

# CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSIDROGENASE DE NAD(P)<sup>+</sup> MITOCONDRIAL EM DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS

Palavras-Chave: NNT, MITOCÔNDRIA, REDOX

Autores(as):

JOÃO VITOR FERRAZ ROSADA, IB - UNICAMP

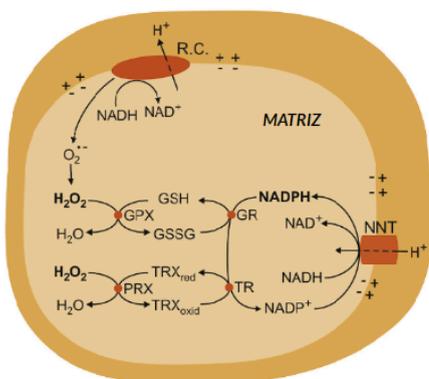
EDILENE DE SOUZA SIQUEIRA-SANTOS, FCM - UNICAMP

ANA PAULA DALLA COSTA, FCM - UNICAMP

PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO (orientador), FCM - UNICAMP

## INTRODUÇÃO

A enzima mitocondrial transidrogenase de NAD(P)<sup>+</sup> (NNT), situada na membrana mitocondrial interna, desempenha a função fisiológica de transferir um hidreto entre NADH e NADP<sup>+</sup>, com a formação de NADPH na matriz mitocondrial. A transferência desse hidreto ao NADP<sup>+</sup> está acoplada à translocação de um próton entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial <sup>(1)</sup>. Esta função é de suma importância, uma vez que o NADPH, neste compartimento celular, atua como um doador de elétrons essencial para sistemas enzimáticos antioxidantes responsáveis pela detoxificação de peróxido de hidrogênio (**Figura 1**), além de ser um componente vital em vias metabólicas de biossíntese, como a síntese de cortisol, neurotransmissores monoaminérgicos, tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e aminoácidos<sup>(2)</sup>.



**Figura 1:** O O<sub>2</sub><sup>-</sup> gerado pela cadeia respiratória mitocondrial (R.C.) pode ser transformado em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que será metabolizado pela glutationa peroxidase (GPX) e peroxirredoxina (PRX) utilizando o poder redutor da glutationa (GSH) e tiorredoxina (TRX<sub>red</sub>), respectivamente. As formas oxidadas dessas moléculas (GSSG e TRX<sub>oxid</sub>) serão reduzidas pela glutationa redutase (GR) e tiorredoxina redutase (TR), respectivamente, utilizando como doador de elétrons o NADPH gerado pela NNT em sua reação direta. Adaptado de Vercesi et al. (2018).

Devido a essa importância a múltiplas reações metabólicas, organismos que apresentam deficiência ou ausência da enzima NNT podem sofrer impactos significativos em suas funções metabólicas, resultando em desbalanço redox mitocondrial e até mesmo desencadeando insuficiência

adrenal primária <sup>(3, 4)</sup>. Essa condição evidencia a importância crítica da NNT na homeostase metabólica e destaca suas implicações potenciais.

O presente projeto foi conduzido no LABIME (Laboratório de Bioenergética e Metabolismo Celular), situado na FCM - UNICAMP. Este laboratório é reconhecido como um dos principais centros de estudo na enzima NNT, destacando-se pela sua significativa contribuição científica nesse campo. Seus estudos concentram-se principalmente na investigação dos aspectos fisiopatológicos da NNT, especialmente em relação ao equilíbrio redox, tanto a nível mitocondrial quanto celular <sup>(2)</sup>.

O objetivo principal deste projeto foi realizar uma caracterização sistemática da atividade da NNT em mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos, incluindo cérebro, coração, fígado, músculo esquelético e rim de camundongos. Essa abordagem abrangente permitirá uma compreensão mais profunda do papel da NNT em diferentes contextos teciduais, fornecendo entendimentos sobre sua função e regulação em diversos órgãos e sistemas.

## **METODOLOGIA**

- **Isolamento das mitocôndrias**

O isolamento das mitocôndrias de cérebro, coração, fígado, músculo esquelético e rim foi realizado através de homogeneização dos tecidos seguida por centrifugação diferencial. Após o deslocamento cervical e decapitação do camundongo, os tecidos foram extraídos e submetidos a uma série de processos para obtenção de uma suspensão enriquecida de mitocôndrias. Embora os procedimentos empregados fossem semelhantes, houve especificidades para cada órgão. Após obtidas as suspensões de mitocôndrias, as concentrações de proteína nas mesmas foram determinadas utilizando o método de Bradford. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA, 6202-1/2023).

- **Taxa de consumo de oxigênio**

A taxa do consumo de oxigênio (OCR) foi medida utilizando um respirômetro de alta resolução (Oxygraph-2k, Oroboros) <sup>(5)</sup>. As adições iniciais consistiram em piruvato (5 mM), malato (2,5 mM) e glutamato (5 mM), os quais foram utilizados como substratos para a respiração mitocondrial. Em sequência, foi adicionado ADP (500 µM), para estimular a cadeia respiratória. Após alguns minutos, foi adicionado oligomicina (1 µg/mL), um composto capaz de inibir a ATP sintase <sup>(6)</sup>, para inibir a fosforilação oxidativa. Por fim, foram feitas subseqüentes adições de CCCP, um desacoplador da membrana mitocondrial, para estimular a cadeia respiratória novamente <sup>(7)</sup>.

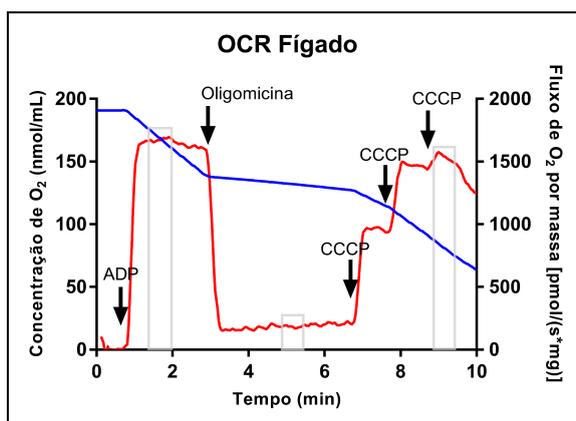
- **Determinação da atividade da NNT**

A atividade da NNT foi quantificada utilizando um espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu). A avaliação da reação direta foi realizada mediante a medição da redução de thio-NADP<sup>+</sup> por NADH, sendo esta monitorada pela absorvância diferencial entre 400 e 460 nm. Já a verificação da reação

reversa foi conduzida através da medição da redução de APAD<sup>+</sup> por NADPH, com monitoramento da absorbância diferencial entre 375 e 425 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **figura 2** mostra um traçado representativo da medição do OCR. Nela, temos que a adição de ADP resulta no primeiro aumento do fluxo de oxigênio (linha vermelha), devido ao estímulo da ATP sintase. O decaimento em seguida corresponde à adição de oligomicina, que inibe a ATP sintase. Os posteriores picos correspondem às subseqüentes adições de CCCP, translocando prótons através da membrana mitocondrial interna e levando ao funcionamento máximo da cadeia respiratória.

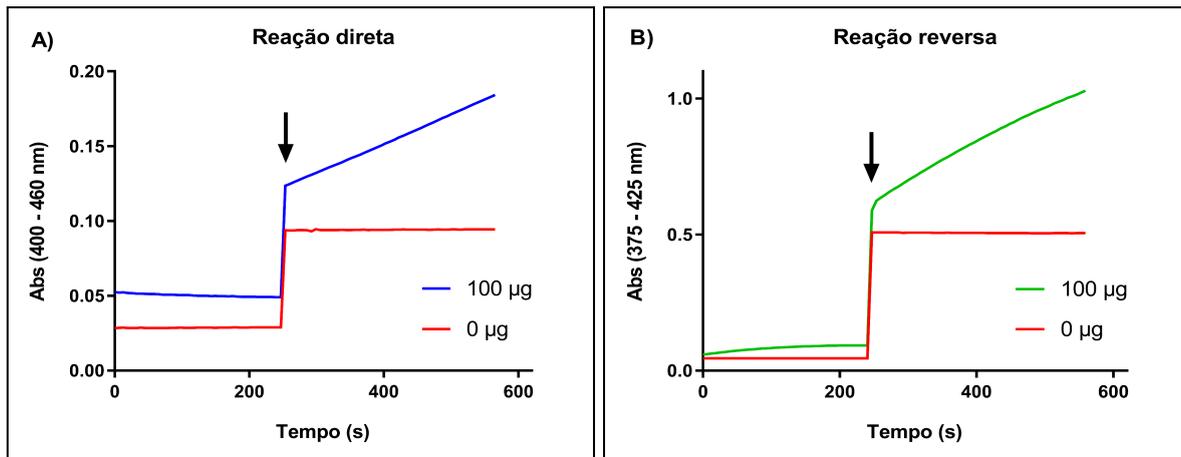


**Figura 2:** Traçado representativo de uma medição completa de OCR utilizando mitocôndrias de fígado, mostrando a concentração de oxigênio na cuba do equipamento (linha azul) e o fluxo de oxigênio por massa (linha vermelha) ao longo de todas as adições.

Foram determinados 4 valores em cada traçado obtido, sendo eles  $OCR_{ADP}$  (OCR após a adição de ADP),  $OCR_{OLIGO}$  (OCR após a adição de oligomicina),  $OCR_{CCCP}$  (OCR máximo após as adições de CCCP) e CR (controle respiratório, correspondente à razão entre  $OCR_{ADP}$  e  $OCR_{OLIGO}$ ). Para o  $OCR_{ADP}$ , os valores obtidos foram de: 1629,01 para mitocôndrias de cérebro, 3761,1 para coração, 1271,1 para fígado, 1916,4 para músculo e 2339,7 para rim, valores estão em  $pmol O_2/(s*mg)$ . Já para o controle respiratório, os valores obtidos foram de: 17,4 para mitocôndrias de cérebro, 10,9 para coração, 8,1 para fígado, 5,1 para músculo e 8,1 para rim.

A **figura 3** ilustra dois traçados representativos da atividade da NNT em mitocôndrias de fígado. No **painel A**, é apresentada a medição da reação direta da NNT, monitorada pela absorbância diferencial entre 400 e 460 nm. A seta indica o momento da adição de NADH, iniciando assim a reação de redução do thio-NADP<sup>+</sup>. No **painel B**, temos a representação da reação reversa da NNT, monitorada pela absorbância diferencial entre 375 e 425 nm. A seta indica o momento da adição de NADPH, dando início à reação de redução do APAD<sup>+</sup>. Ambos os traçados foram obtidos utilizando 100  $\mu g/mL$  de mitocôndria de fígado. O aumento da absorbância indica o aumento da redução de

thio-NADP<sup>+</sup> ou de APAD<sup>+</sup>, refletindo diretamente o funcionamento da enzima. A atividade enzimática da NNT foi determinada pelo valor do aumento da absorbância no primeiro minuto de reação.



**Figura 3:** Traçados representativos da atividade da NNT em mitocôndrias de fígado de camundongo. (A) Reação direta da NNT; o traçado azul corresponde à reação com 100 µg de mitocôndria, enquanto o traçado vermelho representa a reação sem mitocôndria. (B) Reação reversa da NNT; o traçado verde corresponde à reação com 100 µg de mitocôndria, enquanto o traçado vermelho representa a reação sem mitocôndria.

Para a atividade da reação direta da NNT, os valores obtidos foram de: 0,0014 para mitocôndrias de cérebro, 0,0161 para coração, 0,0041 para fígado, 0,0054 para músculo e 0,0086 para rim. Já para a atividade da reação reversa da NNT, os valores obtidos foram de: 0,0037 para mitocôndrias de cérebro, 0,0898 para coração, 0,0158 para fígado, 0,0130 para músculo e 0,0299 para rim. Todos os valores estão em absorbância por minuto por 50 µg de mitocôndria.

Analisando estatisticamente a correlação entre os valores médios obtidos para as reações direta e reversa da NNT, foi observado um R<sup>2</sup> de 0,9509 e um *p*-valor de 0,0047, utilizando um intervalo de confiança de 95%. Esses resultados indicam uma correlação significativa entre os resultados de atividade de NNT nas reações direta e reversa. Em outras palavras, as atividades da enzima em ambas as direções estão correlacionadas, sugerindo um funcionamento interdependente dessas duas vias metabólicas.

## CONCLUSÕES

Quanto ao OCR, as mitocôndrias apresentaram pequenas variações entre os isolamentos. Todas apresentaram Controle Respiratório maior que 5, um indicativo de uma boa qualidade das organelas isoladas<sup>(8)</sup>, e, conforme o esperado, as mitocôndrias de coração apresentaram a maior taxa de respiração<sup>(9)</sup>.

Quanto à atividade de NNT, houve uma certa variação de atividade de NNT entre os tecidos, embora não haja diferença significativa entre mitocôndrias de músculo e fígado para a reação direta e entre músculo e fígado, assim como fígado e rim, para a reação reversa. Nota-se também que as

amostras de mitocôndria de coração mostraram significativamente a maior atividade de NNT, enquanto as amostras de cérebro exibiram consistentemente a menor atividade, tanto na reação direta quanto na reversa.

Ao compararmos os valores de atividade de ambas as reações para cada tecido, observa-se que a reação reversa da NNT apresentou valores aproximadamente 5 vezes maiores que a reação direta. Esta inferência considera que a absorvidade molar de APADH e thio-NADPH são semelhantes<sup>(4)</sup>. Os resultados de atividade da NNT sugerem que a expressão e a atividade desta enzima podem variar consideravelmente entre os diferentes tecidos, refletindo as diferentes demandas metabólicas e fisiológicas de cada um.

Esses achados fornecem uma compreensão mais profunda sobre a interação entre a atividade da NNT e a bioenergética mitocondrial, destacando a complexidade e a especificidade das reações metabólicas nos diferentes tecidos. Essas informações são relevantes para compreensão dos mecanismos subjacentes ao funcionamento das mitocôndrias e podem ter implicações significativas no entendimento de disfunções mitocondriais e desordens metabólicas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 HOEK J.B.; RYDSTRÖM J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 254, pp. 1-10, 1988.
- 2 FRANCISCO A.; FIGUEIRA T. R.; CASTILHO R. F.; Mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup> Transhydrogenase: From Molecular Features to Physiology and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 36, pp. 864-884, 2022.
- 3 FUJISAWA Y.; NAPOLI E.; WONG S.; SONG G.; YAMAGUCHI R.; MATSUI T.; NAGASAKI K.; OGATA T.; GIULIVI C.; Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency **BBA Clinical**, v. 3, pp. 70-78, 2015.
- 4 FRANCISCO A.; GOLER A. M. Y.; NAVARRO C. D. C.; ONDER A.; YILDIZ M.; DEMIRKOL Y. K.; YILMAZ B. K.; MENEVSE T. S.; GÜRAN T.; CASTILHO R. F. Lack of NAD(P)<sup>+</sup> transhydrogenase activity in patients with primary adrenal insufficiency due to NNT variants. **European Journal of Endocrinology**, v 190, pp 130-138, 2024.
- 5 PESTA D.; GNAIGER E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. **Methods in Molecular Biology**, v. 810, pp. 25-58, 2012.
- 6 ALTHAHER A. R.; ALWAHSH M. An overview of ATP synthase, inhibitors, and their toxicity. **Heliyon**, v. 9, e22459, 2023.
- 7 RUAS, J. S.; SIQUEIRA-SANTOS, E. S.; AMIGO, I. RODRIGUES-SILVA, E. KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F. Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells. **PLoS One**, v. 11, e0150967, 2016.
- 8 BRAND M, D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **The Biochemical Journal**, v. 435, pp. 297-312, 2011.
- 9 BERNARD, G.; FAUSTIN, B.; PASSERIEUX, E.; GALINIER, A.; ROCHER, C.; BELLANCE, N.; DELAGE, J. P.; CASTEILLA, L.; LETELLIER, T.; ROSSIGNOL, R. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 291, pp. 1172-1182.