

Laboratório multimídia

Consumo de oxigênio e potencial de membrana em mitocôndrias

Iremos usar um software que simula medidas de consumo de oxigênio e potencial de membrana ($\Delta\Psi$) no tempo em uma suspensão de mitocôndrias isoladas. Podem ser feitas adições de diferentes substratos respiratórios e inibidores de transporte de elétrons, fosforilação oxidativa ou ionóforos de prótons.

1. Baixe **todos** os arquivos presentes na pasta do Google Drive (<https://drive.google.com/drive/folders/18Y4FQnWHvZWOQH7v9vxlennrMW8mKkCW-?usp=sharing>) para a atividade multimídia de respiração e $\Delta\Psi$ no computador. Abra o app “COM” (consumo de oxigênio em mitocôndrias) e leia a introdução.
2. Na tela com gráficos, clique na seta “play/pausa” (▶) para iniciar um traçado de medida de concentração de oxigênio versus tempo. Em seguida, clique em “opções” (☰), indicada pela seta amarela.
3. Selecione a opção para adicionar mitocôndrias. O traçado formado representa a concentração de O₂ dissolvida na suspensão mitocondrial variando no tempo. A seguir, vamos testar os efeitos de vários moduladores diferentes. Consulte a **Legenda** abaixo para saber os efeitos dos inibidores e substratos usados.
4. Teste os efeitos das seguintes adições: piruvato → rotenona → succinato → antimicina A → TMPD → CN⁻ (cianeto). É preciso fazer adições em um traçado único. Você pode modular a velocidade dos traçados na barra lateral direita.
5. Renove a tela no botão superior direito. Teste os efeitos das seguintes adições: mitocôndria → malato (**Atenção! Não confunda malato com malonato**) → ADP + Pi (2) → oligomicina → 2,4 DNP → CO.
6. Renove a tela no botão superior direito. Teste os efeitos das seguintes adições: mitocôndria → Alfa-cet (α -cetoglutarato) → rotenona → succinato → malonato → TMPD → FCCP.
7. Renove a tela no botão superior direito. Clique em opções e habilite o gráfico de potencial junto com a adição de mitocôndrias.
8. Repita os testes nos pontos 4-6, observando o gráfico de $\Delta\Psi$ versus tempo.
9. Anote ou fotografe todos os resultados obtidos e explique-os em termos das transformações de energia e regulação. Você pode também experimentar com sequências de adições próprias.

Legenda

2,4 DNP: dinitrofenol: desacoplador, ionóforo de prótons, permite a passagem livre de prótons através da membrana; **Antimicina**: inibidor do complexo III; **CN⁻**: cianeto, inibidor do complexo IV; **CO**: monóxido de carbono, inibidor do complexo IV; **FCCP**: desacoplador, ionóforo de prótons, permite a passagem livre de prótons através da membrana; **Malonato**: inibidor do complexo II, compete com o succinato; **Oligomicina**: inibidor da ATP sintase; **Rotenona**: inibidor do complexo I; **TMPD**: doador artificial de elétrons ao citocromo c e complexo IV.