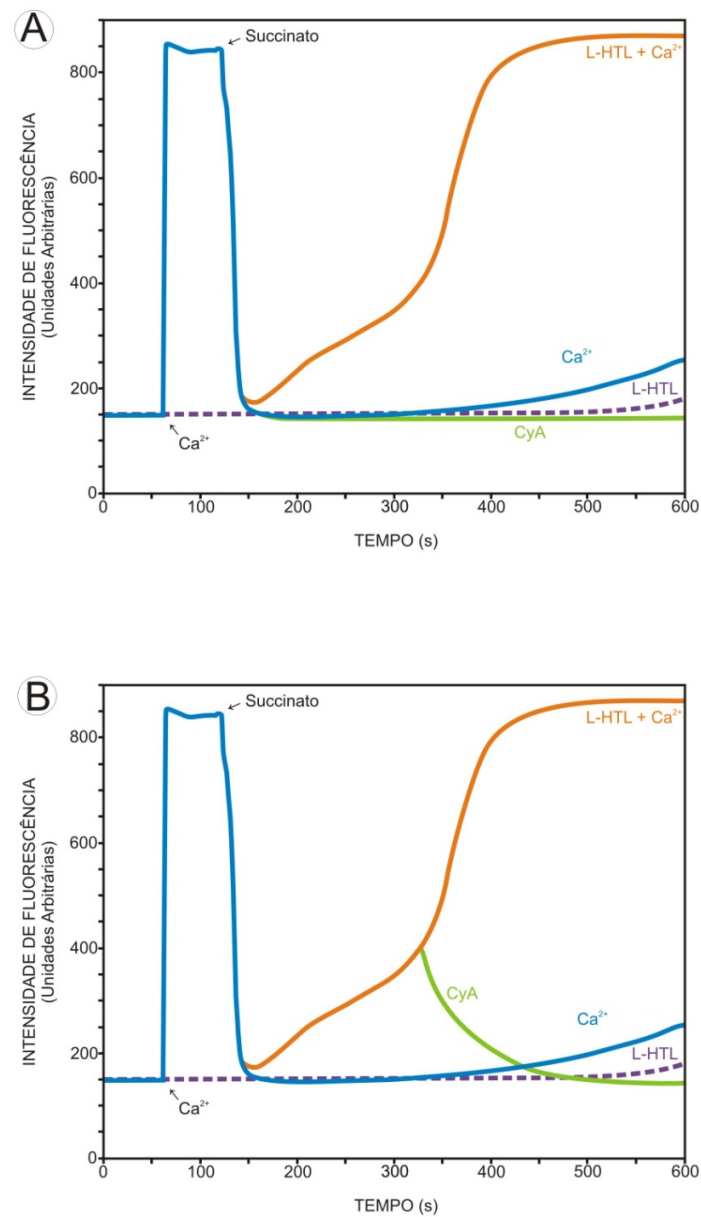


Fig. 44 – Efeito da L-homocisteína tiolactona nos fluxos de Ca^{2+} associados à indução da MPT em mitocôndrias hepáticas. As experiências foram efectuadas nas condições descritas na legenda da Fig. 28. Após adição de 120 nmol Ca^{2+} /mg proteína e succinato, as experiências foram iniciadas na ausência (Ca^{2+}) e presença de L-HTL (0,8-2 μmol /mg proteína) (L-HTL+ Ca^{2+}). A CyA foi incubada conjuntamente com L-HTL (A – CyA) antes do início da reacção e adicionada no decorrer das experiências (B – CyA). As mitocôndrias foram ainda pré-incubadas com a L-HTL na ausência de Ca^{2+} (L-HTL). A intensidade de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias.

HTL na libertação de Ca^{2+} os resultados indicam que este derivado da Hcy também induz a MPT em mitocôndrias hepáticas, apresentando maior capacidade indutora que a DL-Hcy.

No sentido de avaliar o efeito da L-HTL na indução da MPT em mitocôndrias cardíacas, efectuou-se um estudo idêntico nestas mitocôndrias. As mitocôndrias cardíacas acumulam significativamente mais Ca^{2+} que as hepáticas. Deste modo, após o desenvolvimento do $\Delta\Psi$ por adição de glutamato/malato foram adicionadas às mitocôndrias 220 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína, o que provocou a repolarização reversível do $\Delta\Psi$ (Fig. 45 – Ca^{2+}). Após o restabelecimento do $\Delta\Psi$, as mitocôndrias conseguiram-no manter ao decorrer das experiências. À semelhança do observado, a pré-incubação das mitocôndrias cardíacas com L-HTL não mostrou alterar o $\Delta\Psi$ ao longo da experiência (Fig. 45 – L-HTL + Ca^{2+}). No entanto a adição de uma concentração mais elevada de Ca^{2+} (250 nmol/mg proteína) induz à despolarização irreversível do $\Delta\Psi$ das mitocôndrias (Fig. 45 – [Ca^{2+}] alta), o que é prevenido pela pré-incubação com CyA (Fig. 45 – CyA). Por sua vez, em ensaios efectuados com L-HTL, sem a adição de Ca^{2+} , o $\Delta\Psi$ desenvolvido pelas mitocôndrias cardíacas não foi afectado. Os resultados demonstram assim, que tal como a CBZ e a DL-Hcy, a L-HTL não afecta o $\Delta\Psi$ de mitocôndrias cardíacas determinado para avaliar a indução da MPT dependente de Ca^{2+} .

Os efeitos da L-HTL em mitocôndrias cardíacas foram ainda confirmados pelo estudo dos fluxos de Ca^{2+} associados à indução da MPT. A adição de 220 nmol Ca^{2+} /mg proteína às mitocôndrias e a posterior adição de succinato induziu uma diminuição dos níveis de fluorescência da sonda Calcium GreenTM, indicando uma acumulação do catião na matriz mitocondrial (Fig. 46 – Ca^{2+}). A pré-incubação com L-HTL (0,8-2 μmol L-HTL/mg proteína) não conduz a nenhuma alteração na acumulação e libertação de Ca^{2+} em mitocôndrias cardíacas (Fig. 46 – L-HTL + Ca^{2+}). Porém, a incubação das mitocôndrias com 250 nmol Ca^{2+} /mg proteína leva à libertação do Ca^{2+} acumulado após a adição de succinato (Fig. 46 – [Ca^{2+}] alta). Este efeito é inibido pela pré-incubação de CyA (Fig. 46 – CyA) o que comprova a indução da MPT com altas concentrações de Ca^{2+} . Adicionalmente, a presença de L-HTL não parece afectar a intensidade de fluorescência da sonda utilizada nos ensaios. Desta forma, os resultados demonstram que a L-HTL não induz à MPT de mitocôndrias cardíacas, o que apoia os resultados obtidos no estudo da indução da MPT, avaliada por determinação do $\Delta\Psi$.

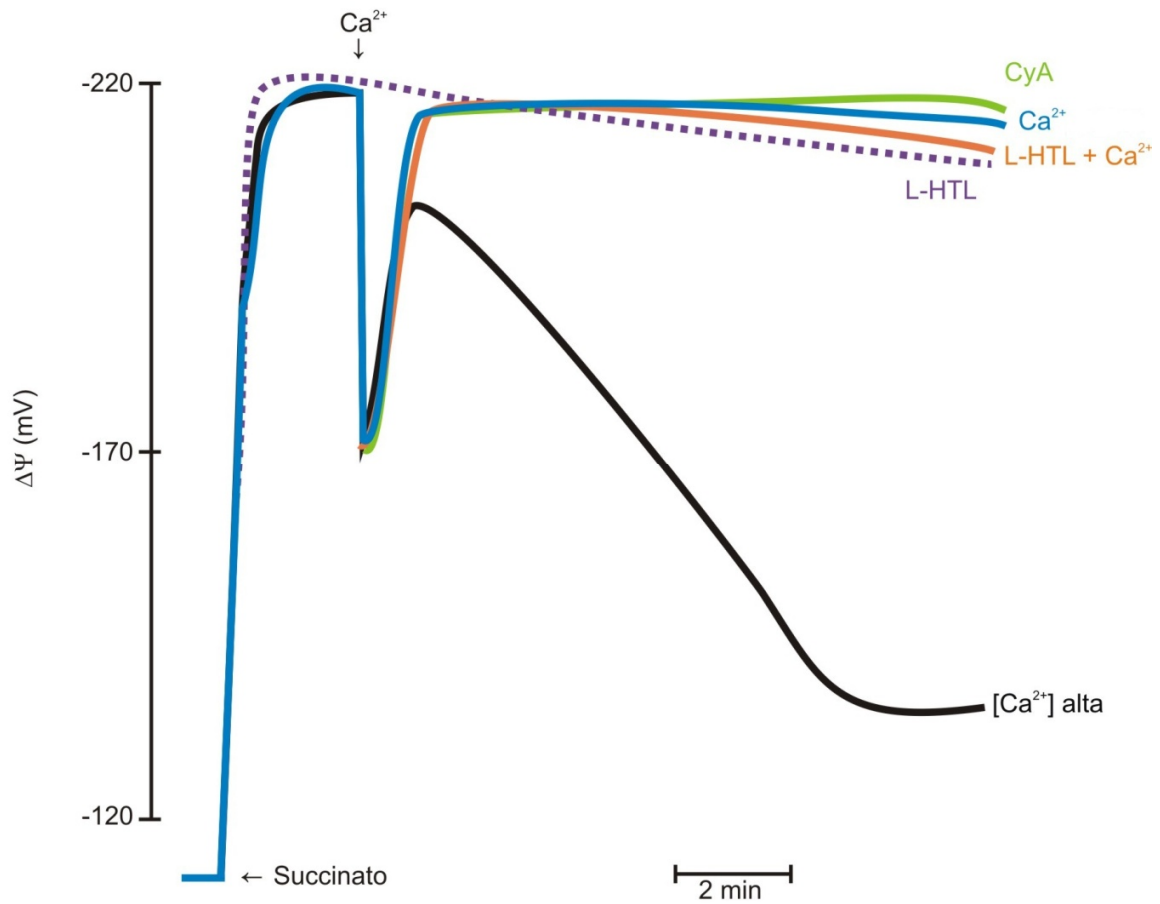


Fig. 45 – Efeito da L-homocisteína tiolactona no $\Delta\Psi$ associado à indução da MPT. As experiências decorreram nas condições descritas na legenda da Fig. 27. O potencial foi determinado após a adição de succinato na ausência (Ca^{2+}) e presença de L-HTL ($0,8\text{-}2\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) (L-HTL + Ca^{2+}), adicionando-se $220\ \text{nmol}$ de Ca^{2+}/mg de proteína após o $\Delta\Psi$ atingir o equilíbrio. Às mitocôndrias foram ainda adicionadas $250\ \text{nmol}$ de Ca^{2+}/mg de proteína na ausência ($[\text{Ca}^{2+}]$ alta) e presença de CyA (CyA). O traçado descontinuo representa o potencial desenvolvido após adição de succinato sem a adição de Ca^{2+} . O valor dos potenciais é expresso em milivoltes (-mV) e foi determinado com um eléctrodo de TPP^+ .

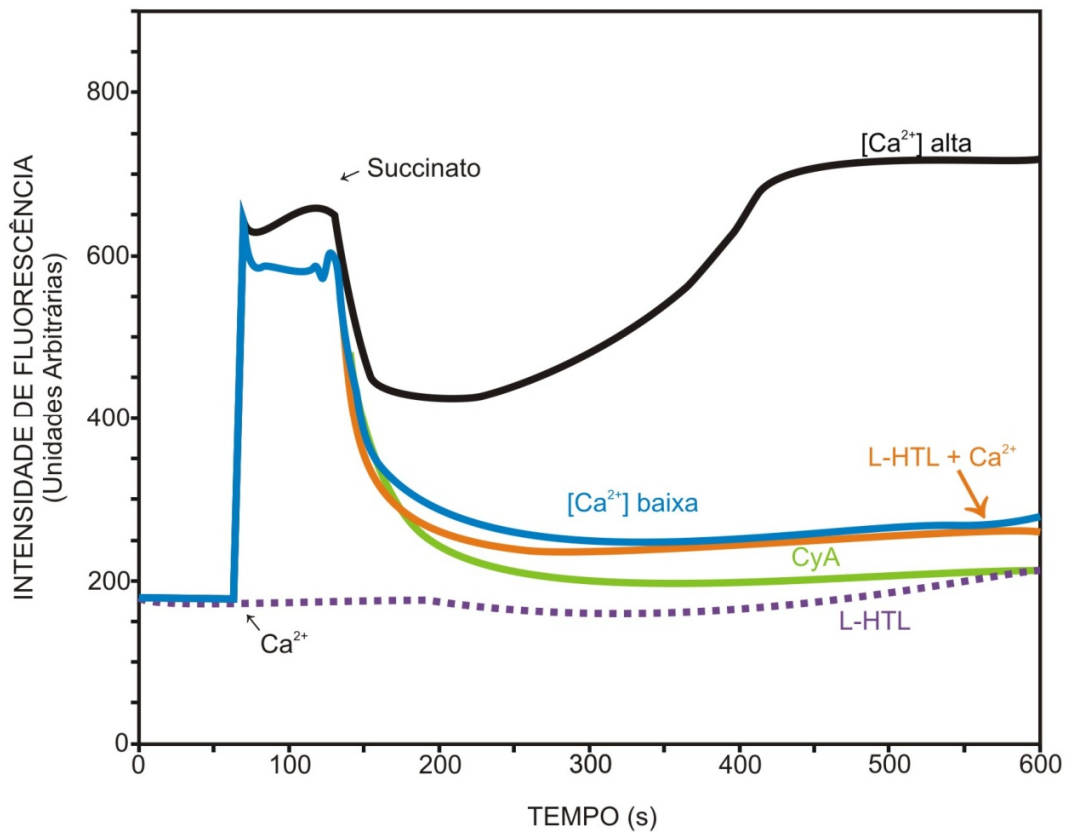


Fig. 46 – Efeitos da L-homocisteína tiolactona nos fluxos de Ca^{2+} associados à indução da MPT em mitocôndrias cardíacas. A incubação das mitocôndrias e a determinação da intensidade de fluorescência do Cálcio GreenTM foi realizada de acordo com o descrito na legenda da Fig. 28. Os ensaios foram efectuados na presença (L-HTL + Ca^{2+}) e na ausência de L-HTL (Ca^{2+}), tendo sido adicionado às mitocôndrias 220 nmol Ca^{2+} /mg proteína e succinato 5 mM. As mitocôndrias foram ainda incubadas com CyA adicionando-se 250 nmol de Ca^{2+} /mg proteína (CyA) e sujeitas à adição da mesma concentração de Ca^{2+} , sem a adição de CyA ($[\text{Ca}^{2+}]$ alta). O traçado descontínuo representa um ensaio em que as mitocôndrias foram incubadas com L-HTL não havendo adição de Ca^{2+} (L-HTL). A intensidade de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias.

4. Efeitos da carbamazepina, DL-homocisteína e L-homocisteína tiolactona na fluidez membranar

A interacção da CBZ, DL-Hcy e L-HTL com lipossomas puros de DPPC foi estudada por polarização de fluorescência do DPH e DPH-PA, de modo a compreender a interacção entre estas moléculas e as membranas biológicas, tendo como objectivo explicar os diferentes efeitos obtidos na indução da permeabilidade transitória em mitocôndrias hepáticas e cardíacas.

O varrimento térmico ascendente induz nas bicamadas fosfolipídicas uma transição de fase, de um estado altamente organizado, onde as cadeias dos ácidos gordos estão numa conformação “trans”, a fase gel, para outra menos ordenada, a fase fluida. Assim, ao utilizar-se sondas fluorescentes que se ligam à superfície (DPH-PA) e à região hidrofóbica (DPH) da bicamada fosfolipídica consegue-se prever, por polarização de fluorescência, alterações na fluidez membranar das membranas biológicas.

Os resultados apresentados na Fig. 47 mostram que os efeitos da CBZ nos lipossomas de DPPC dependem da organização da bicamada lipídica. Assim, para temperaturas acima da transição de fase, em que a bicamada está no estado gel, a CBZ exerce um efeito fluidificante na superfície hidrofílica dos lipossomas (Fig.47B), diminuindo a organização da bicamada, o que é demonstrado pela diminuição dos valores de P, aumentando a mobilidade rotacional da sonda DPH-PA. No intervalo de tempo em que ocorre a transição de fase e coexistem domínios do estado gel e fluído, levando a configurações membranares heterogéneas, não se observa nenhum efeito da carbamazepina. Do mesmo modo, abaixo da transição de fase em que as membranas estão no estado fluído, a carbamazepina induz um efeito fluidificante, ao nível do interior hidrofóbico da bicamada fosfolipídica (Fig. 47A).

Desta forma, a CBZ tem uma acção fluidificante no interior hidrofóbico das membranas de lipossomas de DPPC, onde se liga preferencialmente a sonda DPH, após a fase de transição. Por seu lado, antes da fase de transição, a CBZ exerce também um efeito de fluidez ao nível da superfície da bicamada fosfolipídica, região na qual se liga, preferencialmente a sonda DPH-PA.

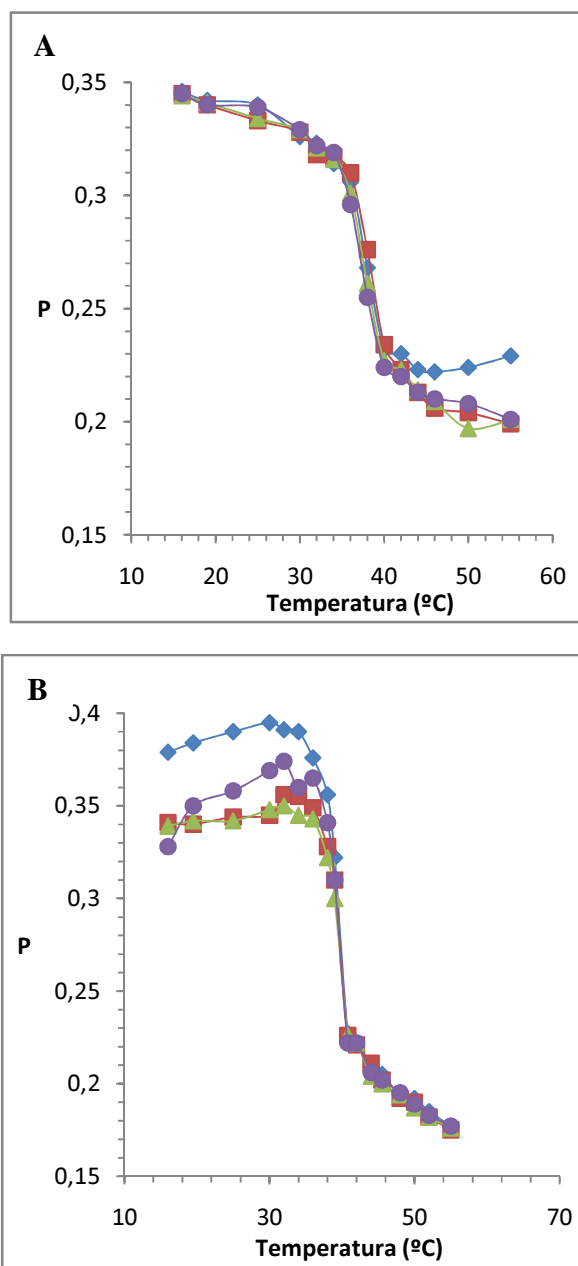


Fig. 47 – Efeito da carbamazepina, em função da temperatura, na organização de lipossomas de DPPC avaliado por polarização de fluorescência (P) do DPH (A) e DPH-PA (B). As experiências decorreram em tampão Tris-maleato (ver materiais e métodos) na ausência de CBZ (◆), e por incubação durante 30 minutos com 100 μM (▲), 200 μM (■) e 400 μM de CBZ. Os valores de P foram determinados com um λ de excitação a 336 nm, absorção a 455 nm e fendas de excitação e absorção a 6 e 8 nm, respectivamente.

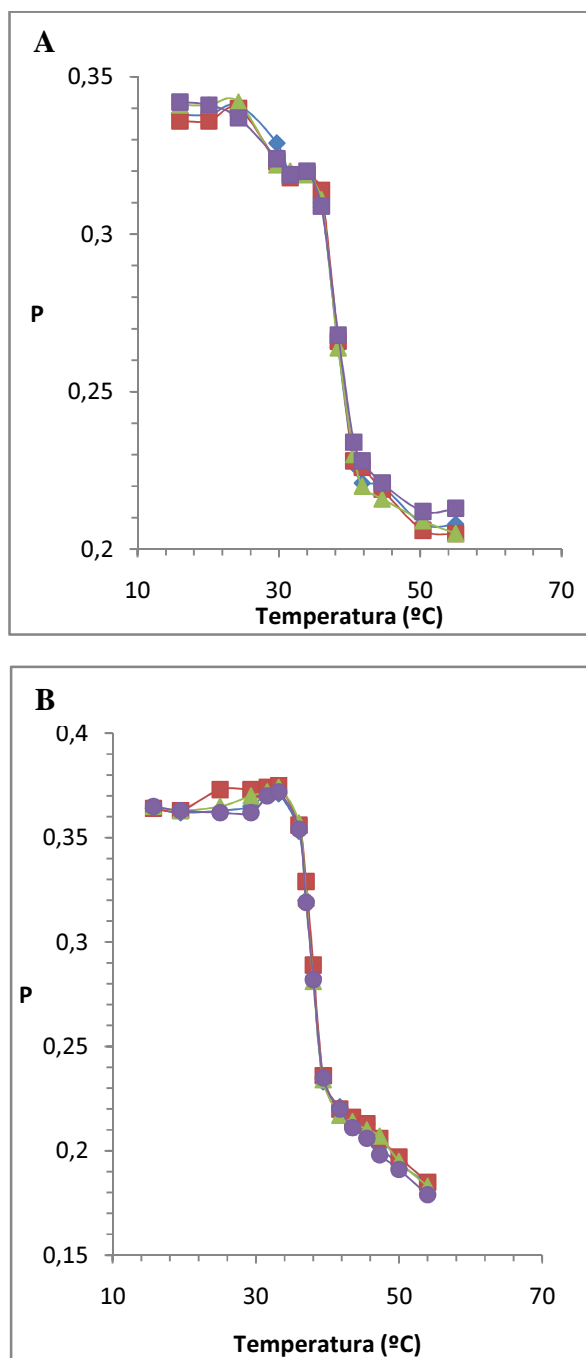


Fig. 48 – Efeito da DL-homocisteína, em função da temperatura, na organização de lipossomas de DPPC avaliado por polarização de fluorescência (P) do DPH (A) e DPH-PA (B). Os ensaios foram realizados na ausência (♦) e presença de 500 μM (▲), 1000 μM (■) e 2000 μM de DL-Hcy nas condições descritas na Fig. 47.

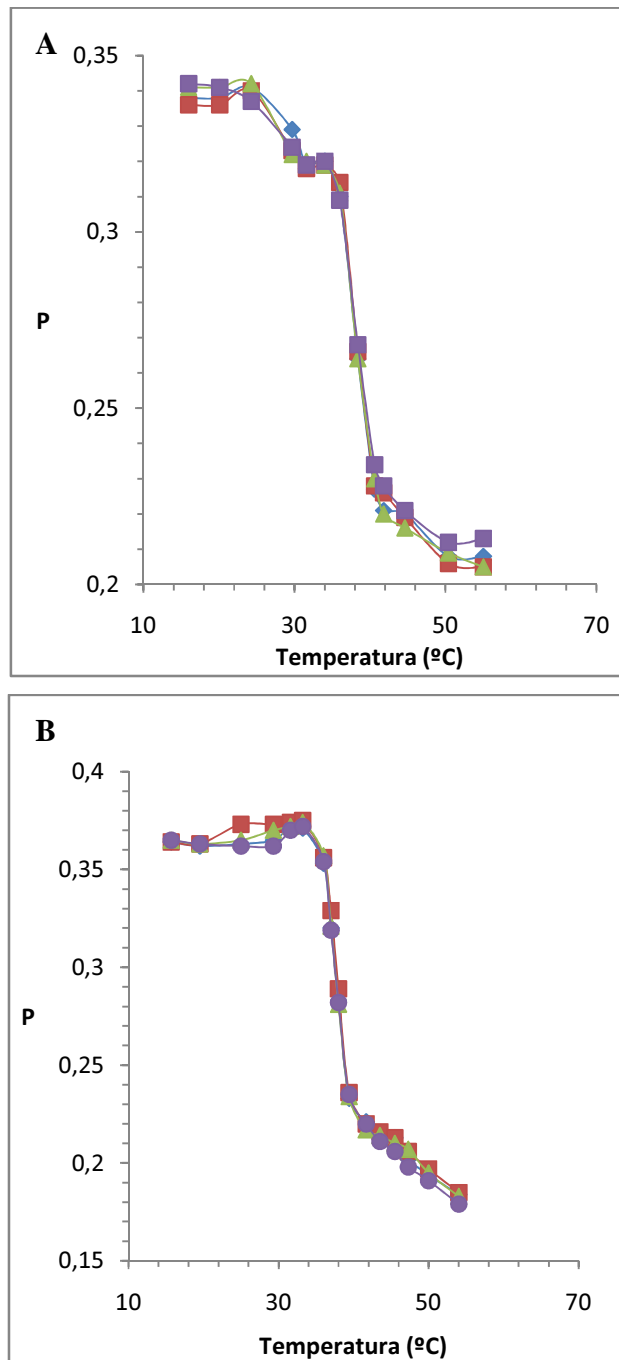


Fig. 49 – Efeito da L-homocisteína tiolactona, em função da temperatura, na organização de lipossomas de DPPC avaliado por polarização de fluorescência (P) do DPH (A) e DPH-PA (B). Os ensaios foram realizados conforme descrito na legenda da Fig. 47, na ausência (♦) e presença de 500 μM (▲), 1000 μM (■) e 2000 μM de L-HTL.

O DPH, que se liga preferencialmente à região hidrofóbica da bicamada mostrou que quer a DL-Hcy (Fig. 48A), quer a L-HTL (Fig. 49A) não alteram a organização e a fluidez das membranas de lipossomas de DPPC, conforme se pode observar pelos varrimentos térmicos efectuados.

Por sua vez o DPH-PA, derivado propionato do DPH, aparentemente localizado à superfície das membranas devido à carga do propionato também detectou que a DL-Hcy e a L-HTL não exercem qualquer acção na organização das membranas fosfolipídicas de lipossomas de DPPC, como se pode observar nas figuras 48B e 49B, respectivamente.

Discussão e Conclusão

A CBZ é dos fármacos mais prescritos no tratamento da epilepsia. No entanto, tem-se também mostrado eficaz no tratamento de outras patologias neurológicas, incluindo doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (Easterford, K., *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, diferentes estudos têm referido a ocorrência de hiperhomocisteinémia em doentes submetidos a terapêuticas com CBZ (Apeland *et al.*, 2001; Aslan *et al.* 2008; Kurul *et al.* 2007). Inerentemente tem-se verificado que os doentes sujeitos a este tipo de terapêutica desenvolvem frequentemente doenças cardiovasculares (Mintzer *et al.*, 2009). Por outro lado, a carbamazepina apresenta também toxicidade hepática. Esta acção ao nível do fígado parece ocorrer devido à acumulação de produtos das reacções de metabolização do fármaco, no entanto parece haver um efeito directo relacionado com mecanismos de stress oxidativo induzidos por este fármaco (Santos *et al.*, 2008).

Neste trabalho foi dado particular ênfase ao estudo da acção directa da CBZ, da Hcy e da HTL, um derivado potencialmente tóxico formado em condições de hiperhomocisteinémia, em mitocôndrias de fígado e de coração de rato (*in vitro*). Assim, pretendeu-se esclarecer possíveis mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade e cardiotoxicidade associados às terapêuticas com CBZ.

A mitocôndria desempenha um papel fundamental na vida celular e no desenvolvimento dos tecidos, tendo múltiplas funções ao nível do metabolismo, produção de energia, transporte iónico, sinalização e morte celular. Para além disso, a mitocôndria ao regular grande parte das funções celulares tem vindo a ser alvo do estudo dos mais variados fármacos utilizados no tratamento de doenças directamente relacionados, ou não, com o funcionamento mitocondrial (Wallace, 2008). Desta forma porque um composto pode actuar sobre a mitocôndria e conduzir a alterações celulares, foi avaliada a acção da CBZ, Hcy e HTL, na bioenergética mitocondrial e na MPT induzida por Ca^{2+} . Na primeira fase deste trabalho procedeu-se ao estudo dos efeitos destes compostos na bioenergética de mitocôndrias hepáticas e cardíacas, tendo sido avaliados os seus efeitos através da determinação do estado 2, estado 3 e estado 4 da respiração, bem como o ICR e ADP/O. A pré-incubação das mitocôndrias com estas moléculas durante três minutos mostrou que os parâmetros da respiração mitocondrial avaliados, não são afectados significativamente nas concentrações utilizadas. Adicionalmente, foi estudado o efeito da CBZ, DL-Hcy e L-HTL no $\Delta\Psi$ de mitocôndrias hepáticas e cardíacas. Os resultados demonstram que as moléculas não

alteram o $\Delta\Psi$ desenvolvido pelas mitocôndrias, nem o $\Delta\Psi$ durante o processo de fosforilação. Por sua vez, o tempo de fosforilação do ADP também não é alterado após incubação dos compostos. Em conjunto com o estudo do consumo de oxigénio, os resultados assim demonstram que os compostos estudados não afectam a cadeia respiratória e a eficiência fosforilativa dos dois tipos de mitocôndrias.

A MPT induz também a despolarização do $\Delta\Psi$, dissociação da fosforilação oxidativa, libertação de solutos matriciais e intumescimento da membrana interna com ruptura da membrana externa mitocondrial, tendo suscitado nos últimos anos grande interesse do ponto de vista fisiológico, farmacológico e toxicológico (Wallace, 2008; Zoratti *et al.*, 2005). A MPT está implicada em vários eventos celulares, nomeadamente na homeostase do Ca^{2+} , na defesa celular, apoptose, necrose e nos mecanismos de toxicidade celular (Baines, 2009). Neste estudo verificámos que a CBZ, em concentrações relativamente baixas (20 nmol/mg proteína) tem a capacidade de induzir a MPT e actuar directamente ao nível da mitocôndria. Assim os danos hepáticos associados à CBZ podem ser uma consequência da morte celular por apoptose e necrose provocada pela indução da MPT.

A regulação dos níveis de Ca^{2+} é primordial para o funcionamento normal do miocárdio pelo que alterações na homeostase deste ião podem explicar as complicações cardiovasculares observadas em doentes sujeitos a terapêuticas com CBZ. Elevados níveis de Ca^{2+} citosólicos podem ser tóxicos para a célula na medida em que podem induzir à sinalização apoptótica e levar à MPT. Adicionalmente o Ca^{2+} pode levar à acumulação de ROS na mitocôndria (Kowaltowski *et al.*, 2001). Por sua vez o ataque das ROS ao grupos SH das proteínas do mtPTP conduz à formação de pontes de dissulfureto e à sua abertura (Kowaltowski *et al.*, 2001). Nos estudos realizados em mitocôndrias cardíacas, a CBZ revelou ser incapaz de induzir a MPT. Desta forma as complicações cardiovasculares observadas em doentes sujeitos a terapêuticas com CBZ não podem ser explicadas pela acção deste fármaco na indução da MPT.

Nas terapêuticas com CBZ tem-se verificado um conseqüente aumento dos níveis de homocisteína no sangue (Apeland *et al.*, 2001; Aslan *et al.* 2008; Kurul *et al.* 2007). A homocisteína é um aminoácido formado a partir da metionina, no ciclo da metilação (Fig. 5). A CBZ parece inibir as vias de eliminação da Hcy o que resulta nos aumentos dos níveis sanguíneos de Hcy (Aslan *et al.* 2008). Por sua vez, a hiperhomocisteinémia leva à formação da

HTL, um derivado potencialmente reactivo com proteínas celulares. Estudos recentes demonstram que a Hcy aumenta os níveis de Ca^{2+} citosólicos e a produção de ROS na mitocôndria (Alexandru, *et al.* 2008) o que pode explicar a hepatotoxicidade e cardiotoxicidade em doentes sujeitos a este tipo de fármacos. Na sequência dos estudos realizados ao nível da MPT verificámos que a Hcy (1,2 $\mu\text{mol DL-Hcy/mg}$ proteína) e a HTL (0,8 $\mu\text{mol L-HTL/mg}$ proteína) induzem a MPT dependente de Ca^{2+} , em mitocôndrias hepáticas. Contudo o mesmo efeito não se verifica em mitocôndrias cardíacas.

Assim, a CBZ a Hcy e a HTL parecem ter um efeito toxicológico ao nível da mitocôndria hepática o que está de acordo com o stress oxidativo observado no estudo de Santos e colaboradores, 2008. Neste estudo verificámos que os efeitos toxicológicos destas moléculas passam por uma acção a nível da mitocôndria hepática, nomeadamente na indução da MPT. Em condições fisiológicas a indução da MPT desencadeia processos que levam à morte celular, como a apoptose o que poderá constituir a base da hepatotoxicidade observada em doentes sujeitos a terapias com CBZ. Contudo, os compostos não apresentaram qualquer efeito toxicológico ao nível das funções avaliadas em mitocôndrias cardíacas, pelo que os distúrbios cardiovasculares documentados na literatura (Valjevac *et al.*, 2009; Zhou and Austin, 2009; Zhang *et al.*, 2009) não podem ser explicados por efeitos das moléculas em mitocôndrias cardíacas.

No sentido de esclarecer os diferentes efeitos observados pelas moléculas em estudo na indução da MPT em mitocôndrias cardíacas e hepáticas, iniciámos estudos no sentido de avaliar a interacção da CBZ, Hcy e HTL com bicamadas lipídicas. A polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA em lipossomas de DPPC, sujeitos a varrimento térmico, revelou que a CBZ altera a organização lipídica dos lipossomas de DPPC na fase gel e fluida, ao contrário do observado com os outros compostos estudados. Os resultados mostram que a CBZ exerce um efeito fluidificante na fase gel, em que as membranas se encontram num estado de organização superior e na fase fluida, onde os lípidos da bicamada se encontram mais desorganizados. Desta forma, os efeitos fluidificantes nas duas fases não poderão explicar os diferentes efeitos observados devido à diferente constituição fosfolipídica das mitocôndrias de fígado e coração, nem à menor fluidez das membranas da mitocôndria cardíaca.

Em conclusão, a CBZ conjuntamente com a Hcy e a HTL, mostraram ter um efeito tóxico directo em mitocôndrias de fígado podendo constituir a causa dos danos hepáticos associados à terapêutica com CBZ. No entanto, estas moléculas não parecem ser responsáveis por um efeito tóxico em mitocôndrias cardíacas, pelo que os efeitos associados à hiperhomocisteinémia não parecem estar relacionados com a disfunção deste organelo, nos cardiomiócitos.

Bibliografia

- Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. K. and Wood, N. W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 207-219.
- Adam-Vizi, V. and Chinopoulos, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 639-745.
- Al-Waili N.S., Al-Waili H., Sallom K.Y., Al-Waili T., et al (2006). Effect of carbamazepine on urinary volume and osmolality, water clearance, and serum osmolality in patients with primary enuresis. *European Urology* 50, 884-850.
- Alexandru, N., Jardín, I., Popov, D., Simionescu, M. (2008). Effect of homocysteine on calcium mobilization and platelet function in type 2 diabetes mellitus. *J. Cell Mol. Med.* 12 (5B), 2015-2026.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell B. G., de Bruijn, M. H., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-65.
- Apeland T., Mansoor M. A. and Strandjord R.E. (2001). Antiepileptic drugs as independent predictors of plasma total homocysteine levels. *Epilepsy Research* 47, 27-35.
- Aslan, K., Bozdemir, H., Unsal, C. and Güvenc, B. (2008). The effect of antiepileptic drugs on vitamin B12 metabolism. *Int. J. Lab. Hematol.* 30 (1), 26-36.
- Attilakos A, Garoufi A, Voudris K, Mastroianni S., et al (2007). Thyroid dysfunction associated with increased low-density lipoprotein cholesterol in epileptic children treated with carbamazepine monotherapy: a causal relationship?. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 11(6), 358-361.
- Baines, C. P. (2009). The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol.* 46 (6), 850-857.

- Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E. and Hajnóczky, G. (2006). Ca²⁺ dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *J. Biol. Chem.* 281, 17347-17358.
- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F. and Forte, M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 26, 112-117.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blalchy-Dyson, E., Di Lisa, F. and Forte, M. A. (2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.* 273 2077-2099
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003). Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 517-529.
- Bolander-Gouaille, C. and Bottiglieri, T. (2007). *Homocysteine Related Vitamins and Neuropsychiatric Disorders*. France: Springer-Verlag.
- Brämshwig, S., Sudhop, T., Luers, C. von Berqmann, K. Berthold, H. K. (2003). Lipoprotein(a) concentration increases during treatment with carbamazepine. *Epilepsia* 44(3), 457-460.
- Cadenas E. and Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29:222–30.
- Cardoso, C. M. P., Custódio, J. B. A., Almeida, L. M. and Moreno, A. J. M. (2001). Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. *Toxicology and Applied Pharmacology* 176, 145-152.

- Castro, R., Rivera, I., Bolm, H. J., Jakobs, C. and Tavares de Almeida, I. (2006). Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29(1), 3-20.
- Chance, B. and Williams, G. R. (1956). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 221, 477-489.
- Custódio, J. B. A., Almeida, L. M., Madeira, V. M. (1993). The active metabolite hydroxytamoxifen of the anticancer drug tamoxifen induces structural changes in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 12, 1153(2), 308-314.
- Custódio, J. B. A., Moreno, A. J. M. and Wallace, K. B. (1998). Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by Ca^{2+} and inorganic phosphate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152, 10-17.
- Das, J. (2006). The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *Bio Essays* 28, 890-901.
- Di Lisa, F., Kaludercic, N., Carpi, A., Menabò, R. and Giorgio, M. (2009). Mitochondria and vascular pathology. *Pharmacol. Rep.* 61 (1), 123-130.
- Du, G., Mouithys-Mickalad, A. and Sluse, F. E. (1998). Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 1066-1074.
- Dykens, J. A. and Will, Y. (2007). The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov. Today.* 12, 777-785.

-
- Easterford, K., Clough, P., Kellett, M., Fallon, K. and Duncan, S. (2004). Reversible parkinsonism with normal beta-CIT-SPECT in patients exposed to sodium valproate. *Neurology*. 62 (8), 1435-1437.
- Engbersen, A. M., Franken, D. G., Boers, G. H., Stevens, E. M., Trijbels, F. J. and Blom, H. J. (1995). Thermolabile 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am. J. Hum. Genet.* 56(1), 142-150.
- Fagiolino P., Vázquez M., Olano I. and Delfino A. (2006). Systemic and presystemic conversion of carbamazepine to carbamazepine-10,11-epoxide during long term treatment. *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.* 12, 13-16.
- Feissner, R. F., Skalska, J., Gaum, W. E. and Sheu, S. S. (2009). Crosstalk signalling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Front. Biosci.* 1:14, 1197-1218.
- Frey, T. G. and Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319-324.
- Gazotti P., Malmstron K. and Crompton M. (1979). *A laboratory manual on transport and bioenergetics, Membrane Biochemistry.* (Carafoli E. & Semenza G., Eds.), New York: Springer-Verlag.
- Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P. and Rizzuto, R. (2008). Ca^{2+} signalling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.* 8(2), 119-30.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. chem* 177(2), 751-66.
- He, L. and Lemasters, J. J. (2002). Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett*, 512, 1-7.

- Heath-Engel, H. M., Shore, G. C. (2006). Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodeling and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 549-560.
- Jakubowski, H. (2002). Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J. Biol. Chem.* 277, 30425-30428.
- Jakubowski, H. (2003). Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 470-487.
- Jakubowski H. (2006). Pathophysiological consequences of homocysteine excess *J Nutr.* 136 (6), 1741S-1749S.
- Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D. and Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 65, 166-76.
- Jezeq P. and Garlid K. D. (1998). Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 1163-116.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., Kobatake, Y. (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* 49(2), 105-121.
- Karabiber H., Sonmezgoz E.S., Ozerol E., Yakinci C., Otw B. and Yologw S. (2003). Effects of valproate and carbamazepine on serum levels of homocysteine, vitamin B12 and folic acid. *Brain & Development* 25, 113-115.
- Klingenberg M. (2001). Uncoupling proteins – how do they work and how are they regulated. *IUMBMB Life* 52, 175-179.

-
- Koppenol, W. H. (2001). "The Haber-Weiss cycle – 70 years later". *Redox Report* 6 (4), 229–234.
- Kovacević I., Parojčić J., Homsek I., Tubić-Grozdanis M. and Langguth P. (2009). Justification of biowaiver for carbamazepine, a low soluble high permeable compound, in solid dosage forms based on IVIVC and gastrointestinal simulation. *Mol. Pharm.* 6 (1), 40-7.
- Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F. and Vercesi, A. E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 20 495 (1-2), 12-5.
- Kugiyama, K., Miyao, Y., Sakamoto, T., Kawano, H., Soejima, H., Myamoto, S., Yoshimura, M., Ogawa, H., Sugiyama, S. and Yasue, H. (2001). Glutathione attenuates coronary constriction to acetylcholine in patients with coronary spastic angina. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280 (1), H264-271.
- Kurul, S., Unalp, A., Yiş, U. (2007). Homocysteine levels in epileptic children receiving antiepileptic drugs. *J. Child. Neurol.* 12, 1389-1392.
- Landmarck, C. J. (2007). Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Med. Sci. Monit.* 13 (1), 1-7.
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M.L., Bergamini, C., Bianchi, C. and Biondi, A. (2006). Mitochondrial complex I: structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1406-1420.
- Litman, B. J. and Barenholz, Y. (1982). Fluorescent probe: diphenylhexatriene. *Methods Enzymol.* 81, 678-85.
- Logan, D. C. (2007). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 58 (1), 1225-1243.

- Navarro, A. and Boveris, A., (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, 670-686.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W H Freeman & Co.
- Nguyen, T. T., Hayakawa, T. and Tsuge, H. (2001). Effect of vitamin B6 deficiency on the synthesis and accumulation of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in rat tissues. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 47(3), 188-194
- Nicholls, D. G. and Ferguson, S. J. (2002). *Bioenergetics 3*. Londres: Academic Press.
- Ma, Y. S., Wu, S. B., Lee, W. Y., Cheng, J. S. and Wei, Y. H. (2009). Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochim Biophys Acta. In Press*.
- Madeira, V. M. C. (1975). A rapid and ultrasensitive method to measure Ca^{2+} movements across biological membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 870-876.
- Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 542–548.
- Marín-García, J. and Goldenthal, M. J. (2004). Heart mitochondria signaling pathways: appraisal of an emerging field. *J. Mol. Med.* 82(9), 565-578.
- Massini, A., Ceccarelli-Stanzani, D. and Muscatello, U. (1984). An investigation on the effect of oligomycin on state-4 respiration in isolated rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 767, 130-137.

- Mintzer, S., Skidmore, C. T., Abidin, C. J., Morales, M. C. et al. (2009). Effects of antiepileptic drugs on lipids, homocysteine, and C-reactive protein. *Ann Neurol.* 65 (4), 448-456.
- Miller, R. J., James-Kracke, M., Sun, G. Y. and Sun, A. Y. (2009). Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. (2009). *Neurochem. Res.* 34 (1), 55-65.
- Mosharov, E. Cranford, M. R., and Banerjee, R. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 39, 13005-13011.
- Orrenius, S., Gogvadze, V. and Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 143-183.
- O'Rourke, B. (2007). Mitochondrial ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 23.1-23.31.
- Perdziak, M., Zimny, J., Jakubowski, H. and Guranowski, A. (2005). Human placental protein purified as homocysteine-thiolactone hydrolase has been identified as human bleomycin hydrolase. (*Abstract*) *Acta Biochim Polon.*, 50, Suplem. 1, 184.
- Perla-Kaján, J., Twardowski, T. and Jakubowski, H. (2007). Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 32, 561-572.
- Perna, A. F., Ingrosso, D., Satta, E., Romano, M., et al. (2001). Metabolic consequences of hyperhomocysteinemia in uremia. *Am. J. Kidney Dis.* 38 (4 Suppl 1), S85-90.
- Rasola, A. and Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12(5), 815-833.
- Rickwood, D., Wilson, M. T. and Darley-Usmar V. M. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria-isolation of mitochondria from mammalian cells. In: Darley-Usmar,

- V.M., Rickwood, D., Wilson, M.T. (Eds). *Mitochondria: A Practical Approach*. IRL Press Oxford, England, pp. 11-13.
- Santos, N. A., Medina, W. S., Martins, N. M., Rodrigues, M. A., et al. (2008). Involvement of oxidative stress in the hepatotoxicity induced by aromatic antiepileptic drugs. *Toxicol. In Vitro* 22 (8), 1820-1824.
- Saraste, M., (1999). Oxidative Phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* 283, 1488-1493.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A. and Korsmeyer, S. J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell* 2, 55-67.
- Sener, U., Zorlu, Y., Karaguzel, O., Ozdamar, O., Coker, I. and Topbas, M. (2006). Effects of common anti-epileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6. *Seizure* 15 (2), 79-85.
- Shorvon, S. D. (2009). Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959-2009. *Epilepsia*. 50 Suppl 3, 93-130.
- Staines, A. G., Coughtrie, M. W. H., and Burchell B. (2004). N-Glucuronidation of carbamazepine in human tissues is mediated by UGT2B7. *J. Pharmac. and Experimental Therapeutics* 311, 1131-1137.
- Tatara, Y., Ohishi, M., Yamamoto, K., Shiota, A., et al. (2009). Macrophage inflammatory protein-1beta induced cell adhesion with increased intracellular reactive oxygen species. *J. Mol. Cell Cardiol.* 47 (1), 104-111.

- Tamura, T., Aison, K., Johnston, K. E., Black, L. and Faught, E. (2000). Homocysteine, folate, vitamin B-12 and vitamin B-6 in patients receiving antiepileptic drug monotherapy. *Epilepsy Research* 40, 7-15.
- Tekgul, H., Demir, N. and Gokben, S. Serum lipid profile in children receiving anti-epileptic drug monotherapy: is it atherogenic?. (2006). *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 19 (9), 1151-1155.
- Toplack, H., Batchilius, V., Hermetter, A., Hunziker, T., et al. (1990). Effects of culture and incubation conditions on membrane fluidity in monolayers of cultured cells measured as fluorescence anisotropy using trimethylammonium-diphenylhexatriene. *Biochim. Biophys. Acta.* 1028, 67-72.
- Valjevac, A., Dzibur, A., Nakas-Ićindić, E., Hadzović-Dzuvo et al. Changes in serum homocysteine level follow two different trends in patients during early post myocardial infarction period. (2009). *Bosn. J. Basic Med Sci.* 9 (2), 161-165.
- Verrotti, A., Pascarella, R., Trotta, D., Giuva, T., Morgese, G. and Chiarelli, F. (2000). Hyperhomocysteinemia in children treated with sodium valproate and carbamazepine. *Epilepsy Res.* 41, 253-257.
- Vilaseca, M. A., Monrós, E., Artuch, R., Colomé, C., Farré, C., Valls, C., Cardo, E. and Pineda, M. (2000). Anti-epileptic drug treatment in children: hyperhomocysteinaemia, B-vitamins and the 677C-->T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 4 (6), 269-77.
- Wallace, K. B. (2008). Mitochondrial off targets of drug therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (7), 361-366.
- Whitford, D. (2007). *Proteins Structure and Function*. England: John Wiley & Sons.

- Yi, P., Stepan, M., Pogribna, M., Pogribny, I. P., Jeane Hine, R. and Jill James, S. (2000). Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylmethionine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J. Biological Chemistry* 275, 29318-29323.
- Zhang, W., Sun, K., Chen, J., Liao, Y., et al. (2009). High plasma homocysteine levels contribute to the risk of stroke recurrence and all-cause mortality in a large prospective stroke population. *Clin. Sci. (Lond). In press*.
- Zhou, J. and Austin, R. C. (2009). Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: Causal relationship and potential mechanisms. *Biofactors*. 35 (2), 120-129.
- Zoratti, M., Szabò, I., De Marchi, U. (2005). Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?. *Biochim. Biophys. Acta*. 1706 (1-2), 40-52.

