UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Three Dimensional

Aspectos bioquímico-estruturais do transportador de nucleotídeos de adenina, cardiolipinas e ciclofilina D na transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca²⁺

Vitochondria

Cezar Rangel Pestana

Cross Section

Ribeirão Preto 2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aspectos bioquímico-estruturais do transportador de nucleotídeos de adenina, cardiolipinas e ciclofilina D na transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca²⁺

> Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Cezar Rangel Pestana

Orientador: Prof. Dr. Carlos Curti

v.1

Ribeirão Preto 2010

| CEZAR | Aspectos bioquímico-estruturais do transportador de nucleotídeos | Doutorado |
|---------|--|-----------|
| RANGEL | de adenina, cardiolipinas e ciclofilina D na transição de | FCFRP |
| PESTANA | permeabilidade mitocondrial induzida por Ca ²⁺ | 2010 |

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pestana, Cezar Rangel

Aspectos bioquímico-estruturais do transportador de nucleotídeos de adenina, cardiolipinas e ciclofilina D na transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca²⁺. Ribeirão Preto, 2010. 97p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Curti

1. Mitocôndrias. 2. Cálcio. 3. Ciclofilina D. 4. Transição de Permeabilidade Mitocondrial. 5. Transportador de Nucleotídeos de Adenina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cezar Rangel Pestana

Aspectos bioquímico-estruturais do transportador de nucleotídeos de adenina, cardiolipinas e ciclofilina D na transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca²⁺.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Curti

| Aprovado em: | |
|--------------|--------------|
| Banca E> | kaminadora |
| Prof. Dr | |
| Instituição: | _Assinatura: |
| | |
| Prof. Dr | |
| Instituição: | _Assinatura: |
| | |
| Prof. Dr | |
| Instituição: | Assinatura: |
| | |
| Prof. Dr | |
| Instituição: | _Assinatura: |
| | |
| Prof. Dr | |
| Instituição: | _Assinatura: |

Dedico este trabalho à minha família, minha mãe Angela e minha irmã Kelly, pelo carinho e apoio incondicionais ao longo de minha vida

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, professor Dr. Carlos Curti, pela oportunidade oferecida, pela orientação e principalmente pelo ótimo convívio e comprometimento ao longo destes anos de trabalho. Saliento sua rica contribuição no desenvolvimento do meu conhecimento científico.

Um agradecimento especial à técnica de laboratório Ana Cristina Morseli Polizello, pelo sempre pronto auxílio nos procedimentos experimentais, e acima de tudo pela satisfação de sua amizade paciente e generosa.

Aos professores Dr. Sérgio Akira Uyemura e Dr. Antônio Cardozo dos Santos, colaboradores do nosso grupo de pesquisa, cujo apoio foi imprescindível à execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva pela dedicação pessoal nos ensaios de química computacional, que pela qualidade e riqueza dos resultados alcançados, tornou-se nosso principal modelo experimental.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório de bioquímica: Daniela Phelippin, Daniel Dorta, Fernando Postalli, Felipe Godoy, Fábio Mingatto, Ingrid Pontes, Mariana Grassi, Valéria Tudella pela amizade e apoio no convívio do ambiente de trabalho. Aos funcionários do laboratório de bioquímica: Nadir, Ana Elisa, Ieda e Alcides com os quais pude sempre contar para o provimento do necessário a realização deste trabalho.

RESUMO

PESTANA, C.R. Aspectos bioquímico-estruturais do transportador de nucleotídeos de adenina, cardiolipinas e ciclofilina D na transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca²⁺. 2010. 97 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A oxidação do resíduo de cisteína 56 (ANT-cys⁵⁶) do transportador de nucleotídeos de adenina (ANT) é descrita como evento crítico da Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM), fenômeno caracterizado pela sensibilidade ao fármaco imunossupressor ciclosporina A (CsA), responsável pela ligação e inibição do componente promotor da abertura do Poro de Transição de Permeabilidade (PTP), a enzima peptidil-prolil-cis trans isomerase (cvp D). Aspectos bioguímicoestruturais do ANT, das cardiolipinas (CDL) que envolvem o transportador e da cyp D na TPM foram avaliados por meio de ensaios turbidimétricos de inchamento mitocondrial e estado conformacional do ANT em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, associados a abordagens de química computacional para análises de campos de interação molecular (MIF) e dinâmica molecular (MD), visando a predição de eventos envolvidos na abertura do PTP. As análises computacionais revelaram aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶, como resultado da interação preferencial do Ca²⁺ com a molécula de CDL ligada à hélice 4 do transportador. enguanto que a inversão da configuração do resíduo de prolina do ANT (ANT-pro⁶¹) potencializou o efeito induzido por Ca2+. A presença de ADP no interior do ANT preveniu o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ promovida pelo Ca²⁺, enquanto que a inversão da configuração do ANT-pro⁶¹, de *trans* para *cis*, potencializou o efeito promovido pelo Ca²⁺ na mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶, de forma insensível ao nucleotídeo. Os ensaios com mitocôndrias isoladas demonstraram que o Ca²⁺ induz a conformação "c" do ANT e promove abertura do PTP, de forma sensível à CsA e ADP. A presença de cyp D estabilizou a conformação "c" do ANT induzida por Ca2+, sendo que Atractilosídeo (ATR) tornou o efeito parcialmente insensível aos inibidores da TPM. Os resultados sugerem que a abertura do PTP induzida por Ca²⁺ envolve a mudança conformacional do ANT para o estado "c", cuja estabilização é obtida pela cyp D na função de inversão do ANTpro⁶¹, com base na avaliação da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ parcialmente sensível ao ADP.

Palavras-chave: Mitocôndrias. Cálcio. Ciclofilina D. Transição de Permeabilidade Mitocondrial. Transportador de Nucleotídeos de Adenina.

ABSTRACT

PESTANA, C.R. Structure-biochemical aspects of adenine nucleotide translocase, cardiolipin and ciclophilin D on Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. 97 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Oxidation of the Adenine Nucleotide Translocase (ANT) cysteine residue 56 (ANTcys⁵⁶) is potentially involved in Ca²⁺-induced Mitochondrial Permeability Transition (MPT), a process which is prevented by cyclosporine A (CsA), due to its inhibition of Permeability Transition Pore (PTP) opener component, the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophylin D (cyp D). The main aspects of ANT, cardiolipins (CDL) and cyp D on Ca²⁺-induced PTP opening were addressed by employing light scattering techniques in isolated rat liver mitochondria to assess both ANT conformational change and mitochondrial swelling in association with computational chemistry analysis of Molecular Interaction Fields (MIF) and Molecular Dynamics (MD) for PTP events predictions. Computational analysis revealed that Ca²⁺ interacts preferentially with the ANT surrounding CDL bound to the H4 helix of the carrier and weakens the CDL/ANT interactions accounting for the ADP-sensitive increase of ANT-cys⁵⁶ relative mobility while ANT-pro⁶¹ cis to trans configuration inversion intensified the Ca²⁺ effect in a ADP-insensitive way. The ANT conformation and mitochondrial swelling analyses demonstrated that Ca²⁺ induces conformation "c" of ANT and opens PTP in a CsA- and ADP-sensitive way. Cyp D stabilizes Ca²⁺-induced ANT conformation "c", whereas ATR renders a PTP opening less sensitive to the inhibition by CsA or ADP. The results suggest that Ca2+-induced PTP opening involves ANT conformation "c" change supported by a cyp D-induced trans to cys ANT-pro⁶¹ configuration inversion based on the relative mobility of ANT-cys⁵⁶, in a ADPsensitive manner.

Keywords: Mitochondria. Adenine Nucleotide Translocase. Ca²⁺. Cyclophilin D. ADP. Permeability Transition Pore.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1. | A) Célula animal mostrando as mitocôndrias em destaque. B) cadeia transportadora de elétrons. C) micrografia eletrônica da mitocôndria | 18 |
|------------|--|----|
| Figura 2. | Representação dos principais modelos propostos para o PTP | 23 |
| Figura 3. | Topologia do ANT e sítios de ação dos moduladores clássicos da TPM | 24 |
| Figura 4. | Isomeria <i>cis trans</i> do resíduo de prolina | 26 |
| Figura 5. | Alterações dos parâmetros respiratórios por Ca ²⁺ em mitocôndrias isoladas | 40 |
| Figura 6. | Pym inibe o inchamento mitocondrial induzido por Ca ²⁺ em mitocôndrias isoladas | 42 |
| Figura 7. | Influência da conformação do ANT no inchamento mitocondrial induzido por Ca ²⁺ em mitocôndrias isoladas | 43 |
| Figura 8. | Efeito do <i>t</i> -BOOH no inchamento mitocondrial induzido por Ca ²⁺ em mitocôndrias isoladas | 45 |
| Figura 9. | Alteração conformacional do ANT induzida por Ca ²⁺ em mitocôndrias isoladas | 47 |
| Figura 10. | Efeito de CsA e ADP no inchamento mitocondrial induzido por Ca ²⁺ e ATR em mitocôndrias isoladas | 49 |
| Figura 11. | Ligação do Ca ²⁺ na estrutura do ANT em presença ou ausência de CDL | 51 |
| Figura 12. | Aumento da mobilidade relativa do ANT-cys ⁵⁶ induzido por Ca ²⁺ | 52 |
| Figura 13. | Posicionamento do ADP no interior da estrutura do ANT | 53 |
| Figura 14. | ADP previne o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys ⁵⁶ induzido por Ca ²⁺ | 55 |
| Figura 15. | Inversão da configuração do ANT-pro ⁶¹ aumenta a mobilidade relativa do ANT-cys ⁵⁶ | 56 |
| Figura 16. | Inversão da configuração do ANT-pro ⁶¹ potencializa o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys ⁵⁶ induzido por Ca ²⁺ | 57 |

| Figura 17. | Inversão da configuração do ANT-pro ⁶¹ aumenta a mobilidade relativa do ANT-cys ⁵⁶ insensível ao ADP | 58 |
|------------|--|----|
| Figura 18. | Esquema representativo da abertura do PTP induzida por Ca ²⁺ | 64 |

ABREVIATURAS

| AIF | Fator indutor de apoptose |
|-----------------------|---|
| Apaf-1 | Fator ativador de proteases pró-apoptóticas-1 |
| ADP | Adenosina 5´-difosfato |
| ANT | Transportador de nucleotídeos de adenina |
| ANT-cys ⁵⁶ | Resíduo de cisteína 56 do ANT |
| ANT-pro ⁶¹ | Resíduo de prolina 61 do ANT |
| ATP | Adenosina 5´-trifosfato |
| ATR | Atractilosídeo |
| Bcl-2 | Linfoma 2 de células B |
| BKA | Ácido Bongkréico |
| CAT | Carboxiatractilosídeo |
| CDL | Cardiolipinas |
| CsA | Cisclosporina A |
| CVFF | Consistent Valence Force Field |
| Сур D | Ciclofilina D |
| EGTA | Ácido etilenoglicol bis(β-aminoetil éter)-N,N,N´,N´-tetracético |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| HEPES | Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico |
| MD | Dinâmica molecular |
| MIF | Campos de interação molecular |
| MOPS | Ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico |
| mRyR1 | Receptor de rianodina mitocondrial tipo 1 |
| NEM | N-etilmaleimida |
| Pic | Carreador de fosfato |
| PDB | Protein Data Bank |
| PTP | Poro de Transição de Permeabilidade |
| РҮМ | N-(1-Pirenil)maleimida |
| RAM | Rapid mode of uptake |
| RCR | Razão de Controle Respiratório |
| RMSD | Desvio padrão da mobilidade relativa |
| t-BOOH | Tert-butil-hidroperóxido |
| ТРМ | Transição de Permeabilidade Mitocondrial |

| TRIS | Tris(hidroximetil)aminometano |
|------|---------------------------------------|
| VDAC | Canal aniônico dependente de voltagem |
| ΔΨ | Potencial elétrico de membrana |

| RESUMO | i |
|--|-----|
| ABSTRACT | ii |
| LISTA DE FIGURAS | iii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | iv |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 Mitocôndrias | 17 |
| 1.2 Mitocôndrias e apoptose | 19 |
| 1.3 Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) | 19 |
| 1.4 Poro de Transição de Permeabilidade (PTP) | 21 |
| 1.5 Transportador de nucleotídeos de adenina (ANT) | 21 |
| 1.6 Ciclofilina D (cyp D) | 25 |
| 1.7 Cardiolipinas (CDL) | 26 |
| 1.8 Cálcio (Ca ²⁺) | 26 |
| 1.9 Racionalização do tema | 28 |
| 1.10 Proposta | 28 |
| 2. OBJETIVO | 29 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 3.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato | 32 |
| 3.2 Ensaios com mitocôndrias isoladas | 32 |
| 3.2.1 Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) | 32 |
| 3.2.2 Potencial de membrana ($\Delta\Psi$) | 33 |
| 3.2.3 Níveis mitocondriais de ATP | 33 |
| 3.2.4 Inchamento mitocondrial | 34 |
| 3.2.5 Mudança conformacional do ANT | 34 |
| 3.3 Análises de química computacional | 34 |
| 3.3.1 Campos de Interação Molecular (MIF) | 34 |

SUMÁRIO

| 3.3.2 <i>Docking</i> molecular | 35 |
|--|----|
| 3.3.3 Dinâmica molecular (MD) | 36 |
| 3.3.3.1 Impacto do Ca ²⁺ na mobilidade relativa do ANT-cys ⁵⁶ | 36 |
| 3.3.3.2 Efeito da inversão do ANT-pro ⁶¹ na mobilidade relativa do ANT- | |
| cys ⁵⁶ | 37 |
| 3.4 Análise estatística | 37 |
| | |
| 4. RESULTADOS | 38 |
| 4.1 Ensaios com mitocôndrias isoladas | 39 |
| 4.1.1 Características da preparação mitocondrial | 39 |
| 4.1.2 Efeito do Ca^{2+} sobre a geração de ERO, $\Delta\Psi$ e níveis de | |
| ATP | 39 |
| 4.1.3 Impacto do substrato e da reatividade do ANT-cys ⁵⁶ no inchamento | |
| mitocondrial induzido por Ca ²⁺ | 41 |
| 4.1.4 Influência da conformação do ANT no inchamento mitocondrial | |
| induzido por Ca ²⁺ | 43 |
| 4.1.5 Efeito do <i>t</i> -BOOH no inchamento mitocondrial induzido por Ca ²⁺ | 44 |
| 4.1.6 Cyp D estabiliza a conformação <i>c</i> do ANT induzida por Ca ²⁺ | 46 |
| 4.1.7 ATR intensifica o inchamento mitocondrial induzido por Ca ²⁺ de | |
| maneira parcialmente sensível à CsA e ADP | 48 |
| 4.2 Análises de química computacional | 50 |
| 4.2.1 Ca ²⁺ liga-se preferencialmente as CDL que envolvem o ANT e | |
| aumenta a mobilidade relativa do ANT-cys ⁵⁶ | 50 |
| 4.2.2 Presença de ADP na estrutura do ANT protege contra o aumento | |
| da mobilidade relativa do ANT-cys ⁵⁶ induzida por Ca ²⁺ | 53 |
| 4.2.3 Inversão da configuração do ANT-pro ⁶¹ aumenta mobilidade | |
| relativa do ANT-cys ⁵⁶ e potencializa o efeito do Ca ²⁺ de maneira | |
| insensível ao ADP | 55 |
| | |
| 5. DISCUSSÃO | 59 |
| | |
| 6. CONCLUSÃO | 68 |

| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |
|-------------------------------|----|
| 7. APÊNDICES | 77 |
| 7.1 Apêndice A | 78 |
| 7.2 Apêndice B | 85 |

1 INTRODUÇÃO

1.1. Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas de células eucarióticas, cuja principal função é a síntese de ATP. Elas são constituídas por duas membranas, externa lisa e interna pregueada; esta última forma cristas que delimitam a matriz mitocondrial. A síntese do ATP necessário às funções celulares se dá por meio da fosforilação oxidativa, associada ao transporte de elétrons pela cadeia respiratória (complexos I – IV) na membrana mitocondrial interna. Os equivalentes redutores de desidrogenases da matriz mitocondrial, dependentes de NAD⁺, são transferidos inicialmente à NADH desidrogenase (complexo I), enquanto que a succinato desidrogenase (complexo II), dependente de FAD⁺, recebe os equivalentes redutores do succinato. Ambos os complexos transferem os elétrons para a ubiquinona por meio de uma série de centros Fe-S, que por sua vez os transfere para a ubiguinona-citocromo c oxidorredutase (complexo III), e este para a citocromo c oxidase (complexo IV), por meio do citocromo c, uma proteína solúvel associada à porção externa da membrana mitocondrial interna; no complexo IV, o oxigênio recebe um par de elétrons e é reduzido à água. Associado ao transporte de elétrons, prótons são bombeados através da membrana mitocondrial interna gerando um gradiente eletroquímico, a força eletromotriz responsável pela fosforilação oxidativa, que ocorre nos sítios catalíticos da F_1F_0 -ATP sintase (BOYER et al., 1973; MITCHELL, 1961; NICHOLS; CROMPTON, 1980).

As mitocôndrias contêm uma diversidade de hemeproteínas (por ex., citocromo *c* oxidase), grupos tióis (por ex., glutationa) e grupos cisteína de proteínas (por ex., em transportadores como o ANT), além de ser a maior fonte celular de espécies reativas de oxigênio (ERO). Mesmo em condições normais, uma fração do O₂ disponível para a respiração mitocondrial sofre redução incompleta gerando

superóxido (O₂⁻), seja por meio do complexo I ou pelo ciclo da ubiquinona (coenzima Q) no complexo III. Frente a isso, a mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante, que inclui superóxido dismutase, glutationa peroxidase, glutationa redutase, glutationa reduzida (GSH), NAD(P) transidrogenase e NAD(P)H (BOVERIS; OSHINO; CHANCE, 1972; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; St-PIERRE et al., 2002). Quando ocorre aumento na geração de O₂⁻ ou deficiência na defesa antioxidante, as ERO produzidas acumulam-se gerando a condição de estresse oxidativo.

As mitocôndrias também estão envolvidas em outras funções celulares, com destaque à regulação do estado redox e homeostasia intracelular do Ca²⁺. Além disso, associado ou não à função clássica das mitocôndrias no metabolismo celular, elas participam dos processos de morte celular por necrose e apoptose (KROEMER; REED, 2000).



Figura 1: A) Célula animal mostrando as mitocôndrias em destaque. B) Cadeia transportadora de elétrons. C) Micrografia eletrônica de uma mitocôndria.

(Adaptado de Pearson Education, Inc.)

1.2. Mitocôndria e apoptose

Proteínas moduladoras do processo apoptótico compartimentalizadas nas mitocôndrias, tais como o citocromo c integrante da cadeia respiratória, o fator indutor de apoptose (AIF), e o Smac/DIABLO, podem ser liberadas da mesma para o citosol em resposta a diferentes estímulos apoptóticos. Uma vez no citosol, o citocromo c liga-se ao fator ativador de proteases pró-apoptóticas (Apaf-1) aumentando sua afinidade por ATP/dATP. A ligação do nucleotídeo ao complexo citocromo c/Apaf-1 promove sua oligomerização formando o apoptossoma, que recruta moléculas de pró-caspase 9, promovendo sua auto-clivagem em caspase 9. Somente as moléculas de caspase 9 ligadas ao apoptosoma são capazes de ativar efetoras, como a caspase 3, tornando-as hábeis em clivar caspases macromoléculas. Ainda que por via distinta, Smac/DIABLO também atua ativando a caspase 3. O efeito do AIF, entretanto, parece ser independente da ativação de caspases efetoras. A TPM é um dos principais mecanismos pelos quais se dá a liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria para o citosol. Além disso, membros da família de proteínas Bcl-2 também são capazes de modular a sinalização apoptótica via mitocôndria. Eles promovem ou previnem a liberação de citocromo c por meio de interação com a membrana mitocondrial (HENGARTNER, 2000; WANG, 2001).

1.3. Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)

Mitocôndrias isoladas expostas a altas concentrações de Ca²⁺ e/ou sob estresse oxidativo, presente numa série de condições patológicas, podem sofrer o fenômeno denominado Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM), mediado pela abertura de poros de natureza protéica, o Poro de Transição de Permeabilidade (PTP). *In vitro*, esse processo é caracterizado por inchamento das mitocôndrias, sensível à inibição por CsA (BERNARDI et al., 2006; CROMPTON; ELLINGER; COSTI, 1988; HALLESTRAP, 2006; HUNTER; HAWORTH, 1979; VERCESI et al., 2006; ZORATTI; SZABO, 1995).

As ERO têm sido freqüentemente associadas à ocorrência da TPM (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001; VERCESI et al., 1997). O processo favorece a liberação de moléculas do sistema antioxidante da matriz mitocondrial, responsáveis pela neutralização das ERO produzidas pela cadeia respiratória, para o citosol. Da mesma forma, a perda de citocromo *c*, componente da cadeia respiratória responsável pelo transporte de elétrons do complexo III para o IV, resulta em aumento adicional da produção de ERO pelas mitocôndrias (LUETJENS et al., 2000).

Uma característica da TPM é sua dependência do potencial de membrana mitocondrial, que quando conduzido a valores menos negativos de voltagem pela oxidação de grupos tióis de proteínas de membrana, reduz o limiar de abertura do PTP a valores fisiológicos. Por outro lado, a presença de reagentes de grupos tióis, tal como N-etilmaleimida (NEM), eleva o potencial aparente para valores mais negativos de voltagem, diminuindo a probabilidade de abertura do PTP (PETRONILLI et al., 1994).

As maiores implicações da abertura do PTP são a difusão de solutos de até 1.500 Da através da membrana mitocondrial interna, dissipação do potencial de membrana, e depleção dos níveis de ATP. Esses efeitos são acompanhados por inchamento das mitocôndrias causado pela diferença osmótica entre a matriz e o meio extramitocondrial, com conseqüente ruptura da membrana externa, e liberação de proteínas pró-apoptóticas a partir do espaço intermembrana.

1.4. Poro de transição de permeabilidade (PTP)

Os componentes estruturais propostos para o PTP incluem (i) o ANT, presente em grande quantidade na membrana mitocondrial interna, (ii) o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) da membrana mitocondrial externa, uma porina responsável pelo acesso de metabólitos do citosol para o espaço intermembrana e reguladora dos estímulos citosólicos de abertura do PTP e (iii) a cyp D, uma isomerase pertencente à família das ciclofilinas. A inibição da TPM induzida por Ca²⁺ pelos anticorpos anti-VDAC e por membros anti-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2 reforçam o envolvimento do VDAC na constituição do PTP (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007). A função da cyp D na regulação da abertura do PTP parece estar ligada principalmente à sua atividade isomerase. Sua participação no processo foi inicialmente proposta devido ao efeito inibitório de seu principal ligante conhecido, a ciclosporina A (CsA) (BASSO et al., 2005; CROMPTON; ELLINGER; COSTI, 1988). Acredita-se que a interação com o ANT e a inversão de configuração de resíduos de prolina sejam as prováveis ações da cyp D na estrutura do transportador (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

1.5. Transportador de nucleotídeos de adenina (ANT)

O ANT catalisa o transporte de ADP/ATP através da membrana mitocondrial interna; ele corresponde a cerca de 10% do conteúdo protéico presente na membrana mitocondrial interna (FIORE et al., 1998). Além de seu papel fisiológico no transporte de nucleotídeos de adenina, o ANT tem sido considerado componente central ou pelo menos um importante regulador do PTP (KOKOSZKA et al., 2004; LEUNG; HALESTRAP, 2008). A inclusão do ANT como componente central do principal modelo proposto para o PTP se deve aos efeitos regulatórios da TPM pelo principal modulador clássico fisiológico, o ADP, e não-fisiológicos, atractilosídeo (ATR) e ácido bongkréico (BKA). (HALESTRAP; BRENNER, 2003; LEQUOC; LEQUOC, 1988).

Em condições fisiológicas, o ANT transporta para o citosol o ATP produzido nas mitocôndrias, além do ADP no sentido inverso, que na matriz mitocondrial é utilizado como substrato para a fosforilação oxidativa. O ANT compartilha seqüências homólogas de outras famílias de translocases da membrana mitocondrial: uma seqüência tripartite de aproximadamente 100 aminoácidos dispostos em 6 domínios de membrana de 18 a 22 aminoácidos; 3 loops de aproximadamente 40 aminoácidos encontram-se voltados para a matriz mitocondrial enquanto que 2 loops menores, contendo 26 e 18 aminoácidos, encontram-se voltados para o espaço intermembrana (KLINGENBERG, 1989).

Quando ligado a uma molécula de ATR ou a duas moléculas de BKA, o ANT comporta-se como um complexo protéico de 60 kDa, o que sugere a formação de dímeros resultantes da sua ligação com proteínas adjacentes (FIORE et al., 1998). Cada unidade pode se apresentar covalentemente ligada, mediante ação de bimaleimidas bifuncionais, por meio de ANT-cys⁵⁶ adjacentes voltados para a matriz mitocondrial (MAJIMA et al., 1994).

Ainda que o exposto acima indique a participação do ANT como constituinte do PTP, estudos de nocaute gênico minimizaram sua essencialidade no processo (KOKOSZKA et al., 2004). Além disso, outro transportador da membrana mitocondrial, o carreador de fosfato (PiC), vem ganhando evidência (LEUNG; HALESTRAP, 2008). De fato, a composição do PTP parece ser complexa e variável, dependendo do estado fisiológico celular. Outra hipótese apresentada para a composição estrutural do PTP sugere um agregado não-específico de proteínas de membrana reguladas por chaperonas (KIM; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ; LEMASTERS, 2007).



Figura 2: Representação dos principais modelos propostos para o PTP.

O ANT apresenta duas conformações distintas que dependem da localização citosólica "c" ou matricial "m" da ligação de nucleotídeos. A TPM é inibida por ADP e induzida por ATR, responsáveis por estabilizar as conformações "c" e "m" do ANT, respectivamente. A inibição da TPM por ADP tem sido associada à diminuição da afinidade do ANT pelo Ca²⁺ (HALESTRAP; BRENNER, 2003).

O ANT possui três resíduos cisteínicos com diferentes reatividades dependentes da conformação do transportador. O estado oxidativo destes resíduos é capaz de modular a ligação da cyp D e o efeito inibitório do ADP sobre o ANT (HALESTRAP; WOODFIELD; CONNERN, 1997). O resíduo ANT-cys⁵⁶, proposto

⁽Adaptado de Brookes, 2004 e Kim, 2003)

como responsável pela sensibilização do PTP ao Ca²⁺ por estresse oxidativo, destaca-se pela proximidade ao resíduo ANT-pro⁶¹, suposto sítio de ligação da cyp D, e sugere envolvimento da alteração conformacional promovida por cyp D na reatividade deste resíduo (WOODFIELD et al., 1998).



Figura 3: Topologia do ANT e sítios de ação dos moduladores clássicos da TPM.

(Adaptado de Halestrap, 2003)

Em baixas concentrações o NEM reage com o ANT-cys⁵⁶, com mínimas modificações nos resíduos de cisteína 159 e 256, porém apenas quando o transportador encontra-se na conformação "m", este efeito é abolido por carboxiatractilosídeo (CAT). A maior reatividade do ANT-cys⁵⁶ na conformação "m" é confirmada pela ação da *o*-fenantrolina e dimaleimidas bifuncionais na promoção de

ligações cruzadas entre duas moléculas de ANT por meio das ANT-cys⁵⁶ adjacentes (MAJIMA et al., 1993).

1.6. Ciclofilina D (cyp D)

O envolvimento da cyp D na TPM tem sido caracterizado pela sensibilidade do processo à inibição por CsA (CROMPTON; ELLINGER; COSTI, 1988), além de estudos de nocaute gênico (BAINES et al., 2005; BASSO et al., 2005). Nessas condições, foi observada resistência das células em sofrer apoptose, sugerindo não somente a importância da cyp D na TPM, mas também a associação da disfunção mitocondrial associada à TPM.

Tem sido proposto que a ação da cyp D na TPM induzida por Ca²⁺ dá-se pela interação com o ANT por meio da atividade peptidil prolil *cis-trans* isomerase, responsável por promover alterações de conformação no transportador, convertendo-o no PTP (CONNERN; HALESTRAP, 1994). Nesse contexto, a participação de resíduos de prolina neste mecanismo tem sido proposta (HALESTRAP; DAVIDSON, 1990). O ANT-pro⁶¹ presente no 1º loop voltado para a face matricial do ANT é altamente conservado entre as isoformas do transportador de mamíferos, cujas mitocôndrias são sensíveis à CsA, enquanto que isoformas de fungos desprovidos do resíduo apresentam TPM insensível à CsA (JUNG; BRADSHAW; PFEIFFER, 1997; MANON et al., 1998).



Figura 4: Isomeria-cis trans do resíduo de prolina

1.7. Cardiolipinas (CDL)

Seis moléculas de CDL estão diretamente ligadas ao ANT, sendo 3 em cada subunidade do transportador. Este fosfolipídeo, presente em grande quantidade na membrana mitocondrial interna de células eucarióticas, é fundamental tanto para o transporte de nucleotídeos pelo ANT (HOFFMANN et al., 1994) quanto na sinalização apoptótica, por meio de regulação da liberação de citocromo *c*, com o qual também interage (PETROSILLO et al., 2006), além de promover mudanças na conformação do ANT (BRUSTOVETSKY; KLINGENBERG, 1996).

1.8. Ca²⁺

A especificidade do PTP ao Ca²⁺ parece ser absoluta, em contraste com o efeito inibitório apresentado por outros cátions bivalentes (BERNARDI et al., 1992). O Ca²⁺ liga-se à face interna do ANT, voltada para matriz mitocondrial, sendo que sua afinidade é maior para a conformação "c" do transportador (HALESTRAP; BRENNER, 2003).

As mitocôndrias possuem diferentes sistemas de transporte que captam e liberam Ca²⁺ através da membrana mitocondrial interna, o que confere à organela papel crucial no equilíbrio iônico da célula, crítico para a maioria dos processos fisiológicos. Isto se deve a presença de uma série de enzimas dependentes de Ca²⁺, tais como fosfolipases, proteases e endonucleases que participam da cascata de sinalização apoptótica (MCCONKEY; ORRENIUS, 1997). O envolvimento do Ca²⁺

nos processos de morte celular também pode ser observado numa série de estados patológicos tais como isquemia cardíaca, distrofia muscular, lesões neuronais decorrentes de isquemia cerebral e hipoglicemia (BUDD, 1998).

As mitocôndrias captam o Ca²⁺ citosólico principalmente por meio de canais específicos (uniporter) presentes na membrana mitocondrial interna. Esse processo pode ser inibido por cátions polivalentes, tais como vermelho de rutênio. A liberação do Ca²⁺ das mitocôndrias para o citosol ocorre por pelo menos 2 vias distintas: uma independente e outra dependente de Na⁺. O mecanismo dependente de Na⁺, eletrogênico, dá-se por meio de canais de Na⁺/Ca⁺² mitocondrial, encontrados principalmente em mitocôndrias de coração e cérebro. Já o mecanismo independente de Na⁺ é não-eletrogênico e observado em mitocôndrias de fígado e rins (GUNTER et al., 1998). Além dos mecanismos saturáveis de liberação de Ca²⁺, a TPM pode liberar o cátion a partir da matriz mitocondrial. Desde os primeiros relatos associando TPM e liberação de Ca²⁺ mitocondrial (PFEIFFER; KAUFMAN e LARDY, 1978), diversos estudos vêm demonstrando a capacidade de inúmeros agentes em promover a liberação de Ca²⁺ mitocondrial mediada pelo processo (BEATRICE; PALMER; PFEIFFER, 1980; RILEY; PFEIFFER, 1985).

Dois mecanismos adicionais de captação de Ca²⁺ incluem o modo rápido de captação (*rapid mode of uptake*, RAM), que se dá na ordem de milissegundos e permite rápidas mudanças nas concentrações de Ca²⁺ mitocondrial (SPARAGNA et al., 1995), e os receptores de rianodina (mRyR1), localizado na membrana mitocondrial interna de células excitáveis (BEUTNER et al., 2001).

1.9. Racionalização do tema

Com relação ao exposto, tem sido proposto o envolvimento da associação CDL/ANT na abertura do PTP por ação do Ca²⁺ e cyp D, a saber: (i) o Ca²⁺ enfraquece a interação ANT/CDL e permite a abertura de canais no interior ou entre subunidades do transportador (BRUSTOVETSKY; KLINGENBERG, 1996); (ii) o Ca²⁺ seqüestra CDL, facilitando a formação de agregados de proteínas de membrana, incluindo o ANT, pela oxidação intermolecular de grupos tiol (GRIJALBA; VERCESI; SCHREIER, 1999); (iii) as CDL mediam a interação entre subunidades do ANT (NURY et al., 2005); (iv) a lipoperoxidação das CDL induz a TPM com o envolvimento do ANT (PETROSILLO et al., 2006) e interfere na alquilação do ANT-cys⁵⁶, aparentemente por oclusão de domínios de superfície que compreendem este resíduo (BEYER; NUSCHER, 1996); (v) a cyp D é responsável por alterações conformacionais na estrutura do ANT, responsáveis, por sua vez, pela abertura do PTP induzida por Ca²⁺ (HALESTRAP; DAVIDSON, 1990).

1.10. Proposta

As observações acima nos levou à avaliação dos potenciais componentes do PTP (ANT, CDL e cyp D) na TPM induzida por Ca²⁺. O estudo envolveu análises de química computacional para previsão de sítios de ligação do Ca²⁺ na estrutura do ANT, *docking* molecular para cálculo da orientação da ligação do ADP no ANT e dinâmica molecular para cálculo da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶. Paralelamente às abordagens computacionais, ensaios clássicos de bioenergética foram realizados em mitocôndrias isoladas para avaliação dos processos mitocondriais associados à TPM induzida pelo acúmulo de Ca²⁺.

2 OBJETIVO

Avaliação do potencial envolvimento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ na TPM induzida por Ca²⁺, associada à inversão de configuração do ANT-pro⁶¹ mediada pela cyp D, na ausência e presença de ADP.

Para tanto, foram realizados os seguintes estudos:

1. Padrão de ligação do Ca2+ na estrutura do ANT;

2. Mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ induzida por Ca²⁺ e inversão do ANT-pro⁶¹;

3. Efeito da presença de ADP na estrutura do ANT na mobilidade relativa do ANTcys⁵⁶ induzida por Ca²⁺ e pela inversão do ANT-pro⁶¹;

4. Ação do Ca²⁺ e cyp D na conformação do ANT e reatividade do ANT-cys⁵⁶;

5. Avaliação da dependência da conformação do ANT no inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺.

Também foram realizados estudos complementares visando à caracterização do sistema utilizado:

1. Efeito do Ca²⁺ nos principais parâmetros respiratórios mitocondriais;

2. Impacto de diferentes substratos da cadeia respiratória e da reatividade do ANT– cys⁵⁶ no inchamento mitocondrial;

3. Papel das ERO no inchamento mitocondrial na ausência e presença de Ca²⁺.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial. Ratos wistar macho pesando aproximadamente 200 g foram sacrificados por decapitação; o fígado (10-15 g) foi imediatamente removido, picotado em meio de homogeneização contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM e HEPES-KOH10 mM, pH 7.2, e homogeneizado três vezes por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto, em homogenizador do tipo Potter-Elvehjem. O homogenizado foi centrifugado (580 *g*, 5 min) e o sobrenadante obtido, contendo a fração mitocondrial, submetido à nova centrifugação (10.300 *g*, 10 minutos). O sedimento resultante foi ressuspenso e centrifugado (3.400 *g*, 15 minutos) em meio de lavagem contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2. O sedimento mitocondrial final foi ressuspenso em sacarose 250 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, em volume final de 1 mL. A suspensão mitocondrial foi utilizada até 3 horas após o isolamento. O conteúdo da fração mitocondrial na suspensão foi estabelecido com base na concentração de proteína, determinada pelo método de biureto.

3.2. Ensaios com mitocôndrias isoladas

3.2.1. Geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A geração de ERO pelas mitocôndrias foi monitorada pela redução da sonda fluorescente Resorfurina (Amplex Red, Molecular Probes) em presença de peroxidase (VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2004). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio reacional padrão contendo sacarose 125 mM, KCI 60 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4, à 30°C, em presença de Amplex Red 50 μM e peroxidase 1 mU/mL e energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2 μM). A quantidade de H₂O₂ foi determinada pela intensidade de fluorescência, monitorada durante 10 minutos nos comprimentos de onda de 563/587 nm para excitação/emissão, utilizando fluorímetro Fluorescence Spectrophotometer Hitachi F-4500 (Tóquio, Japão).

3.2.2. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \Psi$)

O ΔΨ foi determinado monitorando-se as alterações na fluorescência emitida da Safranina O (AKERMAN; WIKSTRÖE, 1976). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas no meio reacional padrão, à 30ºC, em presença de Safranina O 10 µM e energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2 µM). A dissipação do potencial de membrana correlaciona-se com a diminuição da intensidade de fluorescência da sonda, monitorada durante 10 minutos nos comprimentos de onda de 495/586 nm para excitação/emissão, utilizando fluorímetro Fluorescence Spectrophotometer Hitachi F-4500 (Tóquio, Japão).

3.2.3. Níveis mitocondriais de ATP

Os níveis mitocondriais de ATP foram determinados por quimiluminescência utilizando-se o sistema luciferina-luciferase (LEMASTERS; HACKENBROCK, 1976). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio reacional padrão e energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2 µM). Os níveis de ATP foram determinados pela diminuição da luminescência emitida após 10 minutos de incubação, utilizando-se luminômetro AutoLumat LB 953 EG&G Berthold (Baden Wurttemberg, Alemanha).

3.2.4. Inchamento Mitocondrial

As mitocôndrias (0,5 mg de proteína/2mL) foram incubadas no meio reacional padrão, à 30ºC, e energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2 µM). O inchamento mitocondrial foi monitorado durante 10 minutos pela diminuição da absorbância aparente em 540 nm, utilizando espectrofotômetro Shimadzu modelo Multispec-1501 (Kyoto, Japão).

3.2.5. Mudança de conformação do ANT

A detecção de mudança conformacional do ANT foi baseada no método descrito por Das, Parker e Halestrap (2003). Mitocôndrias isoladas (5 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio contendo KCI 125 mM, MOPS 20 mM, TRIS 10 mM, EGTA 0.5 mM, L-glutamato 5 mM, L-malato 2 mM e oligomicina 7,5 μM, pH 7.2, a 30°C. A mudança de conformação foi monitorada durante 10 minutos por meio da diminuição da absorbância aparente em 520 nm, utilizando espectrofotômetro Cary 50-BIO Varian (Mulgrave, Austrália).

3.3. Análises de Química Computacional

3.3.1. Campos de Interação Molecular (MIF)

MIF identificam moléculas ou resíduos que interagem favoravelmente, sugerindo regiões de interação a um ligante. Os potenciais sítios de ligação do Ca²⁺ e ADP na estrutura do ANT foram previstos por meio dos softwares **Almond 3.3** (PASTOR et al.; 2000) do pacote **Sybyl 8.0** (Tripos Inc., St. Louis, USA) e **Grid v.22** (GOODFORD., 1985). Para as análises de **Almond**, o *grid spacing* foi ajustado para 0,5 Å e o *smoothing window* para 0,8. O numero de *filtered nodes* foi de 100, com
35% de peso relativo. Em **Grid**, uma sonda de fosfato foi utilizada para predizer os potenciais sítios de ligação do ADP. Uma região no interior do ANT com *grid spacing* de 0,33 foi delineada visando contemplar todos os possíveis sítios de ligação. Foi utilizada a estrutura do ANT complexada com CDL, obtida do banco de dados protéico Protein Data Bank (PDB entry: 10KC) (PEBAY-PEROULA et al., 2003).

3.3.2. Docking molecular

Uma molécula de ADP foi elaborada e sua energia conformacional minimizada, utilizando-se o software **Discover** do pacote **Insight II** (Accelrys, San Diego, USA). Simulação de *docking* flexível foi realizada utilizando o software **Gold 4.0** (VERDONK et al.; 2003), visando localizar o provável sítio de ligação do ADP no interior do ANT. O software classifica as orientações das moléculas no sítio do ligante por ordem decrescente de afinidade (*fitness*), por meio da função de energia empírica (GoldScore), originalmente parametrizado em relação a afinidades de ligação experimental para 82 interações proteína-ligante. Grupos de 100 confôrmeros, 100.000 operações e 95 cruzamentos foram realizados.

As simulações foram realizadas no interior de uma esfera de 12 Å centralizada no nitrogênio Zeta da Lys³² do ANT. Dentre 5 orientações, a estrutura de maior índice contendo o grupo pirofosfato do ADP foi selecionada em concordância com os sítios de ligação de fosfato preditos em **Grid**.

3.3.3. Dinâmica molecular (MD)

A trajetória do ANT-cys⁵⁶ foi determinada por análises de MD para a descrição de sua mobilidade relativa. As análises de MD foram realizadas utilizando o programa computacional **Discover** do pacote **Insight II** (Accelrys, San Diego, USA),

e as cargas atômicas para os resíduos do ANT foram obtidas por meio de campos de forças *Consistent Valence Force Field* (CVFF).

Antes da simulação, átomos de hidrogênio foram adicionados e orientados em toda estrutura do ANT e a energia total do sistema minimizada com base no protocolo algoritmo combinado de gradiente *Steepest-Descent/Conjugate* para o valor máximo de derivada de 0,001 kcal/mol⁻¹/Å⁻¹. A constante dielétrica de 80 (valor da água) foi aplicada como a condição implícita de solvente, sendo adotado o limite de 12 Å para as interações eletrostáticas e forças de *van der Waals*.

As coordenadas do sistema foram captadas a cada 15 ps em cada condição, para posterior análise dos valores de Desvio Médio da Mobilidade Relativa (RMSD) do ANT-cys⁵⁶, bem como da energia total do complexo.

Para os ensaios com ADP, o nucleotídeo foi posicionado no sítio ativo do ANT, com base nas análises de *docking* molecular.

3.3.3.1. Impacto do Ca²⁺ na mobilidade relativa do ANT-cys56

As simulações de MD para avaliação do impacto do Ca²⁺ na mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ foram realizadas para os seguintes sistemas: *(i)* ANT; *(ii)* ANT/CDL; *(iii)* ANT/CDL/Ca²⁺; *(iv)* ANT/CDL/Ca²⁺ na presença de ADP. As simulações foram realizadas no módulo **Discover** do software **Insight II** (Accelrys, San Diego, USA). Os íons Ca²⁺ foram posicionados em 2 diferentes sítios (ao longo do ANT e ligados a CDL) com base nas análises prévias de MIF.

3.3.3.2. Efeito da inversão do ANT-pro⁶¹ na mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶

As simulações de MD para avaliação do impacto da inversão do ANT-pro⁶¹ na mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ foram realizadas para os seguintes sistemas: *(i)* inversão da configuração *trans* para *cis* do ANT-pro⁶¹; *ii)* inversão da configuração *trans* para *cis* do ANT-pro⁶¹; *iii)* inversão da configuração da configuração à condição ANT/CDL/Ca²⁺; *(iii)* inversão da configuração *trans* para *cis* do ANT-pro⁶¹ na presença de ADP.

3.3.4. Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais, quando pertinente, foi determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para comparações entre os grupos tratados e seus controles, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows (São Diego, USA). Os resultados com valor de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1. Estudos com mitocôndrias isoladas

4.1.1. Características da preparação mitocondrial

A suspensão mitocondrial energizada com succinato (+ rotenona) apresentou valores de Razão de Controle Respiratório (RCR) e razão ADP/O nas faixas de 4,5–5,5 e 1,5–2,0, respectivamente, e $\Delta\Psi$ de aproximadamente 160 mV.

4.1.2. Efeitos do Ca²⁺ sobre a geração de ERO, ΔΨ e níveis de ATP

Os efeitos do Ca²⁺ sobre os parâmetros mitocondriais foram avaliados por meio de ensaios com mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato em ausência ou presença de CsA (Figura 5). Ca²⁺ estimulou a produção basal de ERO a partir da concentração de 100 μ M sensível à inibição por CsA (Figura 5A) e diminuiu o $\Delta\Psi$ e os níveis mitocondriais de ATP a partir de 10 μ M, respectivamente insensível e sensível à CsA (Figura 5B e 5C).



Figura 5 - Alteração dos parâmetros respiratórios por Ca²⁺ em mitocôndrias isoladas. Efeitos do Ca²⁺ sobre (A) produção de ERO, (B) $\Delta\Psi$ e (C) níveis de ATP. Mitocôndrias (M) foram incubadas em meio reacional padrão contendo sacarose 125 mM, KCl 60 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4, à 30°C, e energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2,5 µM) (Suc). As adições estão indicadas por setas; os números correspondem à concentração final de Ca²⁺. **P* < 0,05 *vs* controle.

4.1.3. Impacto do substrato e da reatividade do ANT–cys⁵⁶ no inchamento mitocondrial induzida por Ca²⁺

O efeito da energização das mitocôndrias no inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ foi estabelecido: 2 substratos da cadeia respiratória foram utilizados, sendo que o substrato do sítio 2 succinato em ausência de rotenona foi mais efetivo do que succinato em presença do inibidor ou do que os substratos do sítio 1 glutamato/malato (Figura 6A). A incubação das mitocôndrias com o reagente cisteínico Pym, seletivo para a alquilação do ANT-cys⁵⁶, inibiu o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ 100 μ M (Figura 6B), sugerindo o estado redox deste resíduo como crítico à TPM.



tempo (minutos)

Figura 6 – Impacto do substrato e do Pym inibe o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ em mitocôndrias isoladas. O inchamento mitocondrial foi estimado conforme descrito em Materiais e Métodos. (A) Mitocôndrias foram incubadas em meio reacional padrão e energizadas com diferentes substratos da cadeia respiratória em presença de Ca²⁺ 100 μ M, expostas as seguintes condições: a) controle (EGTA 100 μ M); b) sem substrato; c) glutamato 5 mM + malato 5 mM; d) succinato 5 mM + rotenona 2,5 μ M; e) succinato 5 mM. (B) Mitocôndrias foram incubadas em meio reacional padrão e energizadas com succinato 5 mM em presença de Ca²⁺ 100 μ M, expostas às seguintes condições: a) controle (EGTA 100 μ M); b) sem Pym; c) Pym 2 μ M; d) Pym 10 μ M; e) Pym 20 μ M. Números em A representam percentual (%) de inibição do inchamento mitocondrial em presença de CsA 1 μ M.

4.1.4. Influência da conformação do ANT no inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺

A presença de ligantes moduladores da conformação do ANT influenciou o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺. ADP e BKA, responsáveis por estabilizar a conformação "m" do transportador, reduziram a amplitude do efeito quando comparado à condição contendo apenas Ca²⁺, enquanto que ATR, responsável por estabilizar a conformação "c" do transportador, aumentou sua amplitude (Figura 7).



Figura 7 – Influência da conformação do ANT no inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ em mitocôndrias isoladas. O inchamento mitocondrial foi estimado conforme descrito em Materiais e Métodos. Mitocôndrias foram incubadas no meio reacional padrão e energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2 μ M), expostas às seguintes condições: a) controle (EGTA 100 μ M); b) Ca²⁺ 100 μ M; c) Ca²⁺ 100 μ M + ADP 2 mM; d) Ca²⁺ 100 μ M + BKA 5 μ M; e) Ca²⁺ 100 μ M + ATR 10 μ M; f) ADP 2 mM; g) BKA 5 μ M; h) ATR 10 μ M.

4.1.5. Efeito do *t*-BOOH no inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺

A Figura 8 mostra a curva concentração-resposta para o inchamento mitocondrial, 10 minutos após exposição da suspensão mitocondrial ao Ca²⁺ e/ou *t*–BOOH, em ausência ou presença de CsA. O Ca²⁺ induziu inchamento mitocondrial a partir de 25 μ M, sendo que o efeito máximo foi em aproximadamente 250 μ M. A extensão de inibição do inchamento mitocondrial por CsA 1 μ M manteve-se constante à medida em que a concentração de Ca²⁺ aumentou (Figura 8A). Até a concentração de 250 μ M, *t-B*OOH isoladamente não induziu inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺, mostrando amplitude maior do que a observada em presença de Ca²⁺ isoladamente (Figura 8C). Independente da concentração de *t*-BOOH utilizada, a extensão do inchamento mitocondrial também foi amplamente inibida por CsA.

Resultados semelhantes foram obtidos para mitocôndrias energizadas com substratos respiratórios do sítio 1, glutamato/malato, exceto pela menor extensão do inchamento (~40% dos valores obtidos pelo succinato) e inibição máxima de 20% por CsA (resultados não apresentados).



Figura 8 - Efeito do *t*-BOOH sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ em mitocôndrias isoladas. O inchamento mitocondrial foi estimado conforme descrito em Materiais e Métodos. Mitocôndrias foram incubadas em meio reacional padrão e energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2 μ M), expostas às seguintes condições: A) Ca²⁺ (•) ou Ca²⁺ + CSA (•); B) *t*-BOOH (•) ou *t*-BOOH + CsA (•); C) Ca²⁺ + *t*-BOOH (•) ou Ca²⁺ + *t*-BOOH + CsA (•). **P* < 0,05 *vs* controle. **P*<0,05 *vs* CsA.

4.1.6. Cyp D estabiliza a conformação "c" do ANT induzida por Ca²⁺

De acordo com o método turbidimétrico descrito por Leung e Halestrap (2008) para detecção de alterações conformacionais do ANT, a presença de Ca²⁺ 500 µM diminuiu a absorbância aparente da suspensão mitocondrial em 520 nm (Figura 9B), atribuída à mudança de conformação do estado "m" para "c" do ANT (Das et al., 2003). CsA e ADP preveniram a estabilização da conformação "c" induzida por Ca²⁺, ainda que uma breve alteração pôde ser observada na presença de CsA (Figuras 9C e 9D, respectivamente). Esses resultados sugerem que o Ca²⁺ induz mudança conformacional do ANT do estado "m" para "c", porém a sustentação da alteração dependeu da presença de cyp D, uma condição representada pela ausência de CsA no meio de incubação. ATR isoladamente não promoveu mudança conformacional detectável no ANT (Figura 9E), porém intensificou o decréscimo da absorbância aparente quando associado ao Ca²⁺, além de tornar o processo parcialmente insensível a CsA ou ADP (Figuras 9G e 9H, respectivamente).



Figura 9 – Alteração conformacional do ANT induzida por Ca²⁺ em mitocôndrias isoladas. Os ensaios foram realizados conforme descrito em Materiais e Métodos. Mitocôndrias foram incubadas em meio reacional contendo KCI 125 mM, MOPS 20 mM, EGTA 0.5 mM, L-glutamato 5 mM, L-malato 2 mM, oligomicina 7,5 μ M e TRIS 10 mM pH 7,2, à 30², expostas as seguintes condições: **a**) controle (sem Ca²⁺); **b**) Ca²⁺ 500 μ M; **c**) Ca²⁺ 500 μ M + CsA 5 μ M; **d**) Ca²⁺ 500 μ M + ADP 500 μ M; **e**) ATR 10 μ M + Ca²⁺ 500 μ M; **g**) ATR 10 μ M + Ca²⁺ 500 μ M + CsA 5 μ M; **h**) ATR 10 μ M + Ca²⁺ 500 μ M.

4.1.7. ATR intensifica o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ de maneira parcialmente sensível à CsA e ADP

O efeito dos principais indutores da TPM, Ca^{2+} e ATR, bem como de seus inibidores, CsA e ADP, foram avaliados no inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} . Conforme esperado, a condição de Ca^{2+} 100 μ M induziu o processo de maneira sensível à inibição por CsA e ADP (Figuras 10a-10d). Ca^{2+} 10 μ M (condição incapaz de promover o inchamento mitocondrial isoladamente, não apresentado) intensificou o efeito promovido por ATR 10 μ M isoladamente (Figura 10f). Além disso, ATR tornou o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ parcialmente insensível à CsA ou ADP (Figuras 10g e 10h).



Figura 10 – Efeito de CsA e ADP no inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ e ATR em mitocôndrias isoladas. O inchamento mitocondrial foi estimado conforme descrito em Materiais e Métodos. Mitocôndrias foram incubadas em meio reacional padrão e energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2 μ M), expostas as seguintes condições: a) controle (sem Ca²⁺); b) Ca²⁺ 100 μ M; c) Ca²⁺ 100 μ M + CsA 1 μ M; d) Ca²⁺ 100 μ M + ADP 100 μ M; e) ATR 10 μ M; f) ATR 10 μ M + Ca²⁺ 10 μ M; g) ATR 10 μ M + Ca²⁺ 10 μ M; h) ATR 10 μ M + Ca²⁺ 10 μ M.

4.2. Análises de química computacional

4.2.1. Ca²⁺ liga-se preferencialmente às CDL que envolvem o ANT e aumenta a mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶

Foram realizadas análises de MIF para a previsão dos sítios de ligação do Ca²⁺ na estrutura do ANT, utilizando o programa computacional **Almond 3.3** do pacote **Sybyl 8.0** (Tripos Inc., St. Louis, USA) na ausência ou presença de CDL (figura 11A e 11B). Para a primeira condição (ANT sem CDL), a concentração de cargas revelou uma distribuição dos íons Ca²⁺ dispersos ao longo da molécula do ANT, próximos aos resíduos Ala⁴⁵, Glu⁴⁶, Glu⁴⁸, Gly⁵¹, Asp⁵⁴, Arg⁵⁸, Pro⁶⁰, Lys⁶¹ e Glu⁶², enquanto que para segunda condição (ANT com CDL) os íons Ca²⁺ foram localizados próximos às moléculas de CDL, preferencialmente ligados à hélice H4 do ANT.



Figura 11 – Ligação do Ca²⁺ na estrutura do ANT, em presença ou ausência de CDL. MIF entre Ca²⁺ e ANT na **(A)** ausência ou **(B)** presença de CDL, em –2,0 kcal/mol. ANT-cys⁵⁶ está destacado em amarelo por círculos vermelhos. Cargas de Ca²⁺ estão representadas em nuvens amarelas.

Com base nos resultados obtidos nas análises de MIF, os íons Ca²⁺ foram posicionados dispersos ao longo do ANT, próximos aos resíduos de Ala⁴⁵, Glu⁴⁶, Glu⁴⁸, Gly⁵¹, Asp⁵⁴, Arg⁵⁸, Pro⁶⁰, Lys⁶¹ e Glu⁶² (sítios de ligação do Ca²⁺ na ausência de CDL), como próximo à molécula de CDL (sítios de ligação de Ca²⁺ na presença de CDL).

Após estabilização da energia inicial em sistema solvente aquoso, simulações de MD utilizando o programa computacional **Discover** do pacote **Insight II** (Accelrys, San Diego, USA) foram realizadas para o cálculo da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ e energia total dos sistemas, em intervalos de tempo de 1.000 ps (Figuras 12A e 12B).



Figura 12 – Aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ **induzido por Ca**²⁺**.** Mobilidade relativa (RMSD) (em angstrom) do ANT-cys⁵⁶ (em amarelo) do ANT (diagramas em azul) e energia total do sistema (inserções) em função do tempo. **(A)** Ca²⁺ (6 íons, esferas rosa) dispostos ao longo da estrutura do ANT. **(B)** Ca²⁺ (10 íons, esferas rosa) ligados a CDL (em verde). **(C)** Ca²⁺ (6 íons esferas rosa) ao longo da estrutura do ANT na ausência de CDL.

A RMSD do ANT-cys⁵⁶ aumentou em relação aos valores de mobilidade iniciais apenas para a condição na qual os íons Ca²⁺ foram posicionados diretamente ligados a CDL. A distribuição preferencial dos íons Ca²⁺ próximos à CDL sugere que a ligação do cátion aos fosfolipídeos que envolvem o transportador é capaz de enfraquecer a interação CDL/ANT, desestabilizando o ANT-cys⁵⁶ com conseqüente aumento de sua mobilidade relativa. Por outro lado, a simulação de MD para o ANT na ausência de CDL também mostrou-se capaz de desestabilizar ANT–cys⁵⁶ (Figura 12C).

4.2.2. A presença de ADP na estrutura do ANT protege contra o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ induzida por Ca²⁺

Análises de MD similares às descritas no ítem anterior foram realizadas para o sistema ANT/CDL/Ca²⁺ em ausência ou presença de ADP. Para esse conjunto de ensaios, o nucleotídeo foi posicionado no interior da estrutura do ANT por meio de do programa computacional **Grid v. 22** (GOODFORD, 1985) para a previsão dos sítios de ligação de grupos fosfato, seguido de análises de *docking* flexível pelo programa **GoldScore 67.7** (VERDONK et al.; 2003) para descrição de sua orientação (Figura 13).



Figura 13 – Posicionamento do ADP no interior da estrutura do ANT. MIF (nuvens em laranja) entre fosfato e ANT (diagramas em azul) à – 19,0 kcal/mol. A melhor orientação obtida por *docking* para o ADP (átomos de carbono em azul claro) é mostrada na figura. As setas vermelhas indicam as hélices H4, H5 bem como a h56, α -hélice curta que contem a cys⁵⁶ (em amarelo).

Os resultados de MIF obtidos por **Grid** indicam os resíduos de Arg²³⁴ e Arg⁷⁹ como os prováveis sítios de ligação do grupo pirofosfato do ADP. De fato, estudos anteriores demonstraram que a mutação R96H (denominada de op1) no carreador de *S. cerevisiae*, que corresponde ao resíduo Arg⁷⁹ na estrutura do ANT bovino, diminui drasticamente a afinidade de ligação do ADP (PEBAY-PEROULA et al., 2003).

A presença de ADP no interior da estrutura do ANT, com base nas análises de MIF e *docking*, preveniu o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ induzido por Ca²⁺. Além disso, o sistema apresentou estabilização mais rápida e de menor valor (Figura 14A comparada com a Figura 12B). A ausência de CDL, condição demonstrada como sendo capaz de aumentar a mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶, foi insensível ao ADP, conforme demonstrado por uma mobilidade relativa 2 vezes superior em relação à observada em presença de CDL (Figura 14B).



Figura 14 – ADP previne o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ **induzido por Ca**²⁺. RMSD (em angstrom) do ANT-cys⁵⁶ e energia total do sistema (inserções) em função do tempo. (A) ANT/CDL/Ca²⁺ em presença de ADP e (B) ANT/ADP/Ca²⁺ em ausência de CDL.

Estes resultados sugerem que a ligação do ADP ou a presença da CDL no ANT, próximos às hélices H5 e H4, respectivamente, podem estabilizam os pontos de contato da hélice h56, prevenindo o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶.

4.2.3. Inversão da configuração do ANT-pro⁶¹ aumenta a mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ e potencializa o efeito do Ca²⁺ de maneira insensível ao ADP

Foram realizadas análises de MD para determinação do papel da conformação do ANT na mobilidade relativa de ANT-cys⁵⁶, com base na inversão da configuração do ANT-pro⁶¹, monitorado no intervalo de tempo de 1.000 ps. A mobilidade relativa de ANT-cys⁵⁶ aumentou para a configuração *cis* do ANT-cys⁵⁶ (Figura 15B) com relação à configuração *trans* (Figura 15A).



Figura 15 – Inversão da configuração do ANT-pro⁶¹ aumenta a mobilidade relativa do ANTcys⁵⁶**.** RMSD (em angstrom) do ANT-cys⁵⁶ (em amarelo) antes e após inversão da configuração do ANT-pro⁶¹ e energia total do sistema (inserções) em função do tempo. **(A)** ANT-pro⁶¹ na configuração *trans*; **(B)** ANT-pro⁶¹ na configuração *cis* (resíduo em azul).

Além disso, a inversão *trans* para *cis* da configuração do ANT-pro⁶¹ potencializou o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ promovido por Ca²⁺ (Figura 16).



Figura 16 – Inversão da configuração do ANT-pro⁶¹ potencializa o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ promovida por Ca²⁺. (A) RMSD do ANT-cys⁵⁶ (em amarelo) com Ca²⁺ (6 íons, esferas rosa) ligados ao ANT na configuração *cis* do ANT-pro⁶¹ (resíduo em azul); **(B)** energia total do sistema após inversão da configuração de ANT-pro⁶¹ em presença de Ca²⁺ em função do tempo. Inserções representam a condição de íons Ca²⁺ (6 íons, esferas rosa) ligados ao ANT na configuração *trans* do ANT-pro⁶¹.

Entretanto, para a condição da configuração do ANT-pro⁶¹ invertida (*cis*) a presença de ADP não preveniu o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ induzido por Ca²⁺ (Figura 17).



Figura 17 – Inversão da configuração do ANT-pro⁶¹ aumenta a mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ insensível ao ADP. (A) RMSD (em angstrom) do ANT-cys⁵⁶ (em amarelo) para o ANT-pro⁶¹ (resíduo em azul) na configuração *cis* em presença de ADP; **(B)** energia total do sistema após inversão da configuração de ANT-pro⁶¹ em presença de ADP em função do tempo. Inserções representam a condição do ANT na configuração *trans* do ANT-pro⁶¹.

5 DISCUSSÃO

O ANT foi por longo período considerado o principal componente do PTP, principalmente devido à estabelecida modulação da TPM pelos seus principais ligantes fisiológicos (ADP) e não-fisiológicos (ATR e BKA). ATR estabiliza a conformação "c" do ANT, enquanto que ADP e BKA, a conformação "m" (KLINGENBERG, 2008).

A abertura do PTP está associada preferencialmente à conformação "c" do ANT (HALESTRAP; BRENNER, 2003; HAWORTH; HUNTER, 2000), além do estado oxidativo das CDL que envolvem o transportador (BEYER; NUSCHER, 1996; NURY et al., 2005; PETROSILLO et al., 2006) e da reatividade do resíduo ANT-cys⁵⁶ (BEYER; NUSCHER, 1996). Entretanto, a associação entre essas condições na abertura do PTP ainda não foi estabelecida.

Estudos prévios sugerem que o Ca²⁺ liga-se a moléculas de CDL presentes mitocondrial interna. estimulando ERO membrana а geração de na (BRUSTOVETSKY; KLINGENBERG, 1996; GRIJALBA; VERCESI; SCHREIER, 1999). Nesse sentido, o envolvimento da oxidação de grupos tióis de proteínas da membrana mitocondrial na TPM também parece ser consenso na literatura (HALESTRAP; WOODFIELD; CONNERN, 1997; HASHIMOTO et al., 1999; MCSTAY; CLARKE; HALESTRAP, 2002). O grau de reatividade de grupos tióis presentes nos transportadores da membrana mitocondrial determina a predisposição dos mesmos à oxidação por ERO, favorecendo a formação de ligações intra e intermoleculares, principalmente envolvendo o resíduo do ANT-cys⁵⁶ (GRIJALBA; VERCESI; SCHREIER, 1999; NURY et al., 2005). Além disso, ANT-cys⁵⁶ é o principal responsável pela formação de ligações intermoleculares mediadas pela glutationa, seguido por diminuição da ligação de ADP e aumento da ligação de cyp D, respectivamente, ao ANT (BEYER; NUSCHER, 1996; HALESTRAP; BRENNER,

2003). De fato, a inibição do inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ pelo Pym, um reagente fluorescente tiol-específico, ressalta a importância do estado oxidativo de grupos tióis de proteínas da membrana mitocondrial na abertura do PTP (AQUILA; KLINGENBERG, 1982; LEBLANC; CLAUSER, 1972), especificamente, a alquilação do ANT-cys⁵⁶.

As concentrações de Ca²⁺ utilizadas em nossos experimentos para induzir o inchamento mitocondrial foram baseadas em valores factíveis para observação da TPM *in vitro*. Além disso, valores próximos a estes foram relatados em condições fisiopatológicas como na morte neuronal induzida por excitotoxinas, injúrias decorrentes de isquemia/reperfusão e picos locais de Ca²⁺ mediados por receptores IP3 localizados na interface do retículo endoplasmático e mitocôndrias (KROEMER; REED, 2000).

As CDL estão envolvidas numa série de processos mitocondriais ligados a apoptose, incluindo modulação da TPM e liberação do citocromo *c* para o citosol (PETROSILLO et al., 2006). O papel das CDL na mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ aponta para uma possível dissociação/enfraquecimento da interação ANT/CDL levando à labilidade do resíduo no que se refere a sua oxidação (BEYER; NUSCHER, 1996). Além disso, a dependência de Ca²⁺ para abertura do PTP na condição das CDL oxidadas reforça a associação entre o cátion e o fosfolipídeo na indução da TPM (PETROSILLO et al., 2006).

A cyp D, localizada na matriz mitocondrial, está envolvida na abertura do PTP induzida por Ca²⁺, aparentemente por promover alterações na conformação de proteínas da membrana mitocondrial (CONNERN; HALESTRAP, 1994; CROMPTON; ELLINGER; COSTI, 1988). Devido às evidências de sua interação com cyp D, o ANT tem sido considerado o sítio de ação da mesma na membrana

mitocondrial interna, com a provável função de inverter a configuração do ANT-pro⁶¹ (WOODFIELD et al., 1998).

Análises de química computacional foram aplicadas no presente estudo como abordagem inédita no que se refere a investigação dos mecanismos envolvidos na TPM. Foi utilizada como modelo experimental a estrutura cristalizada do ANT bovino complexada com as CDL, recentemente descrita, a qual compartilha alto grau de homologia e propriedades em relação à isoforma humana (PEBAY-PEROULA et al., 2003). As análises de MD sugerem que a inversão da configuração do ANT-pro⁶¹, alteração visando mimetizar a ação da cyp D sobre o ANT na abertura do PTP, aumenta a mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶. Contrário aos resultados obtidos para o Ca²⁺, o aumento da mobilidade relativa do resíduo ANT-cys⁵⁶ promovido pela inversão da configuração do ANT-pro⁶¹ foi insensível ao ADP. Da mesma forma, os ensaios de alteração de conformação e inchamento mitocondrial demonstraram que o Ca²⁺ induz o estado "c" do transportador e promove o inchamento mitocondrial, efeitos supostamente sustentados pela cyp D na estabilização da mudança de conformação promovida por Ca²⁺, de forma sensível à CsA e ADP. A presença de ATR, por sua vez, parece estabilizar a conformação "c" do ANT induzida por Ca²⁺ e promover abertura do PTP, tornando o processo parcialmente insensível aos inibidores.

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem a associação entre Ca²⁺ e a conformação do ANT na abertura do PTP, sendo que a atividade isomerase da cyp D seria necessária na sustentação de ambos os efeitos. O potencial efeito da cyp D na mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ ainda que na presença de ADP, reforça a possibilidade de abertura do PTP mesmo em situações nas quais o ANT esteja desempenhando a função de transportador de nucleotídeos. De fato, a inibição

completa da TPM por ADP é observada apenas na presença de CsA (resultado não apresentado). Assim, este estudo abre perspectivas para o entendimento da abertura do PTP mesmo em condições fisiológicas nas quais o ANT esteja funcionando no transporte de nucleotídeos. É provável que uma alta atividade da cyp D sobre o ANT seja condição suficiente tanto para indução quanto estabilização do estado "c", mimetizada pela presença do ligante ATR, favorecendo a abertura do PTP.

Tem sido proposto que o aumento da reatividade de ANT-cys⁵⁶ predispõe o resíduo à oxidação por ERO geradas pelo próprio efeito do Ca²⁺ nas mitocôndrias, seguido pela formação de ligações cruzadas entre grupos tióis do ANT ou até mesmo de outros transportadores adjacentes incluindo outros resíduos do ANT-cys⁵⁶, na formação de dímeros protéicos (BEYER; NUSCHER, 1996; HASHIMOTO et al., 1999; NURY et al., 2005). Mais recentemente, tem sido proposto um mecanismo de abertura do PTP envolvendo a ação da cyp D sobre o carreador de fosfato mitocondrial (PiC), seja como componente central do PTP ou associado ao estado "c" do ANT (LEUNG; HALESTRAP, 2008). Nesse sentido, nossos resultados parecem contemplar ambas as possibilidades acima: i) o modelo clássico do PTP tendo o ANT como componente central de sua estrutura, considerando-se a analogia entre a série de transportadores mitocondriais de membrana potencialmente envolvidos no processo, dentre eles o próprio PiC e (ii) o modelo em que o ANT apresenta-se na qualidade de unidade regulatória do TPM.



Figura 18. Esquema representativo da abertura do PTP induzida por Ca²⁺. Na ausência de Ca²⁺, ANT encontra-se na conformação "m" e a mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ permanece inalterada. Na presença de Ca²⁺, ocorre mudança conformacional do ANT para o estado "c", efeito potencializado pela presença da cyp D. A presença de ADP previne o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ induzido por Ca²⁺, mas não pela inversão da configuração do ANT-pro⁶¹.

De fato, a utilização do ANT no presente estudos constitui-se num modelo aplicável aos demais transportadores presentes na membrana mitocondrial, em virtude da analogia entre os resíduos de prolina e cisteína presentes nessa classe de transportadores. A seleção do ANT, em particular, deveu-se à sua importância no contexto da literatura sobre o tema, sua prevalência na membrana mitocondrial interna, além do fato de ser o único componente proposto para o PTP com estrutura cristalográfica disponível em banco de dados de proteínas. Já o ANT-cys⁵⁶ foi selecionado por sua proximidade às CDL que envolvem o ANT e sua participação na dimerização de ANT adjacentes, seja entre si ou associados aos ANT-cys¹⁵⁹/ANT-cys²⁵⁶ (MCSTAY; CLARKE; HALESTRAP, 2002).

O aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ e inchamento mitocondrial insensível ao ADP, seja pela inversão de ANT-pro⁶¹ ou presença do ATR, sugere que o transporte de nucleotídeos de adenina pode ocorrer simultaneamente à abertura do PTP, ou mesmo com envolvimento de outros transportadores de membrana cuja conformação dependa de prolina. De fato, um papel para o ADP independente de ANT tem sido proposto com base na observação de que a inibição do PTP por ADP persiste mesmo na ausência do transportador, demonstrando que a inibição por ADP pode ocorrer, pelo menos em parte, por mecanismo independente de sua ligação ao ANT (LEUNG; HALESTRP, 2008).

Os resultados obtidos também podem contribuir para o entendimento da abertura do PTP em uma forma independente de Ca²⁺ ou insensível à CsA (BAINES et al., 2005; BASSO et al., 2005; JUNG; BRADSHAW; PFEIFFER, 1997; MANON et al., 1998). É possível que certas condições, tais como a presença de ligantes do ANT ou alta atividade isomerase da cyp D sejam suficientes para induzir e estabilizar a conformação "c" do ANT.

Na tentativa de racionalizar a seqüência de eventos envolvidos na abertura do PTP, propomos que o aumento da mobilidade relativa de resíduos cisteína de proteínas da membrana mitocondrial interna, representada aqui por ANT-cys⁵⁶, depende das concentrações de Ca²⁺ e cyp D, que seriam determinantes para a interação CDL/ANT, além da conformação do ANT regulada pela ligação do ADP.

A identidade da composição do PTP parece ser complexa, e pode incluir: o ANT (HALESTRAP; BRENNER, 2003), sua associação com outras proteínas presentes na membrana mitocondrial, como o carreador de fosfato (Pic) (LEUNG; HALESTRP, 2008), ou mesmo um agregado não-especifico de proteínas integrais de membrana, incluindo o ANT (GRIM; BRADICZKA, 2007). Assim, o aumento na mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ induzido por Ca²⁺ e modulada pela cyp D pode ser responsável, pelo menos em parte, pela abertura do PTP.

Em resumo, o presente estudo sugere que: 1) o Ca²⁺ induz a conformação "c" do ANT, aparentemente associada à abertura do PTP, porém, a estabilização do estado "c" depende da atividade peptidil prolil *cis-trans* isomerase da cyp D para a sustentabilidade do efeito induzido por Ca²⁺; 2) Na presença de ADP, o ANT permanece na conformação "m", insensível à ligação do Ca²⁺ às CDL que envolvem o transportador e previne o aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ e a abertura do PTP; 3) A inversão da configuração do ANT-pro⁶¹, por sua vez, aumenta a mobilidade relativa de ANT-cys⁵⁶, além de potencializar o efeito promovido por Ca²⁺ e tornar a TPM parcialmente insensível ao ADP

6 CONCLUSÃO

O aumento da mobilidade relativa do ANT-cys⁵⁶ está potencialmente envolvido na abertura do PTP induzida por Ca²⁺. A ação do Ca²⁺ dá-se por interação com as CDL que envolvem o ANT, responsável por induzir a conformação "c" do transportador, aumentando a mobilidade relativa de ANT-cys⁵⁶. A inversão da configuração de ANT-pro⁶¹ por cyp D potencializa o efeito do Ca²⁺, além de estabilizar a conformação "c" do ANT e induzir a TPM de maneira parcialmente insensível ao ADP.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERMAN, K.E.; WIKSTRÖE M, M.K. Safranine O as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 68(2), p. 191 – 197, 1976.

AQUILA, H.; KLINGENBERG M. The reactivity of -SH groups in the ADP/ATP carrier isolated from beef heart mitochondria. **Eur J Biochem.**, Berlim, v. 122, 141-145, 1982.

BAINES, C.P.; KAISER, R.A.; PURCELL, N.H.; BLAIR, N.S.; OSINSKA, H.; HAMBLETON, M.A.; BRUNSKILL, E.W.; SAYEN, M.R.; GOTTLIEB, R.A.; DORN, G.W.; ROBBINS, J.; MOLKENTIN, J.D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death, **Nature**, London, v. 434, p. 658-662, 2005.

BASSO, E.; FANTE, L.; FOWLKES, J.; PETRONILLI, V.; FORTE, M. A.; BERNARDI, P. Properties of the Permeability Transition Pore in Mitochondria Devoid of Cyclophilin D, **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 280, p. 18558-18561, 2005.

BEATRICE, M.C.; PALMER, J.W.; PFEIFFER, D.R. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca²⁺ by mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 255, 8663–8671, 1980.

BERNARDI, P.; KRAUSKOPF, A.; BASSO, E.; PETRONILLI, V.; BLACHLY-DYSON, E.; DILISA, F.; FORTE, M.A. The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target. **FEBS J.**, Oxford, v. 273, p. 2077-2099, 2006.

BERNARDI, P.; VASSANELLI, S.; VERONESE, P.; COLONNA, R.; SZABO, I.; ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267(5), p. 2934-2939, 1992.

BEYER, K.; NUSCHER, B. Specific cardiolipin binding interferes with labeling of sulfhydryl residues in the adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier protein from beef heart mitochondria. **Biochemistry**, Washington, v. 35, p. 15784 - 15790, 1996.

BEUTNER, G.; SHARMA V.K.; GIOVANNUCCI, D.R.; YULE, D.I.; SHEU, S.S. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 276, p. 21482–21488, 2001.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem. J.**, London, v. 128, p. 617-630, 1972.

BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 70(10), p. 2837-2839, 1973.

BRUSTOVETSKY, N.; KLINGENBERG, M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. **Biochemistry**, Washington, v. 35, p. 8483-8488, 1996.
BUDD, S.L. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 80, p. 203-229, 1998.

CONNERN, C.P.; HALESTRAP, A.P. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. **Biochem J.**, London, v. 302(2), p. 321-324, 1994.

CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺dependent pore in hart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem. J.**, London, v. 255(1), p. 357-360, 1988.

DAS, M.; PARKER, J.E.; HALESTRAP, A.P. Matrix volume measurements challenge the existence of diazoxide/glibencamide-sensitive KATP channels in rat mitochondria, **J. Physiol.**, London, v. 547(3), p. 893-902, 2003.

DE MACEDO D.V.; NEPOMUCENO, M.E.; PEREIRA-DA-SILVA L. Involvement of the ADP/ATP carrier in permeabilization processes of the inner mitochondrial membrane. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 215(3), p. 595-600, 1993.

FIORE, C.; TRÉZÉGUET, V.; LE SAUX, A.; ROUX, P.; SCHWIMMER, C.; DIANOUX, A.C.; NOEL, F.; LAUQUIN, G.J.; BRANDOLIN, G.; VIGNAIS, P.V. The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. **Biochimie**, Paris, v. 80(2), p. 137-50, 1998.

GOODFORD, P.J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 28, p. 849-857, 1985.

GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHREIER, S. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, Washington, v. 38, p. 13279-13287, 1999.

GRIMM, S. AND BRDICZKA, D. The permeability transition pore in cell death. APOPTOSIS v. 12, p. 841-855, 2007.

GUNTER, T.E.; BUNTINAS, L.; SPARAGNA, G.C.; GUNTER, K.K. The Ca²⁺ transport mechanisms of mitochondria and Ca²⁺ uptake from physiological- type Ca²⁺ transients. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 5-15, 1998.

HALLESTRAP, A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 34, p. 232-237, 2006.

HALESTRAP, A.P.; BRENNER, C. The adenine nucleotide translocase: A central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player of cell death. **Cur. Med. Chem.**, Schiphol, v. 10, p. 1507-1525, 2003.

HALESTRAP, A.P.; WOODFIELD, K.Y.; CONNERN, C.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 272(6), p. 3346-54, 1997.

HALESTRAP, A.P.; DAVIDSON, A.M. Inhibition of Ca²⁺-induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin A is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. **Biochem. J.**, London, v. 268, p. 153-160, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radical in Biology and Medicine, 3ed. Oxford: University Press, 1999. 704 p.

HASHIMOTO, M.; MAJIMA, E.; GOTO, S.; SHINOHARA, Y.; TERADA, H. Fluctuation of the First Loop Facing the Matrix of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier Deduced from Intermolecular Cross-Linking of Cys56 Residues by Bifunctional Dimaleimides. **Biochemistry**, v. 38, p. 1050-1056, 1999.

HAWORTH, R.A.; HUNTER, D.R. Control of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP Translocase in Permeabilized Mitochondria. **J. Bioenerg. Biomemb.**, New York, v. 32, p. 91-96, 2000.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, London, v. 407, p. 770-776, 2000.

HOFFMANN, B.; STÖCK, A.; SCHLAME, M.; BEYER, K.; KLINGENBERG, M. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, p. 1940-1944, 1994.

HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 195, p. 453–459, 1979.

JUNG, D.W.; BRADSHAW, P.C.; PFEIFFER, D.R. Properties of a cyclosporininsensitive permeability transition pore in yeast mitochondria, **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 272, p. 21104-21112, 1997.

KIM, I.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; LEMASTERS, J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 462, p. 245-53, 2007.

KLINGENBERG M. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 270(1), p. 1–14, 1989.

KOKOSZKA, J.E.; WAYMIRE, K.G.; LEVY, S.E.; SLIGH, J.E.; CAL, J.Y.; JONES, D.P.; MCGREGOR, G.R.; WALLACE, D.C. The ADP/ATP tanslocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. **Nature,** London, v. 427, p. 461-465, 2004.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters,** Amsterdam, v. 495(1-2), p. 12-15, 2001.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.** Washington, v. 87, p. 99-163, 2007.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, New York, v. 6, p. 513-519, 2000.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 60, p. 619-642, 1998.

LEBLANC, P. CLAUSER H. ADP-dependent inhibition of sarcosomal adenine nucleotide translocase by N-ethylmaleimide. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 23, 107–113, 1972.

LEQUOC, K.; LEQUOC, D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. **Arch. Biochem. Biophys.,** New York, v. 265, p. 249–257, 1988.

LEMASTERS, J.J.; HACKENBROCK, C.R. Continuous measurement and rapid kinetics of ATP synthesis in rat liver mitochondria, mitoplasts and inner membrane vesicles determined by firefly-luciferase luminescence. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v. 67, p. 1–10, 1976.

LEUNG, A.W.C.; HALESTRAP, A.P. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1777, p. 946-952, 2008.

LUETJENS, C.M.; BUI, N.T.; SENGPIEL, B.; MUNSTERMANN, G.; POPPE, M.; KROHN, A.J.; BAUERBACH, E.; KRIEGLSTEIN, J.; PREHN, J.H.M. Delayed Mitochondrial Dysfunction in Excitotoxic Neuron Death: Cytochrome c Release and a Secondary Increase in Superoxide Production. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 20, p. 5715-5723, 2000.

MAJIMA, E,; SHINOHARA, Y.; YAMAGUCHI, N.; HONG, Y.M.; TERADA, H. Importance of loops of mitochondrial ADP/ATP carrier for its transport activity deduced from reactivities of its cysteine residues with the sulfhydryl reagent eosin-5-maleimide. **Biochemistry**, Washington, v. 33(32), p. 9530–9536, 1994.

MAJIMA, E.; KOIKE, H.; HONG, Y.M.; SHINOHARA, Y.; TERADA, H. Characterization of cysteine residues of mitochondrial ADP/ATP carrier with the SH-reagents eosin 5-maleimide and N-ethylmaleimide. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268(29), p. 22181–22187, 1993.

MANON, S.; ROUCOU, X.; GUERIN, M.; RIGOULET, M.; GUERIN, B. Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v. 30, p. 419-429, 1998.

MCCONKEY, D.J.; ORRENIUS, S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 239, p. 357-366, 1997.

MCSTAY, G.P.; CLARKE, S.J.; HALESTRAP, A.P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochem. J.** v. 367, p. 541-548, 2002.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, London, v. 191, p. 144-148, 1961.

NICHOLS, D.G.; CROMPTON, M. Mitochondrial calcium transport. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 111, p. 261-268, 1980.

NURY, H.; DAHOUT-GONZALEZ, C.; TRÉZÉGUET, V.; LAUQUIN, G.; BRANDOLIN, G.; PEBAY-PEYROULA, E. Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 579, p. 6031-6036, 2005.

PASTOR, M.; CRUCIANI, G.; MCLAY, I.; PICKETT, S.; CLEMENTI, S. Grid-Independent Descriptors (GRIND): A novel class of alignment-independent threedimensional molecular descriptors. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 43, p. 3233-3243, 2000.

PEBAY-PEROULA, E.; DAHOUT-GONZALEZ, C.; KAHN, R.; TREZEGUET, V.; LAUQUIN, G.J.M.; BRANDOLIN, G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. **Nature**, London, v. 426, p. 39-44, 2003.

PETRONILLI V.; COSTANTINI, P.; SCORRANO, L.: COLONNA, R.; PASSAMONTI, S.; BERNARDI, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269(24), p. 16638–16642, 1994.

PETROSILLO, G.; CASANOVA, G.; MATERA, M.; RUGGIERO, F.M.; PARADIES, G. Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome *c* release. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 580, p. 6311-6316, 2006.

PFEIFFER, D.R.; KAUFMAN, R.F.; LARDY, H.A. Effects of N- ethylmaleimide on the limited uptake of Ca²⁺, Mn²⁺ and Sr²⁺ by rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 253, 4165-4171, 1978.

RILEY, J.R.; W.W.; PFEIFFER, D.R. Relationships between Ca²⁺ release, Ca²⁺ cycling and Ca²⁺ permeability changes in mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 260, 12416–12425, 1985.

SPARAGNA, G. C.; GUNTER, K.K.; SHEY-SHING S.; GUNTER, T. E. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium a description of the rapid uptake mode. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 270, 27510-27515, 1995.

St-PIERRE, J.; BUCKINGHAM, J.S.; ROEBUCK, S.J.; BRAND, M.S. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, 44784-44790, 2002.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial permeability transition in cell death. **Apoptosis**, London, v. 12, p. 835-840, 2007.

VERCESI, A.; KOWALTOWSKI, A.J.; OLIVEIRA, H.C.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. **Front. Biosci.**, Tampa, v. 11, p. 2554-2564, 2006.

VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; GRIJALBA, M.T.; MEINICKE, A.R.; CASTILHO, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci Reports**, London, v. 17, p. 43-52, 1997.

VERDONK, M.L.; COLE, J.C.; HARTSHORN, M.J.; MULRRAY, C.W.; TAYLOR, R.D. Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD. **Proteins,** New York, v. *52*(4), p. 609-623, 2003.

VOTYAKOVA T.V., REYNOLDS C.I.J. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 431, p. 138–144, 2004.

WOODFIELD, K.; RÜCK, A.; BRDICZKA D.; HALESTRAP, A. P. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. **Biochem. J.**, London, v. 336, 287–290, 1998.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, New York, v. 15(22), p. 2922-2933, 2001.

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophis. Acta**, Amsterdam, v. 1241, p. 139-176, 1995.