



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

Aline Sanches Perez

**Efeitos das radiações eletromagnéticas em mitocôndrias
isoladas**

São Carlos

2022

Aline Sanches Perez

Efeitos das radiações eletromagnéticas em mitocôndrias isoladas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2022

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.

Perez, Aline Sanches

Efeitos das radiações eletromagnéticas em mitocôndrias isoladas / Aline Sanches Perez; orientador Vanderlei Salvador Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2022.
140 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Mitocôndria isolada. 2. Bioenergética. 3. Radiação eletromagnética. I. Salvador Bagnato, Vanderlei, orient. II. Título.

Aos meus pais e ao meu companheiro de vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida. À minha família, em especial à minha mãe, Silmara, pelo amor, carinho e pelas palavras de incentivo e ao meu pai, Hélio, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao meu amado companheiro de jornada, Caio, por todo o apoio e por acreditar em mim. Aos meus sogros, Vilma e Flavio pelo apoio e carinho que sempre me dedicaram.

À minha querida e grande amiga Paloma Moura, cuja amizade contribuiu incalculavelmente para meu crescimento pessoal.

À minha tia, Leonice, pelas palavras de incentivo e pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato, por confiar no meu trabalho e pelas contribuições.

À Dra. Natalia M. Inada, pelas discussões e contribuições, bem como apoio moral e incentivo.

À Ms. Natasha F. Mezzacappo, por toda ajuda e dedicação, bem como pelas importantes discussões.

Ao Prof. Dr. Roger F. Castilho pelas importantes contribuições e discussões realizadas ao longo deste trabalho. Ao Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi pelo incentivo e discussões. À Edilene pela paciência e grande ajuda no manejo dos animais.

Ao Dr. José Dirceu Vollet-Filho pela ajuda e apoio neste trabalho. A todos os colegas do laboratório de Biofotônica, que colaboraram direta ou indiretamente com a elaboração deste trabalho.

Ao CNPq, pelos proventos fornecidos durante a viabilização deste estudo.

“Seu trabalho é descobrir o seu trabalho e, então, de todo o seu coração se entregar a ele.”

Buda

RESUMO

PEREZ, A.S. **Efeitos das radiações eletromagnéticas em mitocôndrias isoladas**. 2022. 140p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

O desenvolvimento e a otimização de novas terapias baseadas em radiação eletromagnética, como a radio-fototerapia (raio X), fototerapia (luz visível e infravermelho) e ablação por micro-ondas, estão direta ou indiretamente ligados às mitocôndrias, um dos principais alvos da radiação eletromagnética. Este estudo dedicou-se à análise sistemática das alterações dos estados respiratórios mitocondriais, devido a interação de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo com radiações nos intervalos do raio X, ultravioleta e micro-ondas, em doses calculadas para equivaler as doses das respectivas terapias. Experimentos de respirometria de alta resolução e inchamento mitocondrial foram realizados. A condição de irradiação no espectro do raio X deu-se em dois formatos: tecido hepático e alíquota ('gota') de mitocôndria isolada, devido a energia do fóton suficientemente alta para ionizar o meio de reação. Diferentemente da condição de irradiação para o ultravioleta e micro-ondas, que se deu em meio de reação. Mitocôndrias irradiadas com raios X se mostraram bioenergeticamente estimuladas, em pelo menos 20%, em baixas doses (0,25 e 0,50 Gy), em ambas as condições de irradiação, e não apresentaram alterações para altas doses, não foi observado correlação entre dose e efeito. As menores doses também apresentaram maior sensibilidade ao cálcio e conseqüentemente maior susceptibilidade ao inchamento mitocondrial. Enquanto mitocôndrias irradiadas com UV-A, não demonstraram nenhuma alteração no padrão respiratório, quando irradiadas com UV-C, ocorre inibição de suas funções bioenergéticas, em pelo menos 30%, para a menor dose utilizada neste estudo ($22,5 \text{ mW/cm}^2$) a variação observada no controle respiratório decresce linearmente com a dose, e também apresentou maior susceptibilidade ao inchamento. Por fim, mitocôndrias irradiadas com micro-ondas apresentaram perda da capacidade bioenergética, em pelo menos 30%, para dose de 0,085 kJ/g, observou-se ainda variação linear entre dose e efeito foi observado e também apresentou maior susceptibilidade ao inchamento. Devido ao aumento da temperatura em decorrência das micro-ondas, investigou-se as alterações provocadas, em mitocôndrias isoladas, decorrentes do tratamento térmico, que por sua vez, apresentam efeitos distintos daqueles observados pela irradiação, indicando que as micro-ondas provocam alterações intrinsecamente ligadas a sua natureza, e portanto não decorrem exclusivamente do aumento de temperatura. Em suma, a partir deste estudo, foi possível observar respostas distintas na bioenergética das mitocôndrias em decorrência de diferentes doses de raio X, ultravioleta e micro-ondas.

Palavras-chave: Mitocôndria isolada. Bioenergética. Radiação eletromagnética.

ABSTRACT

PEREZ, A.S. **Electromagnetic radiation effects in isolated mitochondria**. 2022. 140p. Dissertation (Master in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The development and optimization of new therapies based on electromagnetic radiation, such as radio-phototherapy (X-ray), phototherapy (visible light and infrared) and microwave ablation, are directly or indirectly linked to mitochondria, one of the main targets of electromagnetic radiation. This study was dedicated to the systematic analysis of alterations in mitochondrial respiratory states, due to the interaction of isolated mouse liver mitochondria with radiation in the X-ray, ultraviolet and microwave ranges, in doses calculated to match the doses of the respective therapies. High-resolution respirometry and mitochondrial swelling experiments were performed. The irradiation conditions in the X-ray spectrum were carried out in two formats: liver tissue and aliquot ('drop') of isolated mitochondria, due to the photon energy high enough to ionize the reaction medium. Unlike the irradiation condition for ultraviolet and microwaves, which was carried out in a reaction medium. Mitochondria irradiated with X-rays were shown to be bioenergetically stimulated, at least 20%, at low doses (0.25 and 0.50 Gy), in both irradiation conditions, and showed no alterations at high doses, no correlation was observed between dose and effect. The lower doses also showed greater sensitivity to calcium and consequently greater susceptibility to mitochondrial swelling. While UV-A irradiated mitochondria did not demonstrate any alteration in the respiratory pattern, but, when it is irradiated with UV-C, bioenergetic functions were inhibited at least 30%, for the lowest dose used in this study (22.5 mW/cm²) the observed variation in respiratory control decreases linearly with dose, and also showed greater susceptibility to swelling. Finally, mitochondria irradiated with microwaves showed a loss of bioenergetic capacity, at least 30%, for a dose of 0.085 kJ/g, a linear variation between dose and effect was also observed and also showed greater susceptibility to swelling. Due to the increase in temperature as a result of microwaves interaction, the changes caused in isolated mitochondria resulting from heat treatment were investigated, which, in turn, have different effects from those observed by irradiation, indicating that microwaves cause changes intrinsically linked to their nature, and therefore do not result exclusively from the increase in temperature. In short, from this study, it was possible to observe responses in mitochondria bioenergetics as a result of different doses of X-ray, ultraviolet and microwave.

Keywords: Isolated mitochondria. Bioenergetics. Electromagnetic radiation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – As mitocôndrias possuem dupla membrana lipídica, interna e externa. O DNA circular mitocondrial, o ciclo do ácido cítrico (CAC) e a cadeia de respiração são encontrados dentro da matriz mitocondrial, região delimitada pela membrana interna. 39
- Figura 2 – Representação do ciclo do ácido cítrico (CAC) *in vivo*, também denominado Ciclo de Krebs. A molécula de Acetil-CoA é convertida em citrato que ao ser hidratado assume a forma instável isocitrato, ao perder uma molécula de gás carbônico é convertido alfa-cetoglutarato. A alfa-cetoglutarato ao ser convertida em succinil-CoA tem a formação de NADH. A succinil-CoA é convertida em succinato que por sua vez forma o fumarato, formando uma molécula de $FADH_2$, finalmente obtém-se malato que é convertido em oxaloacetato com a formação de uma molécula de NADH, completando o ciclo. 40
- Figura 3 – Representação da cadeia de transporte de elétrons com base na cristalografia disponível no PDB (PDB ID 3M9S CI; PDB ID 1ZOY CII ;PDB ID1BGY CIII; PDB ID 1OCC – CIV). Complexos enumerados de I a IV formam juntos a CTE. Enzimas, coenzimas e proteínas menores como Q, QH_2 e citocromo c também fazem parte da cadeia e assumem papel fundamental no carreamento de elétrons. O CII, também chamado de succinato desidrogenase, ao contrário dos demais complexos não expulsa prótons para o espaço intermembrana e é parte ativa do CAC. 42
- Figura 4 – Ilustração da ATPase com base na cristalografia disponível no PDB (PDB ID 1BMF e PDB ID 1JNV), sua estrutura é subdividida em duas grandes porções: F_1 e F_o , a primeira é voltada para o lado N da membrana e a segunda está fixada na bicamada lipídica interna da mitocôndria, por ser uma membrana impermeável a íons permite que a passagem de prótons através da ATPase gere trabalho positivo. A força realizada pelos prótons gera um trabalho capaz de girar a subdivisão F_1 que por sua vez converte ADP e fósforo inorgânico em ATP. 43
- Figura 5 – Alterações dos componentes mitocondriais podem levar à alterações das atividades mitocondriais normais. 1) Permeabilidade de poro de transição. 2) O sistema de transporte de elétrons. 3) A força próton-motriz. 4) Translocador de nucleotídeos de adenina. 5) O vazamento de prótons. 6) Desacoplamento químico mitocondrial. 7) DNA mitocondrial. 8) Dissipação de energia. 9) Entrada de solutos e água na matriz. 45

Figura 6 – Desenho esquemático do respirômetro de alta resolução, Oroboros O2k. As duas câmaras, individuais de respiração, permitem a obtenção de dados de amostra irradiada e controle simultaneamente nas mesmas condições experimentais.	47
Figura 7 – Representação dos estados respiratórios mitocondrial. Os substratos de CI (glutamato e malato) são adicionados no meio de reação, seguido da titulação de mitocôndria isolada e ADP, até a fosforilação máxima acoplada, P (estado 3 - E3, do inglês <i>phosphorilation</i>), onde $ADP + P_i$ são convertidos em moléculas de ATP. Oligomicina é adicionada, bloqueando a fosforilação oxidativa, L (estado 4 - E4, do inglês <i>leaking</i>). Finalmente o desacoplador é titulado para obtenção do estado desacoplado, E (estado desacoplado - ED, do inglês <i>electron transport chain</i>). A partir dos estados respiratórios é possível calcular diferentes controles e coeficientes, como P-L, E-L, RC e UCR. Eixo y_1 (linha azul), representa o consumo de oxigênio e y_2 representa a derivada segunda do consumo de O_2 e o eixo x marca o tempo em minutos.	48
Figura 8 – Esquemática dos estados respiratórios mitocondrial. Estado 3, na presença de ADP (em concentração saturada); Estado 4, na presença do inibidor da ATPase, oligomicina; Estado desacoplado, induzido por CCCP.	49
Figura 9 – Representação de uma onda eletromagnética, com oscilações no campo elétrico (rosa), E . E no campo magnético (azul), B . A direção de propagação é indicada na figura. O comprimento de onda, λ é definido como sendo a distância entre duas cristas do campo elétrico.	50
Figura 10 – Espectro eletromagnético. Desde ondas mais energéticas, medidas em eV, como raios X até as menos energéticas como ondas de rádio, apresentado à direita. A ordem de grandeza do comprimento de onda é apresentado à esquerda.	51
Figura 11 – Desenho esquemático do protocolo de isolamento de mitocôndrias de fígado de camundongo. O fígado é rapidamente retirado do animal, pesado e levado para o meio I em baixa temperatura, após a homogeneização o material é levado para a sequência de centrifugação descrita. Ao final são obtidos cerca de 100 μl de amostra fresca.	58
Figura 12 – Esquemática da abordagem experimental adotada neste estudo. Os experimentos são realizados sempre com uma amostra tratada (irradiada) e outra controle (não irradiada). Imediatamente depois da irradiação as amostras são levadas para experimentos de respiração e inchamento mitocondrial.	60
Figura 13 – Desenho esquemático irradiador XRAD 225 X-ray. A amostra é disposta em uma placa petri que por sua vez é centralizada abaixo da passagem dos raios X. O feixe produzido é homogêneo dentro do raio de 90 cm. No painel de controle é possível programar a dose absorvida (Gy).	61

- Figura 14 – Desenho esquemático da cabine de ultravioleta (UV). A amostra é disposta em uma cubeta de quartzo, à uma distância, d . O circuito é fechado apenas quando o núcleo composto pela lâmpada e a cubeta de quartzo é encaixado na cabine. O acionamento da lâmpada é realizado, manualmente, através do interruptor. A foto do aparato pode ser vista na Figura 45A, apêndice. 63
- Figura 15 – Desenho esquemático do forno micro-ondas utilizado. A amostra é disposta em uma cubeta de vidro (5 ml) no centro do prato giratório, de raio $R = 12,5$ cm. No painel à direita o tempo de exposição e a potência podem ser ajustados. 64
- Figura 16 – Desenho esquemático do espectrofotômetro, *Thermo Scientific Multiskan GO Microplate*. As amostras são dispostas em uma placa de 96 poços. 65
- Figura 17 – Estados respiratórios em função da dose (Gy) em meio de reação irradiado sem substratos. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) E3, na presença de ADP. C) E4, na presença de oligomicina. D) ED induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. * valores significativos com $p < 0,05$ 69
- Figura 18 – Estados respiratórios em função da dose (Gy) em meio de reação irradiado com substratos, glutamato e malato. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) E3, na presença de ADP. C) E4, na presença de oligomicina. D) ED induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. * valores significativos com $p < 0,05$ 70
- Figura 19 – Estados respiratórios em função da dose (Gy) para mitocôndrias isoladas de fígados irradiados. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. * valores significativos com $p < 0,05$ 72
- Figura 20 – A) controle de eficiência (P-L), indica menor limitação na capacidade de fosforilação oxidativa do sistema pela CTE quando acoplada à ATPase, para as doses 0,25, 0,50 e 10,00 Gy. B) controle de desacoplamento (UCR), menor dissipação de energia para as duas menores doses. Quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E3, E4 e ED. * valores significativos com $p < 0,05$ 73

- Figura 21 – Dados de inchamento mitocondrial. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca²⁺ (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca²⁺ (linha tracejada laranja): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle irradiado (linha tracejada azul): mitocôndria irradiada com ou sem CsA na ausência de cálcio; controle irradiado (linha tracejada cinza): mitocôndria irradiada com CsA na presença de cálcio (100 μM). 75
- Figura 22 – Controle respiratório e estados respiratórios em função da dose (Gy) para mitocôndrias isoladas. Os dados foram obtidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) E3 na presença de ADP. C) E4 na presença de oligomicina. D) ED induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. * valores significativos com $p < 0,05$ 77
- Figura 23 – A) eficiência de acoplamento (E-L), indica maior preservação do acoplamento da transferência de elétrons para a fosforilação de ADP, B) controle de desacoplamento (UCR), aponta menor dissipação de energia. Quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E4 e ED. * valores significativos com $p < 0,05$ 79
- Figura 24 – Dados de inchamento mitocondrial. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca²⁺ (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca²⁺ (linha tracejada laranja): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle irradiado (linha tracejada azul): mitocôndria irradiada com ou sem CsA na ausência de cálcio; controle irradiado (linha tracejada verde militar): mitocôndria irradiada com CsA na presença de cálcio. (100 μM) 80
- Figura 25 – Estados respiratórios em função da dose (mW/cm^2) para mitocôndrias isoladas (não irradiadas) em meio de reação controle e irradiado. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 2 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. 81

- Figura 26 – Estados respiratórios em função da dose (mW/cm^2) para mitocôndrias isoladas em meio de reação. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $pmol\ s^{-1}ml^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. *valores significativos com $p<0,05$; **valores significativos com $p<0,001$ 83
- Figura 27 – A) eficiência de acoplamento (E-L), indica perda da preservação de acoplamento da transferência de elétrons para a fosforilação de ADP; B) controle de eficiência (P-L), indica limitação do sistema de fosforilação oxidativa; C) controle de desacoplamento (UCR), indica falhas no acoplamento mitocondrial, quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E3, E4 e ED. *valores significativos com $p<0,05$; **valores significativos com $p<0,001$ 84
- Figura 28 – Ajustes para CR e ED normalizados, irradiado/controle. A) Controle respiratório normalizado apresenta decaimento de $-0,23\pm 0,03$. B) O estado desacoplado normalizado apresenta decaimento de $-0,22\pm 0,03$. Os ajustes apresentam R^2 (fator de qualidade de ajuste) de 0,97 e 0,99 respectivamente para A e B. 85
- Figura 29 – Dados de inchamento mitocondrial. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca^{2+} (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca^{2+} (linha tracejada laranja): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle irradiado (linha tracejada azul): mitocôndria irradiada com ou sem CsA na ausência de cálcio; controle irradiado (linha tracejada verde água): mitocôndria irradiada com CsA na presença de cálcio. ($100\ \mu M$) 86
- Figura 30 – Estados respiratórios em função da dose (mW/cm^2) para mitocôndrias isoladas em meio de reação. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $pmol\ s^{-1}ml^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Não foram identificadas alterações estatisticamente significativas em nenhuma dose aplicada. Fonte: Elaborada pela autora. 87

- Figura 31 – Estados respiratórios em função da dose (kJ/g) para mitocôndrias isoladas em meio de reação. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. *valores significativos com $p < 0,05$ 89
- Figura 32 – A) eficiência de acoplamento (E-L), indica perda da preservação de acoplamento da transferência de elétrons para a fosforilação de ADP; B) controle de eficiência (P-L), indica limitação do sistema de fosforilação oxidativa; C) controle de desacoplamento (UCR), indica falhas no acoplamento mitocondrial, quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E3, E4 e ED. *valores significativos com $p < 0,05$; **valores significativos com $p < 0,001$ 91
- Figura 33 – Ajustes para CR e ED normalizados, irradiado/controle. A) Controle respiratório normalizado apresenta decaimento, aproximadamente linear, com taxa de $-6,3 \pm 0,6$. B) Estado desacoplado apresenta decaimento, aproximadamente linear, de $-6,5 \pm 0,9$. O ajuste apresenta R^2 (fator de qualidade de ajuste) de 0,98 e 0,95. 92
- Figura 34 – A) Dados de inchamento mitocondrial, em unidades arbitrárias. Para cada temperatura pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca^{2+} (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca^{2+} (linha tracejada laranja): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle irradiado (linha tracejada azul): mitocôndria irradiada com ou sem CsA na ausência de cálcio; controle irradiado (linha tracejada cinza): mitocôndria irradiada com CsA na presença de cálcio ($100 \mu\text{M}$). $d_1=0,056$; $d_2= 0,085$, $d_3=0,113$ e $d_4=0,141$ kJ/g 93
- Figura 35 – Estados respiratórios em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para mitocôndrias isoladas em meio de reação. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. *valores significativos com $p < 0,05$ 95

Figura 36 – Ajustes para CR, E3 e E4 normalizados, irradiado/controle. A) Controle respiratório normalizado apresenta decaimento exponencial. B) Estado 3 apresenta comportamento de descimento e estagnação, ajustado por uma exponencial de crescimento. C) Estado 4 apresenta comportamento de crescimento e seguido de queda, ajustado por polinômio de segundo grau. Os ajustes apresentam R ² (fator de qualidade de ajuste) de 0,94, 0,98 e 0,99 respectivamente.	97
Figura 37 – A) eficiência de acoplamento (E-L), indica perda da preservação do acoplamento da transferência de elétrons para a fosforilação de ADP; B) controle de eficiência (P-L), indica possíveis limitações impostas às reações de fosforilação oxidativa, decorrente do sistema de fosforilação; C) controle de desacoplamento (UCR), indica falhas no acoplamento mitocondrial, quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E3, E4 e ED. *valores significativos com p<0,05; **valores significativos com p<0,001.	97
Figura 38 – A) Dados de inchamento mitocondrial, em unidades arbitrárias. Para cada temperatura pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca ²⁺ (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca ²⁺ (linha tracejada vinho): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle tratado (linha tracejada azul): mitocôndria tratada com CsA e Ca ²⁺ (100 μM).	98
Figura 39 – Esquematização da resposta bioenergética mitocondrial (CR, linha vermelha), com relação ao controle (linha tracejada verde) em função da radiação eletromagnética.	101
Figura 40 – Espectros das lâmpadas de UV. A) Espectro lâmpada UV-A, Puritec HNS G5 (Itália) modelo G4T5/OF RG3. B) Espectro lâmpada UV-C, UV-BRAVO modelo (F4T5/BL). Intensidade (uni. arbitrárias) por comprimento de onda (nm). As lâmpadas apresentam picos que se encontram na região do azul, verde, e no infravermelho e vermelho. Os picos de maior intensidade caracterizam as lâmpadas, A) UV-A: 371 nm e B) UV-C: 255 nm.	118
Figura 41 – Dados normalizados em função da dose. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com p<0,05.	120
Figura 42 – Eficiência de acoplamento (E-L) calculado a partir dos dados brutos de ED e E4. O teste <i>One-Way ANOVA</i> foi aplicado para todos os resultados com distribuição normal, e nenhum resultado irradiado apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao respectivo controle.	121

- Figura 43 – Dados normalizados em função da dose. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$. 122
- Figura 44 – Controle de eficiência (P-L) calculado a partir dos dados brutos de E4 e ED. O teste *One-Way ANOVA* foi aplicado para todos os resultados com distribuição normal, e nenhum resultado irradiado apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao respectivo controle. 123
- Figura 45 – Foto do equipamento (irradiador) de ultravioleta. 124
- Figura 46 – Estados respiratórios em função da dose (mW/cm^2) para meio de reação irradiado. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em (pmol/sml). A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Não foram identificadas alterações estatisticamente significativas em nenhuma dose aplicada. 125
- Figura 47 – Valores de absorvância medidos em 255 nm, em cubeta de quartzo (largura de 1 cm) em meio de reação com substratos de CI, o valor absorvido pela cubeta + meio de reação + substratos (0,2 unidades arbitrárias), foi subtraído dos dados apresentados. A amostra apresenta um limite de concentração para a qual a luz, praticamente, não atravessa mais a amostra, em 1 mg/ml, apontado pela seta pontilhada no gráfico, a partir deste ponto quase toda luz incidente é absorvida ou espalhada pela amostra. 126
- Figura 48 – Dados normalizados em função da dose. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$; ** valores significativos com $p < 0,001$ 127
- Figura 49 – Dados normalizados em função da dose. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$; ** valores significativos com $p < 0,001$ 128
- Figura 50 – Dados normalizados em função da temperatura. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$; ** valores significativos com $p < 0,001$ 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplo: protocolo de respiração. G: glutamato, M: malato, Oligo: oligomicina, CCCP: carbonil cianeto P- trifluoro-metoxifenil-hidrazona. CI: complexo I.	47
Tabela 2 – Parâmetros de controles de fluxos adotados no estudo. CR - controle respiratório; UCR - controle de desacoplamento; E-L - eficiência de acoplamento; P-L - controle de eficiência; FOX - fosforilação oxidativa; E3 - estado respiratório 3; E4 - estado respiratório 4; ED - estado desacoplado; CTE - cadeia de transporte de elétrons;	50
Tabela 3 – Relação dose \times temperatura, irradiação com micro-ondas. Temperatura inicial de $25 \pm 0,5$ °C.	89
Tabela 4 – Cálculos de dose de UV, integral dos picos do espectro. Doses adotadas no estudo.	118
Tabela 5 – Cálculos de dose de UV, a partir dos dados do medidor de potência.	119
Tabela 6 – Estimativa para doses de micro-ondas.	120

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Intervalos da radiação eletromagnética, seguido pela da ordem de grandeza da frequência, comprimento de onda e energia do fóton, aplicados para cada intervalo. 52
- Quadro 2 – Resumo de resultados obtidos para as radiações eletromagnéticas utilizadas e os parâmetros de eficiência de acoplamento e controles de eficiência e de-sacoplamento. Desempenho da fosforilação oxidativa, FOX. +/-: apresentou uma dose (1,00 Gy) em que o P-L e UCR é menor quando comparado ao controle. +: maior em relação ao controle. -: menor em relação ao controle. >: maior inchamento quando comparado ao controle. 100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil- CoA	Acetilcoenzima A
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
B	Campo magnético
BSA	Albumina do soro bovino
CAC	Ciclo do Ácido Cítrico
CaCl	Cloreto de cálcio
CTE	Cadeia de Transporte de Elétrons
CI	Complexo I, NADH-desidrogenase
CII	Complexo II, succinato-desidrogenase
CIII	Complexo III, citocromo c-oxidoreductase
CVI	Complexo VI, citocromo c-oxidase
Cito.c	Citocromo c
CCCP	Carbonil cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CEUA-IFSC	Comitê de ética no uso de animais - Instituto de Física de São Carlos
CR	Controle respiratório
CoA	Coenzima A
CoA - SH	Coenzima A com enxofre e hidrogênio
CsA	Ciclosporina A
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
E	Campo elétrico
E°	Potencial de óxido redução
E3	Estado respiratório 3
E4	Estado respiratório 4

ED	Estado respiratório desacoplado
E-L	Eficiência de acoplamento
EGTA	etileno glico – bis(-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F_o	Componente da ATPase, sensível à oligomicina
F_1	Componente da ATPase, proteína periférica de membrana
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo com íons de hidrogênio
FCR	Força Centrífuga Relativa
GTP	Trifosfato de guanosina
Gy	Gray
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
H ₂ O	Molécula de água
K_2HPO_4	Fosfato dipotássico
KCl	Cloreto de potássio
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
O ₂	Gás oxigênio
P.A.	Para análise
P_i	Fosfato inorgânico
Ph	Potencial de hidrogênio
P-L	Controle de eficiência
Q	Coenzima Q

QH_2	Ubiquinol
SAR	Specific absorption rate (razão de absorção específica)
UCR	Controle de desacoplamento
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Complexo proteico da ATPase
β	Complexo proteico da ATPase
γ	Complexo proteico da ATPase
λ	Comprimento de onda
ν	Frequência
$\bullet\text{H}$	Átomo de hidrogênio
H_2	Di-hidrogênio
H_3O^+	Íon de hidrônio
$\bullet\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
$\bullet\text{OH}$	Hidroxila
$\bullet\text{O}_2^-$	Superóxido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	35
1.1	Motivação	35
1.2	Estado da Arte	37
1.3	Organização do trabalho	38
2	ASPECTOS TEÓRICOS	39
2.1	Mitocôndrias	39
2.2	Ciclo do ácido cítrico (CAC)	40
2.3	Cadeia de transporte de elétrons (CTE)	41
2.4	Acoplamento: Cadeia de transporte de elétrons e ATPase	43
2.5	Disfunções mitocondriais	44
2.6	Respirometria de alta resolução	46
2.7	Ondas eletromagnéticas	50
2.7.1	Ação de ondas eletromagnéticas em mitocôndrias	53
2.7.1.1	Raios X	53
2.7.1.2	Ultravioleta	54
2.7.1.3	Micro-ondas	55
2.7.1.4	Temperatura	55
3	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1	Reagentes	57
3.2	Animais	57
3.3	Isolamento de mitocôndrias de fígado	57
3.4	Estimativa da concentração de mitocôndrias	58
3.5	Respirômetro	58
3.6	Desenho experimental	59
3.7	Irradiação com raio X	60
3.7.1	Equipamento	60
3.7.2	Procedimento de irradiação	62
3.8	Irradiação com ultravioleta	62
3.8.1	Aparato experimental	62
3.8.2	Procedimento de irradiação	63
3.9	Irradiação com micro-ondas	64
3.9.1	Aparato experimental	64
3.9.2	Procedimento de irradiação	64
3.9.3	Tratamento térmico	65

3.10	Inchamento mitocondrial	65
3.10.1	Equipamento	65
3.10.2	Procedimento experimental	66
3.11	Análise estatística	66
4	OBJETIVOS	67
4.1	Objetivos gerais	67
4.2	Objetivos específicos	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1	Raios X	69
5.1.1	Resultados - mitocôndrias em meio de reação	69
5.1.2	Discussão - interação do meio de reação com raios X	70
5.1.3	Resultados - mitocôndrias 'fígado'	71
5.1.4	Discussão - mitocôndrias 'fígado'	72
5.1.5	Resultados - inchamento	74
5.1.6	Discussão - inchamento	75
5.1.7	Resultados - mitocôndria isolada 'gota'	76
5.1.8	Discussão - mitocôndria isolada 'gota'	77
5.1.9	Resultados - inchamento	79
5.1.10	Discussão - inchamento	80
5.2	Ultravioleta: efeitos em mitocôndrias isoladas	81
5.2.1	Resultados - interação do meio de reação com a radiação	81
5.2.2	Discussão - interação do meio de reação com a radiação	82
5.2.3	Capacidade de penetração: Mitocôndria - UV-C	82
5.2.4	Resultados - mitocôndrias em meio de reação (UV-C)	82
5.2.5	Discussão - mitocôndrias em meio de reação (UV-C)	83
5.2.6	Resultados - inchamento	85
5.2.7	Discussão - inchamento	86
5.2.8	Resultados - mitocôndrias em meio de reação (UV-A)	87
5.2.9	Discussão - mitocôndrias em meio de reação (UV-A)	88
5.3	Micro-ondas: efeitos em mitocôndrias isoladas	88
5.3.1	Resultados - mitocôndrias em meio de reação	88
5.3.2	Resultados - Micro-ondas	89
5.3.3	Discussão - Micro-ondas	90
5.3.4	Resultado - Inchamento	92
5.3.5	Discussão - Inchamento	93
5.4	Temperatura: efeito em mitocôndrias isoladas	94
5.4.1	Resultados - Temperatura	94
5.4.2	Discussões - Temperatura	95

5.4.3	Resultado - inchamento	97
5.4.4	Discussão - inchamento	99
5.5	Discussão geral	99
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
6.1	Conclusões	103
6.2	Perspectivas	104
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICES	115
	APÊNDICE A – APÊNDICES	117
A.1	Dose: Raio X	117
A.2	Dose: Ultravioleta	117
A.2.1	Irradiância UV: integração da curva	117
A.2.2	Irradiância UV: medidor de potência	118
A.3	Dose: Micro-ondas	119
A.4	Resultados complementares: Raio X - mitocôndrias	120
A.4.1	Raio X - fígado	120
A.4.2	Raio X - 'gota'	122
A.5	Resultados complementares: UV - mitocôndrias	123
A.5.1	Irradiador de Ultravioleta (foto)	123
A.5.2	UV-A em meio de reação	124
A.6	UV-C: Absorbância vs. Concentração de mitocôndria	125
A.6.1	UV-C em meio de reação	127
A.7	Resultados complementares: Micro-ondas - mitocôndrias	127
A.7.1	Resultados complementares: Temperatura - mitocôndrias	128
A.8	Análise estatística	129
A.8.1	Teste de normalidade dos dados: Shapiro - Wilk	129
A.8.2	Teste <i>One-Way ANOVA</i>	130
A.8.3	Teste <i>Mann-Whitney - U</i>	131
A.9	Protocolos	131
	ANEXOS	137
	ANEXO A – AUTORIZAÇÃO - COMITÊ DE ÉTICA	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

Mitocôndrias são organelas, presentes em células eucarióticas, especializadas na produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Além disso, também desempenham importante papel na manutenção das células, como por exemplo na regulação e sinalização de cálcio intracelular. (1) As mitocôndrias podem, ainda, atuar nos mecanismos de morte celular, tanto necrótico quanto apoptótico. (2) São as únicas organelas que possuem DNA próprio, capaz de sintetizar proteínas exclusivas, independentemente do conteúdo genético da célula. Estas características fazem das mitocôndrias, entidades chave no desenvolvimento de novas terapias e na compreensão de doenças degenerativas, como o Alzheimer. (3) A preservação da vida é um equilíbrio entre a estrutura e a energia (4), uma vez que a estrutura é alterada, as funções podem ser direta ou indiretamente afetadas. Com as mitocôndrias não é diferente, a preservação das funções bioenergéticas mitocondriais está intimamente ligada à sua estrutura, circunscrita por duas bicamadas lipídicas de composição distintas. A membrana externa, essencial para a entrada e saída de moléculas importantes como ATP e piruvato, bem como, a existência e manutenção do potencial eletroquímico. A membrana interna cuja estrutura serve de âncora para os complexos proteicos responsáveis pela produção de ATP, também apresenta importante papel no desempenho das funções bioenergéticas da organela. As membranas mitocondriais, cadenciam juntas, a função de regulação de solutos e preservação de um potencial eletroquímico diretamente ligado à produção de energia, que ocorre através da fosforilação oxidativa. Esta ação é de suma importância, pois, alterações ou perda do potencial eletroquímico podem levar à disfunções energéticas, impactando a preservação da unidade celular. As mitocôndrias possuem vários dispositivos de autorregulação, como as proteínas desacopladoras (do inglês, *uncoupling protein*, UCR), transportadores de adenosina difosfato (ADP), denominados translocador de ADP-ATP (do inglês, *Adenine nucleotide translocator*, ANT) que são responsáveis por trazer o ADP do citosol para dentro da matriz mitocondrial. Todos os reguladores mitocondriais, em geral, são responsáveis pela capacidade de adaptação à ambientes de estresse, como alterações de temperatura, concentração de cálcio, entre outros. Deste modo, qualquer dano nessas estruturas proteicas e lipídicas, poderiam levar à perda da capacidade energética, levando a morte celular via mitocondrial. Fatores externos à célula, como temperatura, pressão e fármacos, podem levar à alterações significativas nos estados respiratórios mitocondriais. Inclusive a interação com ondas eletromagnéticas pode levar a desregulação ou alterações nos padrões de atividades energéticas nas mitocôndrias. (5) As ondas eletromagnéticas estão presentes na sociedade moderna em diversas frentes, no que tange a tecnologia e tratamentos clínicos, a radioterapia e fototerapia podem ser destacados.

A radiação no espectro do raio X é amplamente utilizada na medicina, especialmente no diag-

nóstico por imagem e tratamentos contra o câncer (radioterapia), cujo os tratamentos datam desde o século XIX. (6) A radioterapia se tornou, desde seu surgimento (1895) até os dias de hoje, uma opção de tratamento para diferentes tipos de tumores internos e malignos. (7) Esta terapia tem se modernizado ao longo do tempo, e hoje apresenta amplas combinações com outras terapias, como a nanoterapia e radio-fototerapia. (8) Os fatores que levam à morte celular tumoral, ainda apontam para danos irreversíveis do material genético das células, que devido ao alto potencial ionizante da radiação X, ligações químicas do DNA podem ser quebradas. Os danos causados no DNA podem ser irreversíveis o que levaria a apoptose celular. Contudo, com o avanço dos estudos em tratamentos oncológicos, a radio-fototerapia tem oferecido a possibilidade de tratamento de tumores malignos internos com baixas doses de raio X, aliada à nanopartículas fotossensibilizadoras neste intervalo de energia. Neste caso, a morte celular não ocorre, necessariamente, por danos nas fitas de DNA. (9) Os mecanismos de morte celular podem, neste caso, ser múltiplos incluindo danos mitocondriais. Além disso, as mitocôndrias tem sido organelas-alvo de nanopartículas nesta abordagem terapêutica, devido ao seu papel central na manutenção da vida celular. (10) A importância de investigar a ação da radiação X, em mitocôndrias isoladas, em doses empregadas na radio-fototerapia (menores que 1 Gy) e doses, geralmente, aplicadas na radioterapia convencional entre 2 e 10 Gy podem ampliar o entendimento da ação global (no organismo vivo) devido a interação com essa radiação. Além de contribuir para otimização de tratamentos empregados neste espectro da radiação. (11)

No espectro do ultravioleta, geralmente, dividido em três intervalos de comprimento de onda, UV-A (ondas longas), UV-B (ondas médias) e UV-C (ondas curtas), devido aos diferentes efeitos biológicos que cada intervalo causa nos organismos vivos. A radiação ultravioleta é naturalmente proveniente do Sol, mas também é gerada artificialmente com diversas finalidades. As ondas longas de UV são fundamentais para formação de vitamina D em seres humanos. (12) Além de serem utilizadas para o tratamento de doenças de pele, como a urticária (13). Enquanto que as ondas curtas de ultravioleta são amplamente utilizadas na descontaminação de superfícies, alimentos e água. (14) Os mecanismos de ação, tanto das ondas longas quanto das ondas curtas de ultravioleta, em organismos vivos ainda não são totalmente compreendidos. A ação do UV em mitocôndrias ainda é pouco explorada, o estudo de Paz *et al.*, indica alterações bioenergéticas de mitocôndrias de queratócitos decorrente da irradiação com UV-B. (15) Apesar dos avanços no reconhecimento dos efeitos do ultravioleta em mitocôndrias, ainda não são encontrados na literatura, estudos sistemáticos do comportamento dos estados respiratórios de mitocôndrias isoladas irradiadas por UV. Assim, para que novas terapias com UV possam ser otimizadas no futuro, é necessário estabelecer possíveis alterações na bioenergética mitocondrial.

As micro-ondas, radiação eletromagnética amplamente empregada nos meios de comunicação modernos, também possuem aplicações na medicina. A terapia de ablação é empregada em tratamentos de tumores sólidos e internos. (16) Com grande potencial de tratamento de tumores hepáticos e baixos riscos e danos para a saúde do paciente, a terapia por ablação, no micro-ondas, é eficiente e tem sido otimizada. (17) Os principais mecanismos apontados para a morte celular é

a elevação da temperatura da área tratada, contudo sabe-se que o sucesso do tratamento não é resultado exclusivo da variação térmica criada pelas micro-ondas. (16, 18) O estudo publicado por Dutton *et al.* demonstra que as micro-ondas causam alterações na atividade mitocondrial comprometendo sua viabilidade. (19) E apesar de avanços nos estudos desta área, pouco se sabe acerca do seu impacto na respiração mitocondrial devido a irradiação com micro-ondas e dos efeitos térmicos induzidos por essa radiação.

Uma vez que a interação de mitocôndrias isoladas e ondas eletromagnéticas não foi suficientemente explorada na literatura, até o presente momento, principalmente a interação com radiações no espectro do raio X, ultravioleta e micro-ondas. A investigação sistemática deste tópico, pode ampliar o conhecimento acerca das capacidades de adaptação e regulação em vista de efeitos causados por esses agentes. Deste modo, um estudo sistemático acerca do comportamento dos estados respiratórios mitocondrial, devido à interação de diferentes espectros do comprimento de onda, foi desenhado. O isolamento de mitocôndrias de suas respectivas células de origem é amplamente empregado em experimentos *in vitro*. O fígado é um dos tecidos com maior número de mitocôndrias, o que permite uma maior reprodução experimental. Além de ser um órgão de fácil extração de mitocôndrias frescas com alta atividade bioenergética, o que garante a reprodutibilidade das medidas.

1.2 Estado da Arte

Em estudos dedicados à interação de mitocôndrias isoladas e ondas eletromagnéticas, observa-se que no espectro da radiação X, realizados desde meados da década de 1960, são quase sempre voltados à danos e alterações no DNA mitocondrial, devido ao potencial ionizante desta radiação. (20, 21) Porém, com o desenvolvimento de nanopartículas radiosensibilizadoras à radiação X, e novos equipamentos para medir a respiração celular (11, 22), os estudos acerca dos efeitos bioenergéticos tem se tornado mais frequentes (23), sendo geralmente, submetidos a irradiação *in vivo*. Após 1 à 60 dias da irradiação a atividade mitocondrial é medida. Mas, estudos realizados *in vitro* imediatamente após a irradiação, ainda são menos explorados na literatura. Outro fator importante, se dá na condição de irradiação das mitocôndrias (ex. em tecido vivo, ou isoladas), que pode mudar, significativamente, o resultado da alteração bioenergética.

No espectro da radiação no ultravioleta (UV), os efeitos no material genético das mitocôndrias (24) também são bastante explorados. Enquanto que estudos relacionados aos efeitos bioenergéticos mitocondriais (25) são mais abundantes para ondas longas de UV (entre 300-370 nm) e comumente exploram a produção de espécies reativas de oxigênio como indicador de preservação mitocondrial, especialmente para células epiteliais. Em geral, a condição de irradiação se dá em cultura celular e conseqüentemente as interações das ondas de UV com a organela são diluídas pelos demais componentes da célula, e devem combinar fatores extracelulares com as respostas mitocondriais.

Menos frequentes na literatura científica, estão os efeitos relacionados a irradiação no espectro das micro-ondas em mitocôndrias isoladas. Parte disto ocorre pelas dificuldades em caracterizar os aparatos experimentais, em geral, são adaptações e reutilização de equipamentos que possuem outras finalidades. (26–28) A importância de estudos dos efeitos de radiação no micro-ondas, em mitocôndrias, podem colaborar para um melhor entendimento de novas terapias médicas neste espectro eletromagnético, como ablação por micro-ondas, e seus potenciais de aplicação. (29) O estudo de DUTTON, *et al.* aplicou doses entre 10 - 100 mW/g de micro-ondas com frequência de 2,45 GHz, e sugere alterações da viabilidade mitocondrial mesmo em baixas doses.(30)

Assim, o presente estudo tem como interesse principal avaliar quantitativamente alterações na bioenergética mitocondrial acerca dos estados respiratórios e também da preservação ou alterações provocadas nas membranas mitocondriais pelas radiações acima citadas. Para isso, um estudo sistemático foi desenhado a fim de acumular dados dos estados respiratórios, a partir de amostras frescas de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo. As medidas foram realizadas em oxígrafo de alta resolução, em paralelo a experimentos de absorção com cálcio, que podem indicar alterações na membrana mitocondrial interna. A análise do estado respiratório 3, na presença de ADP, indicador de fosforilação oxidativa; do estado respiratório 4, na presença de oligomicina, indicador de vazamento de prótons (preservação da membrana interna); e do estado desacoplado induzido por CCCP, indicador da velocidade máxima da atividade da cadeia de transporte de elétrons. Esses parâmetros podem oferecer informações acerca da eficiência de fosforilação oxidativa, controle de eficiência e controle de desacoplamento, sempre em relação ao controle (população de mitocôndria não irradiada). Portanto, combinando informações dos estados respiratórios e da preservação ou disfunção da membrana interna mitocondrial é possível construir um panorama dos alvos das radiações eletromagnéticas nesta organela.

1.3 Organização do trabalho

O **Capítulo 2** é dedicado à apresentação ao tema, bem como aos fundamentos teóricos básicos para o desenvolvimento deste estudo. São discutidos os principais componentes mitocondriais, bem como, disfunções das atividades bioenergéticas e alterações estruturais das mitocôndrias. Também é introduzida a abordagem experimental da respirometria e sua relevância nos estudos de mitocôndrias.

O **Capítulo 3** é dedicado à apresentação das condições experimentais de irradiação, e rotina de experimentos de respiração e inchamento mitocondrial, adotados neste estudo.

O **Capítulo 4** é dedicado à apresentação dos resultados obtidos neste estudo, seguidos das respectivas discussões para cada uma das radiações aqui utilizadas e seus principais efeitos nas mitocôndrias isoladas.

O **Capítulo 5** é dedicado à apresentação das conclusões que o estudo propiciou, além das perspectivas de estudos futuros nesta área.

2 ASPECTOS TEÓRICOS

2.1 Mitocôndrias

Mitocôndrias são organelas intracelulares responsáveis pela maior parte da produção energética das células eucarióticas, na forma de adenosina trifosfato, ATP. (31) São estruturas complexas de tamanho e forma variados, em média possuem 1 μm de comprimento, DNA próprio oriundo exclusivamente do conteúdo genético materno. Estas organelas consomem cerca de 90% do oxigênio celular e produzem mais de 80% da energia necessária para manter a vida metabólica das células. (32) Apresentam duas membranas lipídicas: a membrana externa (ME), com composição e a membrana interna (MI), formando invaginações para aumentar a superfície, denominadas cristas, Figura 1, onde se concentram os complexos proteicos da cadeia de transporte de elétrons e a ATPase.

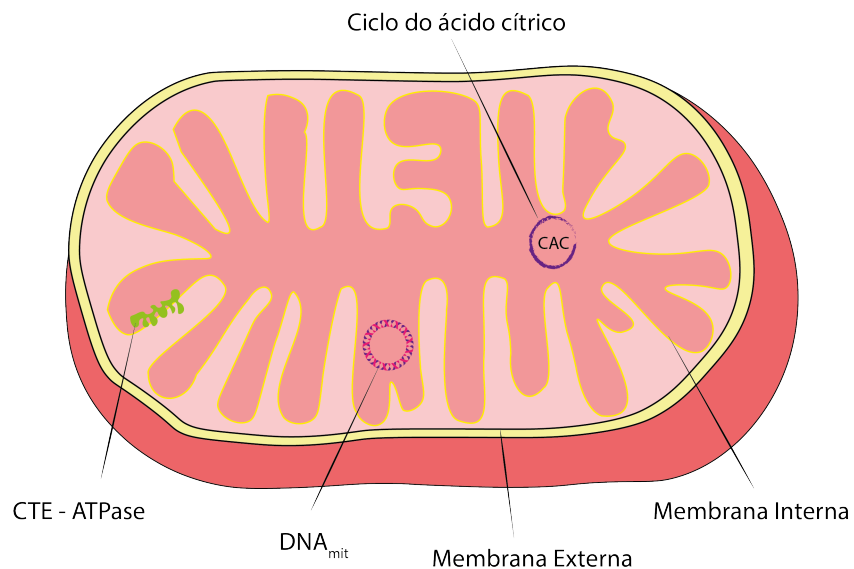


Figura 1 – As mitocôndrias possuem dupla membrana lipídica, interna e externa. O DNA circular mitocondrial, o ciclo do ácido cítrico (CAC) e a cadeia de respiração são encontrados dentro da matriz mitocondrial, região delimitada pela membrana interna.

Fonte: Elaborada pela autora.

As bicamadas lipídicas mitocondriais são diferentes em forma, estrutura e composição, criando um ambiente específico para o melhor funcionamento das enzimas e proteínas que as compõe. Enquanto que em células de mamífero a ME mitocondrial é rica especialmente em fosfatidilcolina, e permeável a moléculas como ATP e ADP, por outro lado a MI é rica em lipídios cardiolipina, além de mais seletiva e impermeável, especialmente à íons, apresentando menos lipídios e mais conteúdo proteico quando comparada à ME. Além disso, a composição das membranas variam substancialmente dependendo da célula de origem. A preservação de ambas membranas mitocondriais é essencial para garantir o funcionamento regular de suas atividades.

Em caso de danos às membranas (interna ou externa) pode ocorrer desacoplamento das funções mitocondriais, como por exemplo diminuir a produção da ATP sintase devido a perda do potencial eletroquímico (vazamento de prótons). (33) Agentes externos podem causar disfunções de várias ordens nessas organelas, levando à alterações das suas capacidades bioenergéticas, algumas disfunções serão abordadas na seção 2.5.

2.2 Ciclo do ácido cítrico (CAC)



Figura 2 – Representação do ciclo do ácido cítrico (CAC) *in vivo*, também denominado Ciclo de Krebs. A molécula de Acetil-CoA é convertida em citrato que ao ser hidratado assume a forma instável isocitrato, ao perder uma molécula de gás carbônico é convertido alfa-cetoglutarato. A alfa-cetoglutarato ao ser convertida em succinil-CoA tem a formação de NADH. A succinil-CoA é convertida em succinato que por sua vez forma o fumarato, formando uma molécula de $FADH_2$, finalmente obtém-se malato que é convertido em oxaloacetato com a formação de uma molécula de NADH, completando o ciclo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tradicionalmente o CAC é introduzido depois do processo de glicólise (em animais), contudo em estudos *in vitro* de mitocôndrias isoladas não há glicólise, e o CAC é parcialmente

acionado gerando NADH ou $FADH_2$ que vão diretamente para a cadeia de transporte de elétrons. O CAC *in vivo* é apresentado, em nove etapas principais, na Figura 2.

A molécula de piruvato formada fora da mitocôndria, no citosol, entra por um canal específico dentro da matriz mitocondrial. Na matriz o piruvato dá origem a molécula de Acetil-coenzima A que inicia o ciclo, se converte em citrato através da enzima citrato sintase, neste processo água e uma molécula CoA-SH são formadas e liberadas. O citrato é convertido em isocitrato pela aconitase (perde uma molécula de gás carbônico), mas possui uma forma instável a cis-Aconitato (uma molécula de água é requerida). O isocitrato ao perder uma molécula de gás carbônico pela enzima isocitrato desidrogenase é convertido em alfa-cetoglutarato. Que por sua vez se converte em succinil – CoA ao incorporar uma molécula de CoA-SH e liberar gás carbônico pela enzima alfa-cetoglutarato desidrogenase, formando uma molécula de NADH que será oxidada na CTE. Quando mitocôndrias são isoladas e incubadas em solução tampão rica em açúcar e fósforo inorgânico podem ter algumas de suas funções manipuladas. Se moléculas de malato e glutamato (denominado substratos do Complexo I) são adicionadas na incubação mitocondrial, somadas à moléculas de ADP podem agir na CTE através do CI e formar ATP. Neste caso, o malato é convertido em oxaloacetato gerando uma molécula de NADH, que será usada na CTE e o glutamato é convertido em alfa-cetoglutarato. Esses substratos, juntos, irão proporcionar uma maior quantidade de NADH que será oxidado ao longo da CTE. Enquanto que, o ADP adicionado poderá ser transformado em ATP pela ATPase. Pode-se ainda adicionar substratos do Complexo II – succinato-rotenona que por sua vez ocorrem no próprio CII. Isto exemplifica que em modelos de mitocôndrias isoladas (*in vitro*) há uma ampla possibilidade de manipulação da cadeia de transporte de elétrons e da ATPase, sendo possível acoplar ou desacoplar um ou mais elementos da respiração.

2.3 Cadeia de transporte de elétrons (CTE)

Formado por uma sequência de quatro complexos proteicos principais, Figura 3, denominados: complexos de I a IV, sendo Complexo I - NADH desidrogenase, Complexo II - succinato desidrogenase, Complexo III - citocromo bc1 e Complexo IV - citocromo c oxidase. A CTE possui a função de otimizar o uso da energia contida nos elétrons contidos em moléculas de $FADH_2$ e NADH obtidos em grande parte do Ciclo do Ácido Cítrico. A partir do potencial de oxirredução de cada componente da cadeia, os elétrons, que são transferidos de estados com menor potencial (moléculas de $FADH_2$ e NADH) para estados com maior potencial de oxirredução, sendo o O_2 o último receptor de elétrons da cadeia, assim o potencial de óxido redução (E°), afinidade por elétrons medida em volts, permite que a transferência de elétrons ocorra espontaneamente, ou seja, são reações termodinamicamente favoráveis. Os elétrons são transportados por enzimas e complexos proteicos específicos até a redução do oxigênio em água, assim o oxigênio que respiramos é chamado de aceptor final da cadeia de transporte de elétrons. Contudo, pode ocorrer dissipação de energia durante a transferência de elétrons, de modo que

elétrons podem sair da CTE capturados por outras molécula, com maior afinidade. (34)

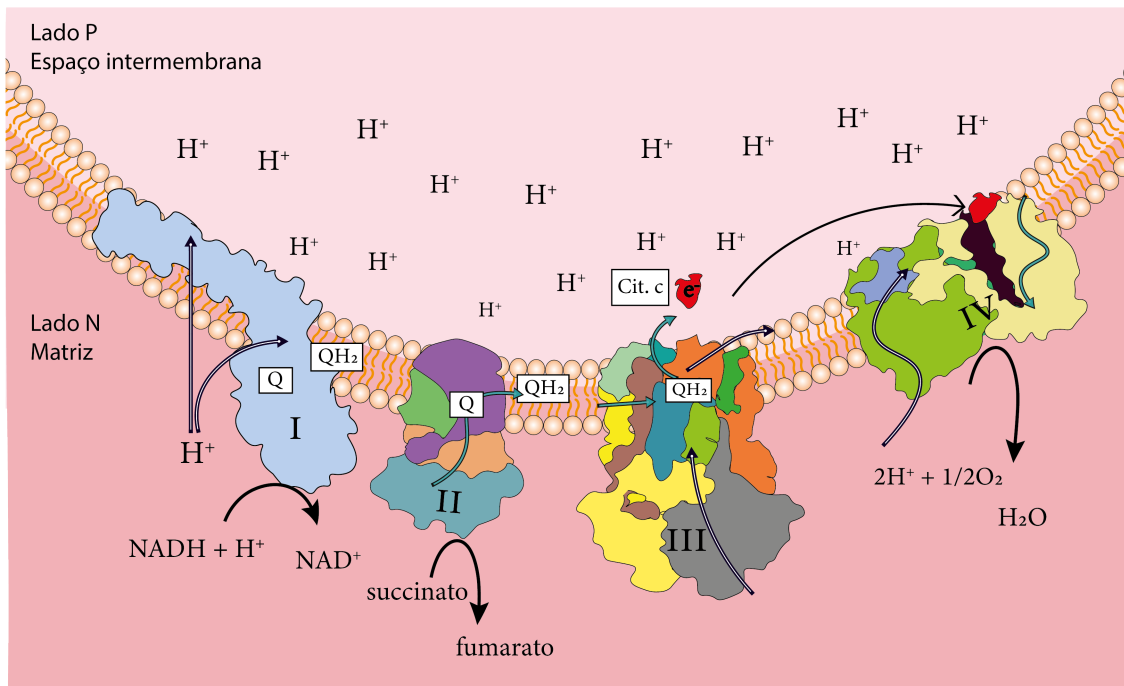


Figura 3 – Representação da cadeia de transporte de elétrons com base na cristalografia disponível no PDB (PDB ID 3M9S CI; PDB ID 1ZOY CII ;PDB ID1BGY CIII; PDB ID 1OCC – CIV). Complexos enumerados de I a IV formam juntos a CTE. Enzimas, coenzimas e proteínas menores como Q, QH_2 e citocromo c também fazem parte da cadeia e assumem papel fundamental no carreamento de elétrons. O CII, também chamado de succinato desidrogenase, ao contrário dos demais complexos não expulsa prótons para o espaço intermembrana e é parte ativa do CAC.

Fonte: Elaborada pela autora.

As moléculas de NADH formadas no CAC são oxidadas pelo Complexo I (CI), que passa o elétron capturado do NADH através de centros de ferro-enxofre contidos dentro de sua estrutura proteica, os elétrons são então transferidos para a Coenzima-Q (também chamada de ubiquinona Q) que na sua forma totalmente reduzida QH_2 (com dois elétrons, chamada de ubiquinol) é capaz de caminhar pela bicamada lipídica mitocondrial até o CIII. O complexo I além de transferir elétrons para a coenzima Q também bombeia prótons para o espaço intermembrana. A ubiquinona é uma coenzima pequena e hidrofóbica carreadora de elétrons e prótons, e por possuir tal capacidade é fundamental no processo de acoplamento do fluxo de elétrons ao movimento dos prótons e está presente tanto no CI quanto nos CII e CIII. Os elétrons capturados no CII são originários das moléculas de $FADH_2$ produzidas da conversão do succinato em fumarato, no CAC. Diferentemente do CI, CIII e CIV o complexo II faz parte do CAC e não bombeia prótons para fora da matriz. A coenzima Q totalmente reduzida é atraída para o CIII e transfere seus elétrons ao citocromo c que caminha no espaço intermembrana, esta enzima é a única unidade da CTE que não está contida na matriz ou dentro da membrana interna, mas sim caminha sobre a

superfície da bicamada lipídica, voltada para o lado P. O citocromo c leva até o CIV os elétrons, que são ligados ao oxigênio e recebem dois átomos de hidrogênio formando água. Em todo esse processo de oxidorredução ocorre o favorecimento termodinâmico, de forma que em cada etapa o elétron caminha para uma enzima/proteína com potencial de oxidação/redução maior do que o anterior, este processo é espontâneo. O lado P, espaço intermembrana, possui pH mais baixo devido à alta concentração de moléculas de H^+ enquanto o lado N, matriz, possui pH mais alto, pois possui poucos cátions de hidrogênio. Durante a passagem de elétrons pela CTE ocorre ainda a formação de radicais livres, como $\bullet H_2O_2$, $\bullet O_2^-$ e $\bullet OH$. Espécies reativas de oxigênio podem causar danos significativos, reagindo com os lipídios de membranas, enzimas, proteínas e ácidos nucleicos. Contudo a célula conta com proteínas e enzimas que atuam na neutralização desses radicais, por exemplo, a superóxido-dismutase que age na neutralização do $\bullet O_2^-$. (34)

2.4 Acoplamento: Cadeia de transporte de elétrons e ATPase

A ATPase, também chamada de ATP – sintetase ou complexo V, é um grande complexo proteico especializado em produção de ATP a partir de ADP e fósforo inorgânico, representada na Figura 4.

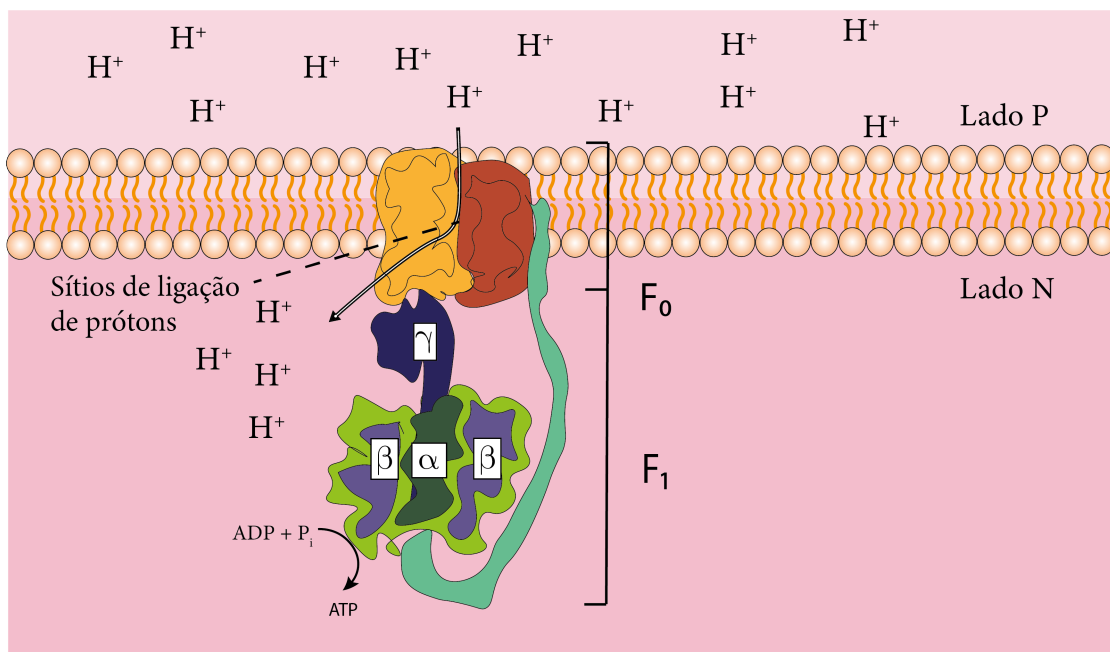


Figura 4 – Ilustração da ATPase com base na cristalografia disponível no PDB (PDB ID 1BMF e PDB ID 1JNV), sua estrutura é subdividida em duas grandes porções: F_1 e F_0 , a primeira é voltada para o lado N da membrana e a segunda está fixada na bicamada lipídica interna da mitocôndria, por ser uma membrana impermeável a íons permite que a passagem de prótons através da ATPase gere trabalho positivo. A força realizada pelos prótons gera um trabalho capaz de girar a subdivisão F_1 que por sua vez converte ADP e fósforo inorgânico em ATP.

Fonte: Elaborada pela autora.

É subdividida em duas partes principais: F_o e F_1 , sendo que a parte F_o fica embebida pela membrana mitocondrial interna, e recebe o subíndice 'o' devido a sua sensibilidade ao antibiótico oligomicina (35), que é capaz de impedir a atividade da ATPase, e conseqüentemente parar a produção de ATP. Enquanto, que a porção F_1 permanece voltada para o espaço matricial (Lado N), e possui a capacidade de girar suas subunidades α e β , de modo que a porção γ atua como eixo, que liga a parte F_o e o rotor da ATPase composto pelas subunidades α e β . (36) O fator de acoplamento entre a CTE e a produção de ATP, pelo complexo proteico ATPase, possui sua origem na teoria quimiosmótica proposta por Peter Mitchell (37), onde a força próton-motriz é a chave para seu entendimento. Dois componentes são fundamentais: 1) a energia potencial química; e 2) energia potencial elétrica. Ambos componentes ocorrem devido a maior concentração de prótons no espaço intermembrana (Lado P) e a maior concentração de elétrons na matriz (Lado N). Caso a CTE não funcione, a ATPase poderá operar em condições propícias (solução tampão com ADP e fósforo inorgânico) até o equilíbrio entre ADP e ATP dentro da matriz. Quando o equilíbrio estiver alcançado mesmo que exista força próton-motriz, não haverá produção de ATP. Com isso, tem-se que em uma mitocôndria intacta tanto a CTE, quanto a força próton-motriz, precisam estar em acordo para o perfeito acoplamento da ATPase. A equação (2.1) mostra a relação entre a energia livre de Gibbs para a reação $\text{ADP} + \text{P}_i = \text{ATP}$ e a força próton motriz:

$$\Delta G_c = 4,3F\Delta p \quad (2.1)$$

onde ΔG_c é a energia livre de Gibbs para a reação de transformação de ADP em ATP, F é a constante de Faraday e Δp é a força próton motriz. A força próton motriz completa dificilmente é determinada, e a maioria dos estudos relatam o componente dominante de Δp , ou seja, o potencial de membrana, $\Delta\Psi$, que geralmente muda em paralelo com Δp . O que isso implica é que o estado de fosforilação de ATP no citoplasma é extremamente sensível a mudanças relativamente pequenas no potencial de membrana ou Δp . (38)

2.5 Disfunções mitocondriais

Efeitos externos podem levar à disfunções mitocondriais diversas, na Figura 5 são enumerados nove possíveis alterações estruturais e/ou bioenergéticas, causadas pela interação com agentes externos (ex. ondas eletromagnéticas, temperatura, fármacos, etc). A maioria dos estudos bioenergéticos em mitocôndrias tem se concentrado na capacidade dessas organelas de gerar ATP através da fosforilação oxidativa e controlar o inchaço mitocondrial. (39) 1) Permeabilidade de poro de transição podem ocorrer devido a efeitos externos como irradiação eletromagnética, temperatura e fármacos. (40) 2) O sistema de transporte de elétrons (Complexos I, II, III e IV) fornece uma série de reações redox e conduz o transporte de prótons da matriz para o espaço intermembranar. (41) 3) A força próton-motriz (FPM) é um gradiente eletroquímico

composto por um gradiente de pH e um componente de potencial elétrico que impulsiona o movimento de prótons através da membrana mitocondrial interna. (42) 4) Devido ao FPM, a ATP sintase pode operar, e ATP é produzido, exportado da mitocôndria através do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT). (43) 5) O vazamento de prótons pode ocorrer devido a diferentes ineficiências que levam à perda de FPM. (44) 6) Experimentalmente é possível induzir o desacoplamento químico mitocondrial, mas também pode ocorrer devido á interferência de agentes externos (45). 7) As mitocôndrias têm seu próprio genoma (DNA circular) que desempenha um papel importante nas funções mitocondriais, pois sintetiza proteínas específicas que não podem ser produzidas pelo DNA celular. (46)

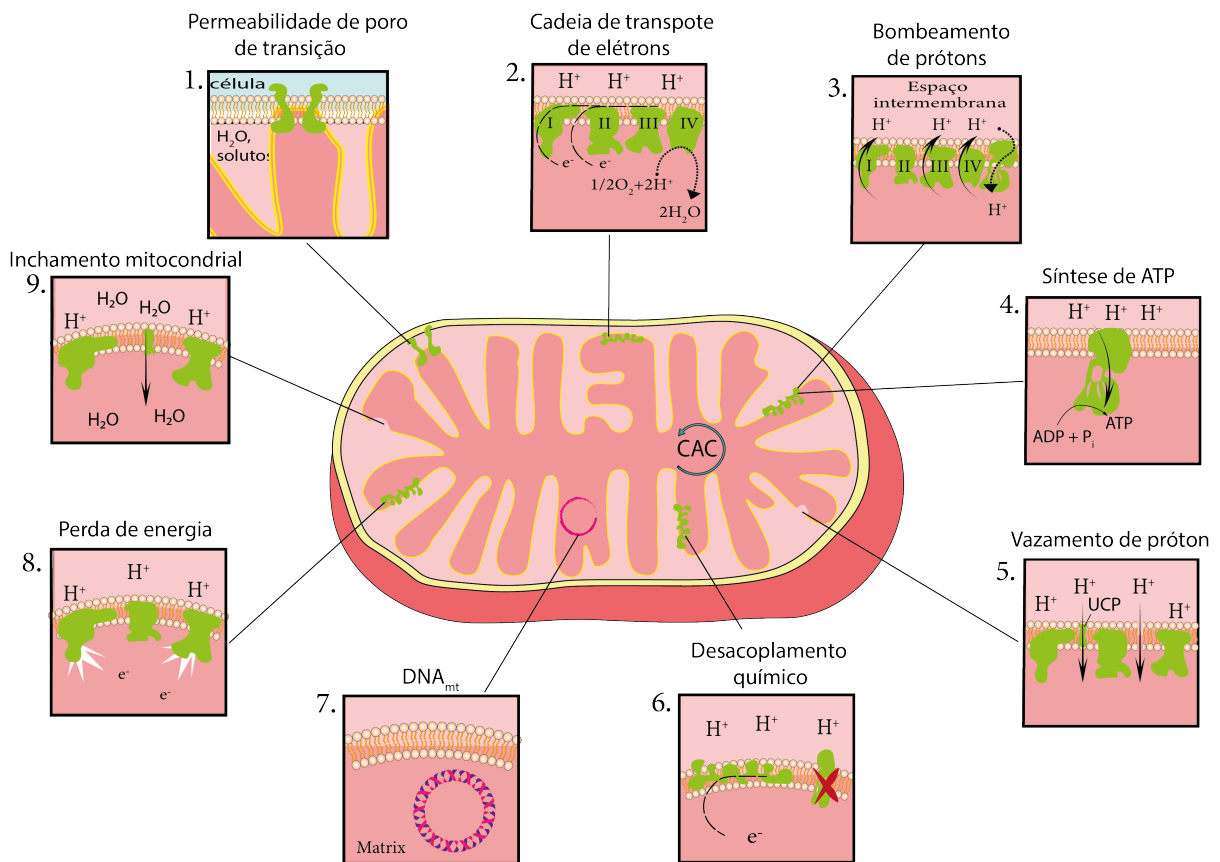


Figura 5 – Alterações dos componentes mitocondriais podem levar à alterações das atividades mitocondriais normais. 1) Permeabilidade de poro de transição. 2) O sistema de transporte de elétrons. 3) A força próton-motriz. 4) Translocador de nucleotídeos de adenina. 5) O vazamento de prótons. 6) Desacoplamento químico mitocondrial. 7) DNA mitocondrial. 8) Dissipação de energia. 9) Entrada de solutos e água na matriz.

Fonte: Elaborada pela autora.

8) Pode ocorrer perda de energia, dissipação, pela CTE devido à perdas de elétrons no processo de carregamento. (47) 9) Solutos e água podem atravessar a matriz, devido a abertura de poros que podem ou não ser específicos, o que levaria a diminuição da FPM. (48)

2.6 Respirometria de alta resolução

Atualmente a abordagem experimental mais recorrente, e aceita na comunidade científica, no estudo de respiração mitocondrial ou celular, é a respirometria de alta resolução. Contudo, desde a década de 1960 estudos de respiração mitocondrial/celular já eram realizados, com eletrodo de oxigênio do tipo Clark, que permitia a medição polarográfica da taxa de consumo de oxigênio por mitocôndrias ou células isoladas em uma câmara selada. Porém, o eletrodo do tipo Clark foi posteriormente substituída por eletrodos mais sensíveis. O funcionamento se baseia em uma membrana de platina exposta e de uma membrana que reduz o oxigênio molecular. O compartimento do eletrodo é isolado da câmara de reação por uma fina membrana de Teflon. Essa membrana é permeável ao oxigênio e permite ao gás reagir com o cátodo, onde é eletroliticamente reduzido. A redução cria uma corrente elétrica, levando à uma diferença de potencial que é medida. Dessa forma a atividade do oxigênio é mensurada. O fluxo de corrente é proporcional à atividade do O_2 no meio de reação. A equação (2.2) mostra a reação de redução do oxigênio:



O equipamento Oroboros O2k fornece medições do consumo de O_2 com maior sensibilidade e precisão, em pico mols, e principalmente minimiza ruídos e interferências externas. O equipamento Oroboros O2k, esquematizado na Figura 6, contém duas câmaras fechadas (por *stoppers*) e herméticas, o que permite medir os estados respiratórios sem superestimar os valores, pois não ocorrem trocas gasosas com o ambiente, também possui um sistema de controle de temperatura nas câmaras. É possível sempre medir uma amostra controle simultaneamente com uma amostra tratada, minimizando variabilidades no processo de manipulação do experimento. (49) Além disso, o equipamento pode ser utilizados para análise de biópsias e homogenatos de tecidos, o que amplia as condições experimentais.

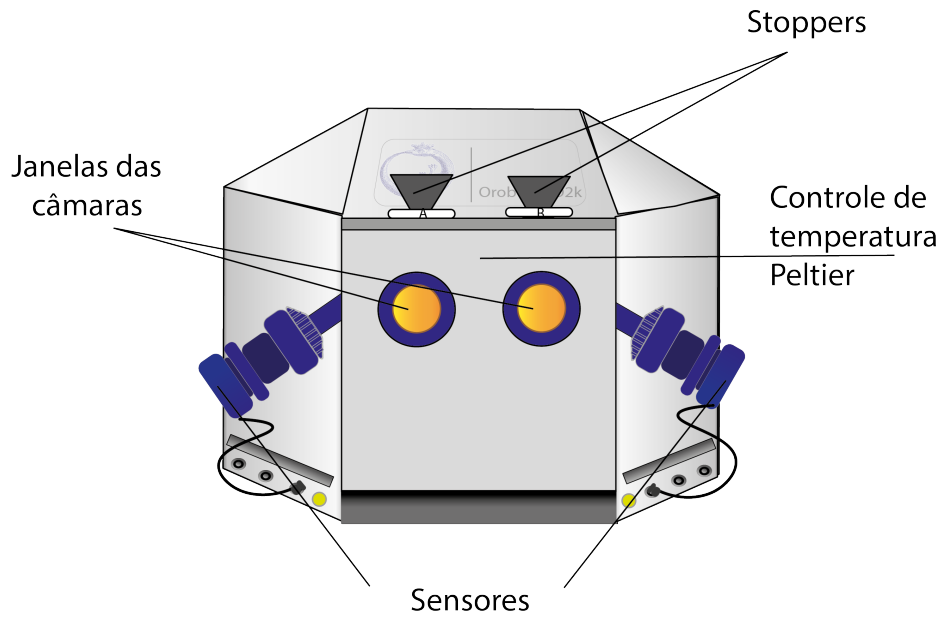


Figura 6 – Desenho esquemático do respirômetro de alta resolução, Oroboros O2k. As duas câmaras, individuais de respiração, permitem a obtenção de dados de amostra irradiada e controle simultaneamente nas mesmas condições experimentais.

Fonte: Elaborada pela autora.

Amostras de mitocôndrias isoladas, podem ser quantitativamente avaliadas e estudadas no Oroboros, a partir de protocolos de respiração. A tabela 1, mostra um exemplo de protocolo experimental para a avaliação bioenergética de amostras de mitocôndrias isoladas. As substâncias seguem na sequência de titulação nas câmaras preenchidas com meio de reação.

Tabela 1 – Exemplo: protocolo de respiração. G: glutamato, M: malato, Oligo: oligomicina, CCCP: carbonil cianeto P- trifluoro-metoxifenil-hidrazona. CI: complexo I.

Protocolo de respiração			
Substância	Função	Parâmetro	Análise
G e M	Substrato do CI	Estado 2	Respiração basal
ADP	Fosforilação	Estado 3	Produção de ATP
Oligo.	Inibidor ATPase	Estado 4	Vazamento de próton
CCCP	Desacoplador	Estado desacoplado	Máx.capacidade de respiração

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado obtido pelo protocolo aplicado no Oroboros, é exemplificado na Figura 7. A partir disso, pode-se observar no eixo y à esquerda a concentração de O_2 em μM (linha azul) e no eixo y à direita a normalização do sinal de concentração de oxigênio pela massa da amostra (linha vermelha) em $pmol/(s * mL)$. Ambos os eixos y estão em função do tempo, eixo x, em minutos. A partir desses valores, medidos pelo equipamento, é possível realizar cálculos que permitam indicar alterações de vários tipos de parâmetros, alguns deles são eficiência de acoplamento, controle de desacoplamento e controle de eficiência. O controle respiratório, CR, (do inglês

respiratory control ratio), é o mais recorrente na literatura, e é responsável por apresentar uma quantificação da viabilidade, e consequentemente da integridade da população de mitocôndrias isoladas, pode ser calculado através da razão dos estados respiratórios 3 (E3) e 4 (E4).

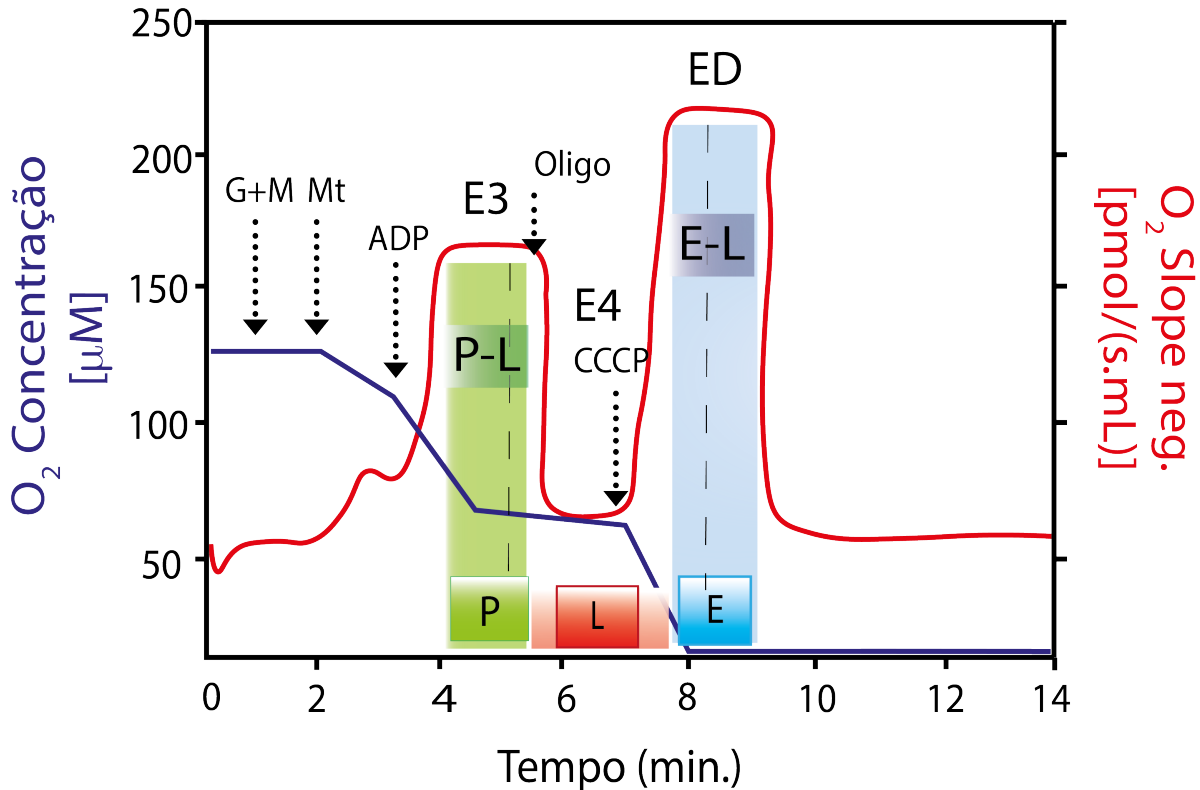


Figura 7 – Representação dos estados respiratórios mitocondrial. Os substratos de CI (glutamato e malato) são adicionados no meio de reação, seguido da titulação de mitocôndria isolada e ADP, até a fosforilação máxima acoplada, P (estado 3 - E3, do inglês *phosphorilation*), onde $ADP + P_i$ são convertidos em moléculas de ATP. Oligomicina é adicionada, bloqueando a fosforilação oxidativa, L (estado 4 - E4, do inglês *leaking*). Finalmente o desacoplador é titulado para obtenção do estado desacoplado, E (estado desacoplado - ED, do inglês *electron transport chain*). A partir dos estados respiratórios é possível calcular diferentes controles e coeficientes, como P-L, E-L, RC e UCR. Eixo y_1 (linha azul), representa o consumo de oxigênio e y_2 representa a derivada segunda do consumo de O_2 e o eixo x marca o tempo em minutos.

Fonte: Elaborada pela autora.

O E3, na presença de ADP, indica o consumo de oxigênio no estado acoplado, onde ocorre a formação de ATP, e, portanto, mede o consumo de oxigênio na fosforilação oxidativa. Enquanto que no E4, na presença de oligomicina (inibidor da ATPase), é o estado onde não ocorre a produção de ATP, mas a CTE opera regularmente. No entanto, no E4 a entrada de prótons para a matriz não ocorre através da ATPase (50, 51), A Figura 8 representa, esquematicamente, os principais eventos dos estados respiratórios.

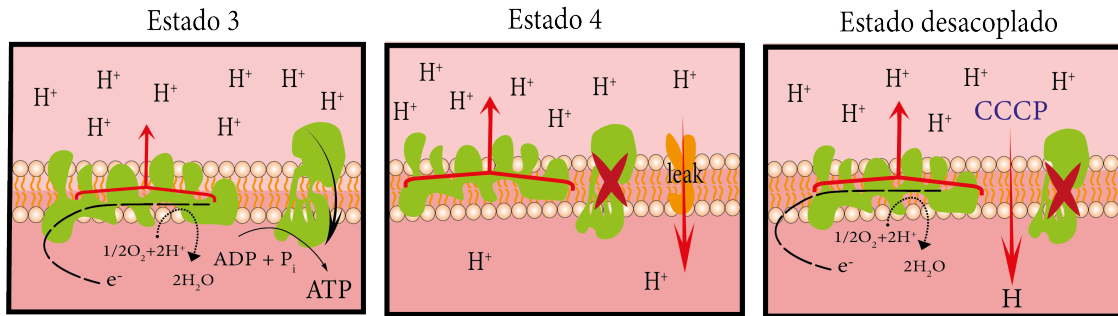


Figura 8 – Esquemática dos estados respiratórios mitocondrial. Estado 3, na presença de ADP (em concentração saturada); Estado 4, na presença do inibidor da ATPase, oligomicina; Estado desacoplado, induzido por CCCP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os parâmetros adotados neste estudos foram calculados a partir dos estados respiratórios, e são: controle de desacoplamento, UCR, (do inglês *uncoupling control ratio*), capaz de indicar perdas de energia resultado de um acoplamento imparcial ou imperfeito (52), de modo que quanto menor o UCR maior é a perda de energia, este parâmetro pode variar de 6 à 20 (52), número adimensional, contudo depende diretamente das condições da amostra e pode ser calculado pela razão (Estado Desacoplado/Estado 4); eficiência de acoplamento (E-L) indica a preservação do acoplamento, ou seja, desde a transferência de elétrons até a fosforilação de ADP, este parâmetro é normalizado e varia de 0 à 1, sendo 1 totalmente acoplado e 0 não acoplado. Pode ser calculado por (Estado Desacoplado - Estado 4)/Estado Desacoplado. O controle de eficiência (P-L) aponta possíveis limitações do sistema de fosforilação oxidativa (como CTE e ATPase) na fosforilação oxidativa, ou seja, na transformação de ADP em ATP, este parâmetro é normalizado e varia de 0 à 1, sendo 1 não limitado e 0 totalmente limitado e pode ser calculado por (Estado 3 - Estado 4)/Estado 3. (53)

A tabela 2 apresenta os controles e seus respectivos cálculos a partir dos estados respiratório, adotados neste trabalho.

Tabela 2 – Parâmetros de controles de fluxos adotados no estudo. CR - controle respiratório; UCR - controle de desacoplamento; E-L - eficiência de acoplamento; P-L - controle de eficiência; FOX - fosforilação oxidativa; E3 - estado respiratório 3; E4 - estado respiratório 4; ED - estado desacoplado; CTE - cadeia de transporte de elétrons;

Parâmetros de controles de fluxos			
Parâmetro	Nome	Cálculo	Análise
CR	Controle respiratório	$E3/E4$	Viabilidade mitocondrial
UCR	Controle desacoplado	$ED/E4$	Dissipação de energia
E-L	Ef. de acoplamento	$(ED-E4)/ED$	Acoplamento-CTE
P-L	Controle de eficiência	$(E3-E4)/E3$	Limitação FOX

Fonte: GNAIGER. (54)

2.7 Ondas eletromagnéticas

Ondas eletromagnéticas são compostas pelos campos: magnético **B** e elétrico **E**, que variam senoidalmente no tempo, Figura 10.

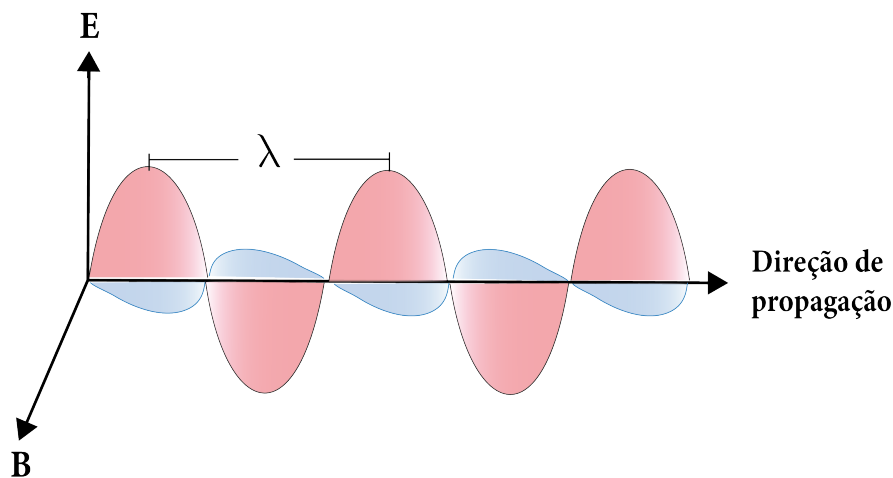


Figura 9 – Representação de uma onda eletromagnética, com oscilações no campo elétrico (rosa), **E**. E no campo magnético (azul), **B**. A direção de propagação é indicada na figura. O comprimento de onda, λ é definido como sendo a distância entre duas cristas do campo elétrico.

Fonte: Elaborada pela autora.

As ondas eletromagnéticas distinguem-se pelo comprimento de onda λ , distância entre duas cristas e pela frequência, quantidade de ciclos por unidade de tempo. Podem ser apresentadas em ordem crescente de comprimento de onda, que vão desde ondas no raios X e raios γ até ondas de rádio (Figura 10). A radiação é energia em transito, e pode ser produzida artificialmente. Uma vez emitida por uma fonte, as ondas geradas podem percorrer o espaço no vácuo ou em meios

materiais. A energia atribuída a um dado espectro da radiação, é geralmente dada em elétron-volt ($1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$).

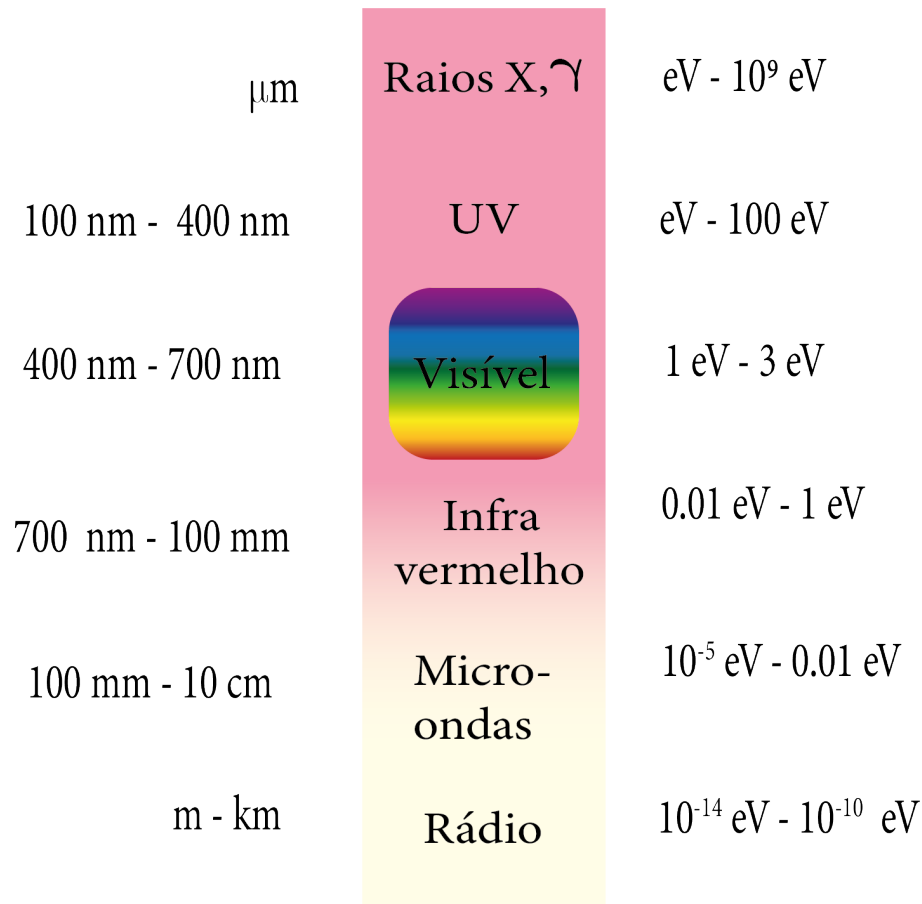


Figura 10 – Espectro eletromagnético. Desde ondas mais energéticas, medidas em eV, como raios X até as menos energéticas como ondas de rádio, apresentado à direita. A ordem de grandeza do comprimento de onda é apresentado à esquerda.

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferentemente de ondas mecânicas, as ondas eletromagnéticas não precisam de meio material para se propagarem. Quando a radiação interage com meios biológicos podem ocorrer diversos tipos de fenômenos físicos, do ponto de vista clássico, como espalhamentos, reflexão, absorção, aquecimento, entre outros, que por outro lado podem levar a danos ao meio biológico, dependendo do material biológico e das características da radiação. (55) As características peculiares das ondas eletromagnéticas geraram, durante vários séculos, grandes discussões no meio científico. Pois, além da sua natureza ondulatória, bem descrita pela física clássica, a radiação também apresenta natureza corpuscular, de modo que a radiação apenas existe em pequenos pacotes de energia, denominados fótons. (56) Este desencontro acerca da natureza da radiação, foi melhor compreendido, a partir de 1905 através da contribuição de diversos cientistas (Marx Planck, Albert Einstein, entre outros), e continua sendo objeto de estudos até os dias atuais. Em suma, as ondas eletromagnéticas também são descritas pela teoria quântica, como ondas de matéria. O espectro eletromagnético mostrado na Figura 10, apresenta o intervalo de

comprimento de onda (λ), e o intervalo de energia em eV. A unidade eV não pertence ao sistema internacional de unidades, mas é amplamente utilizado, especialmente em alguns intervalos do espectro eletromagnético, e possui uma relação de fácil conversão, por exemplo um fóton de 255 nm possui energia de 4,87 eV. (57) Essas energias foram calculadas a partir da equação proposta por Albert Einstein, baseada no conceito de quantização de Max Planck, (58):

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (2.3)$$

Onde,

h é a constante de Planck, ν é frequência, c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda.

Podemos agora, definir a intensidade de radiação eletromagnética monoenergética como o N , que é o número de fótons multiplicado pela energia individual de cada fóton, por unidade de tempo (t) e área (A):

$$I = \frac{E}{At} = \frac{Nh\nu}{At} \quad (2.4)$$

O Quadro 1, a seguir, apresenta algumas aproximações de frequência, comprimento de onda e energia do fóton, para os três principais espectros eletromagnéticos utilizados neste estudo.

Quadro 1 – Intervalos da radiação eletromagnética, seguido pela da ordem de grandeza da frequência, comprimento de onda e energia do fóton, aplicados para cada intervalo.

Radiação eletromagnética	Frequência (Hz)	Comprimento de onda	Energia do fóton (eV)
Raio X	$> 3 \times 10^{15}$	< 100 nm	> 12
UV-C	$3 \times 10^{15} - 1 \times 10^{15}$	100 – 280 nm	12,4 – 4,1
UV-A	$0,9 \times 10^{15} - 0,7 \times 10^{15}$	315 – 400 nm	3,9 – 3,1
Micro-ondas	$300 \times 10^9 - 300 \times 10^6$	1 mm – 1 m	$0,4 \times 10^{-3} - 0,004 \times 10^{-3}$

Fonte: OKUNO (59); YOSHIMURA.(60)

Cada um dos intervalos do espectro eletromagnético apresentado no quadro, possuem diferentes aplicações, como o raio X, amplamente usado na produção de imagens e na investigação de pequenas estruturas. Na medicina, são amplamente empregadas na radioterapia e no radiodiagnóstico; no ultravioleta, geralmente dividida em UV longo (400-315 nm), UV médio (315-280 nm) e UV curto (280-100 nm), para cada intervalo existe uma aplicação desde terapia

para doenças de pele até descontaminação de superfícies e alimentos. (61) As micro-ondas possuem relativamente menor energia, e são empregadas especialmente na comunicação (62), mas nas últimas décadas tem sido aplicadas em terapias clínicas com diferentes finalidades, especialmente na ablação de tumores sólidos internos. (63, 64) As radiações eletromagnéticas podem, dependendo da energia, causar excitações de átomos e moléculas, neste processo pode ocorrer a quebra de ligações químicas. Moléculas ionizadas ou que tiveram ligações químicas quebradas pela radiação, podem realizar novas ligações químicas dando origem à outras moléculas. Assim, esses efeitos podem causar danos biológico, fisiológico ou energético em um organismo vivo. Os efeitos das interações da radiação com organismos vivos podem ocorrer, e se dão principalmente por dois mecanismos: i) o mecanismo direto, onde a radiação provoca alterações diretamente em átomos, moléculas ou estruturas complexas, desta forma, causa efeitos diretamente ligados à interação do componente citado; ii) o mecanismo indireto, ocorre quando a radiação interage com elementos secundários, como água e solutos. Que por sua vez podem levar à formação de moléculas instáveis como radicais livres.

2.7.1 Ação de ondas eletromagnéticas em mitocôndrias

As mitocôndrias são compostas essencialmente de lipídios e proteínas. Caso sofram alterações fundamentais podem acarretar em disfunções mitocondriais, que por sua vez levam à dificuldades para balancear os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas na respiração celular, disfunções significativas podem levar à apoptose celular via mitocondrial. Diferentes agentes externos podem causar alterações na permeabilidade seletiva da membrana interna, tais como fármacos, temperatura e radiações eletromagnéticas. (65) Uma vez que a respiração celular é comprometida, a mitocôndria pode responder através das variações nos estados respiratórios, o que poderia levar ao processo de apoptose celular via mitocondrial. (66) Contudo, a exposição cotidiana à diferentes tipos de radiação eletromagnética, tais como raio X, UV e micro-ondas, é quase inevitável. A seguir são apresentadas algumas aplicações para estas radiações e os principais dados que correlacionam seus efeitos em mitocôndrias. Ainda que grandes avanços tenham ocorrido nesta área, ainda são limitados os estudos que investigam os estados respiratórios mitocondriais imediatamente após a irradiação com raio X, UV ou micro-ondas.

2.7.1.1 Raios X

Os danos mais comumente estudados na literatura no que diz respeito a radiação ionizante e mitocôndrias estão relacionados à danos no DNA mitocondrial, devido a alta energia depositada nas ligações químicas nas fitas de DNA, suficientemente alta para quebrá-las. Contudo, pouco se conhece acerca da interação do raio X com mitocôndrias isoladas. Foram observados outros tipos de danos e efeitos que essas radiações podem desencadear. E, que mesmo baixas doses de raios

X, podem causar danos irreversíveis e substanciais às mitocôndrias cardíacas (67) levando a um menor desempenho da circulação sanguínea e conseqüentemente causando danos generalizados no organismo. O estudo de Cohan *et al.* indica que as mitocôndrias apresentam resistência à radiação X, de modo que doses superiores à 5 Gy em determinadas condições de exposição não afetam significativamente os estados respiratórios das mitocôndrias, mas causam danos na membrana interna levando à entrada de íons na matriz mitocondrial, o que leva à defeitos na produção energética, uma vez que o potencial eletroquímico não está totalmente preservado, podem ainda, causar vazamento de citocromo C levando a apoptose celular. (68, 69) Entretanto, cada órgão ou tecido terá mais ou menos susceptibilidade à radiação X do que outros, em diferentes estudos, nota-se que órgãos como os olhos apresentam maior dano (70, 71), enquanto a pele ou mesmo os ossos demonstram menor susceptibilidade à danos irreversíveis. Para que a radioterapia e o diagnóstico por imagem com raios X possam ser otimizados ou ter ampliados seus mecanismos de ação, é de suma importância conhecer os efeitos desta radiação não apenas no núcleo (principal organela afetada pelos raios X), mas também nas mitocôndrias cujo os danos, eventualmente causados pela radiação, podem levar a apoptose ou necrose celular via mitocondrial.

2.7.1.2 Ultravioleta

A radiação ultravioleta tem sido utilizada como tratamento para algumas doenças crônicas de pele, como psoríase e urticária, devido a sua capacidade de aliviar a inflamação e controlar a doença, estes tratamentos clínicos tem sido bem documentados. (72) Contudo, assim como a radiação X, a exposição à radiação ultravioleta pode ser prejudicial à integridade do DNA (73) e há vários efeitos colaterais indesejáveis que podem variar de eritema à carcinogênese. (61) Por outro lado, a falta de exposição em doses adequadas, pode diminuir a transformação 7-desidrocolesterol em vitamina D a partir da energia captada da radiação no UV-B, que ocorre na pele. (74) O maior número de trabalhos que envolvem a radiação ultravioleta e mitocôndrias, estão relacionados ao seu potencial ionizante, e são dedicados as alterações genéticas. Outros investigam a produção intramitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ERO) para diferentes doses de UV-A. (25) Sabe-se ainda, não apenas a luz no UV é capaz de alterar o funcionamento das mitocôndrias, mas também a luz azul é capaz de causar alterações na bioenergética mitocondrial, levando a maior produção de EROs. (75) Apesar da importância e utilidade terapêutica da luz ultravioleta, também é amplamente empregada em sistemas de desinfecção e esterilização de superfícies e alimentos. (76) A inativação de micro-organismos tem sido um dos métodos mais utilizados pelas indústrias para preservar alimentos (77), contudo pouco ainda se sabe sobre os efeitos do UV em mitocôndrias vegetais, além disso uma possível via de morte de micro-organismos por fotoinativação pode ter origem nos danos irreversíveis causados em suas mitocôndrias, e não apenas por danos nuclear, como indicado geralmente pela literatura. (78)

2.7.1.3 Micro-ondas

A radiação micro-ondas têm um papel importante nas indústrias, como comunicação, processamento de alimentos e tecnologias de segurança. Além disso, as micro-ondas têm sido usadas no desenvolvimento de novos tratamentos médicos como terapia de ablação por micro-ondas e esterilização por efeitos térmicos. (64, 79) As micro-ondas são ondas eletromagnéticas, portanto obedecem às leis do eletromagnetismo, assim como a luz visível, as micro-ondas não precisam de matéria para propagar sua energia e no vácuo assume a velocidade da luz. Além disso, como toda onda eletromagnética, possui propriedades de onda e pode sofrer interferência, reflexão e refração, podendo ainda, interagir com materiais biológicos onde podem ser absorvidos, refletidos ou espalhados (80), o principal efeito, em materiais biológicos, é o aumento da temperatura. Nos últimos anos, a energia neste espectro eletromagnético tem sido explorada com sucesso dentro da medicina para tratar doenças como tumores internos, num método que consiste na inserção de uma pequena sonda através da cavidade torácica do paciente, até o tumor, geralmente um tumor sólido e interno. (81) Uma vez posicionada a sonda, as micro-ondas aquecem e danificam as estruturas celulares, uma vez que as células tumorais têm um teor de água maior do que os tecidos saudáveis, a energia de micro-ondas induz o aquecimento através da interação com moléculas de água polar dentro das células tumorais. A terapia de ablação tem sido usada para tratar tumores de fígado, pulmão e rim. (82, 83) É importante ressaltar que as micro-ondas são classificadas como energia não ionizante (com energia de fóton muito baixa, $0,4 \times 10^{-3}$ eV) que não é suficiente para quebrar as ligações químicas (por exemplo, a energia da ligação para o H-OH é 5,2 eV; H-CH₃ é 4,5 eV e H-NCH₃ é 4,3 eV. (84) Alguns efeitos desta radiação em mitocôndrias de fígado de rato foram documentados por Dutton, em 1984, e indicam perda das capacidades bioenergéticas para doses próximas de 100 mW/g, ou seja perda da viabilidade mitocondrial.(30) Também são reportados resultados para mitocôndrias de cérebro de rato, por Sanders *et al.* em que ocorre a diminuição de moléculas de NADH e ATP. (85) Além disso, ainda é limitado o conhecimento sobre os mecanismos de ação das micro-ondas na bioenergética de mitocôndrias, especialmente na frequência padrão (2,45 GHz) de equipamentos (tanto clínico quanto doméstico) e seus efeitos nos estados respiratórios. A radiação no espectro das micro-ondas, possuem ainda, uma característica fundamental relacionada a sua frequência, capaz de agitar moléculas de um meio elevando sua temperatura. Sendo assim, as micro-ondas não apenas podem induzir danos em mitocôndria devido a radiação, mas também pelo aumento da temperatura causado por ela. Por isso a importância de avaliar os efeitos térmicos paralelamente aos efeitos provocados pelas micro-ondas.

2.7.1.4 Temperatura

É possível aumentar a temperatura de um objeto de diferentes formas, como convecção, condução ou radiação. Fornos micro-ondas fundamentalmente podem promover aquecimento de diversos materiais (que sejam considerados absorventes no espectro de micro-ondas), especi-

almente para líquidos absorventes, a temperatura aumenta principalmente devido à interação das ondas com a matéria. Basicamente podem ocorrer dois processos principais de interação, dependendo das características dos íons e solventes na composição do material: condução iônica e rotação dipolar. Como resultado de ambos os processos, promove-se um movimento molecular no líquido causando o aquecimento do material. De modo que cada molécula (ou alguma molécula do meio sob aquecimento) é responsável pelo efeito de aquecimento devido à sua interação com as micro-ondas, a dissipação de calor é considerada uniforme e localizada, ao contrário do efeito observado no aquecimento convencional. De maneira oposta, a energia no aquecimento convencional (por exemplo, em placas de aquecimento e chamas) é transferida para os materiais por meio de transferência de calor por condução, convecção ou radiação. Neste caso, o calor é transferido da fonte de aquecimento através da parede do recipiente, sendo entregue das paredes para seu conteúdo. (86–88) Arocas *et al.* demonstraram a partir de termografia infravermelha realizada durante os processos de descongelamento por micro-ondas e banho-maria, diferenças nas áreas de aquecimento do material bem como um maior aumento da temperatura no centro da amostra (rica em água) quando aquecidas no forno micro-ondas. Comparativamente, as amostras aquecidas em banho-maria levam mais tempo para aquecer o centro do objeto, além de não atingirem altas temperaturas (no estudo são consideradas altas temperaturas a partir de 60 °C). (88) Com isso, levando tais diferenças em consideração ainda podemos considerar os experimentos propostos neste estudo, onde amostras de mitocôndrias isoladas em meio de reação foram aquecidas em banho-maria até atingirem temperaturas equivalentes aquelas obtidas no experimento com micro-ondas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Sacarose P.A. e cloreto de magnésio P.A. foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, BR), HEPES, EGTA, ADP, glutamato, malato, succinato, rotenona, oligomicina, CCCP e fosfato de potássio dibásico trihidratado e reagente Bradford da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), hidróxido de potássio P.A. e cloreto de potássio da Êxodo Científica (Sumaré, SP, BR).

3.2 Animais

Camundongos fêmeas (25 ± 4 g) da linhagem C57BL/6 entre 3 e 5 meses foram mantidas à 22 ± 2 °C em ciclo claro-escuro de 12h-12h com livre acesso à água filtrada e à ração (Nuvital, Curitiba, PR, BR) no biotério do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantido em gaiolas de plástico para camundongos (ALESCO, SP, BR), com grade metálica e tampa plástica com filtro e serragem de madeira, foram dispostos até 8 camundongos por gaiola. As gaiolas eram dispostas em estantes de armazenamento ventiladas. Os animais permaneceram pelo menos 4 semanas em ambientação antes dos experimentos. O uso de animais neste estudo, bem como o método de eutanásia foram aprovados pelo comitê de ética local (CEUA-IFSC, número do processo: 8604100921).

3.3 Isolamento de mitocôndrias de fígado

Mitocôndrias frescas foram isoladas de fígado de camundongos pela técnica de centrifugação diferencial como descrito em Chweih *et al.*. (89) Brevemente, o fígado é retirado após eutanásia por deslocamento servical e lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES pH 7,2 e 0,5 mM de EGTA (meio I), em baixa temperatura, picado com tesoura e homogeneizado com Potter-Elvehjem. O homogeinato é centrifugado á 800g ($800 \times g =$ Força Centrífuga Relativa, FCR) por 10 minutos, o sobrenadante da primeira centrifugação é transferido para um novo tubo e submetido a 7750g por 10 minutos, desta vez o sobrenadante resultante é descartado e o *pellet* é ressuspenso em novo tubo com 250 mM de sacarose, 5 mM de HEPES pH 7,2 e 0,3 mM de EGTA (meio II), e centrifugado na mesma condição anterior. A temperatura durante as centrifugações é mantida à 4 °C. O *pellet* final resultante é diluído em 100 μ l em solução de sacarose 250 mM e 10 mM de HEPES (meio III) e mantido em gelo. A Figura 11 apresenta esquematicamente o protocolo descrito.

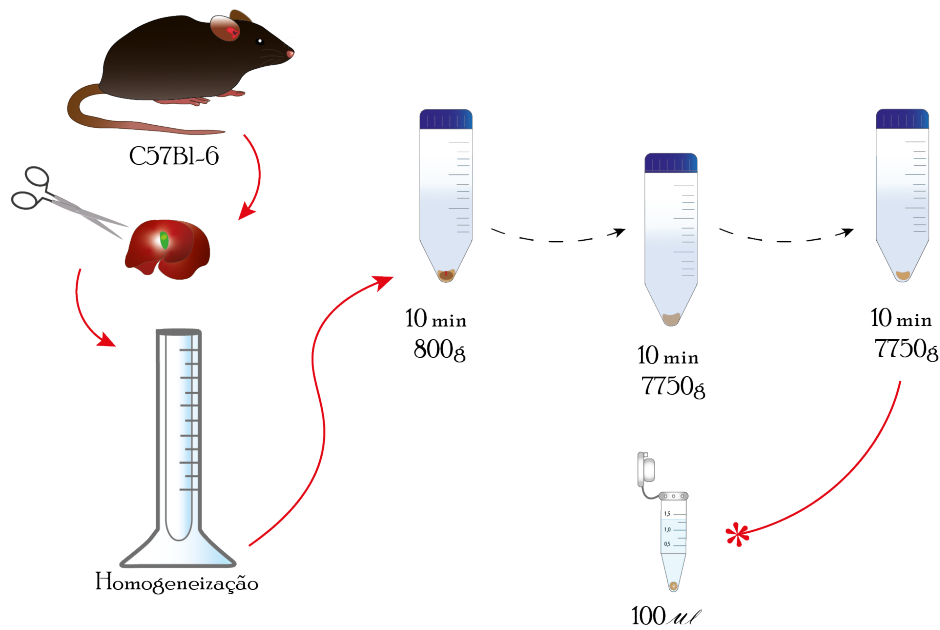


Figura 11 – Desenho esquemático do protocolo de isolamento de mitocôndrias de fígado de camundongo. O fígado é rapidamente retirado do animal, pesado e levado para o meio I em baixa temperatura, após a homogeneização o material é levado para a sequência de centrifugação descrita. Ao final são obtidos cerca de 100 μl de amostra fresca.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Estimativa da concentração de mitocôndrias

A concentração de mitocôndrias isoladas é estimada a partir da concentração de proteína das suspensões mitocondriais pelo método de biureto. (90) Foram obtidas no espectrofotômetro *Thermo Scientific Multiskan GO Microplate*, em temperatura ambiente. Basicamente, neste método a absorbância, em 595 nm, é padronizada com soluções de água deslizada e BSA (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 mg/ml) dispostas em uma placa de 96 poços, no volume de 5 μl , em seguida 250 μl de Bradford são adicionados. A absorbância medida, é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução.

3.5 Respirômetro

Medidas de respiração mitocondrial foram realizadas no respirômetro OROBOROS O2k (Innsbruck, Austria), Figura 6, o sistema Peltier acoplado as câmaras mantém a solução à 37 °C. Os sensores medem a concentração de O_2 (mM) em função do tempo (minutos), os *stoppers* isolam as câmaras do meio externo, não havendo, portanto, troca gasosa. As janelas das câmaras possibilitam a visualização do meio em agitação e a identificação de possíveis bolhas. Em 2 ml

de meio de reação (125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM K_2HPO_4 e 1 mM $MgCl_2$). A adição de substratos de CI, 5 mM glutamato e 2,5 mM malato são titulados no meio de reação. A respiração estimulada com 500 mM de ADP (estado 3 - E3) é inibida com 1 $\mu g/mL$ de oligomicina (estado 4 - E4). Finalmente, 1 $\mu g/mL$ do desacoplador CCCP (carbonil cyanide m-chlorophenyl hydrazone) é titulado. A concentração final de mitocôndria nas câmaras é de 0,5 mg/ml. O controle respiratório (CR) é calculado pela razão entre os estados 3 e 4. As amostras utilizadas em todos os experimentos deste estudo apresentaram CR igual ou superior à 5.

3.6 Desenho experimental

A abordagem experimental adotada neste estudo, visou irradiar amostras de mitocôndrias frescas isoladas. As vantagens de utilizar mitocôndrias isoladas são principalmente a fácil obtenção a partir do fígado (devido à alta concentração de mitocôndrias), e a conveniência de investigar as organelas separadamente da influência celular. (91) Amostras de mitocôndrias frescas são capazes de responderem à controlados estímulos artificiais de forma reprodutível, mimetizando sua atividade fora da célula. Deste modo, é possível investigar de modo específico determinadas atividade bioenergética desempenhada pela organela. Além disso, o modelo animal utilizado, C57BL/6, apresenta grande estabilidade e reprodutibilidade do material genético, ideal para futuros trabalhos de investigação dos possíveis danos ao material genético mitocondrial. (92) Somado a esses fatores, a literatura científica apresenta um grande volume de trabalhos com mitocôndrias frescas isoladas de fígado de camundongo (ou ratos) como ponto de partida para estudos exploratórios. (93) As limitações desta abordagem residem na ausência das contribuições que as células e o organismo vivo como um todo, poderiam apresentar para a atividade mitocondrial. Contudo, para este estudo, amostras de mitocôndrias frescas isoladas são mais convenientes ao objetivos propostos, o que não exclui a complementarização com cultura de células e sistema *in vivo*.

As mitocôndrias foram incubadas em meio de reação com substratos (glutamato e malato). Paralelamente, uma amostra controle oriunda da mesma alíquota de amostra é mantida nas mesmas condições da amostra tratada, contudo não recebe nenhuma dose de radiação eletromagnética. Imediatamente depois são utilizadas no oxígrafo e/ou experimento de inchamento mitocondrial, como esquematiza a Figura 12.

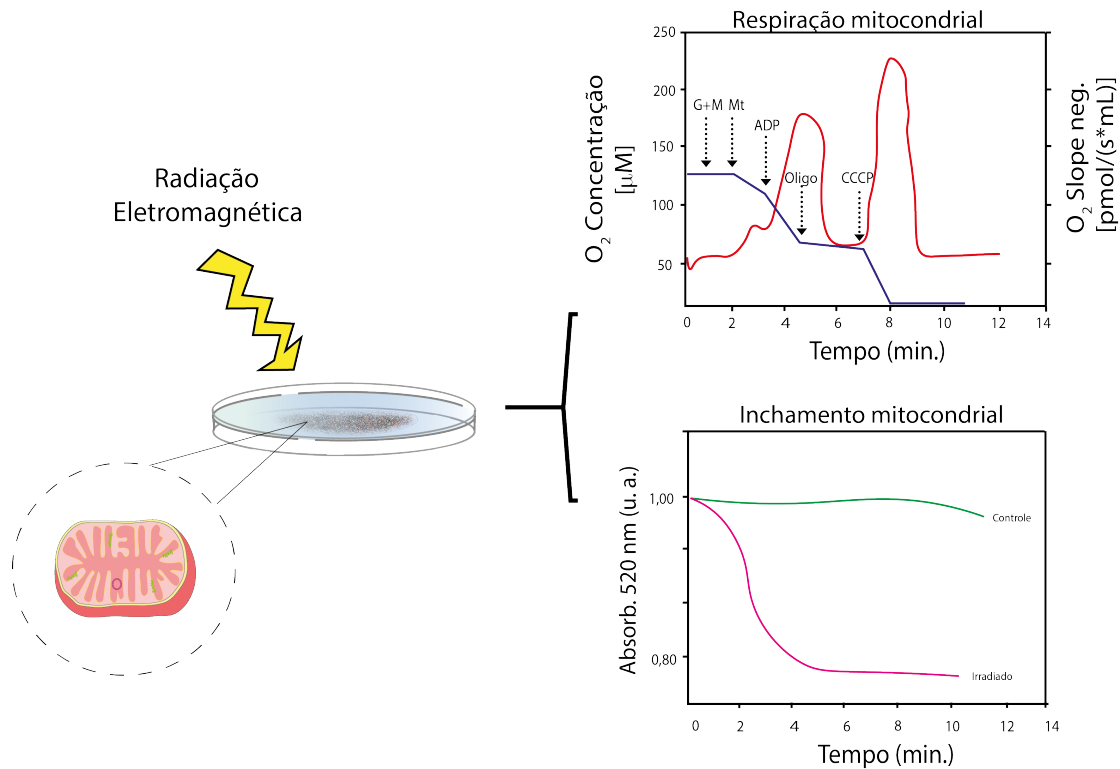


Figura 12 – Esquematização da abordagem experimental adotada neste estudo. Os experimentos são realizados sempre com uma amostra tratada (irradiada) e outra controle (não irradiada). Imediatamente depois da irradiação as amostras são levadas para experimentos de respiração e inchamento mitocondrial.

Fonte: Elaborada pela autora.

Excepcionalmente para os experimentos com radiação X, cuja interação com o meio de reação induziu alterações na respiração mitocondrial, as amostras tratadas não são incubadas em meio de reação para receberem a radiação, mas permanecem concentradas para receber doses de raio X, e imediatamente depois são levadas para experimentos no oxígrafo. Outra condição de irradiação adotada, para este comprimento de onda, é a irradiação de metade do tecido hepático. O órgão é retirado, pesado e imediatamente dividido ao meio, enquanto uma metade é tratada a outra é usada para controle. Tanto o tecido tratado quanto o controle passam pelo protocolo de isolamento separadamente e imediatamente depois são realizados experimentos no oxígrafo e/ou de inchamento mitocondrial.

3.7 Irradiação com raio X

3.7.1 Equipamento

A Figura 13 mostra a esquematização do irradiador *XRAD 225 X-ray* (Precision X-ray Inc., USA). Antes de cada experimento o equipamento é ajustado e calibrado em 225 kV e 13.3

mA, com distância entre o filtro e a amostra de 33 cm.

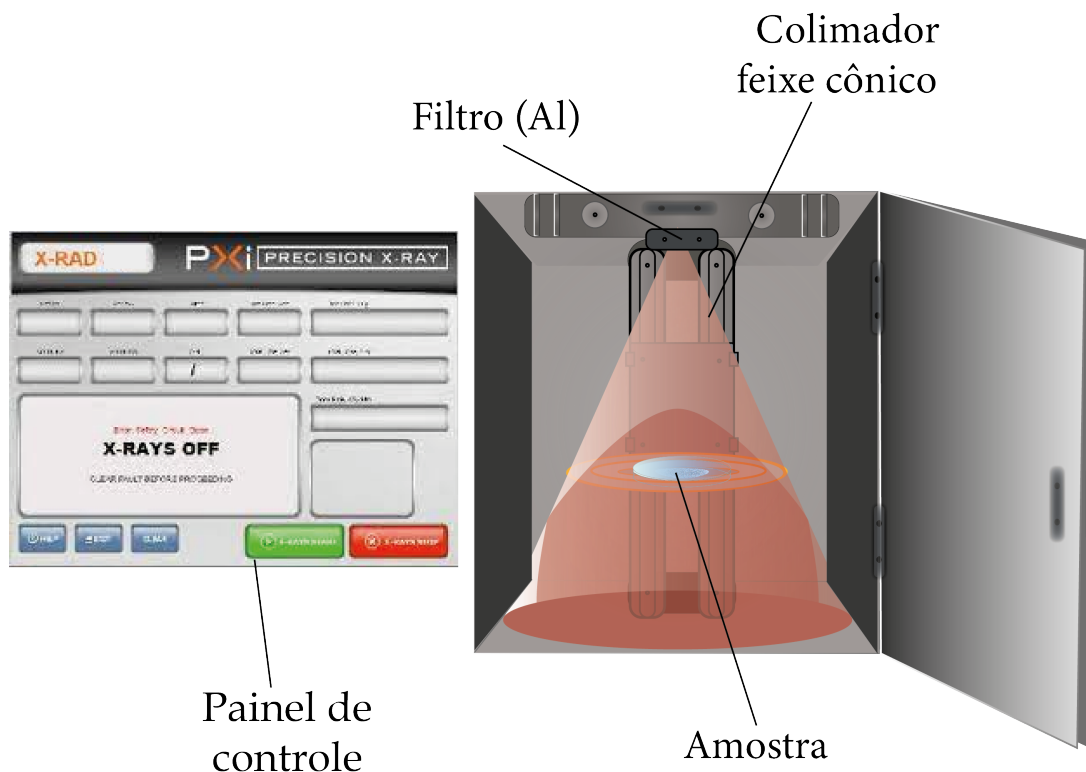


Figura 13 – Desenho esquemático irradiador XRAD 225 X-ray. A amostra é disposta em uma placa petri que por sua vez é centralizada abaixo da passagem dos raios X. O feixe produzido é homogêneo dentro do raio de 90 cm. No painel de controle é possível programar a dose absorvida (Gy).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos foram realizados à uma distância de 33 cm do filtro de alumínio (2 mm) utilizado para barrar a passagem de fótons de baixa energia, numa taxa de dose de 4.0 Gy/min à temperatura ambiente. A fonte do irradiador produz radiação X a partir de um processo, denominado bremsstrahlung, ou freamento. Em resumo, a radiação emitida ocorre devido à elétrons acelerados por uma diferença de potencial, neste caso 225 kV, que colidem com um material denso (metal com número atômico suficientemente alto para não derreter no processo), gerando um espectro contínuo de radiação X. A cada colisão com os átomos ou elétrons do material, o elétron incidente perde uma parte da sua energia emitindo um fóton. Por definição, temos que, o mínimo comprimento de onda gerado neste processo, pode ser calculado por: $\lambda_m = hc/kV$, onde h é a constante de Planck ($4,14 \times 10^{-15}$ eVs), c é a velocidade da luz (8×10^8 m/s) e eV é a energia cinética fornecida ao elétron, neste caso é igual à tensão elétrica, 225 kV. Assim, temos que o comprimento de onda mínimo é de 5,5 pm (picometro, 10^{-12} m) e a máxima energia que o fóton pode assumir nessas condições é de 225 keV. Chen *et al.*, apresenta o espectro (contagem de fóton por energia em eV) calculado a partir do modelo de Monte Carlo para o equipamento XRAD 225 X-ray. (94) A partir do espectro modelado e da equação

(2.1), tem-se que a maior contagem de fótons, com filtro de alumínio, está entre 40-70 keV, e conseqüentemente o intervalo de comprimento de onda mais recorrente está compreendido entre 0,031-0,018 nm (31-18 pm).

3.7.2 Procedimento de irradiação

Dois protocolos de irradiação são utilizados: 1) após retirado o fígado de um animal, metade do órgão é exposto à radiação (1cm x 1cm x 0,2 cm, peso aproximado de 0,5g) e a outra metade é reservada para medidas do respectivo controle (tecido não irradiado) e o isolamento é realizado separadamente; 2) uma alíquota (gota) de mitocôndria isolada é disposta (0,5cm de diâmetro e 0,1 cm de altura) em uma placa Petri para receber a radiação X, logo depois a amostra é incubada na câmara do oxígrafo; A Figura 13 mostra a disposição da amostra dentro da cabine de raio X. As doses selecionadas para este estudo foram 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00 e 10,00 Gy para a condição de irradiação "fígado" e 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00 e 10,00 Gy para a condição "gota". A condição "fígado" não possui dose em 0,10 Gy, pois a dose se encontra no limite de precisão do equipamento e o tecido hepático pode apresentar maior disposição à flutuações na dose entregue (devido a espessura, geometria, etc). As doses selecionadas são comparáveis à doses aplicadas desde exames de imagem por raio X, até radioterapia.

3.8 Irradiação com ultravioleta

3.8.1 Aparato experimental

Lâmpadas de ultravioleta nos comprimentos de onda 371 e 255 nm, respectivamente da Puritec HNS G5 (Itália) modelo G4T5/OF RG3, e UV-BRAVO modelo (F4T5/BL), 4W, - foram utilizadas no experimento. O equipamento, de UV, é composto por uma cápsula cilíndrica de alumínio (cabine de Al), selada por uma tampa onde a lâmpada é acoplada. Por motivos de segurança, a lâmpada apenas é ligada quando posicionada dentro do cilindro, assim fechando o circuito elétrico. Acoplado a essa estrutura, é possível fixar um porta amostra (cubeta de quartzo, 5 ml), 0,8 cm de distância da lâmpada, a Figura 14 apresenta a esquematização do equipamento utilizado.

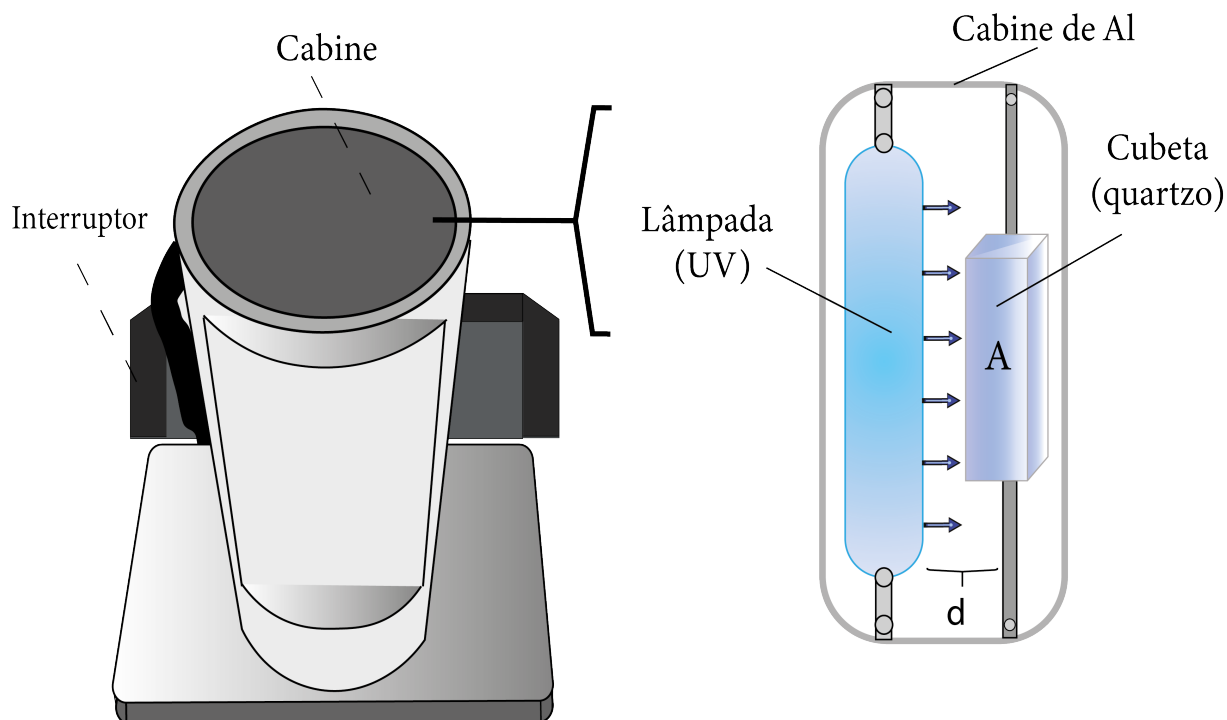


Figura 14 – Desenho esquemático da cabine de ultravioleta (UV). A amostra é disposta em uma cubeta de quartzo, à uma distância, d . O circuito é fechado apenas quando o núcleo composto pela lâmpada e a cubeta de quartzo é encaixado na cabine. O acionamento da lâmpada é realizado, manualmente, através do interruptor. A foto do aparato pode ser vista na Figura 45A, apêndice.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.8.2 Procedimento de irradiação

Para irradiar soluções de mitocôndrias isoladas em meio de reação (com glutamato e malato) dispostas em cubeta de quartzo, à temperatura ambiente e imediatamente depois de irradiadas foram colocadas nas câmaras do oxígrafo. O tempo de exposição da amostra foi estabelecido de acordo com a precisão de aplicação da dose pretendida, assim, como o ligamento e desligamento da lâmpada são realizados manualmente com o auxílio de um cronômetro, o tempo mínimo de exposição deve ser maior que o tempo de reação do operador e de interrupção do circuito da lâmpada, somados, estimou-se 1,5 segundos, deste modo o tempo mínimo de exposição deve ser de 5 segundos para evitar imprecisões maiores. Assim, com a finalidade de diminuir os erros nos tempos de exposição, a mínima dose é àquela cujo tempo de exposição supere o tempo de reação experimental. As irradiâncias das lâmpadas foram calculadas a partir da integral dos espectros medidos (apresentados na Figura 40A, apêndice). A dose foi calculada a partir da equação $Dose(t) = I_R t$, onde I_R é a irradiância (W/cm^2) e t o tempo (s) de exposição, os valores calculados são apresentados na tabela 4A (apêndice).

3.9 Irradiação com micro-ondas

3.9.1 Aparato experimental

Forno micro-ondas Philco (PME22), 20 litros, alimentado por uma tensão nominal de 127 V, foi utilizado para irradiar mitocôndrias isoladas em de meio de reação, à temperatura ambiente. A Figura 15 mostra a esquematização do equipamento. A potência nominal do equipamento é de 1200 W, com eficiência nominal de 53%, foi ajustado para potência total de 10%. O equipamento opera em frequência média padrão de 2450 MHz, resultando em ondas eletromagnéticas de aproximadamente 12 cm. As micro-ondas são produzidas por um magnetron de cavidade, capaz de acelerar elétrons através de um cátodo circundado por um ânodo com ímãs permanentes na estrutura. Neste contexto, os elétrons realizam movimentos oscilatórios e perdem velocidade ao se chocarem contra as paredes do ânodo emitem radiação no intervalo das micro-ondas. (95,96)

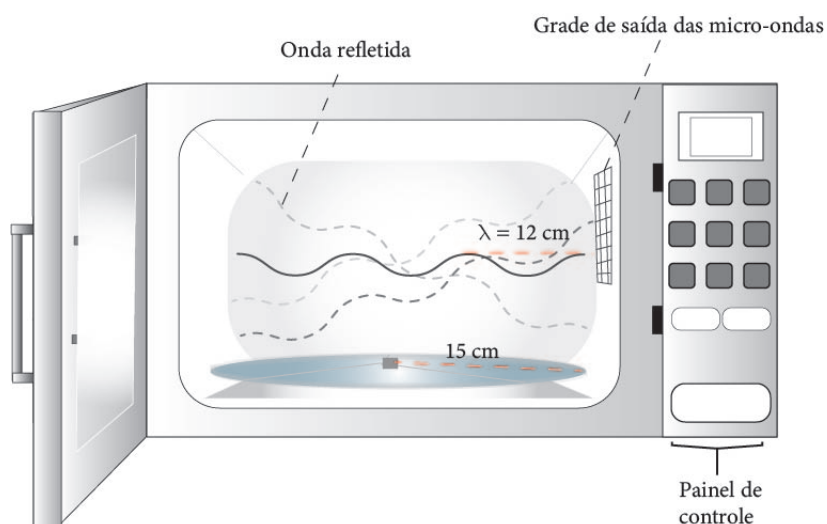


Figura 15 – Desenho esquemático do forno micro-ondas utilizado. A amostra é disposta em uma cubeta de vidro (5 ml) no centro do prato giratório, de raio $R = 12,5$ cm. No painel à direita o tempo de exposição e a potência podem ser ajustados.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.9.2 Procedimento de irradiação

Mitocôndrias isoladas foram incubadas em 2ml meio de reação com substratos (glutamato e malato), e disposto em cubeta de vidro. As doses foram estimadas de acordo com a potência do equipamento, tempo de exposição, e parâmetros de absorção de micro-ondas, já estimados na literatura (97), são apresentadas na tabela A6 (apêndice). A variação de temperatura (T) foi medida com o termômetro Minipa MV-363, resolução de $0,1$ °C.

3.9.3 Tratamento térmico

Devido ao aumento de temperatura inerente à irradiação com micro-ondas utilizada neste estudo, medidas dos estados respiratórios e experimento mitocondrial foram realizados a fim de determinar os efeitos causados apenas pelo tratamento térmico apenas. Muito embora as duas formas de aquecimento sejam distintas, ainda podemos considerar este experimento. Amostras de mitocôndrias isoladas foram incubadas em meio de reação com substratos do CI, em cubeta de vidro. A amostra foi termicamente tratada, nas mesmas temperaturas obtidas na irradiação com micro-ondas, por banho-maria. Imediatamente depois do tratamento térmico, a amostra é disposta em uma das câmaras do oxígrafo, que regula e estabiliza a temperatura do experimento em 37°C.

3.10 Inchamento mitocondrial

3.10.1 Equipamento

Medidas de inchamento mitocondrial foram obtidas no espectrofotômetro *Thermo Scientific Multiskan GO Microplate*, confeccionado com lâmpada *Xenon flash*, o intervalo de comprimento de onda é de 340–850 nm. A Figura 16, mostra a representação esquemática do equipamento e da curva medida em absorbância (unidades arbitrárias) pelo tempo (minutos).

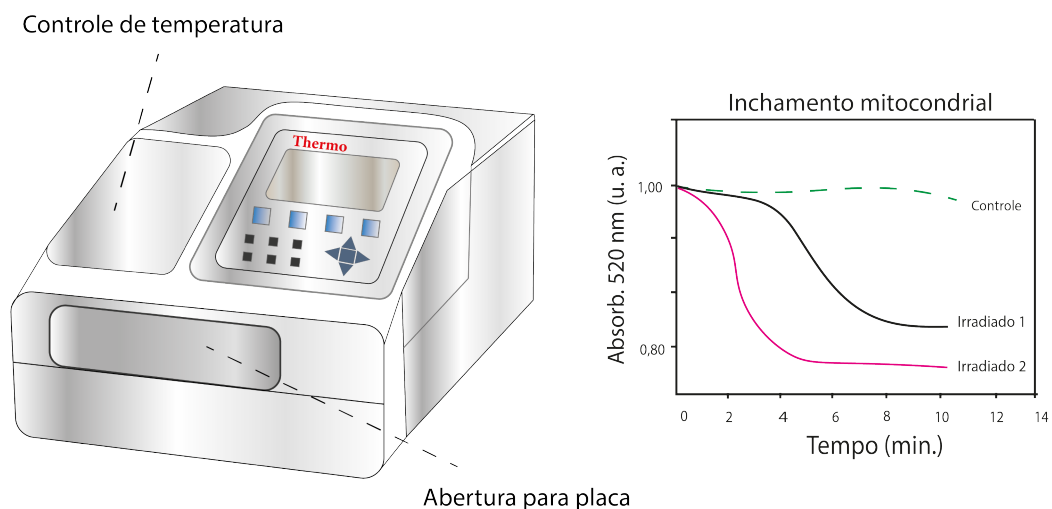


Figura 16 – Desenho esquemático do espectrofotômetro, *Thermo Scientific Multiskan GO Microplate*. As amostras são dispostas em uma placa de 96 poços.

Fonte: Elaborada pela autora.

O equipamento permite ajustar a agitação da placa, a temperatura (até 50 °C) e os intervalos entre as medidas (min. 1 segundo) o protocolo completo do experimento pode ser

verificado no apêndice.

3.10.2 Procedimento experimental

Basicamente, o experimento de inchamento mitocondrial (também conhecido como desafio com cálcio), promove um ambiente desfavorável para as organelas, devido a concentração de cálcio na solução, conhecido por induzir a abertura de poros na membrana mitocondrial externa, e uma vez que apresentem disfunções bioenergéticas são facilmente identificadas, pois acumulam água dentro da matriz mitocondrial, que pode ser medida através da absorção em 540 nm. (98) O inchamento mitocondrial pode indicar, qualitativamente, se ocorreu perda do potencial de membrana.

Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação com substratos (5mM glutamato e 2,5 mM malato) em duplicatas em placa de 96 poços, á temperatura ambiente. 100 μ M de CaCl é titulado nas amostras, diferentes controles foram medidos: 1) mitocôndria (controle e irradiada) em meio de reação (com substratos); 2) mitocôndria (controle e irradiada) em meio de reação (com substratos), com e sem 1 μ M de ciclosporina A (CsA) e na presença e na ausência de CaCl 100 μ M. Intervalos de 15 segundos entre cada medida com agitação média. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em duplicata.

3.11 Análise estatística

Todos os dados brutos tiveram sua parametrização testada, pelo teste estatístico Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição aproximadamente normal, foi aplicado o teste *One-Way ANOVA*, numa comparação entre a amostra irradiada e controle. Em caso de dados não normais, foi aplicado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão, para os dados paramétricos e são apresentados em média \pm interquartil para dados não paramétricos. Todos os cálculos estatísticos foram realizados no software PAST (Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D.2001). Para valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. São apresentados no apêndice deste estudo, as definições matemáticas para o cálculo do teste de Shapiro-Wilk, *One-Way ANOVA* e *Mann-Whitney*. Para todos os resultados apresentados, neste estudo, pelo menos 3 experimentos independentes em duplicatas foram realizados.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo e a qualidade de preservação da membrana mitocondrial interna, em decorrência da irradiação de raios X, ultravioleta e micro-ondas.

4.2 Objetivos específicos

- ★ Analisar os efeitos das radiações, nos estados da respiração mitocondrial acoplado e desacoplado e determinar as variações no comportamento dos estados em função da dose imediatamente após a irradiação;

- ★ Investigar qualitativamente a despolarização do potencial da membrana interna mitocondrial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Raios X

5.1.1 Resultados - mitocôndrias em meio de reação

As condições de irradiação das mitocôndrias podem levar à diferentes efeitos, pois, a radiação X pode interagir com o meio que contém as organelas, e causar alterações indiretas no seu funcionamento, através dos mecanismos indiretos da radiação ionizante. (99)

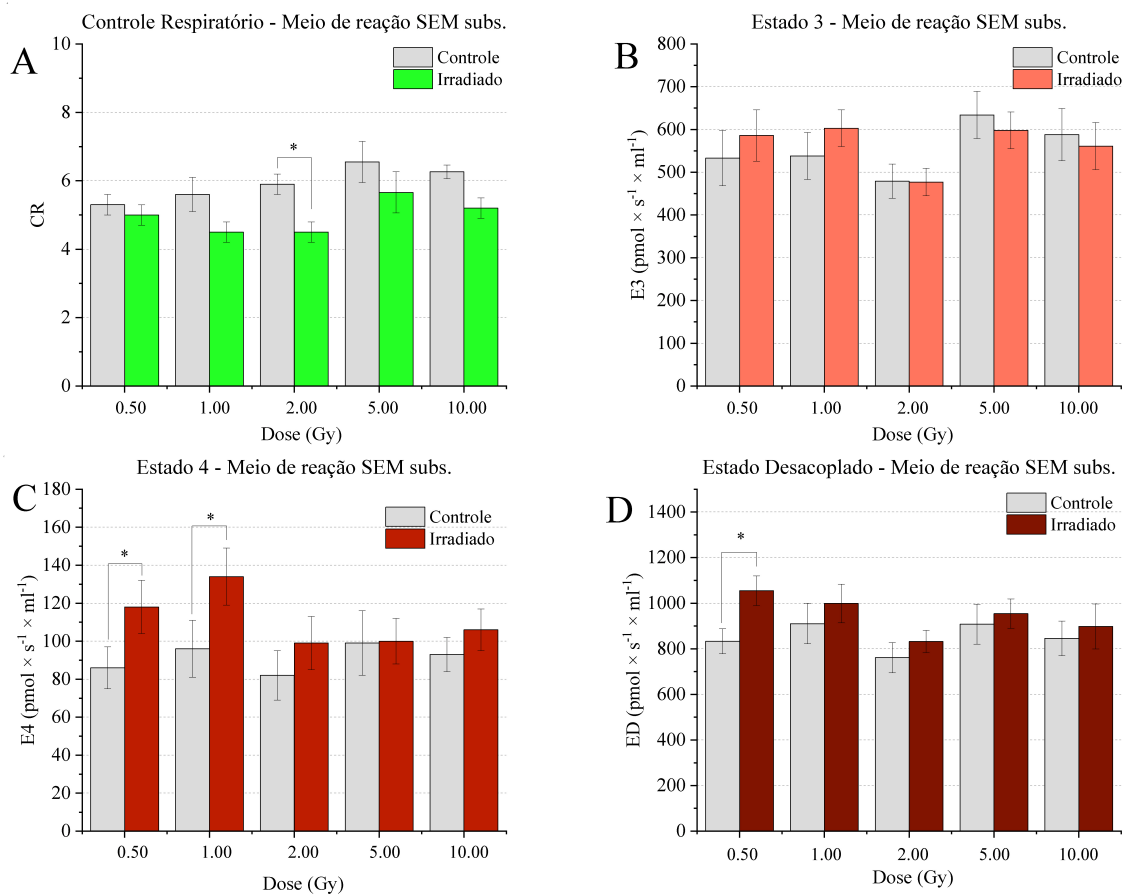


Figura 17 – Estados respiratórios em função da dose (Gy) em meio de reação irradiado sem substratos. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1} \text{ml}^{-1}$. A) CR. B) E3, na presença de ADP. C) E4, na presença de oligomicina. D) ED induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. * valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, devido ao potencial de ionização com as moléculas do meio de incubação, investigamos possíveis interações do meio de reação (sem mitocôndrias), na ausência e na

presença de substratos do CI (glutamato e malato). Os resultados são apresentados nas Figuras 17 e 18 apresentam o controle respiratório, Estado 3, Estado 4 e o estado acoplado, respectivamente no painel A, B, C e D. Para amostras irradiadas (barras coloridas) e controles (barras cinzas). Após a irradiação do meio de reação, estes foram imediatamente levados ao oxígrafo e medidas (controle x irradiado) com a mesma amostra de mitocôndria isolada (não irradiadas) foram realizadas.

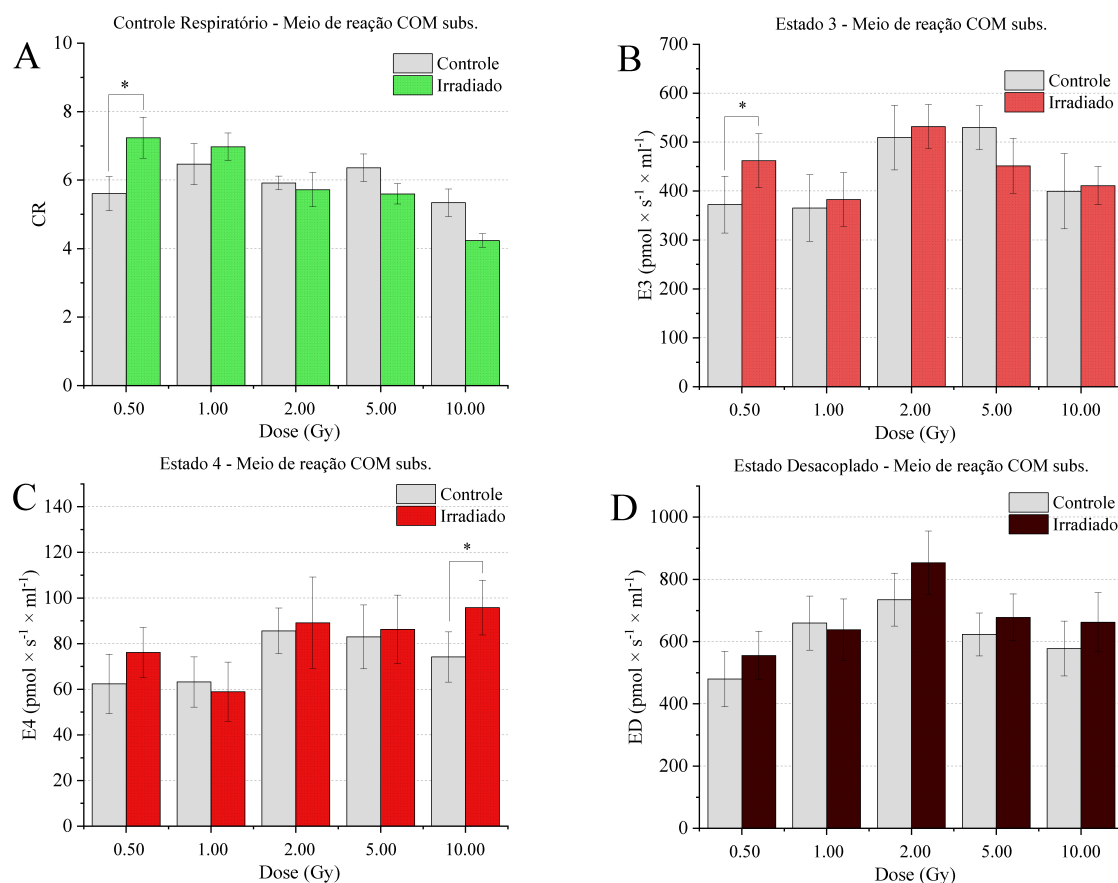


Figura 18 – Estados respiratórios em função da dose (Gy) em meio de reação irradiado com substratos, glutamato e malato. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) E3, na presença de ADP. C) E4, na presença de oligomicina. D) ED induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. * valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 Discussão - interação do meio de reação com raios X

A Figura 17, apresenta os resultados para meio irradiado sem substratos, no painel A, diminuição de cerca de 25% do CR em 2 Gy, quando comparado ao controle. O E3 não possui alterações significativas em nenhuma dose. O E4, painel C, apresenta, aumento em relação ao

controle de cerca de 30% para as doses 0,50 e 1,00 Gy. Finalmente, o ED, painel D, apresenta variação estatisticamente significativa de pelo menos 25% em 0,50 Gy. A Figura 18 apresenta os resultados para o meio de reação, irradiado, com substratos do CI, no painel A, aumento de 25% do CR em relação ao controle, em 0,50 Gy. O mesmo ocorre no E3, painel B, com aumento de 25% quando comparado ao controle, em 0,50 Gy. O painel C, apresenta o E4 com aumento de 25% em relação ao controle para dose de 10 Gy. Enquanto que para o ED não há alterações significativas em nenhuma dose.

As variações significativas apresentadas para o meio de reação com e sem substratos, não ocorrem nas mesmas doses. Além disso, o efeito causado no meio de reação, seja na presença ou na ausência de substratos, não possui relação direta com a dose. Ou seja, o efeito observado não foi aumentado ou diminuído com a variação da dose. Uma possível explicação para este efeito indireto na respiração das mitocôndrias, pode ser a ionização das moléculas de água do meio de reação, uma vez que a energia média dos fótons de raio X, aqui utilizados é de 40-70 keV, que são suficientemente altas para ionizar a água e/ou outras moléculas presentes. (100) A radiólise da água devido à radiação ionizante resulta na produção de elétrons, átomos de \dot{H} , íons e moléculas de H_3O^+ (di-hidrogênio H_2 e peróxido de hidrogênio H_2O_2). (101) Essas espécies possuem tempo de vida muito curto, mas poderiam desencadear danos permanentes em outras moléculas, como na sacarose (substância em maior concentração do meio de reação) o que poderia levar as alterações observadas na respiração mitocondrial. (102) O processo de ionização da água é essencialmente estocástico e não necessariamente o aumento da dose ou da energia do fóton levará à radiólise. (103) E a partir desta abordagem, é possível concluir que os raios X interferem no meio de reação com ou sem substratos. Ao receberem radiação X estes são utilizados imediatamente após a irradiação, no oxígrafo com mitocôndrias controles (não irradiadas). Por isso, o método de irradiação adotado (para radiação X) não inclui o meio de reação, no momento da entrega das doses, deste modo eliminamos possíveis interferências que a radiação possa causar no meio. A partir desses resultados, conclui-se, por tanto, que o meio irradiado leva à alteração indireta na respiração mitocondrial na presença e na ausência de substratos, glutamato e malato. Assim, para evitar artefatos nas medidas de respiração, irradiamos as mitocôndrias em duas condições: 1) no tecido hepático antes do isolamento das mitocôndrias, condição "fígado" e 2) na amostra de mitocôndria isolada, diluída apenas em meio 3, condição "gota". Para ambas as condições, as medidas ocorreram, no oxígrafo, em curto espaço de tempo, como proposto nos objetivos deste estudo, 1) aproximadamente 1 hora depois da irradiação (tempo de isolamento) e 2) aproximadamente 5 minutos após a irradiação.

5.1.3 Resultados - mitocôndrias 'fígado'

A fim de investigar os efeitos nos estados respiratórios mitocondrial, devido a radiação X, diferentes doses foram aplicadas (0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00 e 10,00 Gy). A dose foi entregue em metade do órgão, seguido do protocolo de isolamento. Ao final duas alíquotas do mesmo animal

foram obtidas, irradiada e controle (metade do fígado não irradiado). A Figura 19 apresenta o controle respiratório, Estado 3, Estado 4 e o estado acoplado, respectivamente no painel A, B, C e D. Para amostras irradiadas (barras coloridas) e controles (barras cinzas). Complementarmente a Figura 41A mostra os dados para o CR, E3, E4 e ED normalizados em relação ao controle.

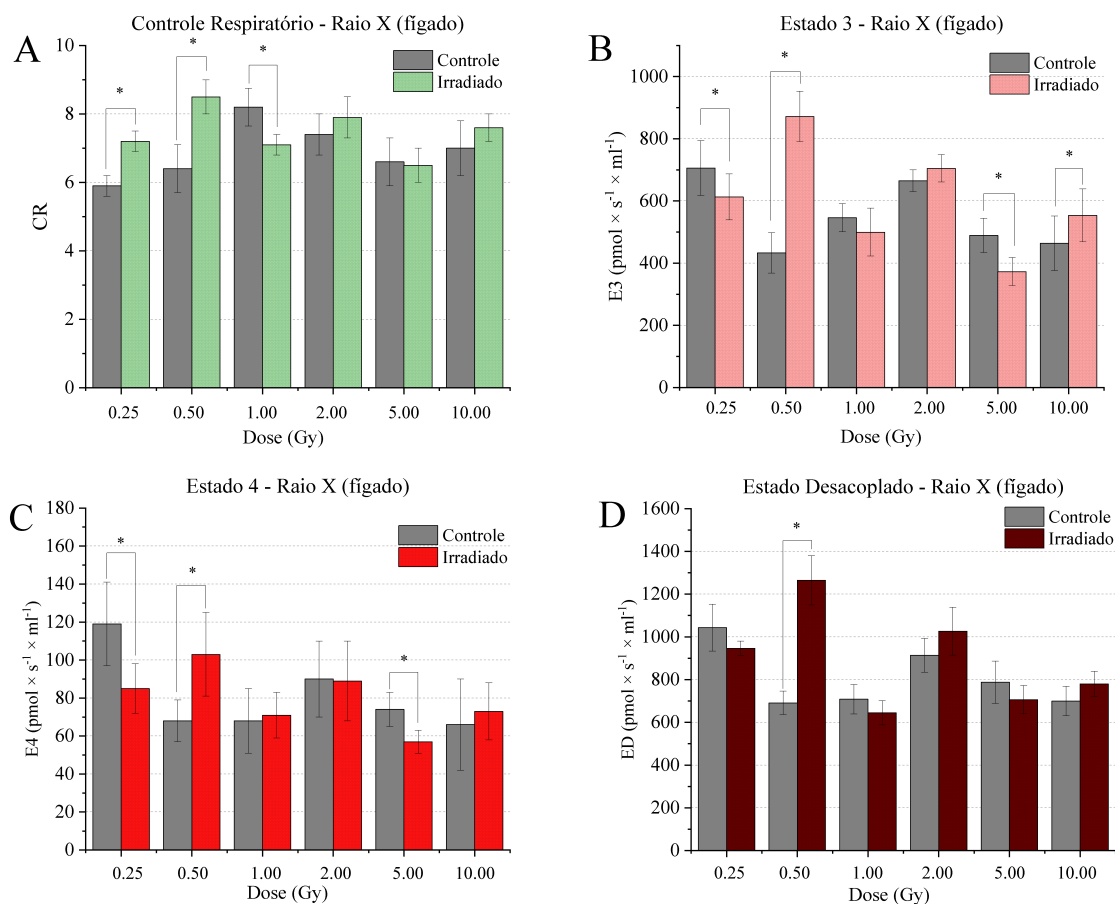


Figura 19 – Estados respiratórios em função da dose (Gy) para mitocôndrias isoladas de fígados irradiados. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. * valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.4 Discussão - mitocôndrias 'fígado'

Os controles respiratórios, mostrados na Figura 19, painel A, apresentam diferenças significativas, em relação ao controle, observadas nas menores doses aplicadas (0,25; 0,50 e 1,00 Gy), de modo que o CR para 0,25 e 0,50 Gy, é aproximadamente 20% e 30% superior ao controle, enquanto que para 1 Gy é 15% menor em relação ao controle, e para doses superiores (2, 5 e 10,00 Gy), não são identificadas alterações significativas.

O estado respiratório 3, painel B, é cerca de 20% menor, quando comparado ao controle, para 0,25

Gy, enquanto para as doses 0,50 e 10,00 Gy ocorre um aumento do E3 em relação ao controle, de cerca de 80 e 25% respectivamente. Nas doses 1 e 2 Gy não há alterações significativas. Em 5,00 Gy o E3 é aproximadamente 25% menor, em relação ao controle. No painel C, estado respiratório 4, nas doses 0,25 e 5,00 Gy, ocorre diminuição de 35 e 15% respectivamente. Enquanto que em 0,50 Gy o E4 é aumentado em 40%. O estado desacoplado, painel D, é aumentado em cerca de 70% em 0,50 Gy. Para estes resultados apresentados, temos variações no CR, mas não descrevem nenhum padrão de proporcionalidade com a dose aplicada. De modo geral não existe uma relação direta ou linear entre dose e efeito nos estados respiratórios. Para cada dose ocorre uma resposta distinta. Para as maiores doses de raio X (2, 5 e 10,00 Gy) os estados respiratórios 3 e 4 se regulam de modo que o CR permanece praticamente inalterado. O aumento do E3, pode indicar maior fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, enquanto que a diminuição pode estar associada à perda de parte da capacidade de fosforilação, ou seja, menos ADP é transformado em ATP. O E4 alterado pode indicar perda parcial da capacidade de permeabilização seletiva da membrana interna, e evidenciar potencial vazamento de prótons, que não envolve a ATPase, e pode ser melhor investigada com experimentos de inchamento mitocondrial. Enquanto o ED permite a investigação da máxima capacidade de atividade da CTE, que é estimulada em 0,50 Gy. Além disso, outros parâmetros foram calculados a partir dos resultados de respiração mitocondrial para melhor delinear os efeitos causados em amostras irradiadas, a Figura 20 apresenta o controle de eficiência (P-L) e o controle de desacoplamento (UCR).

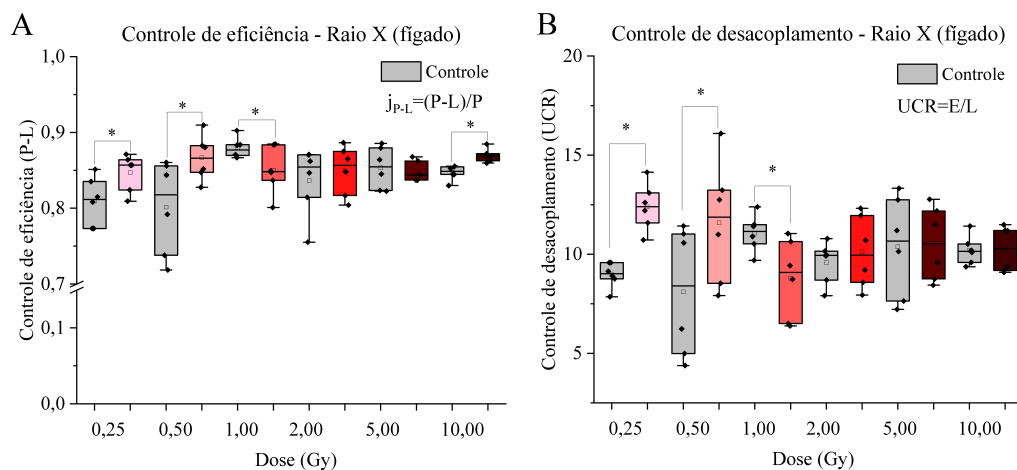


Figura 20 – A) controle de eficiência (P-L), indica menor limitação na capacidade de fosforilação oxidativa do sistema pela CTE quando acoplada à ATPase, para as doses 0,25, 0,50 e 10,00 Gy. B) controle de desacoplamento (UCR), menor dissipação de energia para as duas menores doses. Quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E3, E4 e ED. * valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

O controle de eficiência, apresentado no painel A, indica alterações significativas para as doses 0,25-1,00 Gy e também para 10,00 Gy. As doses 0,25; 0,50 e 10,00 Gy apresentam

aumento do coeficiente quando comparado ao controle, indicando aumento da eficiência de acoplamento da transferência de elétrons na formação de ATP. Enquanto que, para 1,00 Gy o efeito é oposto, ocorre a diminuição do acoplamento e possivelmente formando menos ATP, uma vez que menos ADP é fosforilado (104), em comparação com o CR para dose em 1,00 Gy, que diminui, pode indicar perda da eficiência de fosforilação do sistema. O painel B, apresenta menor dissipação (UCR) para as doses 0,25 e 0,50 Gy, o que pode indicar mais energia sendo aplicada para a transformação de ADP em ATP. Contudo, apresenta maior dissipação de energia, estatisticamente significativa, em 1,00 Gy, quando comparado ao controle, indicando que menos energia fica disponível para a transformação de ADP em ATP, o que é corroborado pelo controle de eficiência. A dose de 10,00 Gy que apresentou maior eficiência de acoplamento, apresenta UCR estatisticamente similar ao controle. Enquanto que o parâmetro E-L (apêndice), Figura A42, não apresentou alterações significativas em nenhuma dose.

5.1.5 Resultados - inchamento

O experimento de inchamento mitocondrial poderá fornecer mais informações acerca da preservação da MI. A Figura 21 apresenta, primeiramente, diferentes controles (linhas tracejadas) para obtenção de informações acerca do mecanismo pelo qual ocorre a entrada de soluto e na atuação do inibidor de poro de transição CsA. As amostras irradiadas são apresentadas para as doses 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00 e 10,00 Gy (linhas contínuas).

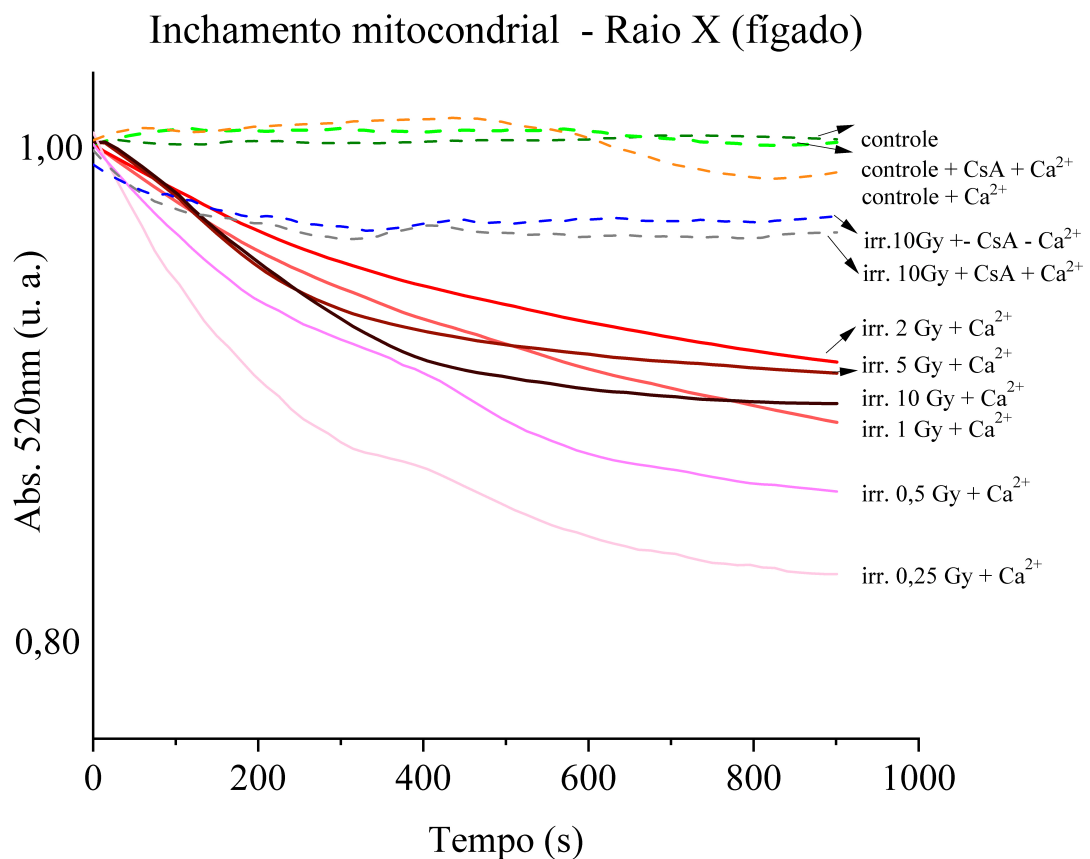


Figura 21 – Dados de inchamento mitocondrial. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca^{2+} (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca^{2+} (linha tracejada laranja): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle irradiado (linha tracejada azul): mitocôndria irradiada com ou sem CsA na ausência de cálcio; controle irradiado (linha tracejada cinza): mitocôndria irradiada com CsA na presença de cálcio ($100 \mu\text{M}$).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.6 Discussão - inchamento

A CsA é um inibidor de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) que podem ocorrer na MI. Sua presença inibe o inchamento tanto para amostras controles, sem irradiação (linhas tracejadas), quanto para as amostras irradiadas (linhas contínuas), o que indica que o inchamento, possivelmente, ocorre pela abertura de PTPM. Observa-se maior decaimento para as menores doses 0,25-1,00 Gy seguido da maior dose 10,00 Gy, cuja as doses são as mesmas que sofrem alterações significativas indicadas pelo parâmetro de eficiência, P-L, e nas doses 0,25; 0,50 e 1,00 Gy pelo controle de desacoplamento, UCR.

O inchamento mitocondrial apresentado, indica que a MI mitocondrial possui maior abertura de

poros, e conseqüentemente tem maior dificuldade de manter a concentração de H^+ fora da matriz, o que leva à entrada de água para dentro da matriz. O inchamento pode levar à diminuição do desempenho das funções bioenergéticas. Entretanto, os resultados da respiração mitocondrial nas doses de 0,25 e 0,50 Gy, que tiveram seus CR aumentados, além de apresentarem (P-L) maior em relação ao controle, o que indicaria maior eficiência de acoplamento das funções mitocondriais. Contudo, é possível que danos ocasionados nas organelas, decorrente da irradiação, não se apresentem neste roteiro de experimento de respiração, realizado no oxígrafo devido ao ambiente favorável ao seu funcionamento e os altos níveis de atividade (105), na presença de ADP. (106) O elevado grau de acoplamento alcançado entre a CTE e a ATPase, apresentados nos resultados de respiração, indicam que a mitocôndria possui maior capacidade de regulação de possíveis danos à MI (107) nessas condições (de atividade energética). Maior desempenho do controle de eficiência observado (em 0,25; 0,50 e 10,00 Gy), contudo, não exclui a possibilidade de danos provocados pela radiação X na MI mitocondrial. Apenas apresentam-se controladas no momento da respiração, na presença de ADP e da fosforilação oxidativa. A abertura de poros de transição (PT) na membrana interna mitocondrial faz com que a ocorra a transição de permeabilidade de membrana (TPM) e leva ao inchamento mitocondrial, despolarização da membrana e liberação de solutos intramitocondriais. Os resultados apresentados acima, indicam que quanto menor a dose, maior é a permeabilidade da MI, devido da presença de cálcio, seguido da maior dose do estudo (10,00 Gy) que também apresenta maior permeabilidade e, conseqüentemente, as funções mitocondriais podem ser afetadas. (108) Observa-se ainda, que não há correspondência linear entre dose e efeito neste experimento.

Inúmeros trabalhos na literatura (109–111), demonstram a importância do transporte de cálcio, nas mitocôndrias, para a fosforilação oxidativa. Além disso, o cálcio é capaz de desacoplar a respiração mitocondrial de modo reversível. (112) Sendo assim, no oxígrafo, em condições controladas sem a presença de cálcio, as mitocôndrias irradiadas (em baixas doses 0,25-0,50 Gy) foram estimuladas bioenergeticamente nessas doses, quando comparadas aos respectivos controles. O que não exclui a possibilidade de danos nas membranas mitocondriais ou outras estruturas, decorrente da interação com a radiação X. E uma vez expostas a ação do cálcio, demonstraram (a partir do experimento de inchamento mitocondrial) que a capacidade de regulação de cálcio foi parcialmente danificada, especialmente em baixas doses. Contrariando uma relação linear entre dose e efeito, ou seja, não cresce o inchamento a medida que a dose aumenta.

5.1.7 Resultados - mitocôndria isolada 'gota'

A fim de investigar os efeitos nos estados respiratórios, devido a radiação X, em alíquotas de mitocôndrias isoladas. Diferentes doses de raio X (0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00 e 10,00 Gy) foram aplicadas. O experimento de respiração ocorreu imediatamente após a irradiação, paralelamente a uma amostra controle (não irradiada). A Figura 22 apresenta o controle respi-

ratório, Estado 3, Estado 4 e o estado acoplado, respectivamente no painel A, B, C e D. Para amostras irradiadas (barras coloridas) e controles (barras cinzas). Complementarmente a Figura 43A mostra os dados para o CR, E3, E4 e ED normalizados em relação ao controle.

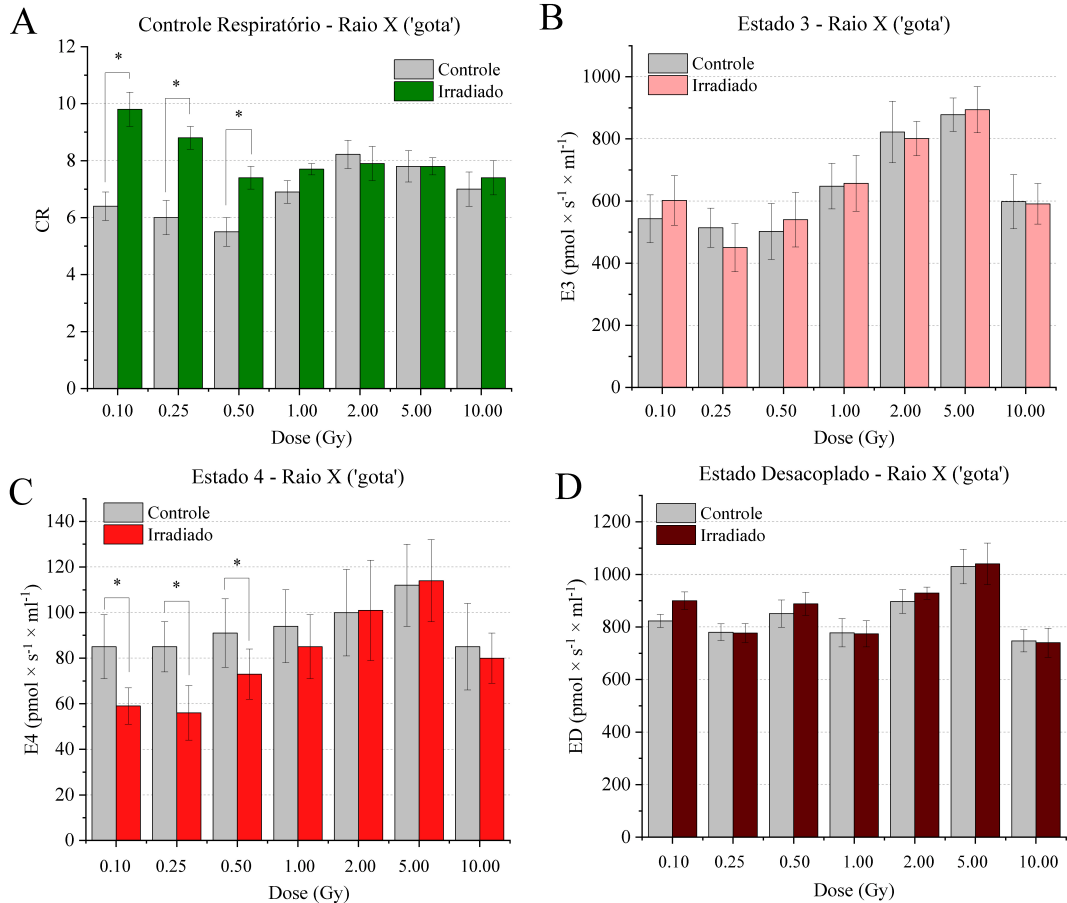


Figura 22 – Controle respiratório e estados respiratórios em função da dose (Gy) para mitocôndrias isoladas. Os dados foram obtidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) E3 na presença de ADP. C) E4 na presença de oligomicina. D) ED induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. * valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.8 Discussão - mitocôndria isolada 'gota'

Para a dose de 0,10 Gy o controle respiratório, painel A, é cerca de 45% maior em relação ao controle, aproximadamente 40% maior em relação ao controle em 0,25 Gy e 35% maior em 0,50 Gy, quando comparados aos respectivos controles. Nas demais doses não há alteração significativa no CR. O E3, painel B, na presença de ADP não há mudanças significativas, em relação ao controle, para nenhuma dose. O E4, painel C, é aproximadamente 30% menor em relação ao controle, para 0,10 e 0,25 Gy, diminui em cerca de 35% enquanto na dose de 0,50

Gy o E4 é cerca de 20% menor quando comparado ao controle. As doses 1,00-10,00 Gy não apresentam alterações significativas para o E4. O estado desacoplado, painel D, não apresenta mudanças significativas quando comparado ao controle em nenhuma dose.

Os resultados obtidos, neste método de irradiação, mostram que ocorreram aumento significativo em relação ao controle apenas em baixas doses (0,10-0,50 Gy), no CR. Enquanto que o E3, não apresenta nenhuma mudança significativa, em relação ao controle, para nenhuma dose. O estado 3 na presença de ADP, fornece indicativos da capacidade de fosforilação oxidativa da população de mitocôndria, ou seja, ocorre a passagem de elétrons de espécies com menor potencial oxidativo para espécies com maior potencial oxidativo pela cadeia de transporte de elétrons acoplado à produção de ATP. De acordo com os dados apresentados, a radiação X não desencadeou nenhuma perturbação que pudesse alterar a forma ou a velocidade da oxidação fosforilativa. Este é um indicativo de que não ocorrem alterações significativas da produção de ATP, uma vez que o E3 apresenta-se preservado em todas as doses aplicadas. O estado respiratório 4, na presença de oligomicina, responsável por bloquear a produção de ATP, promove artificialmente a paralisação da ATPase. Os resultados mostram a diminuição significativa do E4 para baixas doses (0,10-0,50 Gy), o que pode ser um indicativo de perda da capacidade seletiva da membrana interna, com isso pode ocorrer a passagem de água e solutos para dentro da matriz. Os resultados para o estado respiratório desacoplado, indicam que não houveram alterações significativas em nenhuma dose. Neste estado, a CTE e a ATPase são desacoplados, permitindo que ocorra a passagem de prótons para dentro da matriz sem que eles atravessem a ATPase, levando a queda do potencial eletroquímico que atua na mitocôndria. O ED permite que a CTE opere na máxima velocidade e, portanto, indica o máximo de consumo de oxigênio nessas condições. Os dados mostram que a velocidade e a capacidade da CTE não sofreram perturbações significativas em nenhuma dose, indicando a preservação da atividade da CTE.

Os valores calculados para a eficiência de acoplamento (E-L) e o controle de desacoplamento (UCR) são apresentados na Figura 23. O parâmetro E-L, painel A, apresenta variação, estatisticamente significativa, apenas nas doses de 0,10 e 0,25 Gy, e indica maior preservação do acoplamento entre a transferência de elétrons e a fosforilação de ADP. O UCR, painel B, indica perdas de energia ao longo da CTE devido a imperfeições no acoplamento (por exemplo, perda de elétrons para outras moléculas que não levem a oxidação de NAD) e quanto maior o valor do controle menor é a perda (113), painel B indica aumento significativo do parâmetro UCR, apenas para baixas doses, 0,10-0,50 Gy, em relação ao controle, o que pode apontar para uma menor perda de energia, o que por sua vez favoreceria a formação de ATP. Enquanto que o parâmetro P-L (apêndice), Figura A23, não sofre alterações significativas, portanto o a capacidade de fosforilação oxidativa do sistema não é limitada pela CTE quando acoplada à ATPase, isto também se reflete nos dados do ED, Figura 22, painel D, onde não ocorrem alterações significativas entre o estado desacoplado entre controle e irradiado.

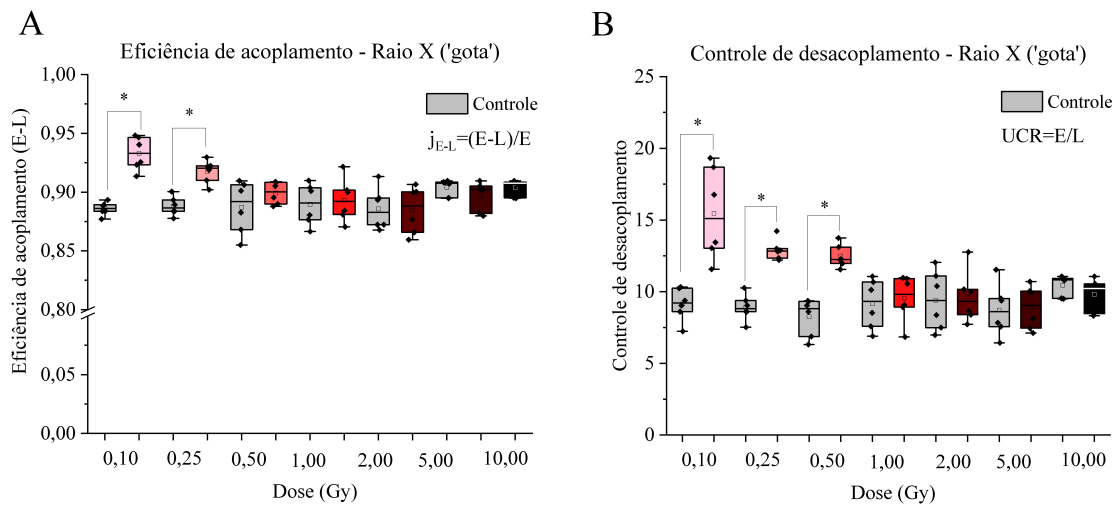


Figura 23 – A) eficiência de acoplamento (E-L), indica maior preservação do acoplamento da transferência de elétrons para a fosforilação de ADP, B) controle de desacoplamento (UCR), aponta menor dissipação de energia. Quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E4 e ED. * valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.9 Resultados - inchamento

Medidas de inchamento mitocondrial foram feitas a fim de obter mais informações acerca das condições da membrana interna. Os dados de inchamento mitocondrial são apresentados na Figura 24, e diferentes controles são medidos na presença e na ausência de Ca^{2+} e CsA (linhas tracejadas), a fim de constatar se o inchamento ocorre devido a abertura de poros ou não. Os resultados indicam que, a partir, do efeito do inibidor de poros, CsA, causado nas amostras irradiadas, o inchamento ocorre devido a abertura de poros que permitem a passagem de água para a matriz.

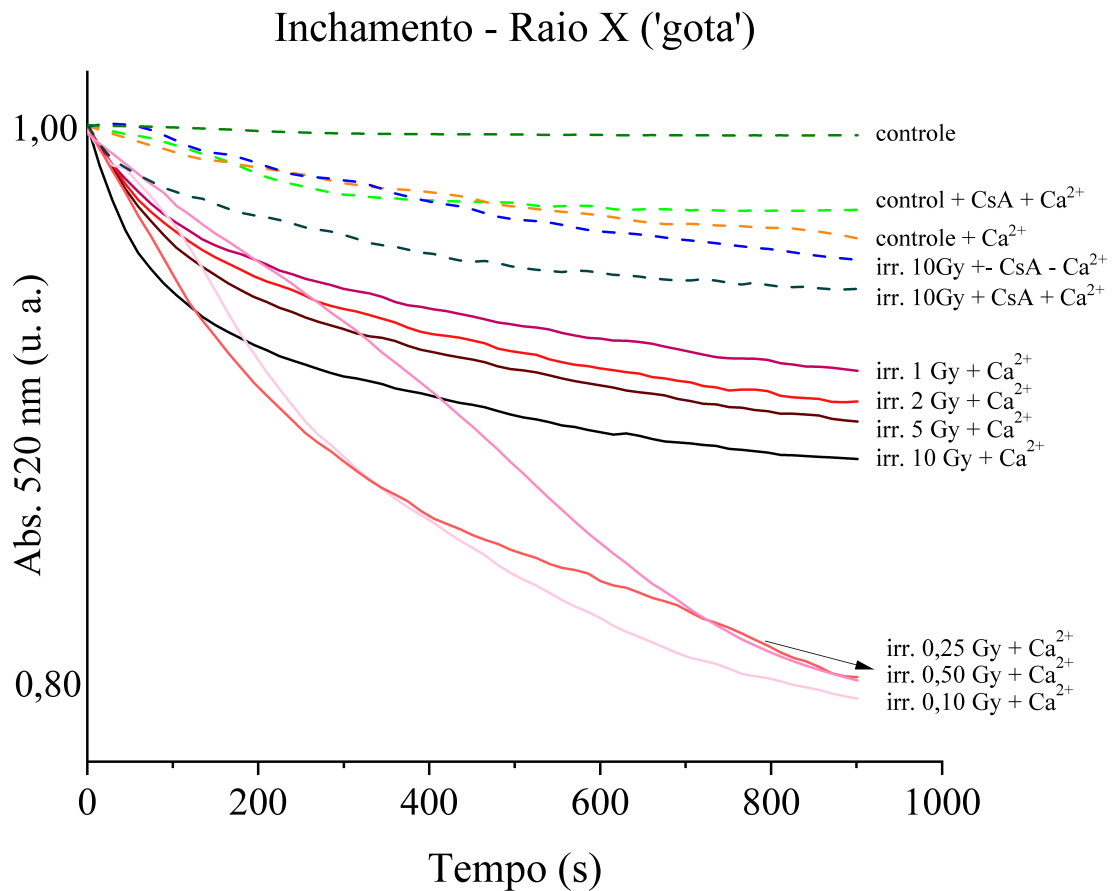


Figura 24 – Dados de inchamento mitocondrial. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca^{2+} (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca^{2+} (linha tracejada laranja): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle irradiado (linha tracejada azul): mitocôndria irradiada com ou sem CsA na ausência de cálcio; controle irradiado (linha tracejada verde militar): mitocôndria irradiada com CsA na presença de cálcio. ($100 \mu\text{M}$)

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.10 Discussão - inchamento

Assim como tratado anteriormente, diferentes controles para obtenção de informações acerca do mecanismo pelo qual ocorre a entrada de soluto. A Figura 24 aponta maior inchamento, devido a diminuição da absorvância (em unidades arbitrárias) para as amostras irradiadas com doses menores de raio X, na presença de Ca^{2+} . A menor absorvância, para as doses 0,25-0,50 Gy, pode indicar disfunções na capacidade seletiva da MI. Estes resultados corroboram com as alterações observadas no estado respiratório 4, Figura 22, painel C. Mostrando que doses menores possuem maior capacidade de induzir abertura de poros, levando ao inchamento mitocondrial

observado, e perda das funções normais. Contudo, assim como discutido na seção anterior, é possível mascarar danos na MI, no momento da respiração no oxígrafo em decorrência do ambiente favorável ao seu funcionamento e os altos níveis de atividade e na presença de ADP. O grau de acoplamento alcançado entre a CTE e a ATPase, apresentados nos resultados de respiração, indicam que a mitocôndria possui maior capacidade de regulação de possíveis danos à MI. O resultado de inchamento, porém, não elimina a possibilidade de danos provocados pela radiação X nas membranas mitocondriais. Mas, é controlada durante a respiração, na presença de ADP e da fosforilação oxidativa.

5.2 Ultravioleta: efeitos em mitocôndrias isoladas

5.2.1 Resultados - interação do meio de reação com a radiação

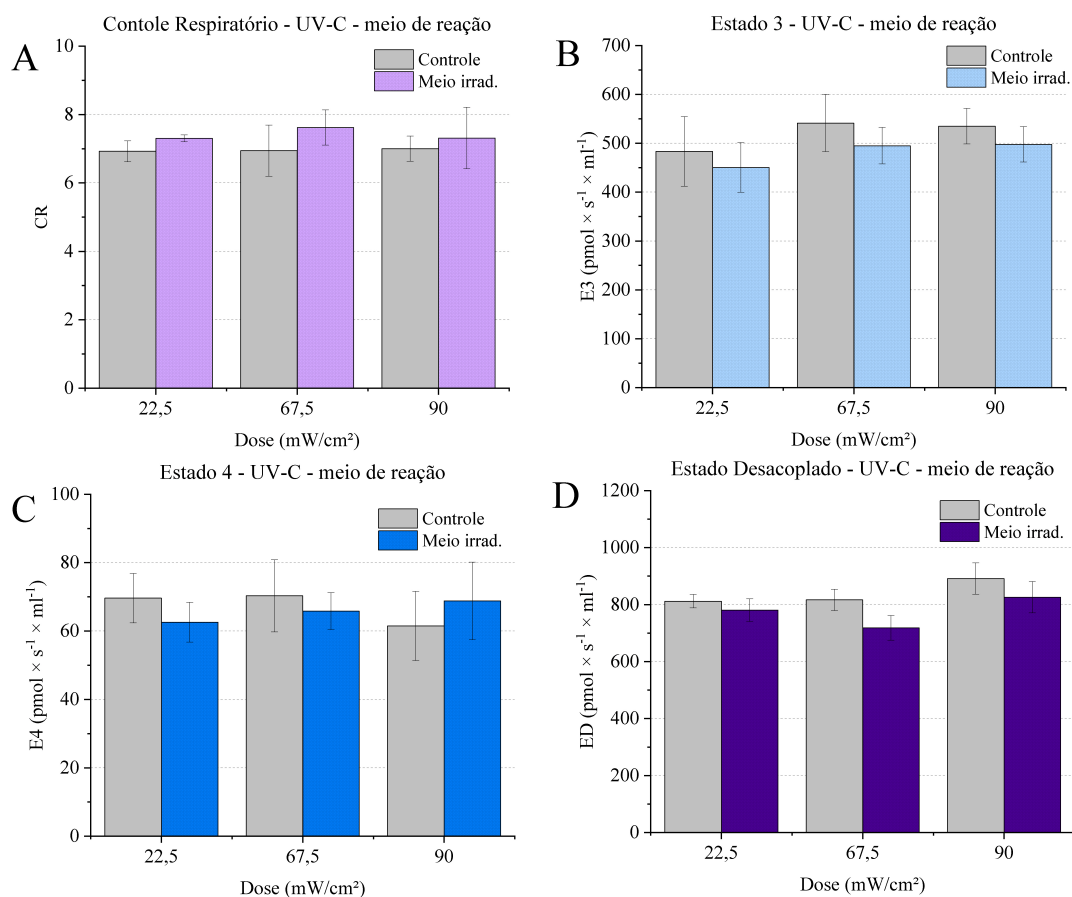


Figura 25 – Estados respiratórios em função da dose (mW/cm²) para mitocôndrias isoladas (não irradiadas) em meio de reação controle e irradiado. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em pmol s⁻¹ ml⁻¹. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 2 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados.

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de investigar possíveis efeitos, no meio de reação com substratos, devido a exposição à comprimentos de onda no ultravioleta, experimentos de respiração com meio irradiado em comparação com controle, foram realizados e são apresentados na Figura 25, que apresenta o controle respiratório, Estado 3, Estado 4 e o estado acoplado, respectivamente no painel A, B, C e D. Para amostras irradiadas (barras coloridas) e controles (barras cinzas). As amostras controle são compostas pelo meio de reação (não irradiado) e mesma alíquota de mitocôndria isolada usada na amostra com meio irradiado.

5.2.2 Discussão - interação do meio de reação com a radiação

Apesar da radiação no intervalo do UV ser, geralmente, categorizada como não ionizante há potenciais de ionização, não apenas de moléculas como o DNA (114) mas, de moléculas inorgânicas, por isso a importância de investigar possíveis efeitos indiretos em mitocôndrias isoladas devido á alterações no meio de reação. Os resultados apresentados na Figura 25 para a lâmpada de UV-C, foram obtidos a partir da irradiação do meio de reação com substratos, (na ausência de mitocôndrias), em paralelo à um meio controle (sem irradiação), os dados demonstraram que não há nenhum efeito, estatisticamente significativo, decorrente da irradiação com UV-C no meio de reação, em nenhuma dose. Mínimas variações no CR, E3, E4 e ED são da ordem de 5% dentro da barra de erro. O mesmo experimento foi realizado para o meio de reação com substratos no UV-A, a Figura A46 (apêndice), apresenta os resultados para os estados respiratórios E3, E4 e ED, e também verificou-se que não ocorrem alterações significativas. Sendo assim, todos os experimentos com UV foram realizados em meio de reação com adição de substratos do CI, em temperatura ambiente. Imediatamente após a irradiação, a amostra é disposta no oxígrafo e o protocolo de respiração mitocondrial é seguido a partir da titulação de ADP.

5.2.3 Capacidade de penetração: Mitocôndria - UV-C

Com o intuito de avaliar a capacidade de penetração do UV-C (255 nm) na amostra disposta na cubeta de quartzo, medidas de absorvância em diferentes concentrações de mitocôndria isolada foram realizadas, e são apresentadas na Figura A47 (apêndice). Concluímos que pouca luz é capaz de atravessar a amostra em 0,50 mg/ml (concentração utilizada no oxígrafo), indicando que a luz é absorvida ou espalhada pela amostra. Contudo, os dados de respiração e inchamento mitocondrial demonstram que uma quantidade significativa de luz interage com a população de mitocôndrias da amostra, viabilizando medidas sistematicamente reproduzíveis.

5.2.4 Resultados - mitocôndrias em meio de reação (UV-C)

A Figura 26 apresenta o CR, E3, E4 e o ED, respectivamente no painel A, B, C e D. Para amostras irradiadas (barras coloridas) e controles (barras cinzas). Imediatamente após a

irradiação com UV-C as amostras de mitocôndrias incubadas em meio de reação com substratos do CI, receberam diferentes doses, 22,5; 45,0; 67,5 e 90,0 mW/cm². Complementarmente a Figura 48A mostra os dados para o CR, E3, E4 e ED normalizados em relação ao controle.

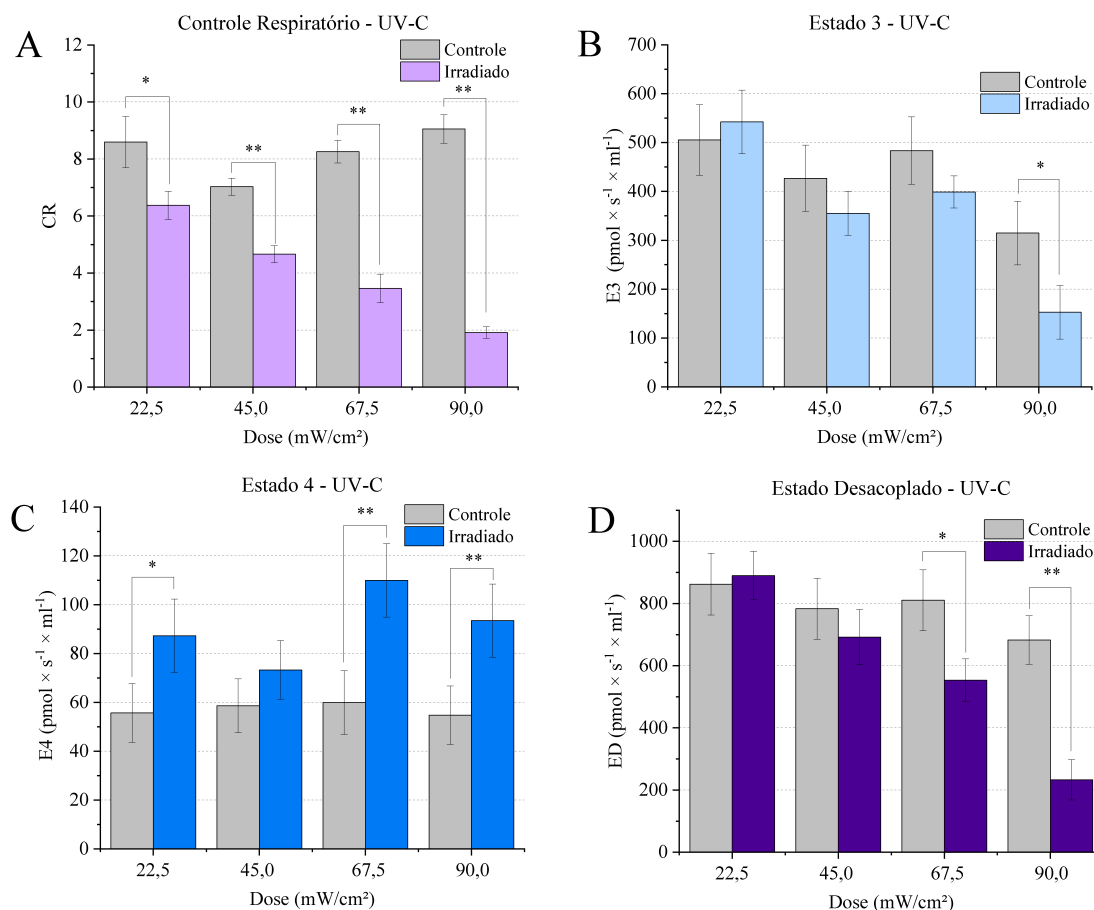


Figura 26 – Estados respiratórios em função da dose (mW/cm²) para mitocôndrias isoladas em meio de reação. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. *valores significativos com $p < 0,05$; **valores significativos com $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5 Discussão - mitocôndrias em meio de reação (UV-C)

O controle respiratório, painel A, apresenta diminuição estatisticamente significativas em todas as doses, quando comparado ao controle. Apresentando uma diminuição de cerca de 30, 35, 60 e 75 % respectivamente para as doses 22,5; 45,0; 67,5 e 90,0 mW/cm². O E3, painel B, apresenta apenas alteração significativa na maior dose, aproximadamente 50% menor em relação ao controle, enquanto as demais doses não apresentam mudanças quando comparadas

ao controle. O E4, painel C, apresenta aumento significativo para as doses 22,5; 67,5 e 90,0 (mW/cm^2), aproximadamente 50, 80 e 85% maior em relação ao controle, respectivamente. O ED, painel D, decresce, significativamente, para as duas maiores doses estudadas, 67,5 e 90,0 (mW/cm^2).

Assim como calculado anteriormente, o painel A, Figura 27, apresenta a eficiência de acoplamento (E-L), com diminuição significativa em relação ao controle para todas as doses, indicando que, quando comparadas ao controle, as amostras irradiadas apresentam menor preservação do acoplamento das funções mitocondriais e com isso pode ocorrer menos fosforilação oxidativa, então menos moléculas de ATP devem ser formadas. Mesmo o E3 não apresentando alteração significativa para as doses 22,5-67,5 mW/cm^2 , é indicado pelo cálculo do E-L, perda da preservação de acoplamento levando a inibição das funções bioenergéticas mitocondrial. O controle de eficiência (P-L) apresentado no painel B, possui diminuição significativa em todas as doses, apontando para possíveis limitações do sistema de fosforilação oxidativa (como CTE e ATPase) na fosforilação oxidativa. O controle de acoplamento (UCR), painel C, é capaz de indicar perdas de energia, dissipada durante o transporte de elétrons, assim, quanto maior o valor do controle de desacoplamento menos perdas ocorrem, o resultado mostra diminuição do controle para todas as doses, indicativo de perda da capacidade da cadeia de transporte de elétrons de carrear elétrons de maneira efetiva, a baixa atividade da CTE também irá determinar a produção de ATP, pois pode haver desbalanços no potencial de membrana devido ao menor bombeamento de prótons para fora da matriz.

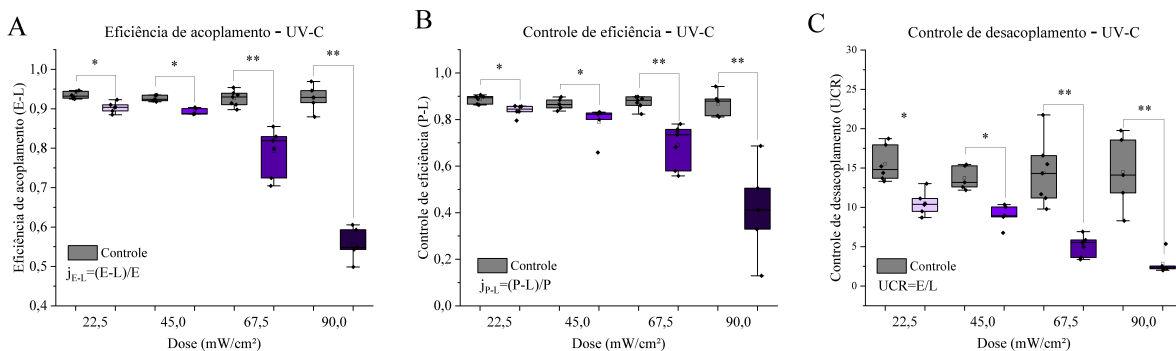


Figura 27 – A) eficiência de acoplamento (E-L), indica perda da preservação de acoplamento da transferência de elétrons para a fosforilação de ADP; B) controle de eficiência (P-L), indica limitação do sistema de fosforilação oxidativa; C) controle de desacoplamento (UCR), indica falhas no acoplamento mitocondrial, quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E3, E4 e ED. *valores significativos com $p < 0,05$; **valores significativos com $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pela autora.

O controle respiratório, normalizado em relação ao controle, decai à medida em que a dose aumenta, o decaimento é aproximadamente linear, apresentado na Figura 28, painel A. A velocidade de decaimento é de $-0,23 \pm 0,03$ neste intervalo de doses. O que pode ser um indicativo de que a medida em que a dose aumenta os estados E3 e E4 são alterados de modo que as funções mitocondriais sejam significativamente prejudicadas. Enquanto o E3 indica inibição da fosforilação oxidativa, apenas em $90,0 \text{ mW/cm}^2$, o E4 apresenta aumento mesmo em menores doses como $22,5$; $67,5$ e $90,0 \text{ mW/cm}^2$, o que pode indicar vazamento de prótons devido a danos na membrana interna mitocondrial. O estado desacoplado, normalizado, também decresce linearmente com a dose, painel B, a velocidade de decaimento é de $-0,22 \pm 0,03$. O ED induzido pelo CCCP, mostra que quando comparado ao controle decai a uma taxa constante indicando possível perda da diferença de potencial presente entre a matriz e o espaço intermembrana. O CR e o ED decaem, aproximadamente, na mesma taxa a medida em que a dose aumenta.

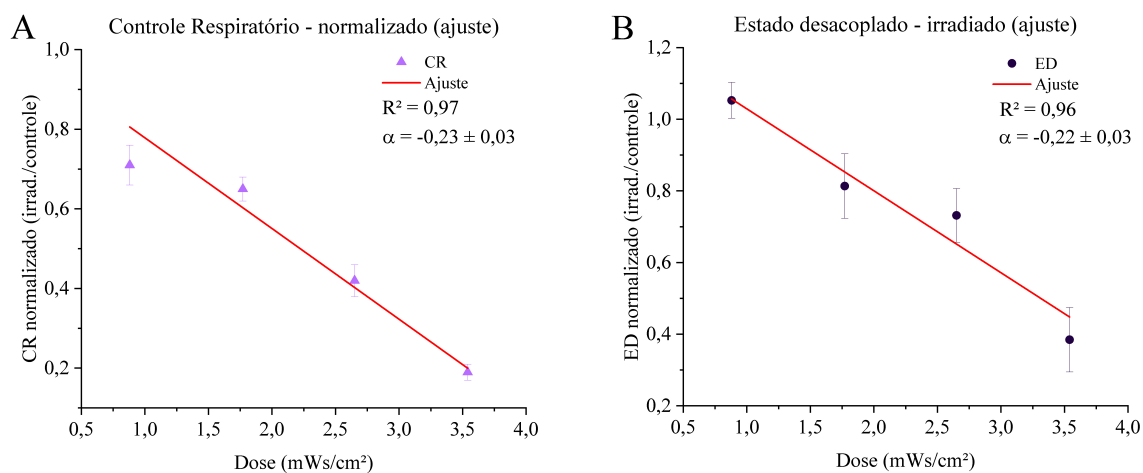


Figura 28 – Ajustes para CR e ED normalizados, irradiado/controle. A) Controle respiratório normalizado apresenta decaimento de $-0,23 \pm 0,03$. B) O estado desacoplado normalizado apresenta decaimento de $-0,22 \pm 0,03$. Os ajustes apresentam R^2 (fator de qualidade de ajuste) de 0,97 e 0,99 respectivamente para A e B.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.6 Resultados - inchamento

Medidas de absorvância para amostras de mitocôndrias irradiadas com UV-C, em diferentes doses são apresentadas na Figura 29. Os controles estão representados em linhas tracejadas. As curvas irradiadas (linhas contínuas) apontam maior decaimento em relação aos controles, onde $d1=22,5$; $d2=45,0$; $d3=67,5$ e $d4=90,0 \text{ mW/cm}^2$.

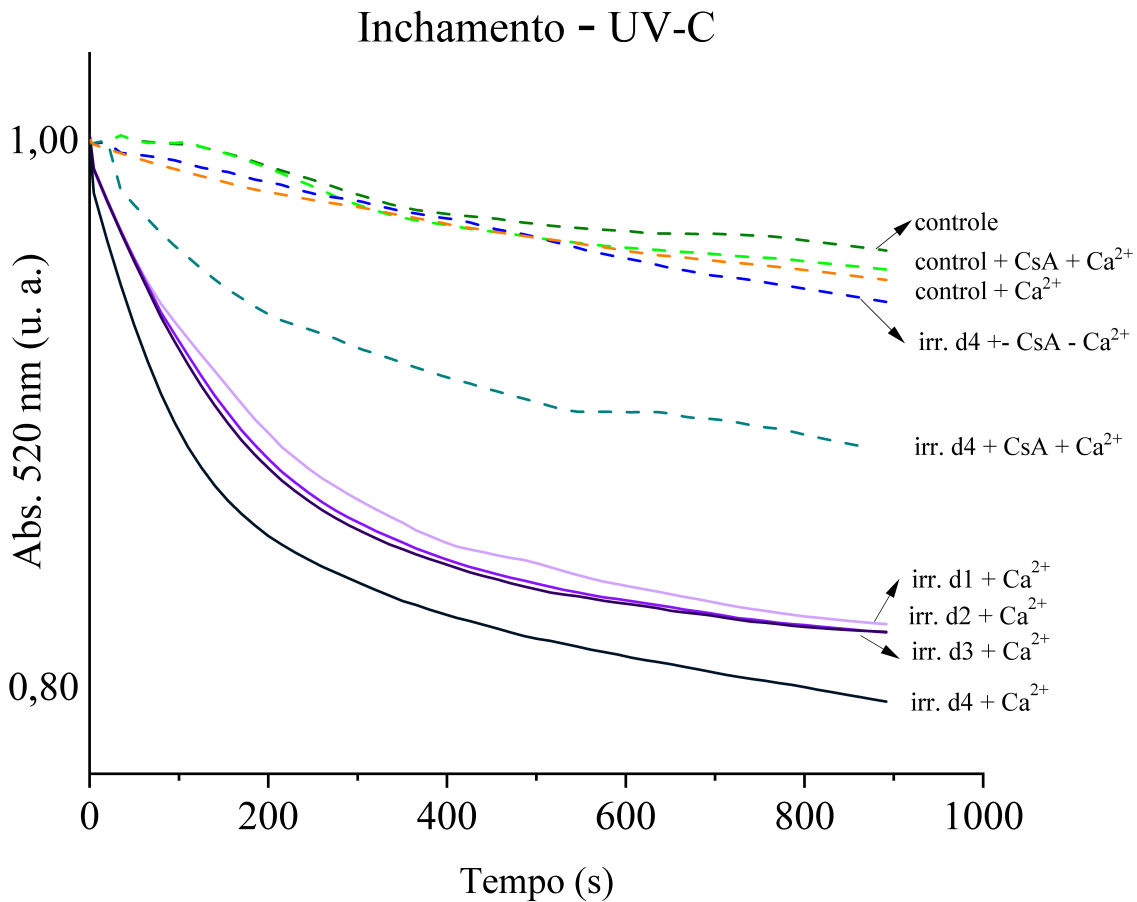


Figura 29 – Dados de inchamento mitocondrial. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca²⁺ (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca²⁺ (linha tracejada laranja): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle irradiado (linha tracejada azul): mitocôndria irradiada com ou sem CsA na ausência de cálcio; controle irradiado (linha tracejada verde água): mitocôndria irradiada com CsA na presença de cálcio. (100 μM)

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.7 Discussão - inchamento

Diferentemente dos efeitos decorrentes da irradiação com raios X, amostras de mitocôndrias isoladas expostas à UV-C apresentam diminuição da absorvância proporcionalmente à dose. Ou seja, menores doses possuem absorvidade maior, e doses maiores possuem absorvidade menor quando comparadas aos controles. As curvas irradiadas decaem (linhas contínuas), em todas as doses, para valores de absorvância, em unidades arbitrárias, assumindo valores muito próximos, apontando para danos na MI mitocondrial. (115) De modo que o resultado do inchamento, pode estar atrelado à despolarização do potencial de membrana, que também pode estar indicado na Figura 26, painel D, pois o ED é significativamente diminuído nas duas

maiores doses aplicadas (67,5 e 90,0 mW/cm²). Além do E4, que apresenta crescimento em 22,5; 67,5 e 90,0 mW/cm², este crescimento pode estar relacionado à perda das funções de permeabilidade seletiva da MI mitocondrial. Além disso, a despolarização devido a abertura de poros de transição está diretamente ligado a liberação de citocromo C, o que em *in vivo* levaria a apoptose ou necrose via mitocondrial. (116)

5.2.8 Resultados - mitocôndrias em meio de reação (UV-A)

A Figura 30 apresenta o controle respiratório, Estado 3, Estado 4 e o estado acoplado, respectivamente no painel A, B, C e D. Para amostras irradiadas (barras coloridas) e controles (barras cinzas), obtidos para a respiração mitocondrial depois da irradiação com UV-A de amostras com mitocôndrias incubadas em meio de reação com substratos de CI, em diferentes doses, 31,5; 63,0; 94,5; 126,0 e 756,0 mW/cm².

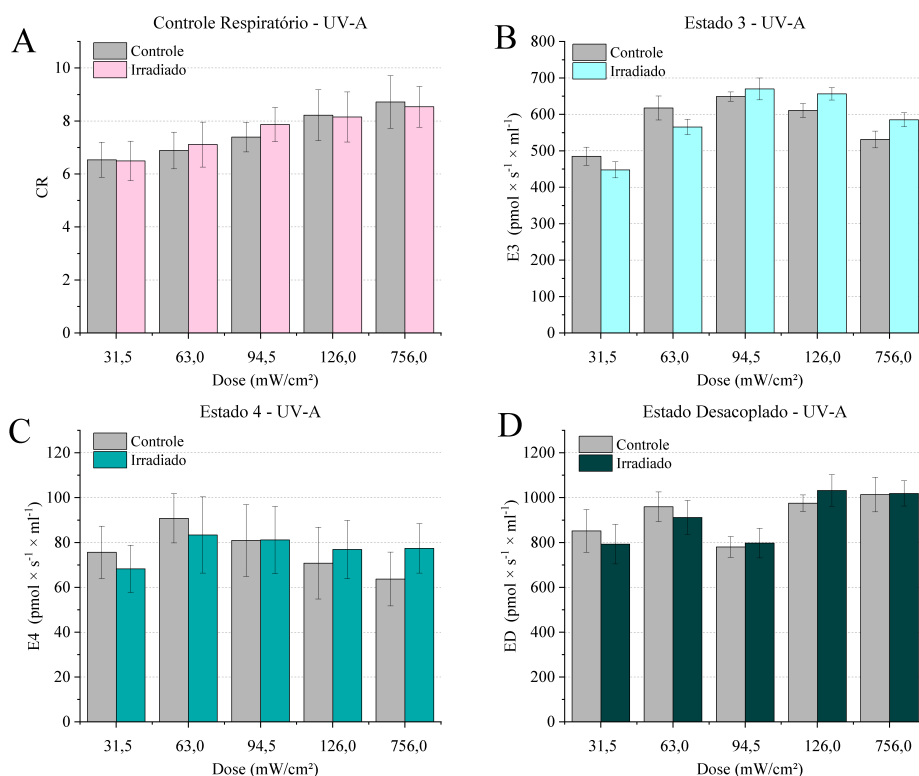


Figura 30 – Estados respiratórios em função da dose (mW/cm²) para mitocôndrias isoladas em meio de reação. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em pmol s⁻¹ml⁻¹. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Não foram identificadas alterações estatisticamente significativas em nenhuma dose aplicada. Fonte: Elaborada pela autora.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.9 Discussão - mitocôndrias em meio de reação (UV-A)

Diferentemente dos efeitos observados no UV-C (255 nm), a irradiação, em 371 nm, de mitocôndrias incubadas em meio de reação, na presença de substratos, não levou à alteração estatisticamente significativa, imediatamente após a irradiação. Não ocorrem alteração em nenhum dos estados respiratórios estudados, mesmo quando a dose chega a 756,0 mW/cm². Como nenhuma alteração foi verificada, não foram realizadas outras análises e conclui-se que mesmo para doses altas (quando comparado à literatura) (13), não há efeitos nos estados respiratórios. Na literatura científica, como indicam Gniadecki *et al.* e Schauen *et al.* mitocôndrias de células HeLa e queratinócitos, respectivamente, apresentam maior produção de H₂O₂ e disfunções na atividade da CTE decorrente da irradiação com UV-A em doses que variaram de 4 - 65 mW/cm². (25, 117) Enquanto que, em mitocôndrias de fígado de camundongo, não foram encontrados dados que reportem alterações dos estados respiratórios nas condições experimentais adotadas neste estudo. Embora a radiação no UV-A seja conhecida por causar oxidação de lipídios (118), o que poderia levar a danos indiretos na respiração mitocondrial os resultados não indicam que as doses oferecidas tenham potencial de oxidação lipídica. Assim, os efeitos observados em mitocôndrias, de células HeLa e queratinócitos, podem ter relação com a diferente composição lipídica que as mitocôndrias podem apresentar para cada tipo de célula. (119) Além disso, a irradiação das células podem induzir efeitos diversos daqueles observados em mitocôndrias isoladas. Uma vez que o ambiente celular pode oferecer outras condições para a resposta mitocondrial, enquanto a resposta de mitocôndrias isoladas são limitadas exclusivamente à sua estrutura, como organela.

5.3 Micro-ondas: efeitos em mitocôndrias isoladas

5.3.1 Resultados - mitocôndrias em meio de reação

As amostras, de mitocôndrias isoladas, foram irradiadas, com micro-ondas, em quatro doses (0,056; 0,085; 0,113 e 0,141 kJ/g). Sendo que as doses 0,085; 0,113 e 0,141 kJ/g apresentam aumento da temperatura da amostra tratada, foi realizado também um estudo que investigou as alterações, nos estados respiratórios mitocondriais, devido ao aumento de temperatura apenas por indução térmica, ou seja, as amostras não foram irradiadas, mas sim aquecidas em banho-maria até atingir a temperatura correspondente à dose de micro-ondas. Uma amostra controle, em temperatura ambiente, foi também utilizada para fins de comparação. Assim, será possível avaliar as diferenças das alterações causadas pelo efeito das micro-ondas e da temperatura, separadamente. A Tabela 3 a seguir, apresenta a relação dose (micro-ondas, kJ/g) e temperatura em °C. Complementarmente a Figura 49A mostra os dados para o CR, E3, E4 e ED normalizados em relação ao controle.

Tabela 3 – Relação dose x temperatura, irradiação com micro-ondas. Temperatura inicial de $25 \pm 0,5$ °C.

Dose (kJ/g)	Temperatura final (°C)
0,056	$25,5 \pm 0,5$
0,085	$37,3 \pm 0,5$
0,113	$40,1 \pm 0,5$
0,141	$44,3 \pm 0,5$

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Resultados - Micro-ondas

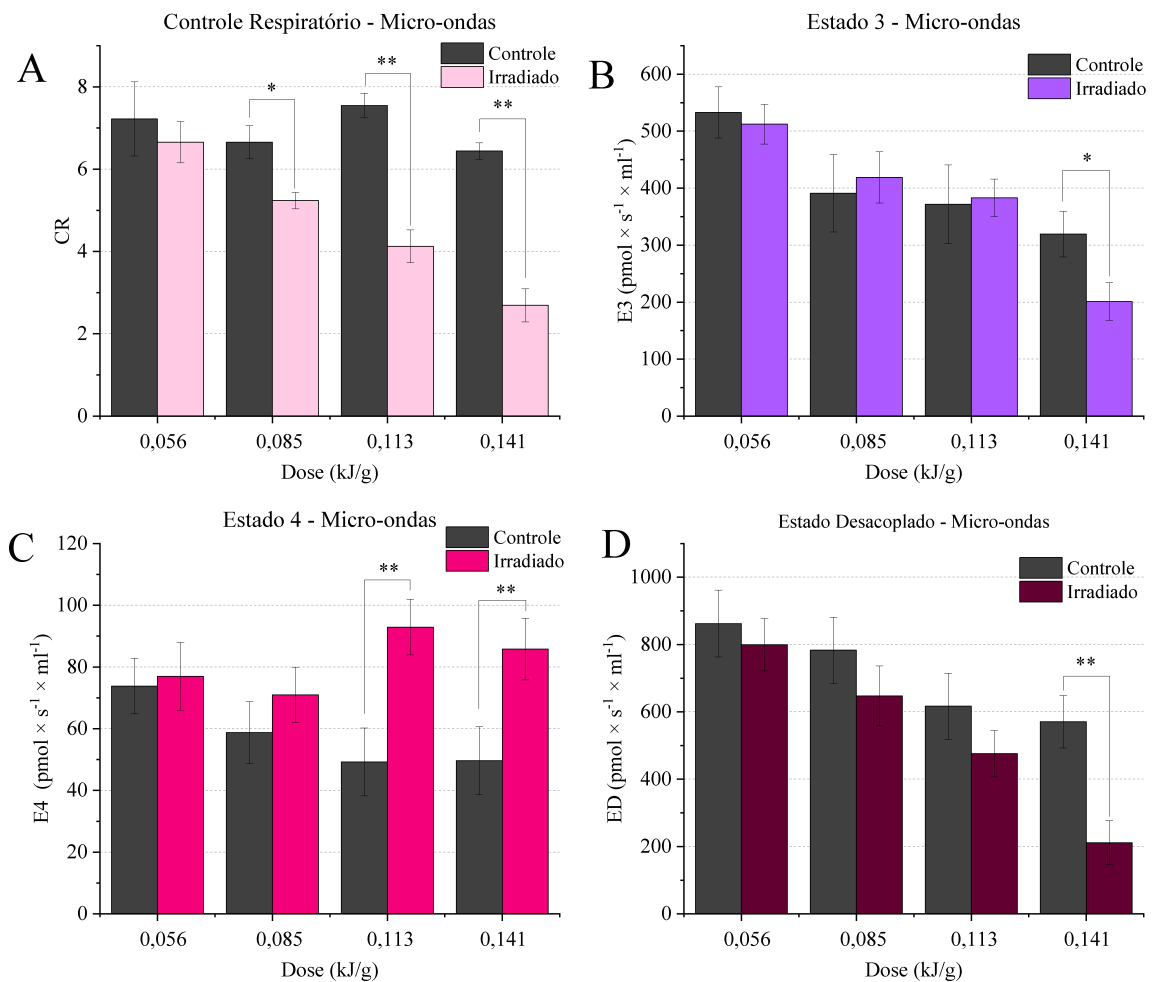


Figura 31 – Estados respiratórios em função da dose (kJ/g) para mitocôndrias isoladas em meio de reação. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1} \text{ml}^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. *valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de investigar possíveis efeitos, em mitocôndrias isoladas, devido a exposição ao intervalo, da radiação eletromagnética, no espectro do micro-ondas, experimentos de respiração mitocondrial foram realizados. A Figura 31 apresenta o controle respiratório, Estado 3, Estado 4 e o estado acoplado, respectivamente no painel A, B, C e D. Para amostras irradiadas (barras coloridas) e controles (barras cinzas).

5.3.3 Discussão - Micro-ondas

A Figura 31, apresenta alterações no controle respiratório, painel A, para amostras irradiadas e controles, são observadas para as doses 0,085; 0,113 e 0,141 kJ/g, diminuições de cerca de 30, 50 e 60%, respectivamente. O E3, painel B, apresenta diminuição significativa, cerca de 40%, apenas em 0,141 kJ/g, em relação ao controle. O E4, painel C, apresenta aumento significativo, cerca de 70 e 60% nas duas maiores doses 0,113 e 0,141 kJ/g respectivamente, enquanto o estado desacoplado, painel D, apresenta diminuição em todas as doses, contudo, estatisticamente significativa apenas em 0,141 kJ/g, cerca de 70%. Vale destacar que todos os efeitos apresentados são, em comparação com uma amostra controle não irradiada e que permaneceu em temperatura constante de 25 °C antes do experimento no oxígrafo. Portanto, todas as alterações se devem, provavelmente, não apenas devido irradiação com micro-ondas, mas da combinação com o aumento da temperatura, como apresentado na Tabela 3. A diminuição do CR, indica perda da viabilidade das funções mitocondriais, como já discutido. Atrélado as alterações do CR, temos que o E3 é menor apenas para a dose 0,141 kJ/g. Que, por sua vez, pode apontar para a capacidades de fosforilação oxidativa, em estado acoplado, ou seja tanto a CTE e a ATPase estão em atividade. Desta forma, quando o resultado tratado, comparada ao controle, não apresentam valores próximos, pode indicar perda ou ganho da capacidade de fosforilação. Neste caso, o E3 é menor em relação ao controle, o que pode ser um indicativo de menor capacidade de fosforilação oxidativa, que pode estar atrélado ao desacoplamento total ou parcial dos estados respiratórios, vazamento de prótons, inchamento mitocondrial, entre outros. Enquanto que o estado E4, é maior em relação ao controle, para as duas maiores doses aplicadas, 0,113 e 0,141 kJ/g. O E4 pode indicar alterações no vazamento de prótons, de modo que se o E4 estiver aumentado pode ser indicativo de perda (parcial) da capacidade de manter a força próton-motriz (FPM). (120) Os coeficientes de controle e eficiência, E-L, P-L e UCR são apresentados na Figura 33. A eficiência de acoplamento (E-L), painel A, possui valores alterados em relação ao controle, para as doses 0,085; 0,113 e 0,141 kJ/g. Cujo a diminuição da eficiência de acoplamento indica que a amostra possui menor preservação de acoplamento, o que é refletido indiretamente no CR, que possui as mesmas três doses alteradas, são todas menores em relação ao controle. O controle de eficiência (P-L), pode ser indicativo de limitações do sistema de fosforilação, decorrente de disfunções na CTE ou na ATPase. Os resultados apresentados no painel B, mostram menor controle de eficiência para as doses 0,085; 0,113 e 0,141 kJ/g, quando comparado ao controle. Indicando limitações no sistema de fosforilação oxidativa. O controle

de desacoplamento, painel C, também apresenta diminuição em relação ao controle, para as mesmas três maiores doses (0,085; 0,113 e 0,141 kJ/g), indicando possíveis dissipação de energia ao logo do sistema de fosforilação. Estas disfunções estão ligadas ao possível desacoplamento das mitocôndrias nesta condição. Neste caso, podemos investigar qualitativamente o potencial de membrana com experimento de inchamento mitocondrial, apresentados mais à frente. Em resumo, os parâmetros E-L, P-L e UCR juntos, indicam que menos ATP é formado, e a produção de EROs é aumentada.

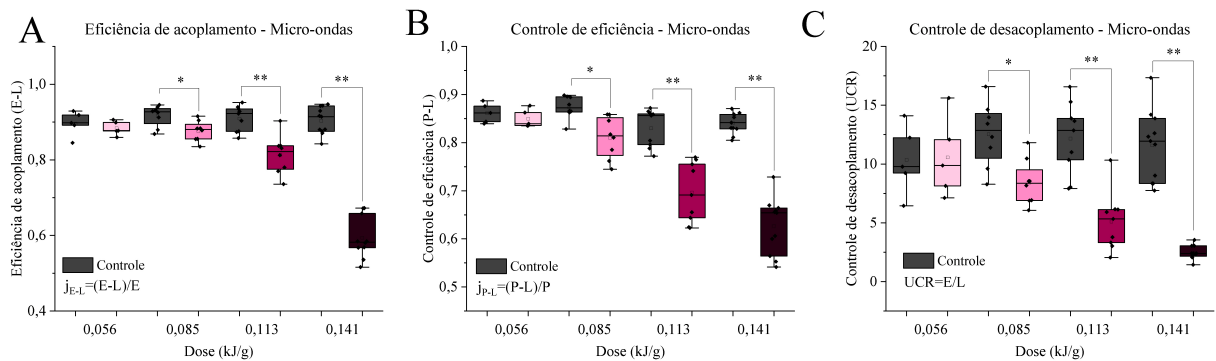


Figura 32 – A) eficiência de acoplamento (E-L), indica perda da preservação de acoplamento da transferência de elétrons para a fosforilação de ADP; B) controle de eficiência (P-L), indica limitação do sistema de fosforilação oxidativa; C) controle de desacoplamento (UCR), indica falhas no acoplamento mitocondrial, quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E3, E4 e ED. *valores significativos com $p < 0,05$; **valores significativos com $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pela autora.

As taxas de decaimento do CR e do ED são apresentados na Figura 33. Em dados normalizados em relação ao respectivo controle, podem indicar a relação entre dose e efeito. Ambos os parâmetros estão decaindo (quando comparados ao respectivo controle) à medida em que a dose é aumentada. A taxa de decaimento, aproximadamente linear, para o CR é de $-6,3 \pm 0,6$, apresentado no painel A. Enquanto que a taxa de decaimento para o ED, painel B, é de $-6,5 \pm 0,9$, observa-se que tanto o CR quanto o ED decaem, aproximadamente, com a mesma taxa.

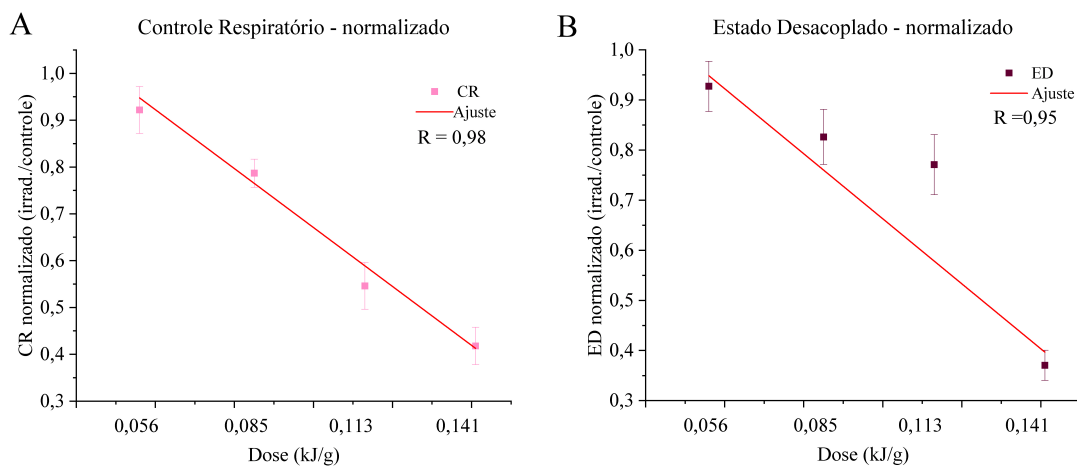


Figura 33 – Ajustes para CR e ED normalizados, irradiado/controle. A) Controle respiratório normalizado apresenta decaimento, aproximadamente linear, com taxa de $-6,3 \pm 0,6$. B) Estado desacoplado apresenta decaimento, aproximadamente linear, de $-6,5 \pm 0,9$. O ajuste apresenta R^2 (fator de qualidade de ajuste) de 0,98 e 0,95.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.4 Resultado - Inchamento

Medidas de absorvância para amostras de mitocôndrias irradiadas com micro-ondas, em diferentes doses são apresentadas na Figura 34. Os controles estão representados em linhas tracejadas. As curvas irradiadas, linhas contínuas, apontam maior decaimento em relação aos controles, onde $d1=0,056$; $d2= 0,085$, $d3=0,113$ e $d4=0,141$ kJ/g.

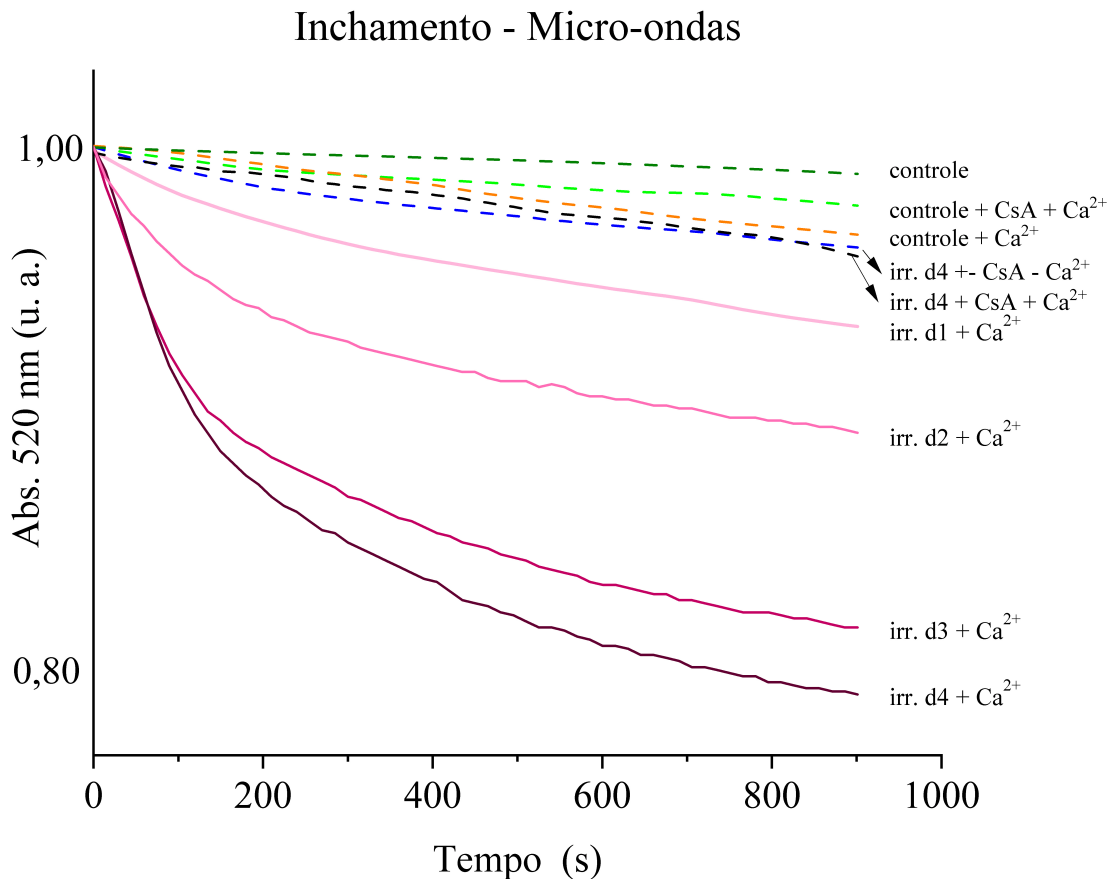


Figura 34 – A) Dados de inchamento mitocondrial, em unidades arbitrárias. Para cada temperatura pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca^{2+} (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca^{2+} (linha tracejada laranja): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle irradiado (linha tracejada azul): mitocôndria irradiada com ou sem CsA na ausência de cálcio; controle irradiado (linha tracejada cinza): mitocôndria irradiada com CsA na presença de cálcio ($100 \mu\text{M}$). $d_1=0,056$; $d_2=0,085$, $d_3=0,113$ e $d_4=0,141$ kJ/g

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.5 Discussão - Inchamento

O inchamento apresentado na Figura 34 aumenta em função da dose, de modo que ocorre maior inchamento, quando comparado ao controle, especialmente para amostras irradiadas com as doses $d_2=0,085$, $d_3=0,113$ e $d_4=0,141$ kJ/g. Quando comparados ao controle, o E4 foi aumentado nas mesmas doses. O aumento do E4 pode ter diferentes razões (121), mas é dirigido principalmente pelo vazamento de prótons para dentro da matriz. Enquanto o ED é significativamente menor, em relação ao controle, na maior dose $0,141$ kJ/g, o que pode indicar perda da força protomotriz. Houve maior sensibilidade ao cálcio para as maiores doses, enquanto

que a menor dose, 0,056 kJ/g, possui menor sensibilidade ao cálcio, também é a mesma dose que não possui aumento da temperatura durante a irradiação. Observa-se ainda, correlação linear entre dose e efeito, ou seja, quanto maior a dose maior é o inchamento na população mitocondrial estudada. O experimento de inchamento visa testar a capacidade, da organela, em regular a passagem de cálcio. Estudos demonstram que a passagem de cálcio pelos canais específicos dependem da preservação do potencial de membrana gerada pela CTE. (109–111) Ao passo que o excesso de cálcio, no meio externo à mitocôndria, pode induzir a permeabilidade de transição mitocondrial. Como observado nos resultados dos estados respiratórios, a força próton-motriz e a preservação da eficiência energética são prejudicadas devido a irradiação com micro-ondas para as doses 0,085, 0,113 e 0,141 kJ/g, o que corresponde ao inchamento mitocondrial, na presença de cálcio, observado para as mesmas doses. Os resultados de inchamento indicam, portanto, que quanto maior a dose de micro-ondas aplicada, maior é a probabilidade da organela liberar citocromo C, o que em condições fisiológicas levaria à morte celular via mitocondrial, por apoptose ou necrose. (116)

5.4 Temperatura: efeito em mitocôndrias isoladas

5.4.1 Resultados - Temperatura

A fim de investigar efeitos causados na bioenergética mitocondrial, devido a alterações térmicas, correspondentes à variação de temperatura observada na irradiação com micro-ondas, amostras de mitocôndria incubada foram aquecidas e imediatamente depois dispostas no oxígrafo. Os resultados do controle respiratório, Estado 3, Estado 4 e Estado desacoplado, respectivamente no painel A, B, C e D, para amostras aquecidas em diferentes temperatura, 37, 44 e 50 °C, são apresentados na Figura 33, com relação à amostras controles (sem variação de temperatura). Complementarmente a Figura 50A mostra os dados para o CR, E3, E4 e ED normalizados em relação ao controle.

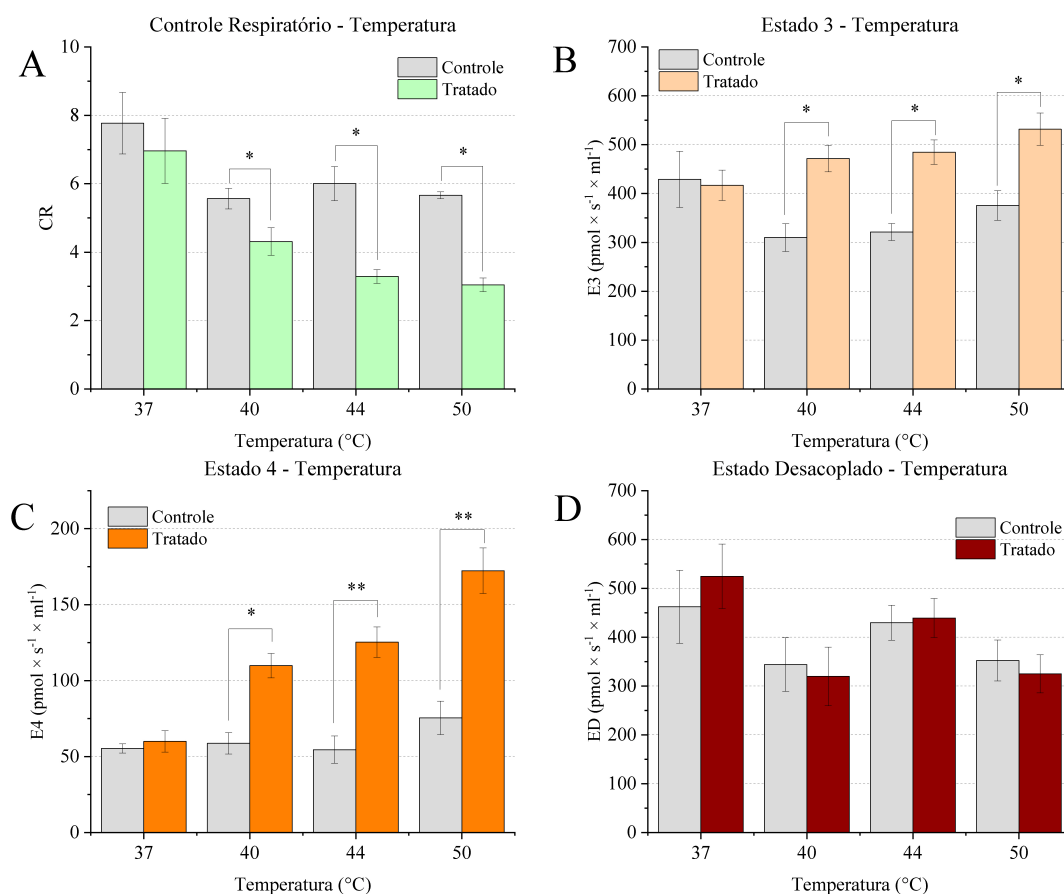


Figura 35 – Estados respiratórios em função da temperatura (°C) para mitocôndrias isoladas em meio de reação. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em $\text{pmol s}^{-1}\text{ml}^{-1}$. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. *valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.2 Discussões - Temperatura

A Figura 35 apresenta, no painel A, o CR com variações significativas para as temperaturas 40, 44 e 50 °C, sendo esta última, a temperatura padrão no tratamento de ablação hepática por micro-ondas (122). O CR decresce cerca de 20, 50 e 40% respectivamente. O E3, painel, B sofre aumento significativo nas três maiores temperatura, em cerca de 40, 50 e 48% respectivamente. O E4, painel C, sofre aumento nas mesmas temperaturas, em cerca de 220, 250 e 300 %, quando comparados ao controle. Enquanto que o ED, painel D, não apresenta variações estatisticamente significativas para nenhuma temperatura.

Como já apresentado anteriormente, o E3 alterado está diretamente relacionado a capacidade de fosforilação oxidativa, em alguns casos pode indicar aumento da capacidade de acoplamento.

Diferentemente do E3, observado nos resultados para mitocôndrias irradiadas com micro-ondas, não apresentam aumento, mas sim diminuição em 0,141 kJ/g apenas. (123) Contudo, no caso de mitocôndrias tratadas com calor, todos os estados indicam, que nessas condições experimentais, o aumento do E3 pode estar atrelado ao aumento das velocidades de reação devido a maior atividade enzimática do sistema, o que poderia indicar o aumento do E3. (124)

Além disso, o aumento do E3, no caso do tratamento térmico, não se deve pela maior capacidade de acoplamento, mas sim pela perda dessa capacidade, pois O E4 é significativamente aumentado, indicando possível perda da força próton-motriz. Este fato indicaria menor produção energética em forma de ATP, como é mostrado no estudo térmico de mitocôndrias de fígado de mamífero, por Muleme *et al.* com variações térmicas de 25-37 °C.(125) O parâmetro de eficiência de acoplamento apresentado na Figura 37, painel A, apresenta significativa queda da eficiência em função da temperatura. O controle de eficiência, painel B também apresenta queda em função da temperatura, e o mesmo se dá com o controle de desacoplamento. Assim, pode-se afirmar que o aumento do E3 e do E4 são indicativos de perda da capacidade de fosforilação e perda da eficiência de acoplamento.

O ED, por outro lado, não apresenta alterações significativas em nenhuma temperatura. Os parâmetros E-L, P-L e UCR são apresentados, na Figura 37, com o intuito de apresentar mais informações acerca da eficiência de acoplamento e desacoplamento, em função da temperatura. No painel A, a eficiência de acoplamento diminui significativamente para 40, 44 e 50 °C. Indicando perda da preservação do acoplamento na transferência de elétrons pela CTE. Enquanto que no painel B, o controle de eficiência apresenta nas mesmas temperaturas citadas acima, possível limitação de fosforilação oxidativa devido ao próprio sistema de fosforilação. O controle de desacoplamento, UCR, apresentado no painel C, mostra possíveis falhas no acoplamento no sistema de fosforilação.

A fim de comparar as taxas de decaimento e crescimento em comparação com os resultados apresentado para micro-ondas, a Figura 36 mostra o CR, E3 e E4 normalizados.

A taxa de decaimento do CR, ajustado por uma exponencial de decaimento, em função da temperatura, painel A. Quando comparado ao CR em função das doses de micro-ondas, o CR normalizado devido a efeitos térmicos decai mais lentamente. O que indica menor impacto no CR quando amostras são apenas aquecidas, nas mesmas temperaturas observadas nos experimentos com micro-ondas. Diferentemente dos resultados obtidos para amostras irradiadas com micro-ondas, onde o ED foi afetado e, descrito por uma reta, não são observadas alterações no ED devido à variação térmica. Contudo, há alterações no E3, painel B, de modo que a curva que melhor ajusta os dados é uma exponencial de crescimento, seguido de uma região de estagnação. E no E4, a curva que melhor ajusta os dados normalizados é uma polinomial de grau 2, onde observa-se uma região de crescimento (40 e 44 °C) seguido de um decréscimo (50 °C).

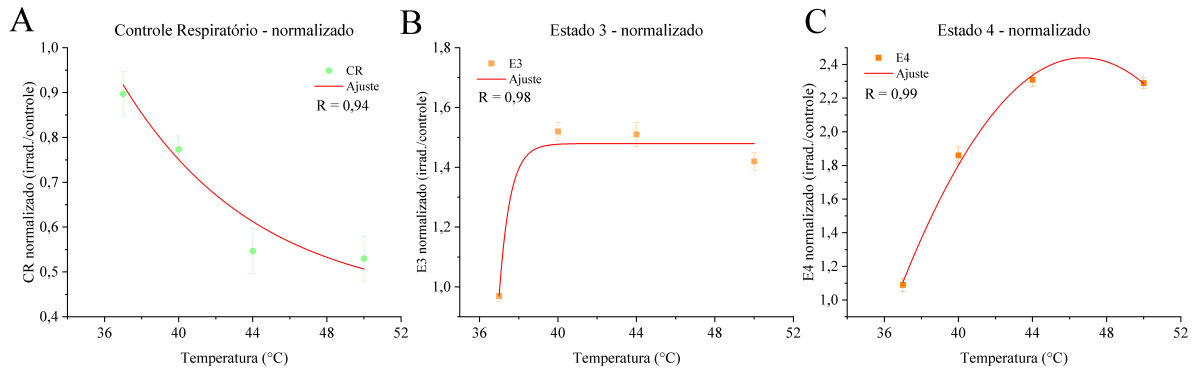


Figura 36 – Ajustes para CR, E3 e E4 normalizados, irradiado/controlado. A) Controle respiratório normalizado apresenta decaimento exponencial. B) Estado 3 apresenta comportamento de descimento e estagnação, ajustado por uma exponencial de crescimento. C) Estado 4 apresenta comportamento de crescimento e seguido de queda, ajustado por polinômio de segundo grau. Os ajustes apresentam R^2 (fator de qualidade de ajuste) de 0,94, 0,98 e 0,99 respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

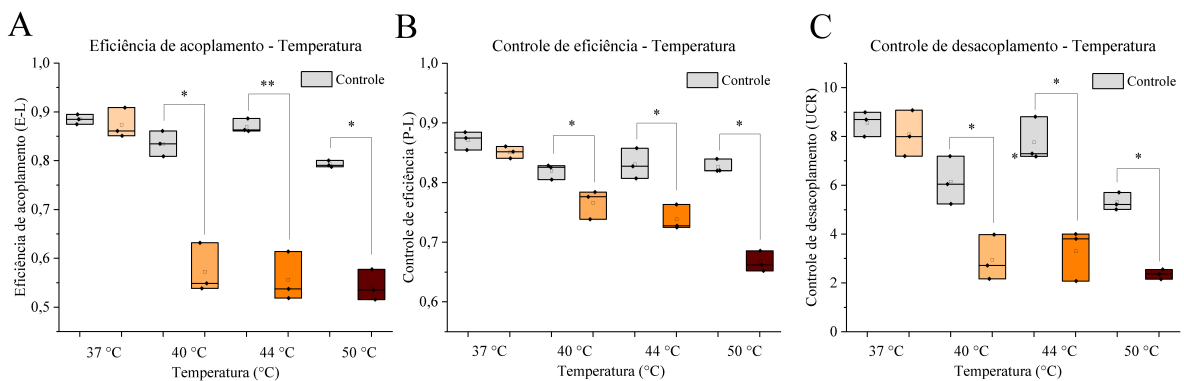


Figura 37 – A) eficiência de acoplamento (E-L), indica perda da preservação do acoplamento da transferência de elétrons para a fosforilação de ADP; B) controle de eficiência (P-L), indica possíveis limitações impostas às reações de fosforilação oxidativa, decorrente do sistema de fosforilação; C) controle de desacoplamento (UCR), indica falhas no acoplamento mitocondrial, quanto maior o valor mais acoplado é o sistema. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados brutos dos estados respiratórios E3, E4 e ED. *valores significativos com $p < 0,05$; **valores significativos com $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pela autora.

As alterações térmicas induzidas, em mitocôndrias, podem levar a variações nas velocidades das reações químicas que nela ocorrem, ex. transformação de ADP em ATP, oxidação de substratos, etc. O aumento da temperatura, pode levar a possíveis desnaturação de proteínas, que podem ser degradadas a partir de 40 °C. (126–128)

5.4.3 Resultado - inchamento

Experimentos de inchamento mitocondrial foram realizados para amostras aquecidas em quatro temperaturas, 37, 40, 44 e 50 °C. As curvas de absorbância são apresentadas na Figura 38. Os controles estão representados em linhas tracejadas. As curvas em linhas contínuas, indicam amostras em diferentes temperaturas. Observa-se maior decaimento em relação aos controles, a amostra aquecida na maior temperatura. Vale ressaltar que as amostras tratadas, tiveram suas temperaturas elevadas, e ao atingir a variação térmica desejada o aquecimento é imediatamente cessado. O experimento de inchamento mitocondrial, portanto, é realizado à temperatura ambiente. As variações que a Figura 38 apresenta, referem-se ao aquecimento prévio, de modo que o experimento é iniciado quando as amostras retornaram à temperatura ambiente.

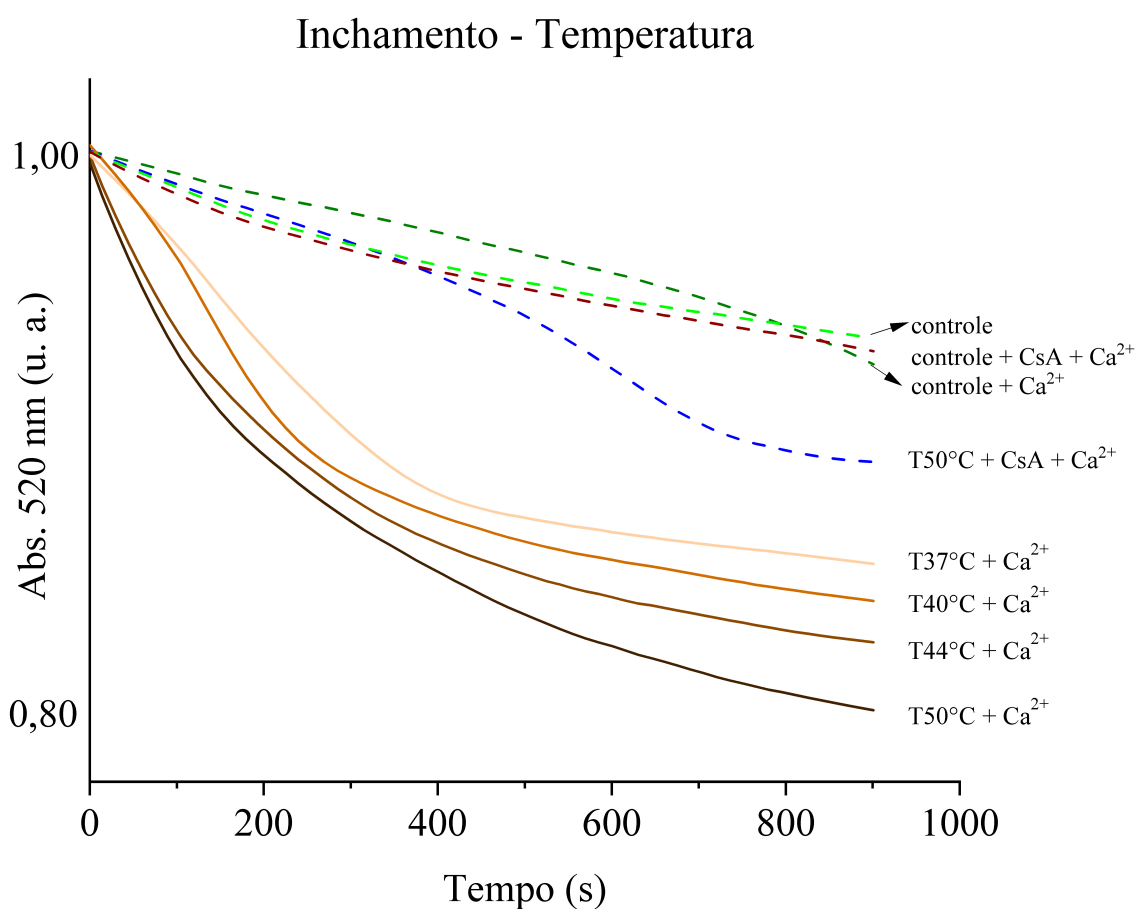


Figura 38 – A) Dados de inchamento mitocondrial, em unidades arbitrárias. Para cada temperatura pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Controle (linha tracejada verde claro): mitocôndria controle não irradiada; controle + CsA + Ca²⁺ (linha tracejada verde escuro): mitocôndria controle na presença do inibidor CsA e de cálcio; controle + Ca²⁺ (linha tracejada vinho): controle na presença de cálcio sem inibidor; controle tratado (linha tracejada azul): mitocôndria tratada com CsA e Ca²⁺ (100 μ M).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.4 Discussão - inchamento

O inchamento apresentado na Figura 38, aumenta em função da temperatura. De modo que ocorre maior inchamento, quando comparado ao controle, para a amostra em 50 °C. Diferentemente das alterações do ED para amostras irradiadas com micro-ondas, o ED em função do aumento de temperatura não apresentou alterações significativas, quando comparados ao controle.

Contudo, o E4, sofre aumento significativo em 40, 44 e 50 °C. Este aumento pode ter diferentes razões (121), mas é dirigido principalmente pelo vazamento de prótons para dentro da matriz, o que parece ser corroborado pelo resultado de inchamento mitocondrial. (129) Segundo Packer *et al.* o aumento da temperatura pode afetar diretamente o pH mitocondrial, e levar a perda do potencial eletroquímico. (130) Os resultados de inchamento mostram maior sensibilidade ao cálcio nas mesmas temperaturas em que o E4 foi aumentado. Como já discutido anteriormente a abertura de poros (devido a presença de cálcio) está diretamente ligada ao processo de necrose ou apoptose celular via mitocondrial, através da liberação de citocromo C. Os resultados apresentados indicam que quanto maior a temperatura maior é a disposição, da organela, de liberar citocromo C.

5.5 Discussão geral

Em suma, a radiação X foi capaz de estimular o E3, fosforilação oxidativa, nas menores doses aplicadas, apenas na condição de irradiação no tecido hepático (fígado). Mas não alterou o E3 na condição "gota". O parâmetro de preservação de acoplamento (E-L), não foi alterado para a condição de irradiação "fígado", mas foi estimulado na condição "gota". O controle de eficiência (P-L), limitação do sistema de fosforilação oxidativa, foi estimulado na condição "fígado" e não apresentou alterações na condição "gota". O controle de desacoplamento (UCR), dissipação de energia, foi estimulado em ambas as condições de irradiação. Os resultados de inchamento mitocondrial apresentam que amostras irradiadas com baixas doses (0,10-1,00 Gy) são mais suscetíveis ao inchamento do que aquelas irradiadas com doses maiores 2,00; 5,00 e 10,00 Gy. O que pode ser um indicativo de perda da capacidade seletiva da MI. Contudo, este efeito pode ser atenuado durante o experimento de respiração mitocondrial, devido a alta atividade bioenergética que as organelas apresentam.

No ultravioleta, no espectro do UV-A não foram observadas alterações nos estados respiratórios mitocondrial. Enquanto no UV-C observou-se inibição da fosforilação oxidativa. A eficiência de acoplamento decai proporcionalmente a dose de irradiação. O mesmo ocorre para os controles de eficiência e desacoplamento, decaem linearmente com a dose. Os resultados de inchamento mitocondrial indicam relação linear entre dose e permeabilização da membrana interna, se tornando mais suscetível ao inchamento conforme a dose aumenta. O que corrobora com o E4, de UV-C, que indica possíveis danos à MI em decorrência da irradiação ultravioleta.

No micro-ondas observa-se inibição da fosforilação oxidativa. Enquanto que a eficiência de acoplamento decai proporcionalmente a dose de irradiação. Os controles de eficiência e desacoplamento também decrescem linearmente conforme a dose aumenta. Os resultados de inchamento mitocondrial mostram que quanto maior a dose de micro-ondas, mais facilitada é a entrada de água na matriz mitocondrial. Quando tratamos termicamente amostras de mitocôndria incubadas, verificou-se estimulação, proporcionalmente a temperatura, da fosforilação oxidativa. Mas, tanto a eficiência de acoplamento quanto os controles de eficiência e desacoplamento decresceram a medida que a temperatura aumenta. O Quadro 2 apresenta o resumo dos resultados obtidos para a fosforilação oxidativa, eficiência de acoplamento e controles de eficiência e desacoplamento e inchamento mitocondrial, correlacionando à radiação e sua respectiva energia média em eV.

Quadro 2 – Resumo de resultados obtidos para as radiações eletromagnéticas utilizadas e os parâmetros de eficiência de acoplamento e controles de eficiência e desacoplamento. Desempenho da fosforilação oxidativa, FOX. +/-: apresentou uma dose (1,00 Gy) em que o P-L e UCR é menor quando comparado ao controle. +: maior em relação ao controle. -: menor em relação ao controle. >: maior inchamento quando comparado ao controle.

Radiação/tratamento	Energia média do fóton (eV)	Eficiência de acoplamento (E-L)	Controle de eficiência (P-L)	Controle de desacoplamento (UCR)	FOX	Inchamento
Raio X (fígado)	60×10^3	Sem alteração	+/-	+/-	Estimulada/ inibida	>
Raio X (gota)		+	Sem alteração	+	Sem alteração	>
UV-A	3	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
UV-C	5	-	-	-	Inibida	>
Micro-ondas	1×10^{-5}	-	-	-	Inibida	>
Temperatura	-	-	-	-	Estimulada	>

Fonte: Elaborada pela autora.

No que diz respeito à viabilidade mitocondrial, os resultados indicaram melhora, em mitocôndrias irradiadas, para doses menores de 1 Gy, em ambas as condições de irradiação com raios X. Enquanto apresenta queda de 15% apenas na condição de irradiação "fígado". Para doses superiores à 1 Gy, não há alterações na viabilidade mitocondrial em ambas as condições de irradiação. Mitocôndrias irradiadas por ondas longas de ultravioleta, UV-A, não apresentaram alteração, em nenhuma dose estudada, para a viabilidade mitocondrial. Enquanto que, para mitocôndrias irradiadas com ondas curtas, UV-C, produziu decréscimo da viabilidade à medida em que a dose aumentou. O mesmo é observado para mitocôndrias isoladas, irradiadas por micro-ondas ou tratadas termicamente, contudo à uma taxa menor quando comparada ao decréscimo da viabilidade mitocondrial observada no UV-C. A Figura 39 esquematiza o comportamento da viabilidade mitocondrial em função da radiação eletromagnética.

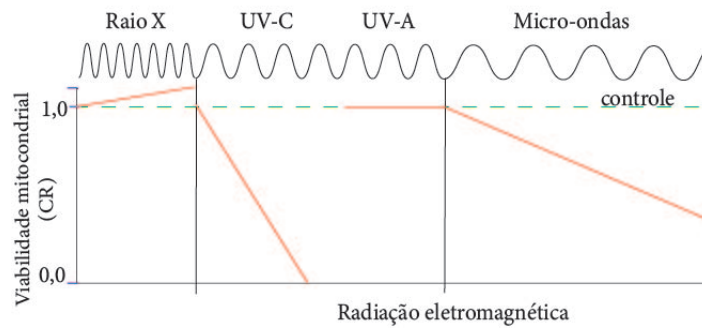


Figura 39 – Esquematização da resposta bioenergética mitocondrial (CR, linha vermelha), com relação ao controle (linha tracejada verde) em função da radiação eletromagnética.

Fonte: Elaborada pela autora.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Conclusões

Diferentes intervalos da radiação eletromagnética apresentam distintos valores de energia associados ao comprimento de onda, e conseqüentemente podem levar à diferentes efeitos em sistemas biológicos. Os objetivos deste estudo perpassaram pela análise dos efeitos bioenergéticos em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo, referentes aos três estados respiratórios mitocondriais: E3, E4 e ED. A resposta entre dose (tratamento) e efeito (na respiração) imediatamente após a irradiação, foram avaliados. Quando mitocôndrias foram irradiadas com radiação X, em duas condições distintas, observou-se alterações bioenergéticas, especialmente em baixas doses (0,10 - 0,50 Gy). Os parâmetros de E-L e UCR indicaram, tanto para mitocôndrias irradiadas no fígado, quanto para mitocôndrias irradiadas após o isolamento, maior acoplamento e menor dissipação de energia. Além disso, os experimentos de inchamento mitocondrial apresentaram maior sensibilidade ao cálcio em amostras irradiadas nas menores doses. As alterações dos estados respiratórios estudados não apresentam relação direta entre dose (Gy - de radiação X) e efeito seja no CR, ou nos estados respiratórios.

Para mitocôndrias incubadas em meio de reação com substratos, irradiadas com UV-C, observou-se alterações significativas nos estados respiratórios, indicando perda da capacidade bioenergética mitocondrial. Os parâmetros E-L, P-L e UCR indicaram perda da eficiência de acoplamento, limitação da fosforilação oxidativa imposta pelo sistema e aumento da dissipação de energia. Os experimentos de inchamento mitocondrial indicaram possíveis danos na MI, e conseqüentemente perda da permeabilidade seletiva. A resposta entre dose e efeito, nessas condições, se mostram linearmente relacionadas, especialmente no CR. Diferentemente dos efeitos observado em UV-C, amostras irradiadas, com UV-A, nas mesmas condições não apresentaram alterações estatisticamente significativas em nenhuma dose.

Mitocôndrias incubadas nas mesmas condições que as apresentadas em UV-C e UV-A, irradiadas com micro-ondas apresentaram aumento da temperatura nas três maiores doses (0,085; 0,113 e 0,141 kJ/g). Em decorrência da radiação no micro-ondas e do aumento da temperatura, observou-se queda expressiva do CR em função da dose, bem como perda da eficiência de acoplamento, limitação da fosforilação oxidativa imposta pelo sistema e aumento da dissipação de energia, apresentados pelos parâmetros (E-L, P-L e UCR, respectivamente). Os experimentos de inchamento indicaram possíveis danos na MI. A resposta entre dose e efeito, nessas condições, se mostraram linearmente relacionadas. Finalmente, uma breve investigação dos efeitos térmicos, para fins de comparação com os dados obtidos em irradiação com micro-ondas, indicou que os efeitos exclusivamente térmicos são diferentes daqueles observados em micro-ondas.

Especialmente no ED, onde não sofreu alteração estatisticamente significativa em ne-

nhuma temperatura. Quando comparadas, as taxas de decaimento do CR normalizado, entre os efeitos térmicos e efeitos devido a radiação no micro-ondas, temos que a taxa devido aos efeitos térmicos, decaiu muito mais rapidamente que a taxa devido aos efeitos das micro-ondas. Podendo ser um indicativo de menor perda das capacidades bioenergéticas das amostras irradiadas com micro-ondas, quando comparadas às amostras aquecidas. Observou-se também uma resposta linear entre temperatura e efeito, tanto nos estados respiratórios 3 e 4, quanto no CR.

Em resumo, este estudo pode contribuir para a ampliação do entendimento acerca dos efeitos causados pelo raio X, ultravioleta e micro-ondas na bioenergética de mitocôndrias isoladas. Podendo, no futuro, levar à otimização da radioterapia, da fototerapia por UV e da terapia de ablação por micro-ondas, uma vez que são conhecidas as alterações na viabilidade mitocondrial, determinadas sistematicamente para doses equivalentes àquelas empregadas nas terapias citadas.

6.2 Perspectivas

A partir deste estudo é possível aplicar diversas abordagens para investigar mais detalhadamente quais elementos, na organela, sofrem maior interação com as radiações eletromagnéticas. As membranas mitocondriais (interna e externa) podem ser a chave para uma melhor investigação dos efeitos eletromagnéticos. Medidas do potencial de membrana, permitiria calcular a energia livre contida nas mitocôndrias tratadas em comparação com o controle. Além disso, a atividade enzimática de cada um dos complexos, bem como o uso de rotinas de respiração mitocondrial mais completas, por exemplo, com o uso de citocromo c, e/ou substratos do CII poderiam enriquecer o estudo e complementá-lo, levando à uma maior compreensão dos efeitos observados nestes espectros da radiação eletromagnética. Outra abordagem possível é a investigação em cultura de célula ou em biópsia, cuja condição poderia incluir respostas combinadas, decorrentes do meio celular e as mitocôndrias. Além disso, a partir dos resultados deste estudo para a interação de mitocôndrias e a radiação X pode-se avançar na aplicação e no entendimento da radio-fototerapia em baixas doses no tratamento de tumores internos e a importância das mitocôndrias neste tipo de terapia.

REFERÊNCIAS

- 1 GRIFFITHS, E. J. Mitochondria—potential role in cell life and death. **Cardiovascular Research**, v. 46, n. 1, p. 24–27, 2000. DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00020-1.
- 2 KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, n. 1, p. 619–642, 1998.
- 3 PRATICÒ, D. Alzheimer’s disease and oxygen radicals: new insights. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 563–567, 2002. DOI: 10.1016/S0006-2952(01)00919-4.
- 4 WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 359, 2005. DOI:10.1146/annurev.genet.39.110304.095751.
- 5 THAR, R.; KÜHL, M. Propagation of electromagnetic radiation in mitochondria? **Journal of Theoretical Biology**, v. 230, n. 2, p. 261–270, 2004. DOI: 10.1016/j.jtbi.2004.05.021.
- 6 THARIAT, J. *et al.* Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 1, p. 52–60, 2013. DOI: 10.1038/nrclinonc.2012.203.
- 7 REGATO, J. A. D. **Radiological oncologists: the unfolding of a medical specialty**. Virginia: Radiology Centennial, 1993.
- 8 CONNELL, P. P.; HELLMAN, S. Advances in radiotherapy and implications for the next century: a historical perspective. **Cancer Research**, v. 69, n. 2, p. 383–392, 2009. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6871.
- 9 GADZHIMAGOMEDOVA, Z. *et al.* Nanocomposites for x-ray photodynamic therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4004, 2020.
- 10 YANG, Y.-L.; LIN, K.; YANG, L. Progress in nanocarriers codelivery system to enhance the anticancer effect of photodynamic therapy. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1951, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111951.
- 11 LI, N. *et al.* A mitochondria-targeted nanoradiosensitizer activating reactive oxygen species burst for enhanced radiation therapy. **Chemical Science**, v. 9, n. 12, p. 3159–3164, 2018. DOI: 10.1039/C7SC04458E.
- 12 CARBONE, L. D. *et al.* 25-hydroxyvitamin d, cholesterol, and ultraviolet irradiation. **Metabolism**, v. 57, n. 6, p. 741–748, 2008. DOI: 10.1016/j.metabol.2008.01.011.
- 13 DJAVAHERI-MERGNY, M. *et al.* Uv-a irradiation induces a decrease in the mitochondrial respiratory activity of human nctc 2544 keratinocytes. **Free Radical Research**, v. 34, n. 6, p. 583–594, 2001. DOI: 10.1080/10715760100300481.
- 14 FAN, X.; HUANG, R.; CHEN, H. Application of ultraviolet c technology for surface decontamination of fresh produce. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, p. 9–19, 2017. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.10.004.

- 15 PAZ, M. L. *et al.* Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet b irradiation in human keratinocytes. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, n. 3, p. 115–122, 2008. DOI: 10.1111/j.1600-0781.2008.00348.x.
- 16 SIMON, C. J.; DUPUY, D. E.; MAYO-SMITH, W. W. Microwave ablation: principles and applications. **Radiographics**, v. 25, n. suppl_1, p. S69–S83, 2005. DOI: 10.1148/rg.25si055501.
- 17 IZZO, F. *et al.* Radiofrequency ablation and microwave ablation in liver tumors: an update. **The Oncologist**, v. 24, n. 10, p. e990–e1005, 2019. DOI: 10.1634/theoncologist.2018-0337.
- 18 BRACE, C. L. Microwave tissue ablation: biophysics, technology, and applications. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 38, n. 1, 2010. DOI: 10.1615/CritRevBio-medEng.v38.i1.60.
- 19 DUTTON, M. S.; GALVIN, M. J.; MCREE, D. In vitro effects of microwave radiation on rat liver mitochondria. **Bioelectromagnetics**, v. 5, n. 1, p. 39–45, 1984. DOI: 10.1002/bem.2250050105.
- 20 SCHWARZ, H.; DREISBACH, L.; KLESCHICK, A. The effect of x-ray irradiation on the phospholipids of the liver mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 101, n. 1, p. 103–107, 1963. DOI: 10.1016/0003-9861(63)90540-X.
- 21 KAM, W. W.-Y.; BANATI, R. B. Effects of ionizing radiation on mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 607–619, 2013. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.024.
- 22 NI, K. *et al.* Nanoscale metal-organic frameworks for mitochondria-targeted radiotherapy-radiodynamic therapy. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-06655-7.
- 23 BARJAKTAROVIC, Z. *et al.* Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to x-rays. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. e27811, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027811.
- 24 BIRCH-MACHIN, M.; RUSSELL, E.; LATIMER, J. Mitochondrial dna damage as a biomarker for ultraviolet radiation exposure and oxidative stress. **British Journal of Dermatology**, v. 169, p. 9–14, 2013. DOI: 10.1111/bjd.12207.
- 25 GNIADECKI, R. *et al.* Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 80, n. 2, p. 216–222, 2001. DOI: 10.1002/1097-4644.
- 26 ELEY, D.; MAYER, R.; PETHIG, R. **Microwave Hall mobility measurements on heavy beef heart mitochondria**. New York: Springer, 1972. 389–402 p.
- 27 LI, Z. *et al.* Mitochondria morphologic changes and metabolic effects of rat hippocampus after microwave irradiation. **Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection**, v. 27, n. 6, p. 602–604, 2007.
- 28 HITCHCOCK, R. T. **Radio-frequency and microwave radiation**. Virginia: AIHA, 2004.
- 29 WEN, L. *et al.* Microwave pumped high-efficient thermoacoustic tumor therapy with single wall carbon nanotubes. **Biomaterials**, v. 75, p. 163–173, 2016. DOI:10.1016/j.biomaterials.2015.10.028.

- 30 DUTTON, M. S.; GALVIN, M. J.; MCREE, D. In vitro effects of microwave radiation on rat liver mitochondria. **Bioelectromagnetics**, v. 5, n. 1, p. 39–45, 1984. DOI: 10.1002/bem.2250050105.
- 31 BOTTJE, W. Oxidative metabolism and efficiency: the delicate balancing act of mitochondria. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 4223–4230, 2019.
- 32 ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology or the cell**. New York: Garland Science, 2002.
- 33 SCHULER, M.-H. *et al.* Phosphatidylcholine affects the role of the sorting and assembly machinery in the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 44, p. 26523–26532, 2015. DOI: 10.1074/jbc.M115.687921.
- 34 DAVID, L. *et al.* **Principles of biochemistry**. 3rd. ed. New York: Worth, 2000.
- 35 PAGLIARANI, A.; NESCI, S.; VENTRELLA, V. Modifiers of the oligomycin sensitivity of the mitochondrial f1f0-atpase. **Mitochondrion**, v. 13, n. 4, p. 312–319, 2013. DOI: 10.1016/j.mito.2013.04.005.
- 36 NESCI, S. *et al.* Sulfide affects the mitochondrial respiration, the ca^{2+} activated f1f0-atpase activity and the permeability transition pore but does not change the mg^{2+} activated f1f0-atpase activity in swine heart mitochondria. **Pharmacological Research**, v. 166, p. 105495, 2021. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105495.
- 37 MITCHELL, P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. **Science**, v. 206, n. 4423, p. 1148–1159, 1979. DOI: 10.1126/science.388618.
- 38 NICHOLLS, D. Mitochondrial bioenergetics, aging, and aging-related disease. **Science of Aging Knowledge Environment**, American Association for the Advancement of Science, v. 2002, n. 31, 2002.
- 39 PICARD, M. *et al.* Mitochondria: isolation, structure and function. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 18, p. 4413–4421, 2011. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.212712.
- 40 PANEL, M.; GHALEH, B.; MORIN, D. Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore. **Aging Cell**, v. 17, n. 4, p. e12793, 2018. DOI: 10.1111/accel.12793.
- 41 ST-PIERRE, J. *et al.* Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 44784–44790, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M207217200.
- 42 BERRY, B. J. *et al.* Use the protonmotive force: mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 21, p. 3873–3891, 2018. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.03.025.
- 43 SCHÖNFELD, P. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? **FEBS Letters**, v. 264, n. 2, p. 246–248, 1990. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80259-1.
- 44 BRAND, M. D. *et al.* The causes and functions of mitochondrial proton leak. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - bioenergetics**, v. 1187, n. 2, p. 132–139, 1994. DOI: 10.1016/0005-2728(94)90099-X.

- 45 MOOKERJEE, S. A. *et al.* Mitochondrial uncoupling and lifespan. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 7-8, p. 463–472, 2010. DOI: 10.1016/j.mad.2010.03.010.
- 46 CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial dna and human evolution. **Nature**, v. 325, n. 6099, p. 31–36, 1987.
- 47 KIM, S.-K.; BELZER, F. O.; SOUTHARD, J. H. Loss of mitochondrial respiratory function and its suppression during cold ischemic preservation of rat livers with university of wisconsin solution. **Hepatology**, v. 16, n. 3, p. 742–748, 1992.
- 48 KAASIK, A. *et al.* Regulation of mitochondrial matrix volume. **American Journal of Physiology - cell physiology**, v. 292, n. 1, p. C157–C163, 2007. DOI: 10.1152/ajpcell.00272.2006.
- 49 VORONKOV, A. V. *et al.* Evaluation of the mitochondria respirometric function in the conditions of pathologies of various geneses. **Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 20–31, 2019.
- 50 MASINI, A.; CECCARELLI-STANZANI, D.; MUSCATELLO, U. The effect of oligomycin on rat liver mitochondria respiring in state 4. **FEBS Letters**, v. 160, n. 1-2, p. 137–140, 1983.
- 51 DIVAKARUNI, A. S.; BRAND, M. D. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. **Physiology**, v. 26, n. 3, p. 192–205, 2011. DOI: 10.1152/physiol.00046.2010.
- 52 FERNSTRÖM, M.; TONKONOJI, M.; SAHLIN, K. Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 554, n. 3, p. 755–763, 2004. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.055202.
- 53 FISCHER, C. *et al.* Mitochondrial respiration in response to iron deficiency anemia: Comparison of peripheral blood mononuclear cells and liver. **Metabolites**, v. 12, n. 3, p. 270, 2022. DOI: 10.3390/metabo12030270.
- 54 GNAIGER, E. **Mitochondrial pathways and respiratory control: an introduction to oxphos analysis**. 4th ed. Innsbruck: Oroboros Instruments, 2014. 80 p. (Mitochondrial physiology network 19.12.).
- 55 GARTSHORE, A.; KIDD, M.; JOSHI, L. T. Applications of microwave energy in medicine. **Biosensors**, v. 11, n. 4, 2021. DOI: 10.3390/bios11040096.
- 56 ZEILINGER, A. *et al.* Happy centenary, photon. **Nature**, v. 433, n. 7023, p. 230–238, 2005.
- 57 DURNEY, C. H. Electromagnetic dosimetry for models of humans and animals: A review of theoretical and numerical techniques. **Proceedings of the IEEE**, v. 68, n. 1, p. 33–40, 1980. DOI: 10.1109/PROC.1980.11578.
- 58 DORLING, J. Einstein's introduction of photons: argument by analogy or deduction from the phenomena. **British Journal for the Philosophy of Science**, v. 22, n. 1, p. 1–1, 1971.
- 59 ICRU, I. report 60-fundamental quantities and units for ionizing radiation. **Journal of the ICRU**, 1998. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/478506677/ICRU-60-Fundamental-Quantities-and-Units-for-Ionizing-Radiation-pdf>. Acesso em: 23 jan. 2021.

- 60 OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. M. **Física das radiações**. São Paulo: Oficina de Textos, 2016.
- 61 GRIMES, D. R. Ultraviolet radiation therapy and uvr dose models. **Medical Physics**, v. 42, n. 1, p. 440–455, 2015. DOI: 10.1118/1.4903963.
- 62 SOBOL, H. Microwave communications-an historical perspective. **IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques**, v. 32, n. 9, p. 1170–1181, 1984. DOI: 10.1109/TMTT.1984.1132829.
- 63 ASAN, N. B. *et al.* Intra-body microwave communication through adipose tissue. **Healthcare Technology Letters**, v. 4, n. 4, p. 115–121, 2017. DOI: 10.1049/htl.2016.0104.
- 64 WASSER, E. J.; DUPUY, D. E. Microwave ablation in the treatment of primary lung tumors. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, n. 04, p. 384–394, 2008. DOI: 10.1055/s-2008-1081281.
- 65 NICHOLLS, D. G. **Bioenergetics**. New York: Academic Press, 2013.
- 66 SCHUERMAN, D.; MEVISSSEN, M. Manmade electromagnetic fields and oxidative stress—biological effects and consequences for health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3772, 2021.
- 67 BARJAKTAROVIC, Z. *et al.* Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to x-rays. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. e27811, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027811.
- 68 COHAN, S.; ABBOTT, J.; CATRAVAS, G. The effect of ionizing radiation upon mitochondria of the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1555–1561, 1973. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.024.
- 69 DIAZ, G.; EGANA, E. Oxidative-phosphorylation index po/adp-o in developing cns mitochondria and gamma-whole body irradiation. **Radiation Research**, v. 51, n. 2, p. 500, 1972.
- 70 MAO, X. W.; CRAPO, J. D.; GRIDLEY, D. S. Mitochondrial oxidative stress-induced apoptosis and radioprotection in proton-irradiated rat retina. **Radiation Research**, v. 178, n. 3, p. 118–125, 2012. DOI: 10.1667/RR2821.1.
- 71 MAO, X. W. *et al.* Spaceflight environment induces mitochondrial oxidative damage in ocular tissue. **Radiation Research**, v. 180, n. 4, p. 340–350, 2013. DOI: 10.1667/RR3309.1.
- 72 SINGER, S.; BERNEBURG, M. Phototherapie. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 16, n. 9, p. 1120–1131, 2018.
- 73 SINHA, R. P.; HÄDER, D.-P. *et al.* Physiological aspects of uv-excitation of dna. **Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids II**, p. 203–248, 2014. DOI: 10.1007/1282014531.
- 74 SLOMINSKI, A. T. *et al.* Melatonin, mitochondria, and the skin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 21, p. 3913–3925, 2017.
- 75 NAKASHIMA, Y.; OHTA, S.; WOLF, A. M. Blue light-induced oxidative stress in live skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 300–310, 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.010.

- 76 LI, X.; FARID, M. A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. **Journal of Food Engineering**, v. 182, p. 33–45, 2016. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2016.02.026.
- 77 PANTANELLA, E. *et al.* Aquaponics and food safety: Effects of uv sterilization on total coliforms and lettuce production. **Acta Horticulturae**, p. 71–76, 2010. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1062.8.
- 78 GURZADYAN, G. G.; GÖRNER, H.; SCHULTE-FROHLINDE, D. Ultraviolet (193, 216 and 254 nm) photoinactivation of escherichia coli strains with different repair deficiencies. **Radiation Research**, v. 141, n. 3, p. 244–251, 1995. DOI: 10.2307/3579001.
- 79 SATHIASEELAN, V. *et al.* A clinical microwave hyperthermia system with multipoint real-time thermal dosimetry. **The British Journal of Radiology**, v. 58, n. 696, p. 1187–1195, 1985.
- 80 BANIK, S.; BANDYOPADHYAY, S.; GANGULY, S. Bioeffects of microwave: a brief review. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 155–159, 2003. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00169-4.
- 81 IBRAHIM, A. T. Using microwave energy to treat tumors. **Progress in Electromagnetics Research**, v. 1, p. 1–27, 2008. DOI: 10.2528/PIERB07092504.
- 82 YANG, Y.-L.; CHEN, C.-Z.; ZHANG, X.-H. Microwave ablation of benign thyroid nodules. **Future Oncology**, v. 10, n. 6, p. 1007–1014, 2014. DOI: 10.2217/fon.13.260.
- 83 GOATS, G. Microwave diathermy. **British Journal of Sports Medicine**, v. 24, n. 4, p. 212, 1990. DOI: 10.1136/bjism.24.4.212.
- 84 MCQUARRIE, D. A.; SIMON, J. D. **Physical Chemistry: a molecular approach**. 1st. ed. CA: University science books Sausalito, 1997.
- 85 SANDERS, A. P.; SCHAEFER, D. J.; JOINES, W. T. Microwave effects on energy metabolism of rat brain. **Bioelectromagnetics**, v. 1, n. 2, p. 171–181, 1980. DOI: 10.1002/bem.2250010207.
- 86 ZLOTORZYNSKI, A. The application of microwave radiation to analytical and environmental chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 43–76, 1995. DOI: 10.1080/10408349508050557.
- 87 KINGSTON, H. Introduction to microwave sample preparation: Theory and practice, 263 s. **ACS professional reference book**, Washington - USA, 1993.
- 88 AROCAS, A. *et al.* Comparing microwave-and water bath-thawed starch-based sauces: infrared thermography, rheology and microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1554–1562, 2011.
- 89 CHWEIH, H.; CASTILHO, R. F.; FIGUEIRA, T. R. Tissue and sex specificities in ca²⁺ handling by isolated mitochondria in conditions avoiding the permeability transition. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 9, p. 1073–1092, 2015. DOI: 10.1113/EP085248.
- 90 KAPLAN, R. S.; PEDERSEN, P. L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 212, n. 2, p. 279–288, 1983. DOI: 10.1042/bj2120279.

- 91 LANZA, I. R.; NAIR, K. S. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 457, p. 349–372, 2009. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)05020-4.
- 92 TAKEDA, K. *et al.* Replicative advantage and tissue-specific segregation of rr mitochondrial dna between c57bl/6 and rr heteroplasmic mice. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 777–783, 2000. DOI: 10.1093/genetics/155.2.777.
- 93 LEE, C. Biochemical studies of isolated mitochondria from normal and diseased tissues. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - molecular basis of disease**, v. 1271, n. 1, p. 21–28, 1995. DOI: 10.1016/0925-4439(95)00005-O.
- 94 CHEN, Q. *et al.* Impact of backscatter material thickness on the depth dose of orthovoltage irradiators for radiobiology research. **Physics in Medicine & Biology**, v. 64, n. 5, p. 055001, 2019. DOI: 10.1088/1361-6560/ab0120.
- 95 DINANI, S. T.; KUBBUTAT, P.; KULOZIK, U. Assessment of heating profiles in model food systems heated by different microwave generators: solid-state (semiconductor) versus traditional magnetron technology. **Innovative Food Science Emerging Technologies**, v. 63, p. 102376, 2020. DOI: 10.1016/j.ifset.2020.102376.
- 96 WATHEN, R. L. Genesis of a generator—the early history of the magnetron. **Journal of the Franklin Institute**, v. 255, n. 4, p. 271–287, 1953.
- 97 GOLDBLITH, S. A. Basic principles of microwaves and recent developments. **Advances in Food Research**, v. 15, p. 277–301, 1966. DOI: 10.1016/S0065-2628(08)60082-8.
- 98 GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **American Journal of Physiology - cell physiology**, v. 258, n. 5, p. C755–C786, 1990.
- 99 RILEY, P. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 65, n. 1, p. 27–33, 1994. DOI: 10.1080/09553009414550041.
- 100 SANDER, M. U. *et al.* Liquid water ionization: mechanistic implications of the h/d isotope effect in the geminate recombination of hydrated electrons. **Chemical Physics**, v. 258, n. 2-3, p. 257–265, 2000. DOI: 10.1016/S0301-0104(00)00170-1.
- 101 CAËR, S. L. Water radiolysis: influence of oxide surfaces on h₂ production under ionizing radiation. **Water**, v. 3, n. 1, p. 235–253, 2011. DOI: 10.3390/w3010235.
- 102 GONCHAROV, A. F. *et al.* Dynamic ionization of water under extreme conditions. **Physical Review Letters**, v. 94, n. 12, p. 125508, 2005. DOI: 10.1103/PhysRevLett.94.125508.
- 103 PIMBLOTT, S. M.; LAVERNE, J. A. Stochastic simulation of the electron radiolysis of water and aqueous solutions. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 101, n. 33, p. 5828–5838, 1997. DOI: 10.1021/jp970637d.
- 104 FISCHER, C. *et al.* Mitochondrial respiration in response to iron deficiency anemia: Comparison of peripheral blood mononuclear cells and liver. **Metabolites**, v. 12, n. 3, p. 270, 2022. DOI: 10.3390/metabo12030270.
- 105 BRUSTOVETSKY, N. *et al.* Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 4858–4867, 2003. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-12-04858.2003.

- 106 LÊQUÔC, K.; LÊQUÔC, D. Involvement of the adpatp carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 265, n. 2, p. 249–257, 1988. DOI: 10.1016/0003-9861(88)90125-7.
- 107 HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A. The ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria: I. the protective mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 195, n. 2, p. 453–459, 1979. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90371-0.
- 108 GUNTER, T. *et al.* Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. **Cell Calcium**, v. 28, n. 5-6, p. 285–296, 2000. DOI: 10.1054/ceca.2000.0168.
- 109 GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **American Journal of Physiology - cell physiology**, v. 258, n. 5, p. C755–C786, 1990. DOI: 10.1152/ajpcell.1990.258.5.C755.
- 110 GUNTER, T. E.; SHEU, S.-S. Characteristics and possible functions of mitochondrial ca^{2+} transport mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -bioenergetics**, v. 1787, n. 11, p. 1291–1308, 2009. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.12.011.
- 111 GUNTER, T. *et al.* Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. **Cell calcium**, v. 28, n. 5-6, p. 285–296, 2000.
- 112 CARAFOLI, E. Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 175–181, 2003. DOI: 10.1016/S0968-0004(03)00053-7.
- 113 KIM, S.-K.; BELZER, F. O.; SOUTHARD, J. H. Loss of mitochondrial respiratory function and its suppression during cold ischemic preservation of rat livers with university of wisconsin solution. **Hepatology**, v. 16, n. 3, p. 742–748, 1992. DOI: 10.1002/hep.1840160321.
- 114 MAVERAKIS, E. *et al.* Light, including ultraviolet. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. J247–J257, 2010. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.11.011.
- 115 SEN, T. *et al.* Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondria. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 1, p. 20–27, 2006. DOI: 10.1016/j.neuint.2005.12.018.
- 116 HANSSON, M. J. *et al.* Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. **Brain Research**, v. 960, n. 1-2, p. 99–111, 2003.
- 117 SCHAUEN, M. *et al.* Mitochondrial electron transport chain activity is not involved in ultraviolet a (uva)-induced cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 4, p. 499–509, 2007. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.016.
- 118 BAUMGART, E. *et al.* Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for zellweger syndrome (pex5 knockout mouse). **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 4, p. 1477–1494, 2001. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62534-5.
- 119 HORVATH, S. E.; DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 590–614, 2013. DOI: 10.1016/j.plipres.2013.07.002.
- 120 BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 2, p. 297–312, 2011. DOI: 10.1042/BJ20110162.

- 121 BOSETTI, F. *et al.* Increased state 4 mitochondrial respiration and swelling in early post-ischemic reperfusion of rat heart. **FEBS Letters**, v. 563, n. 1-3, p. 161–164, 2004.
- 122 KEANGIN, P.; RATTANADECHO, P.; WESSAPAN, T. An analysis of heat transfer in liver tissue during microwave ablation using single and double slot antenna. **International Communications in Heat and Mass Transfer**, v. 38, n. 6, p. 757–766, 2011. DOI: 10.1016/j.icheatmasstransfer.2011.03.027.
- 123 FRIDOLFSSON, H. N. *et al.* Mitochondria-localized caveolin in adaptation to cellular stress and injury. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 11, p. 4637–4649, 2012. DOI: 10.1096/fj.12-215798.
- 124 BROWN, J. C.; GERSON, A. R.; STAPLES, J. F. Mitochondrial metabolism during daily torpor in the dwarf siberian hamster: role of active regulated changes and passive thermal effects. **American Journal of Physiology**, v. 293, n. 5, p. R1833–R1845, 2007. DOI: 10.1152/ajpregu.00310.2007.
- 125 MULEME, H. M.; WALPOLE, A. C.; STAPLES, J. F. Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 3, p. 474–483, 2006. DOI: 10.1086/501053.
- 126 PEREZ, A. S.; OLIVEIRA, C. L. P. Thermal-induced denaturation and aggregation behavior of lysozyme and bovine serum albumin: a thermodynamic and structural study. **Brazilian Journal of Physics**, v. 47, n. 5, p. 524–531, 2017. DOI: 10.1007/s13538-017-0520-1.
- 127 COLLADO, M. D. *et al.* Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 11, p. 1721–1732, 2016. DOI: 10.1071/RD15067.
- 128 SOMERO, G. N. Proteins and temperature. **Annual review of physiology**, v. 57, n. 1, p. 43–68, 1995.
- 129 CHAPPELL, J.; GREVILLE, G. Effects of oligomycin on respiration and swelling of isolated liver mitochondria. **Nature**, v. 190, n. 4775, p. 502–504, 1961.
- 130 PACKER, L.; UTSUMI, K.; MUSTAFA, M. G. Oscillatory states of mitochondria: I. electron and energy transfer pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 117, n. 2, p. 381–393, 1966. DOI: 10.1016/0003-9861(66)90426-7.
- 131 TONNESSEN, B. H.; POUNDS, L. Radiation physics. **Journal of Vascular Surgery**, v. 53, n. 1, p. 6S–8S, 2011. DOI: 10.1016/j.jvs.2010.05.138.
- 132 FAIRRIS, G.; MACK, D. P.; ROWELL, N. Superficial x-ray therapy in the treatment of constitutional eczema of the hands. **British Journal of Dermatology**, v. 111, n. 4, p. 445–449, 1984. DOI: 10.1111/j.1365-2133.1984.tb06607.x.
- 133 SVOBODOVA, A. *et al.* Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical Papers**, v. 150, n. 1, p. 25, 2006. DOI: 10.5507/bp.2006.003.
- 134 LOPEZ-ITURRI, P. *et al.* Estimation of radiofrequency power leakage from microwave ovens for dosimetric assessment at nonionizing radiation exposure levels. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/603260.

- 135 LAURENCE, J. A. *et al.* Biological effects of electromagnetic fields—mechanisms for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 206, n. 2, p. 291–298, 2000. DOI: 10.1006/jtbi.2000.2123.
- 136 BAUZA-KASZEWSKA, J. *et al.* Effect of microwave radiation on microorganisms in fish meals. **Annals of Animal Science**, v. 14, n. 3, p. 623, 2014. DOI: 10.2478/aoas-2014-0020.
- 137 BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P. de; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo: EPU, 1981.
- 138 VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A – APÊNDICES

A.1 Dose: Raio X

Foi introduzida, em 1950, a grandeza para determinar a dose em radioterapia, medida em unidades de rad (*radiation absorbed dose*), sendo que 1 rad equivale a 10^{-2} J/kg. (131) É uma grandeza calculada como $D = dE_{ab}/dm$, onde dE_{ab} é a energia média depositada em um volume elementar de massa dm . Esta grandeza é aplicada para qualquer meio, qualquer geometria de irradiação e qualquer tipo de radiação. Contudo, ocorreu sua substituição pelo gray (Gy), de modo que 1 Gy equivale à 100 rad. (132) Deste modo é comum que equipamentos médicos indiquem doses em cGy, tal como o XRAD precision, que oferece a dose indicada pelo usuário baseado na calibração realizada, no ar, antes da irradiação. E a partir dos dados coletados na calibração, voltagem e amperagem de funcionamento do equipamento a dose absorvida é calculada. (94)

A.2 Dose: Ultravioleta

A.2.1 Irradiância UV: integração da curva

Nesta dissertação adotou-se como subdivisões da radiação no ultravioleta aquela disposta pela ICI (*International Commission on Illumination*) que define o intervalo UV-A entre 315 a 380 nm (onda longa); UV-B entre 280 a 315 nm (onda média) e UV-C entre 100 a 280 nm (onda curta). (133) Os espectros das lâmpadas foram medidos, por um espectroradiômetro *Ocean Optics*, com uma fibra óptica da mesma empresa, para comprimentos de onda de 180-890 nm. A fibra óptica foi posicionada formando-se um ângulo de 90° com a superfície da lâmpada à uma distância de 0,8 cm, distância entre a lâmpada e amostra. Os dados são medidos em intensidade (I, unidades arbitrárias) por comprimento de onda (λ , nm). Os espectros obtidos são apresentados na Figura 40, tanto para a lâmpada caracterizada como UV-A quanto para a lâmpada de UV-C são observados picos no vermelho e infravermelho, bem como nos comprimentos de onda que compreendem o verde e o azul. Contudo, nota-se ainda picos característicos, de maior intensidade, para cada uma das lâmpadas, painel A, em 371 nm e painel B, em 255 nm.

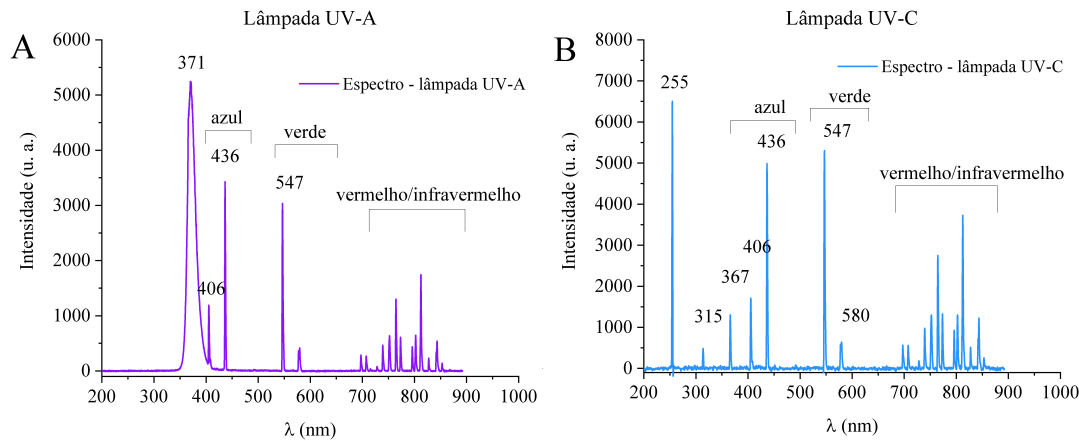


Figura 40 – Espectros das lâmpadas de UV. A) Espectro lâmpada UV-A, Puritec HNS G5 (Itália) modelo G4T5/OF RG3. B) Espectro lâmpada UV-C, UV-BRAVO modelo (F4T5/BL). Intensidade (uni. arbitrárias) por comprimento de onda (nm). As lâmpadas apresentam picos que se encontram na região do azul, verde, e no infravermelho e vermelho. Os picos de maior intensidade caracterizam as lâmpadas, A) UV-A: 371 nm e B) UV-C: 255 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A irradiância de cada lâmpada foi calculada a partir integração dos espectros normalizados (área abaixo do gráfico em relação à linha de base construída) foi realizada no *software Origin Lab*. A irradiância total calculada para UV-A foi de 12,6 P/cm² e para UV-C foi de 9,0 P/cm², assim são apresentadas as doses calculadas na tabela 4. Onde P = mW = 1mJ/s.

Tabela 4 – Cálculos de dose de UV, integral dos picos do espectro. Doses adotadas no estudo.

Tempo de exposição (s)	Dose UV-A (mW/cm ²)	Dose UV-C (mW/cm ²)
5	31,5 ± 0,1	22,5 ± 0,1
10	63,0 ± 0,1	45,0 ± 0,1
15	94,5 ± 0,1	67,5 ± 0,1
20	126,0 ± 0,1	90,0 ± 0,1
120	756,0 ± 0,1	-

Fonte: Elaborada pela autora.

A.2.2 Irradiância UV: medidor de potência

Além disso, para fim de comparação com o método anterior, a fim de determinar a irradiância das lâmpadas, a potência (mW) emitida pelas lâmpadas foram medidas, com o medidor de potência *LabMax™-TOP LaserPower/Energy Meter* usando como *input* os comprimentos de onda característicos de cada lâmpada, UV-A em 371 nm e UV-C em 255 nm. A partir da potência medida pelo *power meter*, foram calculados os valores para irradiância em mW/cm², a partir da área do detector, 4,52 cm², temos, portanto as irradiâncias: 12,56 e 10,21 P/cm² para UV-A e

UV-C, respectivamente. Considerou-se ainda que a distância entre o porta amostra (cubeta de quartzo) usado no experimento e a fonte de luz, é de 0,8 cm, sendo assim o detector do medidor de potência foi posicionado à mesma distância da lâmpada. O valor obtido, de irradiância, para UV-A é aproximadamente igual àquele obtido na integração do espectro. Contudo, o valor obtido para UV-C é cerca de 13% maior em relação ao valor calculado pelo método anterior. Considerando que não se trata de um laser (com comprimento de onda pontual e bem definido), mas sim uma lâmpada cujo espectro contempla vários picos, com diferentes comprimentos de onda, o *input* de comprimento de onda fornecido ao equipamento não gerou uma boa aproximação para a medida de potência. Assim as doses calculadas a partir do método de integração foram adotadas neste estudo.

Tabela 5 – Cálculos de dose de UV, a partir dos dados do medidor de potência.

Tempo de exposição (s)	Dose UV-A (mW/cm ²)	Dose UV-C (mW/cm ²)
5	27,8 ± 0,3	25,5 ± 0,2
10	55,6 ± 0,5	51,0 ± 0,5
15	83,4 ± 0,8	76,6 ± 0,8
20	111 ± 1	102 ± 1
120	667 ± 1	-

Fonte: Elaborada pela autora.

A.3 Dose: Micro-ondas

Existem na literatura vários trabalhos voltados para o estudo da interação do micro-ondas com tecidos biológicos, e diferentes estimativas de dose, neste espectro da radiação eletromagnética, em diferentes tecidos são realizadas. (97) Estudos mais recentes investigam a dose absorvida por usuários (134) de forno micro-ondas, bem como efeitos biológicos das micro-ondas em proteínas. (135) A partir de alguns desses estudos, apresentados na literatura, optou-se pela estimativa de dose de radiação de micro-ondas. (136) Estimamos a dose para 2ml de amostras de mitocôndrias isoladas incubadas em cubeta de vidro, posicionada no centro do forno micro-ondas. Considerando a frequência padrão de 2450 MHz de operação do equipamento. Desde modo, calculamos a potência de eficiência nominal (53%) que resultou em 564 W. Como ajustamos a potência para 10%, temos que a potência nominal entregue é de 56,4 W. Finalmente, podemos usar a relação de dose de radiação:

$$D = \frac{P_e}{m}(t) \quad (\text{A.1})$$

Onde,

P_e é a potência nominal, do equipamento

m , massa da amostra em gramas (g)

t , tempo de exposição em segundos (s)

Convertendo a potência nominal usada para 0,0564 kW, temos as doses calculadas em função do tempo de exposição, apresentada na tabela 6. A dose é dada em kJ/g = kW·s/g

Tabela 6 – Estimativa para doses de micro-ondas.

Tempo de exposição (s)	Dose Micro-ondas (kJ/g)
2	0,056 ± 0,001
3	0,085 ± 0,001
4	0,113 ± 0,001
5	0,141 ± 0,001

Fonte: Elaborada pela autora.

A.4 Resultados complementares: Raio X - mitocôndrias

A.4.1 Raio X - fígado

Os dados brutos para o CR, E3, E4 e ED podem também ser normalizados pelo respectivo controle. A Figura 41 apresenta os dados normalizados onde facilmente identifica-se a variação e a tendência obtidas devido à irradiação nas diferentes doses apresentadas no eixo x.

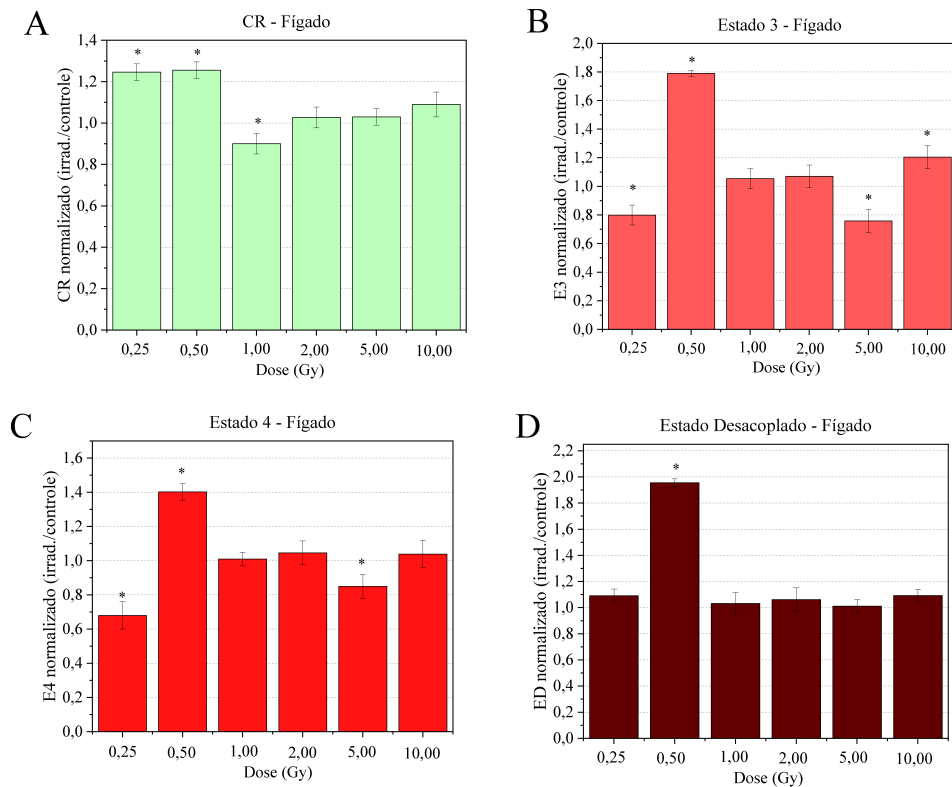


Figura 41 – Dados normalizados em função da dose. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

A eficiência de acoplamento (E-L), Figura 42, calculada não apresentou alterações estatisticamente significativas, ou seja, quando o resultado irradiado é comparado ao respectivo controle não são observadas alterações na preservação de acoplamento entre a CTE e a ATPase.

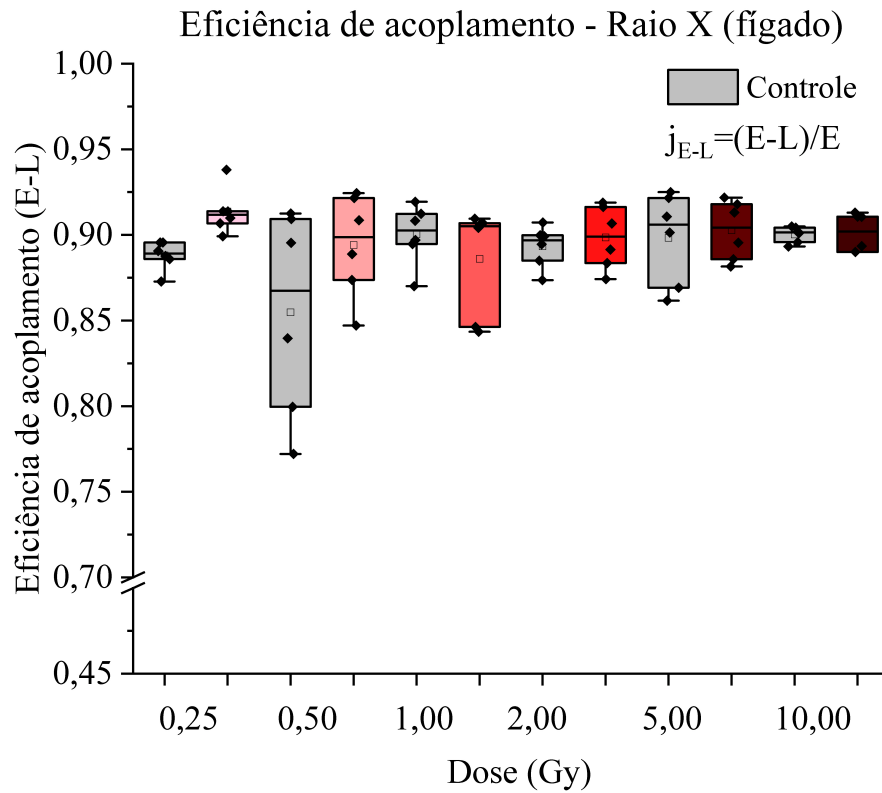


Figura 42 – Eficiência de acoplamento (E-L) calculado a partir dos dados brutos de ED e E4. O teste *One-Way ANOVA* foi aplicado para todos os resultados com distribuição normal, e nenhum resultado irradiado apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao respectivo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

A.4.2 Raio X - 'gota'

A Figura 43 apresenta os dados normalizados onde facilmente identifica-se a variação e a tendência obtidas devido à irradiação nas diferentes doses apresentadas no eixo x.

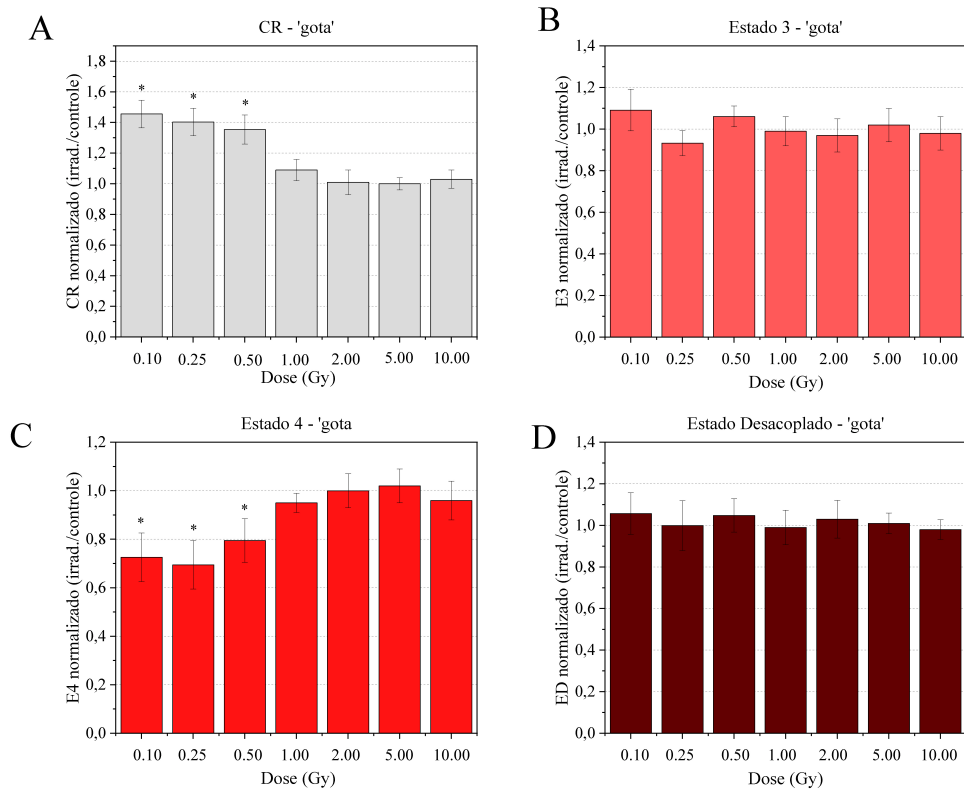


Figura 43 – Dados normalizados em função da dose. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

O controle de eficiência (P-L), Figura 44, não sofreu alterações significativas, portanto a capacidade de fosforilação oxidativa do sistema não é limitada pela CTE quando acoplada à ATPase, o que aponta para preservação das funções mitocondriais.

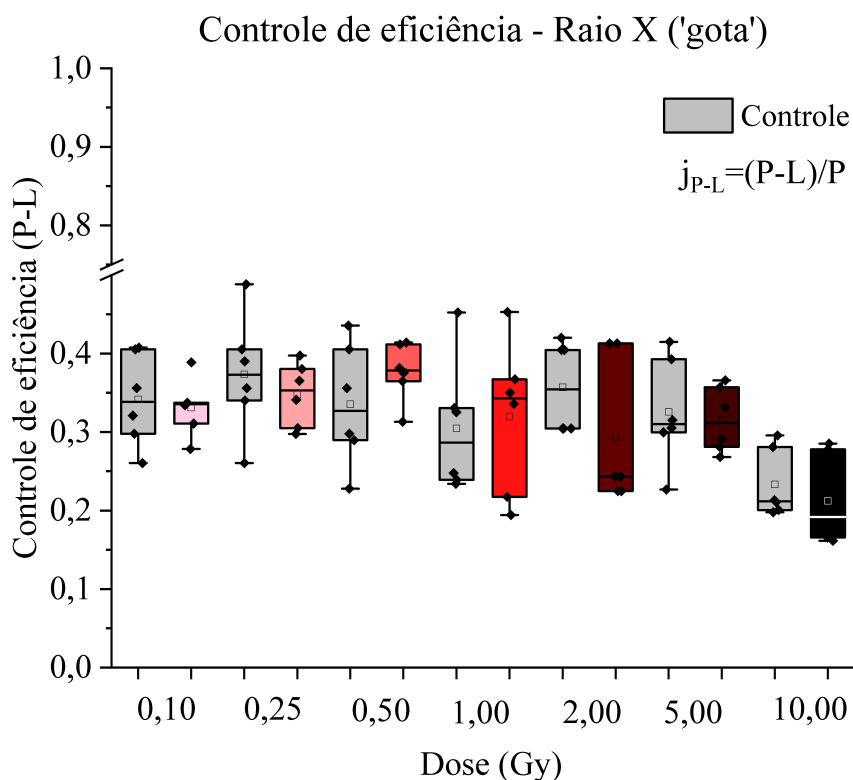


Figura 44 – Controle de eficiência (P-L) calculado a partir dos dados brutos de E4 e ED. O teste *One-Way ANOVA* foi aplicado para todos os resultados com distribuição normal, e nenhum resultado irradiado apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao respectivo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

A.5 Resultados complementares: UV - mitocôndrias

A.5.1 Irradiador de Ultravioleta (foto)

A Figura 45 mostra a foto do irradiador utilizado neste estudo. As lâmpadas de UV-C e UV-A são facilmente intercambiáveis, mantendo-se a distância entre a fonte de luz e a cubeta que contém a amostra.



Figura 45 – Foto do equipamento (irradiador) de ultravioleta.

Fonte: Elaborada pela autora.

A.5.2 UV-A em meio de reação

A Figura 46A, apresenta o resultado obtido para meio de incubação irradiado com UV-A, em diferentes doses (31,5; 126,0 e 756,0 mW/cm²). Não são observadas alterações, estatisticamente significativas, mesmo em 756,0 mW/cm². A energia característica do comprimento de onda do UV-A (371 nm), é em média aproximadamente 3,3 eV. Diante desses resultados, há indicativos de que esta energia foi insuficiente para promover ionização ou danos nas moléculas que compõe o meio de reação. A água líquida, molécula mais abundante do meio, possui energia de ligação de aproximadamente 12 eV. Assim, não são identificados, como indica o resultado, efeitos indiretos do meio de reação na respiração mitocondrial.

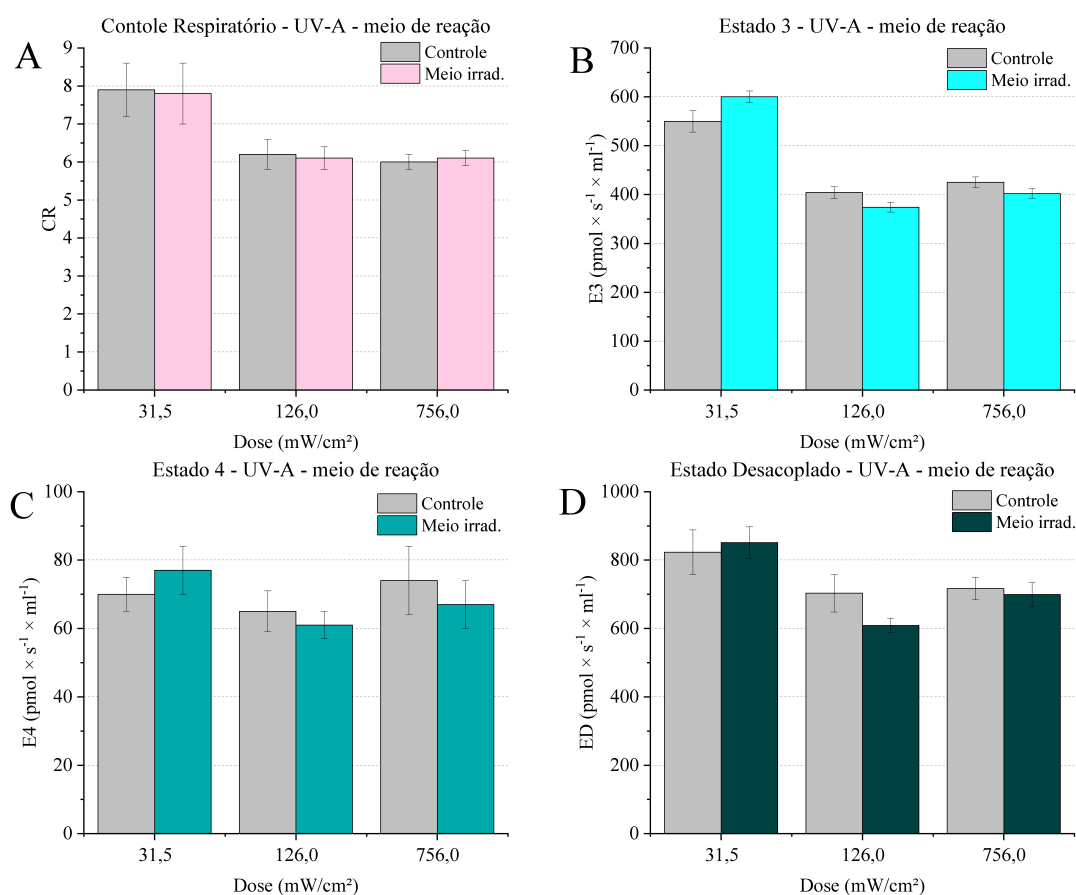


Figura 46 – Estados respiratórios em função da dose (mW/cm²) para meio de reação irradiado. Os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram medidos em (pmol/sml). A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. Para cada dose pelo menos 3 experimentos independentes, em duplicatas, foram realizados. Não foram identificadas alterações estatisticamente significativas em nenhuma dose aplicada.

Fonte: Elaborada pela autora.

A.6 UV-C: Absorbância vs. Concentração de mitocôndria

As lâmpadas de UV utilizadas neste estudo, apresentam um espectro com picos que variam do azul ao infra-vermelho. Contudo, numa aproximação, foram realizadas medidas de absorbância de soluções de mitocôndrias isoladas (em meio de reação com substratos de CI) em 255 nm (UV-C), para determinarmos a quantidade de luz que é absorvida (ou espalhada) pela amostra, em temperatura ambiente. A Figura 47A apresenta o resultado de absorbância em função da concentração de mitocôndria isolada. É possível observar que mesmo em 0,125 mg/ml pouca luz é capaz de atravessar a amostra. Contudo, os resultados de respiração e inchamento mitocondrial para amostras irradiadas com UV-C demonstram que a luz, neste espectro, é capaz de interagir com a amostra de modo a causar danos bioenergéticos, proporcionalmente a dose.

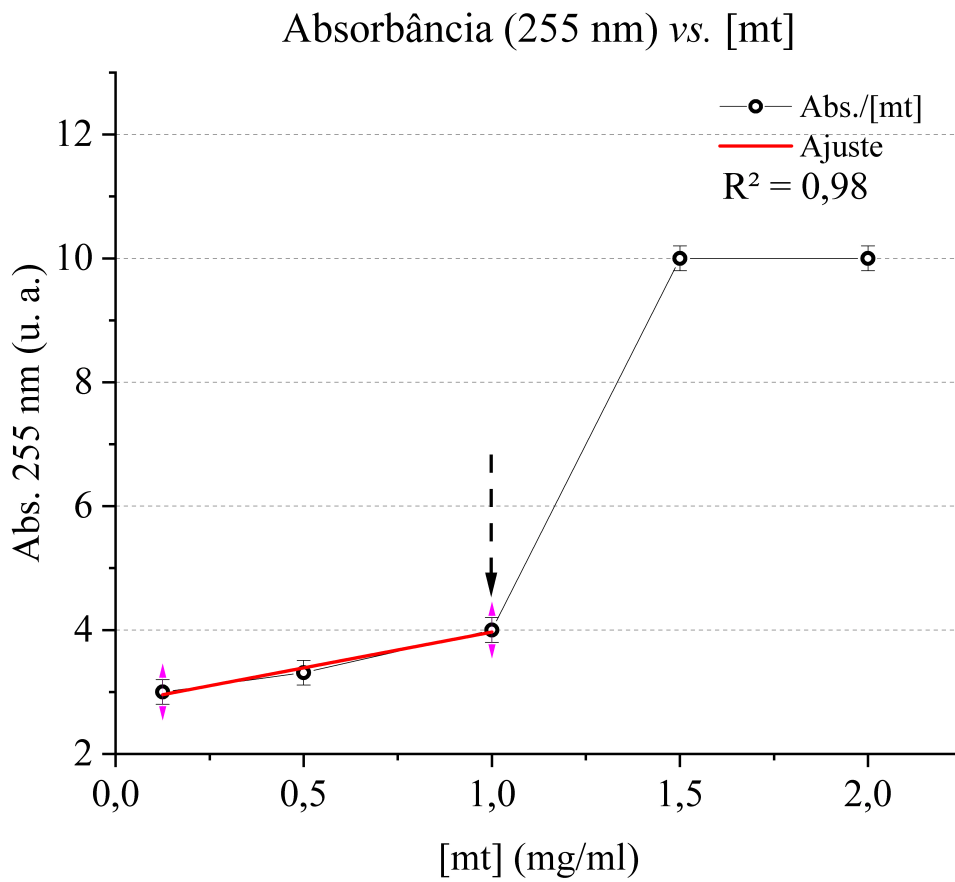


Figura 47 – Valores de absorbância medidos em 255 nm, em cubeta de quartzo (largura de 1 cm) em meio de reação com substratos de CI, o valor absorvido pela cubeta + meio de reação + substratos (0,2 unidades arbitrárias), foi subtraído dos dados apresentados. A amostra apresenta um limite de concentração para a qual a luz, praticamente, não atravessa mais a amostra, em 1 mg/ml, apontado pela seta pontilhada no gráfico, a partir deste ponto quase toda luz incidente é absorvida ou espalhada pela amostra.

Fonte: Elaborada pela autora.

A.6.1 UV-C em meio de reação

A Figura 48 apresenta os dados normalizados onde facilmente identifica-se a variação e a tendência obtidas devido à irradiação nas diferentes doses apresentadas no eixo x.

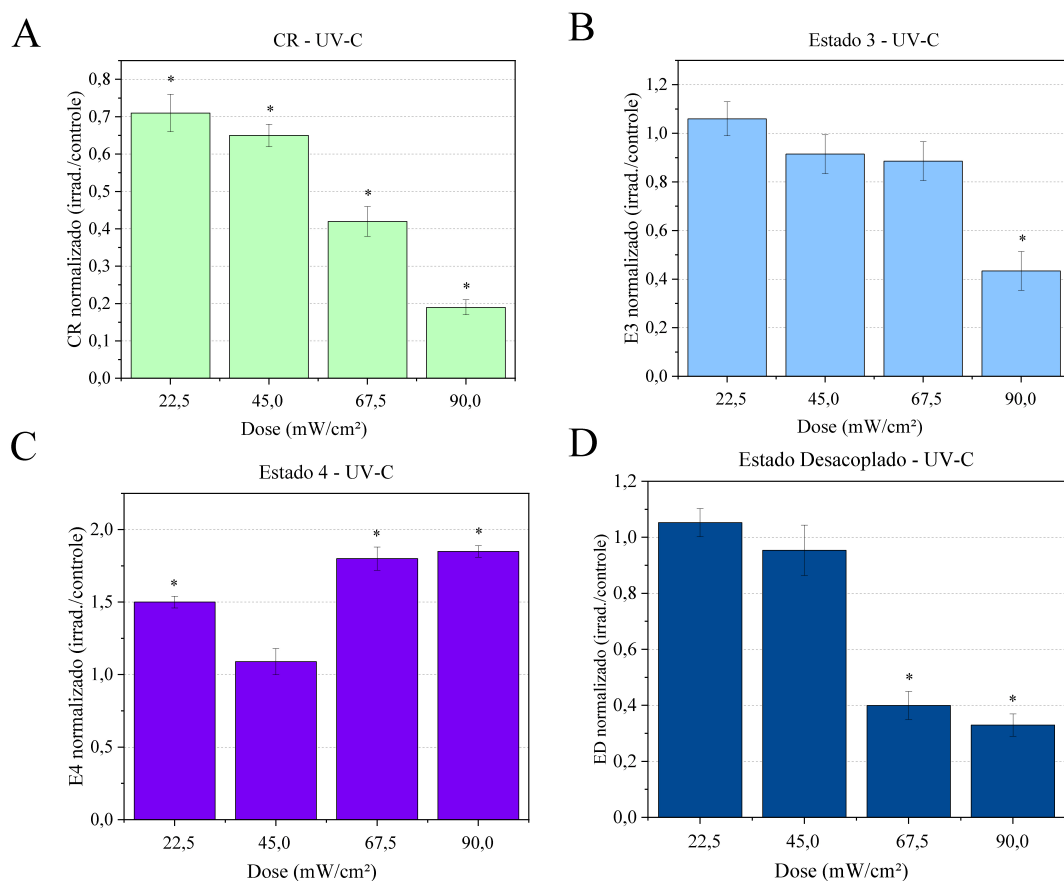


Figura 48 – Dados normalizados em função da dose. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$; ** valores significativos com $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pela autora.

A.7 Resultados complementares: Micro-ondas - mitocôndrias

A Figura 49 apresenta os dados normalizados onde facilmente identifica-se a variação e a tendência obtidas devido à irradiação nas diferentes doses apresentadas no eixo x.

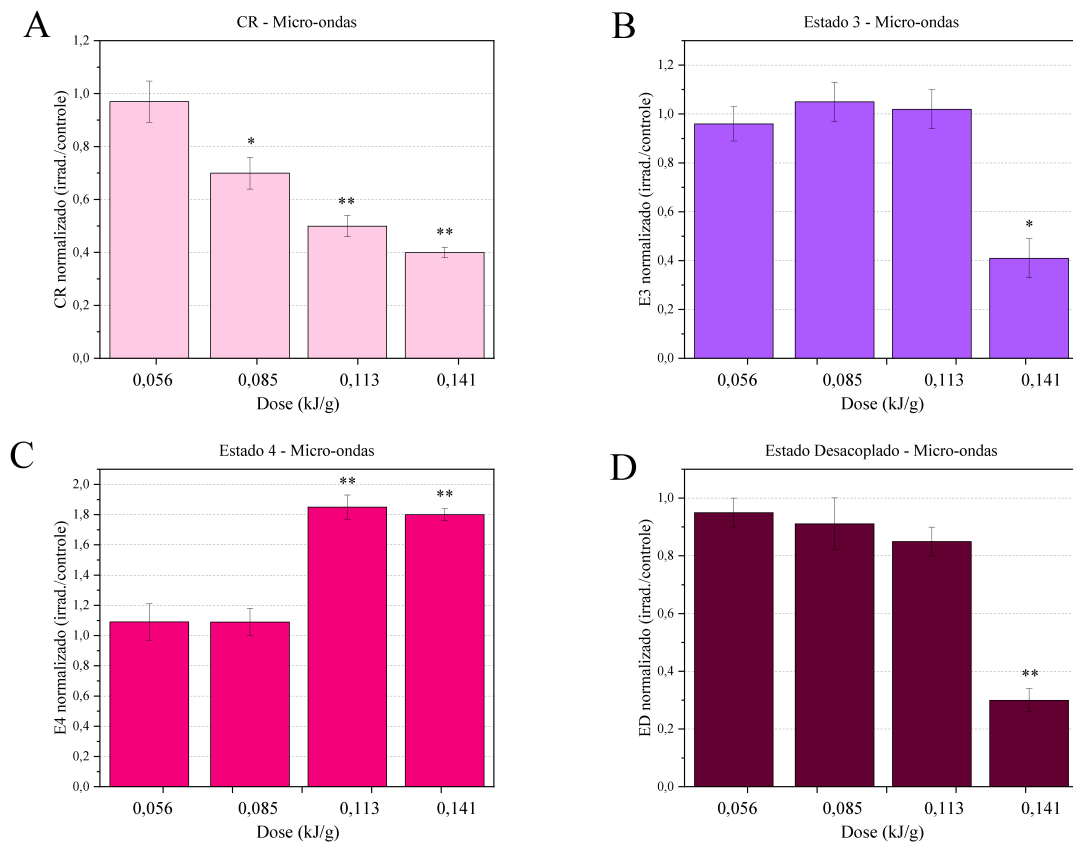


Figura 49 – Dados normalizados em função da dose. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$; ** valores significativos com $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pela autora.

A.7.1 Resultados complementares: Temperatura - mitocôndrias

A Figura 50 apresenta os dados normalizados onde facilmente identifica-se a variação e a tendência obtidas devido ao aumento da temperatura nas diferentes doses apresentadas no eixo x.

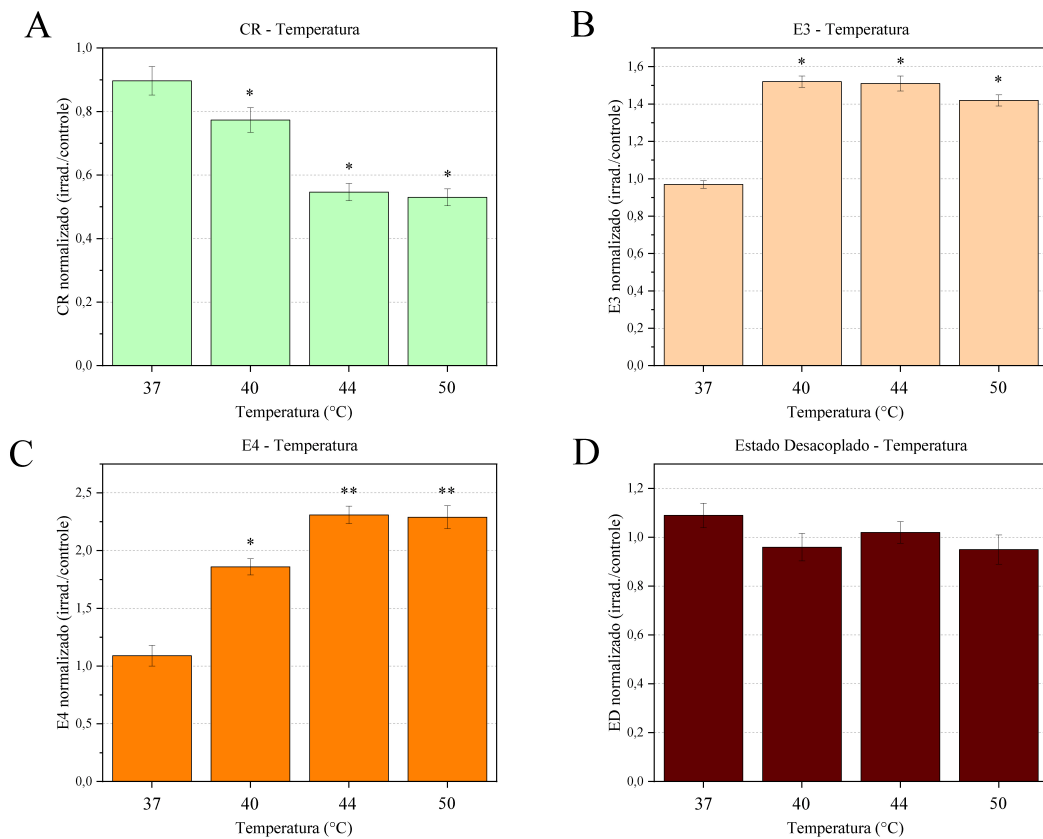


Figura 50 – Dados normalizados em função da temperatura. O CR e os estados E3, E4 e desacoplado (ED) foram normalizados em relação aos respectivos controles. A) CR. B) Estado 3, na presença de ADP. C) Estado 4 na presença de oligomicina. D) Estado desacoplado induzido por CCCP. * valores significativos com $p < 0,05$; ** valores significativos com $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pela autora.

A.8 Análise estatística

A.8.1 Teste de normalidade dos dados: Shapiro - Wilk

A fim de avaliar se uma amostra tem distribuição Normal. O teste de Shapiro - Wilk pode ser utilizado para amostras de qualquer tamanho. Pode ser calculado a partir da igualdade relacionada abaixo:

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{A.2})$$

Onde,

y_1, \dots, y_n : ordenamento decrescente do universo amostral

n: tamanho da amostra

a_1, \dots, a_n : são calculados como a solução do vetor dos valores esperados das estatísticas de ordem da amostra e V a matriz de covariâncias dessas estatísticas. O p-valor deste teste é calculado exatamente para $n = 3$.

A.8.2 Teste *One-Way ANOVA*

A análise estatística, para dados com distribuição aproximadamente normal, se deu pelo teste F. O teste F é feito através de uma análise de variância, que separa a variabilidade devido aos 'tratamentos', da variabilidade residual, ou seja, devido ao acaso. (137) Para realizar a análise de variância, primeiramente calculou-se a seguinte sequência: 1. Determinação do grau de liberdade

- os graus de liberdade (gl) dos grupos: $(k-1)$
- gl do total: $n-1$.
- gl dos resíduos: $(n-1) - (k-1) = n - k$.

2.1. Valor de correção (c) dado pela razão do total geral ao quadrado e o número de dados,

$$c = \frac{(\sum x)^2}{n} \quad (\text{A.3})$$

Onde,

x : média total dos dados

n : número de dados

2.2. Soma do quadrado total (SQT)

$$SQT = \sum x^2 - c \quad (\text{A.4})$$

2.3. Soma do Quadrado do Total de cada repetição (SQTr)

$$SQTr = \frac{\sum(T^2)}{r} - c \quad (\text{A.5})$$

Onde,

T : total de tratamentos

r : soma das repetições

2.4 Soma dos Quadrados dos Resíduos (SQR)

$$SQR = SQT - SQTr \quad (\text{A.6})$$

2.5 Quadrado médio do Total de cada repetição (QMTr)

$$QMT_r = \frac{SQT_r}{k-1} \quad (\text{A.7})$$

2.6 Quadrado médio do Total do Residuo (QMR)

$$QMR = \frac{SQR}{n-k} \quad (\text{A.8})$$

2.7 Calcular o valor de F

$$F = \frac{QMT_r}{QMR} \quad (\text{A.9})$$

3. Finalmente, pode-se comparar o F calculado com o valor dado na tabela de F, ao nível de significância estabelecido, observando os k-1 graus de liberdade no numerador e os n-k graus de liberdade no denominador.

A.8.3 Teste *Mann-Whitney* - U

O teste U de Mann-Whitney ordena os resultados de todos os sujeitos em ambas as situações como se fossem apenas um conjunto simples de resultados. Após realizado o ordenamento global de todos os resultados é apresentado em $Ordens_1$ e $Ordens_2$. São adicionados ordens totais para o $grupo_1$ e $grupo_2$ separadamente. Quanto menor for U mais significativas serão as diferenças entre as ordens das duas situações. (138)

$$U = n_1 n_2 \frac{N_x(n_x + 1)}{2} - T_x \quad (\text{A.10})$$

Onde,

n_1 : número de sujeitos do grupo 1

n_2 : número de sujeitos do grupo 2

T_x : maior total de ordens

N_x : número de sujeitos do grupo com maior total de ordens

A.9 Protocolos

RECEITA DOS MEIOS

pH ajustado com KOH

As amostras foram preparadas seguindo este protocolo, em temperatura ambiente (25°C). Os insumos são devidamente pesados e dissolvidos em água Milli-Q, e ficam cerca de 20 minutos em agitação magnética ou até a completa homogeneização. O pH é ajustado com uma solução estoque de KOH (0,5M), com auxílio de um phmetro devidamente calibrado. O meio de reação é preparado e fracionado em tubos plásticos 50 ml, que são congelados por até 2 meses. Os meios de isolamento (I, II e III) são preparados um dia antes do experimento, colocados em garrafas de vidro devidamente esterilizadas e refrigerados à 4 °C, e mantidos para uso por até 5 dias. Os volumes são calculados em função da frequência de experimentos. Vale destacar que toda a vidraria ou objeto que entre em contato direto com os meios são lavados apenas com água e álcool (70%), e autoclavados quinzenalmente.

Meio de reação pH 7.2

Insumo/PM (g/mol)	[mM]
Sacarose (342,30)	125
KCl (74,56)	65
HEPES (238,30)	10
K ₂ HPO ₄ (228,22)	2
MgCl ₂ (203,30)	1

Meio I - pH 7.2

Insumo/PM (g/mol)	[mM]
Sacarose (342,30)	250
HEPES (238,30)	10
EGTA (380,35)	0,5

Meio II - pH 7.2

Insumo/PM (g/mol)	[mM]
Sacarose (342,30)	250
HEPES (238,30)	10
EGTA (380,35)	0,3

Meio III - pH 7.2

Insumo/PM (g/mol)	[mM]
Sacarose (342,30)	250
HEPES (238,30)	10

PROTOCOLO DE ISOLAMENTO

Este protocolo contém informações para realizar o isolamento de mitocôndrias a partir do fígado de camundongo, sem o uso de anestésicos.

EUTANÁSIA

Temperatura ambiente: 25 °C | Tempo estimado:
1 minuto

Em uma gaiola de apoio, limpa e com pouca serragem, colocar apenas um animal. Devolver imediatamente os demais animais para o alojamento. Na gaiola de apoio, segurar o camundongo pela base da cauda e aguardar o momento em que o pescoço estará o mais esticado possível, com rapidez realizar o deslocamento com o copo ou outra ferramenta, afastando a cabeça do tronco sem gerar danos visíveis ou sangramento. A morte do animal deve ser instantânea. Verificar se a eutanásia foi realizada com sucesso para que o próximo passo possa ser executado.

EXTRAÇÃO DO ÓRGÃO

Temperatura da sala: 20 °C | Tempo estimado:
40-60 segundos

Com o auxílio de uma tesoura e uma pinça regular, segurar a pele e a região do tórax para acessar a cavidade. Cortar perpendicularmente, com a tesoura, as costelas, abrindo espaço para segurar o fígado com a pinça Collin e com a tesoura desconectar os tecidos de adesão com a cavidade. Uma vez livre o fígado pode ser apoiado em uma superfície limpa para retirada da vesícula, em seguida o órgão deve ser pesado e imediatamente imerso em 20-25 ml de meio I à ~10 °C para seguir o procedimento de homogeneização.

HOMOGENEIZAÇÃO



Temperatura da sala: 20 °C | Tempo estimado: 2 minutos

Após imerso em ~ 20-25 ml de meio I, disposto em um tubo falcon (limpo), o fígado deve ser picado com uma tesoura, até que os pedaços tenham cerca de 1-2 milímetros. Neste processo deve-se trocar o meio I, por 3x, retirando o excesso de sangue. Depois de picado o fígado deve ser transferido para o tubo de vidro próprio para o pistão do homogeneizador, que deve estar em gelo. O pistão deve girar a uma velocidade de 30-35 rpm. Subir e descer o tubo de 7-9 vezes e então transferir o homogenato para um tubo falcon limpo.

NA CENTRÍFUGA

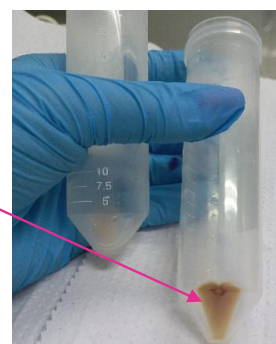
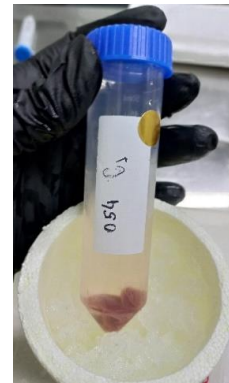
Temperatura: 4 °C | Tempo estimado: 40 min.

1° centrif.: Balancear os tubos falcon contendo fígado homogeneizado em meio I, ~ 20-25 ml → 10 minutos à 800 g.

2° centrif.: Transferir sobrenadante da centrifugação anterior para um novo tubo falcon limpo. Balancear, se necessário com meio I → 10 minutos à 7700 g.

3° centrif.: Descartar sobrenadante e com cuidado (evitando coágulos de sangue) desfazer o pellet em 100µl de meio II. Transferir o concentrado para ~20-25 ml de meio II disposto em um novo tubo falcon (limpo) → 10 minutos à 7700 g.

Coletando a amostra: Após a última centrifugação, com cuidado (evitando possíveis coágulos de sangue), lavar 3x o pellet com meio III. Em seguida, diluir o pellet em 100 µl de meio III e transferir para um eppendorf identificado.



PROTOCOLO INCHAMAMENTO

Este protocolo contém informações para realizar o experimento de inchamento mitocondrial induzido por cálcio, para duas amostras: tratada e controle. O experimento é realizado em leitor de placa – espectrofotômetro.

1. MATERIAL

Além das amostras, são necessários: meio de reação (ver protocolo de receitas), solução de $CaCl_2$, solução estoque de ciclosopina A (CsA), soluções estoque de glutamato e malato.

2. CONCENTRAÇÕES

$CaCl_2$: $[]_{final} = 25 \text{ à } 100 \text{ mM}$, CsA: $[]_{final} = 1 \mu\text{M}$, glutamato: $[]_{final} = 5 \text{ mM}$ e malato: $[]_{final} = 2,5 \text{ mM}$

3. QUANTIDADES E VOLUMES

O volume de meio de reação, mitocôndria isolada, cálcio e CsA devem ser calculados a partir da seguinte relação de volume, por poço:

$$Volume_{final} = 200 \mu\text{l} = V_{*meio\ de\ reação} - V_{mt\ isolada} - V_{Ca^{2+}} - V_{CsA}$$

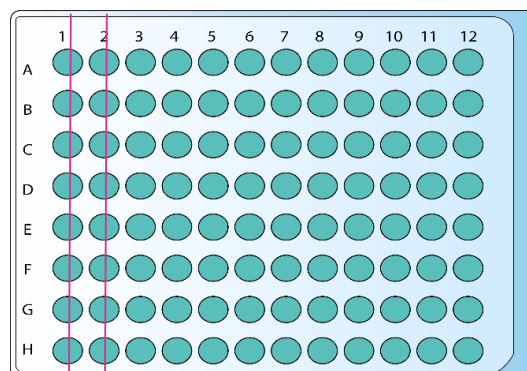
O meio de reação já contém 5 mM glutamato e 2,5 mM malato.

4. CONTROLES E TRATADOS

Na placa de 96 poços

A fim de obter resultados comparáveis com diferentes controles, as seguintes combinações são utilizadas:

Col. 1 e 2	Amostra	Ca^{2+}	CsA
A	controle	-	-
B	controle	-	+
C	controle	+	+
D	controle	+	-
E	tratado	-	-
F	tratado	+	+
G	tratado	+	-
H	tratado	-	+



5. PARÂMETROS PARA LEITURA

No software da *Thermo Scientific Multiskan GO Microplate*, na função *kinetics*, aplicar intervalos de leituras entre 10-20 segundos, com agitação (intensidade média), comprimento de onda de leitura em 540 nm, à 25 °C. Tempo de leitura total de 15 minutos.

ANEXOS

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO - COMITÊ DE ÉTICA



IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Sao Carlos, 17 de março de 2022
CEUA N [8604100921](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Aline Sanches Perez

Área: Grupo De óptica / Fcm

Vanderlei Salvador Bagnato (orientador)

Título da proposta: "Efeitos da radiação eletromagnética na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IFSC

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 04/março/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "No período de seis meses, metade dos animais aprovados pelo comitê foram utilizados e geraram resultados satisfatórios. Contudo, devido ao surgimento de novas doses e parâmetros relevantes a serem analisados no projeto, serão necessários mais animais. A quantidade de animais que serão necessários para a realização da segunda etapa do projeto está relacionada aos parâmetros/doses. Para cada grupo subdividido pelas radiações eletromagnéticas haverá o grupo irradiado com três doses distintas e um grupo controle (subgrupos), para cada subgrupo, experimentos de estimativa de concentração, respiração, inchamento mitocondrial e análise estrutural serão realizados. Assim, estimasse um número de 12 animais por grupo, e somando-se a repetição dos experimentos tem-se que serão necessários 150 (cento e cinquenta) animais para o projeto."

Comentário da CEUA: "Após apreciação por parte dos relatores da CEUA/IFSC e na ausência de objeções, a solicitação foi aprovada ad referendum pelo Presidente da Comissão."

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo