

***Abertura do Poro de Transição de Permeabilidade  
mitocondrial em concentrações fisiopatológicas de  $Ca^{2+}$***

**SORAYA EL-KHATIB**

**Orientador**

**Profa. Dra. DENISE VAZ DE MACEDO**  
**Depto. de Bioquímica-IB-UNICAMP**

**Tese apresentada ao curso de pós  
graduação em ciências biológicas para  
obtenção do título de Mestre em ciências  
biológicas, área de concentração em Bioquímica.**

**CAMPINAS-SP**  
**1997**

Este exemplar é a redação final  
da tese de doutorado  
e aprovada pela Comissão Julgadora

Soraya  
El. Khatib

18/12/97 x 206-11 M-6

4805498

NIDADE	BC
CHAMADA:	71/UNICAMP
	EL 52a
Ex.	
COMBO BC/	32934
ROC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/03/98
N.º CPD	

CM-00106187-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

EL 52a  
EL 1a

**El-Khatib, Soraya**

Abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial em concentrações fisiopatológicas de  $Ca^{2+}$  / Soraya El-Khatib. -- Campinas, SP:[s.n.],1997.  
67f. ilustr.

Orientadora: Denise Vaz de Macedo  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Calcio. 2. Mitocondria. 3. Ciclosporina. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

*Abertura do Poro de Transição de Permeabilidade  
mitocondrial em concentrações fisiopatológicas de  $Ca^{2+}$*

**SORAYA EL-KHATIB**

**Orientador**

**Profa. Dra. DENISE VAZ DE MACEDO**

**Depto. de Bioquímica-IB-UNICAMP**

**Tese apresentada ao curso de pós  
graduação em ciências biológicas para  
obtenção do título de Mestre em ciências  
biológicas, área de concentração em Bioquímica.**

Este exemplar é devolvido à redação f. l.  
da tese de graduação e do candidato  
*Soraya El-Khatib*  
e aprovada pela Comissão Julgadora

18/12/97 x 36-11-11-6

**CAMPINAS-SP**

**1997**

---

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Denise Vaz de Macedo (Orientadora)

Denise Vaz de Macedo

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Eva Gunilla Skare Carnieri

Eva Gunilla Skare Carnieri

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Fernanda Ramos Gadelha

Fernanda Ramos Gadelha

**SUPLENTE**

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Ione Salgado Martins

\_\_\_\_\_

Campinas, 18 de dezembro de 1997.

*‘ Uma muralha não vai intimidar, algumas desilusões não irão desanimar  
diante da realidade da vida, que se enfrenta com fé, luta, amor, cultura,  
solidariedade e a sabedoria das palavras.’*

*Nizar El- Khatib*

*Dedico este trabalho à minha  
mãe Leda Maria, pelo exemplo  
de vida que és.*

---

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Denise Vaz de Macedo, pela oportunidade, amizade, confiança. E por me mostrar que fazer pesquisa não está entre as dez coisas mais fáceis do mundo, porém entre as mais belas.

A Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Lucia Pereira-da-Silva, pela oportunidade, paciência e pelas valiosas correções.

A Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Neoci, pela iniciativa de me introduzir ao Universo da Ciência.

Ao Armino Antônio Alves, o verdadeiro amigo.

Ao Daniel, pelas mitocôndrias e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica da UNICAMP.

Ao meu marido Elson de Almeida, pela companhia, amizade, apoio e paciência.

Aos meus pais Leda e Nizar, meu irmão Tarek, os amigos e companheiros de sempre.

Ao Sr. Wilson de Almeida e Sr<sup>a</sup>. Elsa Gratão de Almeida, pela consideração e amizade.

A minha família, pelo apoio.

A todos que cooperaram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

---

## ÍNDICE

<b>Resumo .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>5</b>
A. Mitocôndrias, fábricas de energia .....	5
B. Carreador ADP/ATP .....	7
C. Manutenção da homeostase de $\text{Ca}^{2+}$ : relevância fisiológica e patológica .....	8
-Sistemas de transporte de $\text{Ca}^{2+}$ .....	10
D. Sistemas de transporte de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial .....	11
E. Transição de permeabilidade mitocondrial dependente de $\text{Ca}^{2+}$ : Um breve histórico .....	15
F. Moduladores da abertura do PTP .....	17
G. Papel da CsA como inibidor específico do PTP .....	20
H. Identidade molecular do PTP .....	21
I. Carreador ADP/ATP X PTP .....	22
<b>Objetivos .....</b>	<b>23</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>24</b>
A. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato .....	24
B. Determinação do consumo de $\text{O}_2$ .....	25
C. Simulação das consequências do processo de isquemia/reperfusão em condições fisiopatológicas de $\text{Ca}^{2+}$ .....	26
D. Determinação das variações do volume mitocondrial (inchamento mitocondrial) .....	27
E. Determinação do potencial elétrico de membrana ( $\Delta\psi$ ) .....	28
F. Determinação da concentração de carreadores ADP/ATP ativos na membrana mitocondrial interna através da titulação com CAT .....	29
G. Extração e dosagem de nucleotídeos de adenina .....	29
<b>Resultados .....</b>	<b>31</b>



<b>Discussão .....</b>	<b>43</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>50</b>
<b>Comunicações em congressos .....</b>	<b>67</b>

---

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 01 .....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 02 .....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 03 .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 04 .....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 05 .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 06 .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 07 .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 08 .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 09 .....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 01 .....</b>	<b>42</b>

---

## **ABREVIACÕES**

AA: Antimicina A

AAC: Carreador ADP/ATP

ADP: Adenosina 5' difosfato

ATP: Adenosina 5' trifosfato

BHT: Butil hidroxitolueno

CAT: Carboxiatractilato

CR: Controle Respiratório

CsA: Ciclosporina A

DTT: Ditionitrito

EGTA: Ácido etileno glicol-bis ( $\beta$ -amino éter) N, N, N',N'- Tetracético

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo forma oxidada

FADH<sub>2</sub>: Flavina adenina dinucleotídeo forma reduzida

FCCP: Carbonil cianida *p*- trifluorometoxifenilhidrazona

GSH : Glutathione forma reduzida

GSSG: Glutathione forma oxidada

HEPES: [ N-(2 hidroxietil) piperazina N'-(2-ácido etanosulfônico)]

Ins-P<sub>3</sub> : Inositol 1,4,5-trifosfato

MFR: Mitocôndrias isoladas de fígado de rato

MMI: Membrana mitocondrial interna

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida

PTP: Poro de transição de permeabilidade

Pi: Fosfato inorgânico

SKT: Sacarose-KCl-Tris

TPP<sup>+</sup>: Tetrafenilfosfônio

TP : Transição de permeabilidade

V R: Vermelho de rutênio

$\Delta\psi$  : Potencial elétrico de membrana

---

## **RESUMO**

A natureza do Poro de Transição de Permeabilidade (PTP) existente em mitocôndrias isoladas tem sido estudada desde a década de 70 até os dias de hoje por diversos autores, sem ainda haver um consenso a respeito de sua composição molecular. Vários trabalhos formularam a hipótese de que o carreador ADP/ATP (AAC) poderia fazer parte da estrutura do PTP. Outros, mostraram que a abertura do PTP poderia ocorrer em situações de isquemia/reperfusão. Porém, na literatura, ainda não foi excluída a possibilidade de estar se estudando um artefato, pois estes trabalhos sempre se basearam no efeito de concentrações suprafisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (acima de 10  $\mu\text{M}$ ) ou seja, concentrações muito distantes das que poderiam ocorrer 'in vivo'.

Neste trabalho, procuramos verificar a ocorrência de abertura do PTP na presença de concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (0-500 nM) em condições que simulassem 'in vitro' as consequências de um processo de isquemia/reperfusão para as mitocôndrias. Ainda nestas condições, tentamos verificar o envolvimento do AAC na formação do PTP. Para tanto, variamos diferentes parâmetros dos ensaios como:  $[\text{Ca}^{2+}]$ , tempo de pré-incubação na presença do íon e temperatura do meio de reação. A caracterização da abertura do PTP, sensível a ciclosporina A (CsA), foi feita através da medida da velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  nos estados respiratórios 3 e 4 ( $v_3$  e  $v_4$  respectivamente) e controle respiratório (CR); formação de potencial elétrico de membrana ( $\Delta\psi$ ), através da captação do cátion lipofílico  $\text{TPP}^+$  e

inchamento mitocondrial. Para verificar como a abertura do PTP, nestas condições experimentais, influenciava a atividade do AAC realizamos uma titulação com CAT (carboxiatractilato) e extração e dosagem de nucleotídeos de adenina.

Os resultados mostraram que nossas condições experimentais de baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram suficientes para induzir abertura do PTP. Aparentemente a ação do  $\text{Ca}^{2+}$  é potencializada pelo aumento do período de pré-incubação das organelas com o íon, onde observamos uma diminuição em  $v_3$  e ligeiro estímulo em  $v_4$ , levando à queda no CR; aumento na permeabilidade da membrana a  $\text{H}^+$  e inchamento mitocondrial de baixa amplitude. Embora muitos trabalhos na literatura tenham mostrado algumas destas interrelações, a originalidade do nosso trabalho está em mostrar, pela primeira vez, a ocorrência da abertura do PTP em condições fisiopatológicas. A diminuição em  $v_3$  sugere que nestas condições ocorreu uma inibição na atividade do AAC. Esta inibição poderia ocorrer ou devida a uma diminuição no conteúdo de AAC ativos, que poderia estar se mobilizando para fazer parte da estrutura do poro, ou devida à perda de nucleotídeos de adenina endógenos com a abertura do poro, essenciais para troca obrigatória que o carreador catalisa. Nossos dados mostraram que o período de pré-incubação com concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , foi suficiente para induzir despolarização da membrana e perda de nucleotídeos de adenina do interior das organelas, sugerindo um envolvimento do AAC com a abertura do PTP nos seus estágios iniciais.

---

## **ABSTRACT**

Although the mitochondrial permeability transition pore (PTP) has been studied since the late 70s, there is no precise knowledge about its molecular structure. Ischemia and reperfusion process has been pointed as one of the conditions that might trigger the PTP opening and some authors suggest that the ADP/ATP carrier (AAC) is one of the proteins involved in the pore structure. This process is  $\text{Ca}^{2+}$ - dependent and, due to the high  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (above 10  $\mu\text{M}$ ) used throughout the literature, the possibility of the PTP be an artifact and not occur 'in vivo', under physiological conditions, could not be excluded.

Here we have studied the occurrence of the PTP in the presence of physiopathologic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (0-500 nM), under conditions where an ischemia/reperfusion process was simulated and the involvement of the AAC was analysed. The mitochondria were incubated at  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations, preincubation times in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and at different temperatures. The CsA-sensitive PTP opening was studied through the determination of  $\text{O}_2$  consumption under respiratory States 3 and 4 ( $v_3$  and  $v_4$  respectively) and calculation of the respiratory control ( $\text{RC} = v_3/v_4$ ); through the generation of membrane electrical potential ( $\Delta\psi$ ), using the uptake of the lipophilic cation  $\text{TPP}^+$  and also through the mitochondrial swelling. Under the same conditions the involvement of the AAC was analysed by a titration with carboxyatractylate (CAT) and extration followed by the determination of adenine nucleotide release. Our results showed that these experimental concentrations were enough to open the PTP. It seems that the  $\text{Ca}^{2+}$  effect is

potencialized by an increase on the mitochondria preincubation time in the presence of the ion, without addition of exogenous respiratory substrates. A decrease in  $v_3$  and a slight increase in  $v_4$  was observed, leading to a decrease in RC. There was also an increased permeability to  $H^+$  and a small amplitude mitochondrial swelling. Although most of these effects have already been reported in the literature, the originality of our results is to show, for the first time, the PTP occurrence under physiopathological  $Ca^{2+}$  concentrations. The observed decrease in  $v_3$  suggests a possible inhibition of the AAC activity. This could be explained either through a decrease of active carriers being mobilized to form PTP or due to endogenous adenine nucleotides loss, which are needed to the exchange the carrier catalyses. Our data show that preincubation under physiopathological concentrations was sufficient to induce a membrane depolarization and loss of internal adenine nucleotides, suggesting the involvement of the AAC at the very beginning of PTP generation.



---

## **INTRODUÇÃO**

### **A. Mitocôndrias, fábricas de energia.**

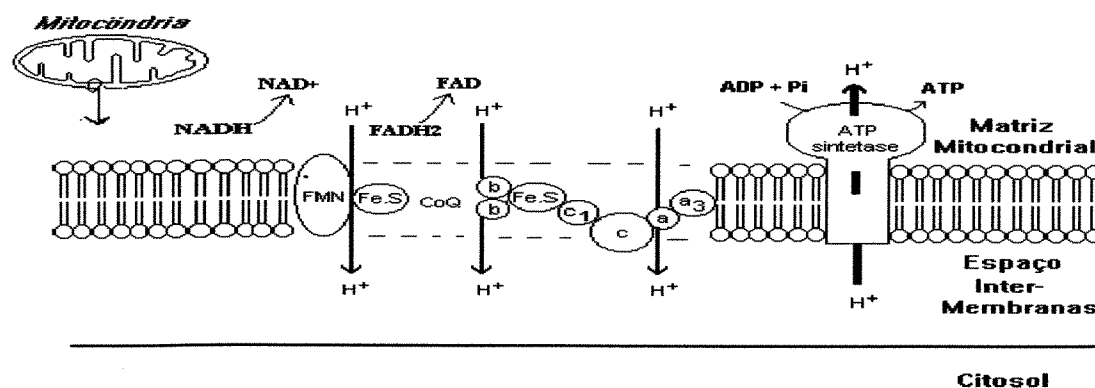
As mitocôndrias são organelas celulares muito complexas constituídas de dupla membrana, sendo uma interna e outra externa, espaço intermembranas e matriz mitocondrial. Estas organelas têm como principal função a produção aeróbica de ATP. A hidrólise da molécula de ATP libera energia suficiente para realizar diversos trabalhos intracelulares, tais como contração muscular, transporte ativo de metabólitos através das membranas, processos de síntese e transmissão de impulsos nervosos, entre outros. Assim sendo, a síntese de ATP é de vital importância para os organismos vivos e necessita de energia para ocorrer. A produção de ATP, a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi) é obtida principalmente através da oxidação das moléculas alimentares provenientes dos carboidratos, lipídios e proteínas constituintes dos alimentos, num processo denominado de fosforilação oxidativa. Assim, durante o catabolismo, as reações de oxidação de metabólitos pelo ciclo de Krebs e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos resultam na produção de coenzimas na forma reduzida (NADH e  $\text{FADH}_2$ ). Na membrana mitocondrial interna (MMI), onde está localizada a cadeia de transporte de elétrons, as coenzimas são reoxidadas através da remoção de seus elétrons, que são transferidos pelas enzimas que compõem a cadeia respiratória até oceptor final, o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ). Este, ao receber quatro elétrons liga-se a dois prótons do meio formando  $\text{H}_2\text{O}$ . Simultaneamente, a energia gerada pelas reações de óxido-redução que acontecem durante o transporte de elétrons, é utilizada para o bombeamento unidirecional de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos proteicos I, III e IV, gerando um

gradiente eletroquímico de prótons na membrana ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ). O  $\Delta\mu\text{H}^+$ , possui dois componentes: um elétrico ( $\Delta\psi$ ) e outro químico ( $\Delta\text{pH}$ ), relacionados entre si de acordo com a equação:

$$\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\psi - 60\Delta\text{pH}.$$

A volta específica de prótons pela  $\text{FoF}_1$  ATP sintetase (enzima também localizada na MMI) é termodinamicamente favorável e é imprescindível para o desligamento do ATP sintetizado a partir de ADP e  $\text{P}_i$  (Figura 1). Esta teoria, chamada de teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa foi proposta por Mitchell em 1960 e o fez ganhador do prêmio Nobel em 1978 (Mitchell, 1961; Mitchell & Moyle, 1969). Assim, para que este sistema transdutor de energia esteja funcionando em perfeitas condições, é imprescindível que a MMI seja impermeável a prótons, a íons tais como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ , a moléculas neutras como sacarose e também a nucleotídeos de adenina.

É importante salientar que a energia do gradiente eletroquímico de prótons, além de estar acoplada à síntese de ATP, também fornece energia para o transporte ativo de metabólitos através da membrana mitocondrial interna (MMI). Portanto, o transporte de íons e metabólitos através da MMI, geralmente é feito através de transportadores específicos, que asseguram uma comunicação controlada entre o citosol e a matriz mitocondrial.



**Figura 1** - Esquema da membrana interna da mitocôndria, mostrando a formação do  $\Delta\mu\text{H}^+$  pelo funcionamento da cadeia respiratória e a entrada dos prótons pela  $\text{FoF}_1$ -ATP sintetase.

## **B. Carreador ADP/ATP (AAC).**

O carreador ADP/ATP (AAC) ou translocase de nucleotídeos de adenina, uma das proteínas mais abundantes da membrana mitocondrial interna, é responsável pela troca entre  $\text{ADP}^{3-}$  citosólico e  $\text{ATP}^{4-}$  da matriz. Desempenha portanto um papel importante na regulação da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (Tager et alii, 1983) e na determinação do conteúdo e razão de nucleotídeos de adenina nas células (Davis & Lumeng, 1975). A existência de inibidores altamente específicos para esta proteína forneceram dados importantes para um melhor entendimento das propriedades e mecanismos de funcionamento do AAC. Inibidores como o atractilato (ATR) ou carboxiatractilato (CAT), por serem hidrofílicos, ligam-se seletivamente ao carreador do lado externo da membrana. Já o boncrecato (BKA), outro inibidor específico, liga-se somente do lado interno, voltado para matriz mitocondrial.

Uma das primeiras observações a respeito do mecanismo de ação do carreador foi que mudanças na velocidade de consumo de oxigênio do estado respiratório 4 (na presença de substrato respiratório) para o estado 3 (após a adição de ADP) eram seguidas por uma contração de baixa amplitude, registrada pelo aumento na absorbância da suspensão mitocondrial a 540 nm (Scherer & Klingenberg, 1974). Durante algum tempo, se acreditou que este efeito era devido a transição do estado respiratório do repouso para o 'ativo'. Na década de 70 entretanto, Klingenberg e colaboradores demonstraram que os inibidores do AAC também influenciavam este processo. O CAT e o ATR aboliam o aumento na absorbância induzido pelo ATP, enquanto o BKA acentuava ligeiramente o efeito do ATP (Scherer & Klingenberg, 1974). Este mesmo grupo havia também verificado efeitos distintos destes inibidores sobre a ligação do ADP ao carreador; ATR ou CAT desligavam imediatamente ADP dos sítios de ligação de nucleotídeos de adenina,

enquanto BKA aumentava um pouco essa ligação (Klingenberg & Bucholz, 1973). Estas observações, em conjunto com o modelo dimérico estrutural do AAC levou ao conceito aceito até hoje, de que o carreador pode ocupar na membrana dois estados conformacionais diferentes, dependendo da orientação dos sítios de ligação de nucleotídeos de adenina: o estado 'c', com os sítios de ligação de nucleotídeos de adenina voltados para o citosol, e o estado 'm', com os sítios de ligação voltados para a matriz mitocondrial (Weideman et alii, 1970).

### **C. Manutenção da homeostase de $\text{Ca}^{2+}$ celular: Relevância fisiológica e patológica.**

O  $\text{Ca}^{2+}$  nos organismos superiores, é um dos elementos químicos mais abundantes. Cerca de 99% está presente na forma de hidroxapatita, no esqueleto e dentes; o restante está localizado nos líquidos intra e extracelulares, na forma de fosfatos, carbonatos e hidróxidos. O  $\text{Ca}^{2+}$  assume portanto, além de uma função estrutural, a de reservatório, na forma de hidroxapatita importante para a manutenção das concentrações dos fluidos corpóreos (Carafoli, 1987; Ritcher & Kass, 1990).

Nas células, o  $\text{Ca}^{2+}$  é encontrado principalmente no citosol, no retículo endoplasmático, e no núcleo, que devem atuar de forma integrada para permitir uma distribuição adequada do íon nas organelas ou nos eventos intracelulares sujeitos à sua regulação. Em condições de repouso, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol das células é sempre mantida muito baixa, da ordem de nM quando comparada à existente no líquido extracelular (da ordem de mM). A existência deste gradiente de concentração confere ao  $\text{Ca}^{2+}$ , quando sua concentração está aumentada no citosol, o papel de segundo mensageiro celular. Ou seja, o aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico

( $[Ca^{2+}]_i$ ) é capaz de sinalizar a regulação e/ou manutenção de inúmeros processos celulares, tais como glicogenólise, gliconeogenese, divisão celular, estímulo da motilidade, controle da secreção de hormônios e neurotransmissores, termogênese, aceleração da reoxidação do NADH e regulação da concentração de  $O_2$  nas células (Cobbald & Rink, 1987; Carafoli, 1987; Gunter et alii, 1994).

Por outro lado, embora o íon  $Ca^{2+}$  desempenhe uma função extremamente importante na fisiologia celular, em algumas condições patológicas, quando ocorrem danos em alguma das membranas envolvidas na sua homeostase intracelular, há um consequente aumento do  $Ca^{2+}$  no citosol. Este aumento, se mantido por um longo período de tempo interrompe severamente as funções mitocondriais relacionadas com os processos transdutores de energia, inativando temporária ou permanentemente as  $Ca^{2+}$  - ATPases da membrana plasmática. O resultado final é um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  suficiente para disparar processos que dependem do íon, como por exemplo a ativação de enzimas catabólicas como fosfolipases, endonucleases e proteases, além de induzir a formação de numerosas evaginações na membrana das células. Existe na literatura, a proposta de que a ação conjunta destes eventos pode levar à morte celular (Lemasters et alii, 1987; Bond, 1988; Ritcher & Kass, 1990).

Devido sua importância, a manutenção do gradiente de concentração de  $Ca^{2+}$  entre os compartimentos intra e extracelulares envolve sistemas de transporte, que diferem tanto na sua afinidade quanto na sua capacidade de transporte e ainda na importância da manutenção de estados fisiológicos ou patológicos celulares (Murphy et alii, 1980; Rasmussen & Weisman, 1983; Williams et alii, 1986; Carafoli, 1987; Cobbald & Rink, 1987; Duddy et alii, 1989; Kawanishi et alii, 1989).

## ***Sistemas de transporte de $\text{Ca}^{2+}$***

A **membrana plasmática** é a principal responsável pela manutenção do gradiente de concentração entre os compartimentos intra e extracelulares. O  $\text{Ca}^{2+}$  geralmente entra nas células através de canais específicos, que são abertos por variações no potencial elétrico, sensíveis a neurotransmissores adrenérgicos. O transporte do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, contra seu gradiente de concentração é feito por dois sistemas: o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que é mais ativo em células de coração e cérebro e troca 3  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , e a enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, que retira  $\text{Ca}^{2+}$  da célula, pelo acoplamento da hidrólise de 1mol de ATP para cada mol de  $\text{Ca}^{2+}$  transportado (Carafoli, 1987; Ritcher & Kass, 1990).

O **retículo endoplasmático** é a principal organela responsável pela manutenção de uma baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A captação do íon é feita por uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase controlada por hormônios, que transporta dois íons  $\text{Ca}^{2+}$  para cada ATP hidrolisado. O mecanismo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático envolve a produção de outro segundo mensageiro, inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{Ins-P}_3$ ) (Carafoli, 1987; Ritcher & Frei, 1988).

O **núcleo** também possui capacidade de captar e tamponar  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo estar envolvido na regulação da concentração citosólica deste íon. A captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo núcleo envolve a ação de uma bomba, dependente de calmodulina e gera um aumento líquido de  $\text{Ca}^{2+}$  livre na matriz nuclear. Já a liberação também é mediada pelo  $\text{Ins-P}_3$ , o que evidencia a participação de hormônios e outros agentes na regulação da concentração intranuclear de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carafoli, 1987).

O transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas **mitocôndrias** é feito através da MMI, é bem mais complexo e envolve diferentes sistemas. Por sua vez, a existência de diversos sistemas reflete elos funcionais entre as mitocôndrias e processos no citoplasma mediados pelo íon. O acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias é

importante para a regulação do metabolismo energético. Nestas organelas o  $\text{Ca}^{2+}$  exerce o papel de ativador alostérico das enzimas piruvato desidrogenase,  $\text{NAD}^+$ -isocitrato desidrogenase e 2-oxoglutarato desidrogenase (Hansford, 1985; Unitt et alii, 1989; McCormack et alii, 1990). Assim, o aumento fisiológico do  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol, na faixa de concentração entre 100-300 nM ocorre também para sinalizar a necessidade de aumento na produção de ATP pelas células (Gunter et alii, 1994). Por outro lado, há evidências na literatura que alterações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  das mitocôndrias, seguida de uma disfunção no metabolismo mitocondrial são passos essenciais nos processos de apoptose, carcinogênese ou de danos celulares associados com processos da isquemia/reperfusão (Griffiths & Halestrap, 1995). Nesse sentido, embora nos últimos 40 anos tenha havido grande investigação, o controle e o mecanismo de ação detalhado estão longe de estar totalmente elucidados.

#### **D. Sistemas de transporte de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial.**

A MMI, ao contrário da membrana plasmática e do retículo, não possui ATPase transportadora (Gunter et alii, 1994). O  $\text{Ca}^{2+}$  entra nas mitocôndrias por um processo eletroforético, em resposta ao potencial elétrico ( $\Delta\psi$ ) gerado durante a respiração e que constitui o principal componente do  $\Delta\mu\text{H}^+$ . Este processo, é conhecido como mecanismo de *influxo de  $\text{Ca}^{2+}$*  e é uma via muito rápida de transporte (Scarpa & Azzzone, 1970; Selwyn et alii, 1970; Moore, 1971; Crompton et alii, 1977; Nicholls & Akerman, 1982; Akerman & Nicholls, 1983; Gunter & Pfeiffer, 1990; Gunter et alii, 1994). Por este transportador (uniporter) também passam vários outros cátions bivalentes, como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  e lantanídeos, os quais competem com o  $\text{Ca}^{2+}$ , inibindo seu transporte (Gunter & Puskin, 1972; Akerman et alii,

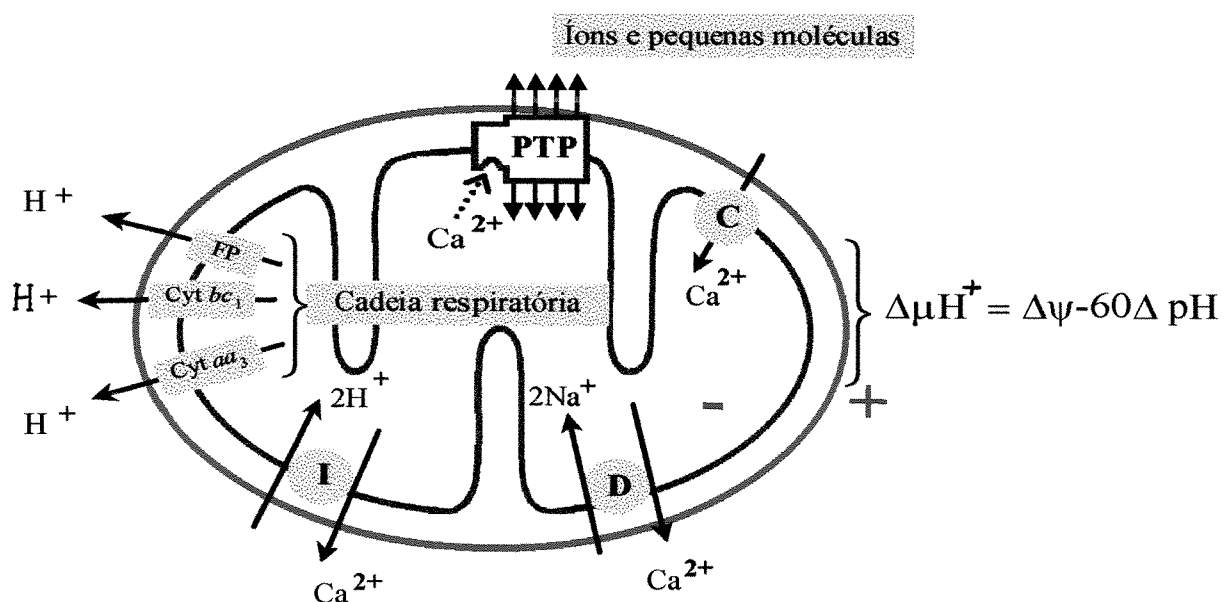
1977). O vermelho de rutênio também é um potente inibidor não competitivo deste carreador (Reed & Bygrave, 1975).

O mecanismo de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial por sua vez pode ser dividido inicialmente em dois tipos: um de baixa capacidade e outro de alta capacidade de transporte. O *efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  de baixa capacidade de transporte*, também pode ser subdividido em dois: *independente de  $\text{Na}^+$*  e *dependente de  $\text{Na}^+$* . Esses sistemas estão esquematizados na figura 2. A atividade máxima desses transportadores é negligível se comparada a atividade máxima da via de influxo, mas seu funcionamento assegura o ajuste preciso da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz, de acordo com a necessidade da fosforilação oxidativa. Ou seja, a operação destes transportadores à velocidade máxima não dissipa o potencial de membrana o suficiente para inibir a síntese de ATP (Novgorodov & Gudz, 1996). O mecanismo de *efluxo independente de  $\text{Na}^+$*  transporta também  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  além de  $\text{Ca}^{2+}$  e parece trocar  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ , com gasto de energia (Akerman, 1978; Bernardi & Azzone, 1979; Brand 1985; Saris, 1987). Esta via é inibida por cianeto, alguns desacopladores e altos níveis de vermelho de rutênio (Lukács & Fonyó, 1985; Gunter et alii, 1986; Gunter et alii, 1988; Gavin et alii, 1990; Fralix et alii, 1991). O mecanismo de *efluxo dependente de  $\text{Na}^+$*  pode ser identificado como um carreador que troca  $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$  (Brand, 1985; Crompton et alii, 1977; Li et alii, 1992; Kroner, 1986). Esta via pode ser inibida por uma grande escala de compostos, tais como, trifluoperazina, verapamil, clorazepam,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e também por altos níveis de vermelho de rutênio (Gunter & Pfeiffer, 1990). Estes dois mecanismos citados acima (*independente de  $\text{Na}^{2+}$*  e *dependente de  $\text{Na}^+$* ), existem em mitocôndrias de diversos tecidos. Entretanto, o primeiro é mais frequente em fígado e rins, sendo o segundo predominante em coração, músculo esquelético e cérebro (Wingrove & Gunter, 1986).

Atualmente, um outro mecanismo de *efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , de alta capacidade de transporte* vem sendo formulado (Novgorodov & Gudz, 1996).



Ele propõe a existência de um poro proteico latente na MMI, cuja abertura seria induzida pela ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  a sítios internos da membrana somada a outras condições como concentração de fosfato elevada, baixos níveis de nucleotídeos de adenina ou estresse oxidativo. A abertura deste poro não específico na membrana, com um diâmetro de aproximadamente 2,8 nm, culminaria no aumento de permeabilidade para solutos com massa molecular menor ou igual a 1500 Da. (Macedo et alii, 1988; Gunter & Pfeiffer, 1990; Zoratti & Szabó, 1995). Este processo é conhecido na literatura como “Transição de Permeabilidade” (TP) e por ser reversível e modulado há um certo consenso atualmente que seria mediado pela abertura de um canal ou poro na membrana, também conhecido como “Poro da Transição de Permeabilidade” (PTP). (Crompton et alii, 1987; Crompton & Costi, 1988).



**Figura 2.** Sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. I: efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  independente de  $\text{Na}^{2+}$ ; D: efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de  $\text{Na}^{2+}$ ; PTP: poro da transição de permeabilidade; C: via de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  por ‘uniporter’ dependente de  $\Delta\psi$ ;  $\Delta\mu\text{H}^+$ : gradiente eletroquímico de prótons.

Historicamente, a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias “in vitro”, após serem carregadas com o íon, sempre foi considerada como inespecífica e irreversível (Crompton & Costi, 1987; Gunter & Pfeiffer, 1990). Reforçando esta idéia, as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizadas para visualizar o processo de abertura do PTP, de maneira quase universal são suprafisiológicas, ou seja, jamais seriam alcançadas nas células “in vivo”. Assim, a abertura do PTP tem sido associada ao dano mitocondrial observado durante algumas situações patológicas, nas quais o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células causaria um aumento prolongado na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , o que levaria a um acúmulo do íon pelas mitocôndrias. De acordo com esta proposta, a abertura do PTP ocorreria após a hipóxia ou isquemia de um órgão, durante a subsequente restauração do fluxo sanguíneo pela reperfusão ou no caso da ação tóxica de algumas drogas e seus metabólitos (Crompton & Costi, 1987; Gunter & Pfeiffer, 1990; Griffiths & Halestrap, 1995). Isto faz com que o conhecimento dos mecanismos envolvidos nesta perturbação das funções mitocondriais possa ser útil, por exemplo, na prática médica, para o desenvolvimento de métodos de profilaxia e tratamento de órgãos isquêmicos ou em hipóxia, ou ainda no transplante de órgãos.

Adicionalmente em defesa de um possível papel fisiológico para a abertura do PTP, alguns autores sugerem sua participação na exibição de ‘capacidade de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelo próprio íon’, observada na transdução de sinais celulares mediados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Ins-P}_3$  (Ichas et alii, 1994).

## **E. Transição de Permeabilidade Mitochondrial dependente de $\text{Ca}^{2+}$ : Um Breve Histórico**

Como visto, uma das bases do modelo quimiosmótico da transdução de energia é a impermeabilidade da MMI a todos os solutos que não possuam sistemas de transporte específicos (Mitchell, 1961; Mitchell & Moyle, 1969). Entretanto, durante as décadas de 60 e 70 ficou estabelecido que a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  era uma condição capaz de induzir um aumento inespecífico na permeabilidade da membrana. A partir dessa época, foram testados mais de 65 compostos capazes de potencializar a permeabilização da MMI induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Entre eles estão o fosfato inorgânico (Pi), agentes oxidantes, inibidores do carreador ADP/ATP, desacopladores como o FCCP e vários outros (Gunter & Pfeiffer, 1990; Zoratti & Szabò, 1995). Uma das formas de demonstrar essa permeabilização dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  tem sido através do uso da técnica de inchamento mitocondrial, registrada pela diminuição na absorbância da suspensão a 520nm. Esta permeabilização, também está sempre associada ao colapso progressivo de  $\Delta\psi$  e a liberação de outros componentes da matriz tais como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , o próprio  $\text{Ca}^{2+}$ , além de outros íons e moléculas com massa molecular menor que 1.500 Da. (Zoratti & Szabò, 1995). Por outro lado, todo este processo pode ser revertido, e a remoção de  $\text{Ca}^{2+}$  pela adição de EGTA ao meio de reação é suficiente para que as mitocôndrias se “re-selem” (Crompton et alii, 1987).

Felizmente, para o melhor entendimento do mecanismo de ação do  $\text{Ca}^{2+}$  nesse processo, no final da década de 80 foi demonstrada a existência de um inibidor da abertura do PTP altamente específico, a Ciclosporina A (CsA). Concentrações extremamente baixas, da ordem de pmoles (60-100 pmoles/mg de proteína mitocondrial) são capazes de inibir a TP. Isto reforçou a idéia que a TP resulta da alteração de algum componente específico da MMI, que pode ser regulado. Começou-se então a trabalhar com a existência de um poro

proteico na MMI que seria capaz de se abrir na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e outros agentes (Fournier & Crevat, 1987; Crompton, 1988; Halestrap & Davidson, 1990; Petronilli et alii, 1994). Embora a formação deste poro dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  tenha sido postulada desde 1979 por Hunter e Haworth (Hunter & Haworth, 1979a) somente agora, na década de 90, esta hipótese está sendo aceita como verdadeira (Bernardi, 1992b; Crompton et alii, 1992; Novgorodov et alii, 1992). Foi também demonstrado que há três sítios regulatórios da abertura do PTP na MMI: um sítio de ligação interno, que quando ocupado por  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta a probabilidade do poro se abrir; um sítio de ligação externo, que quando ligado ao  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta a probabilidade do poro permanecer fechado; e um sítio de ligação para CsA, independente dos outros dois, que quando ocupado pela droga, também aumenta a probabilidade do poro permanecer no estado fechado (Bernardi et alii, 1993; Petronilli et alii, 1993).

Uma das hipóteses propostas para o mecanismo de ação do  $\text{Ca}^{2+}$  que vigorou um bom tempo na literatura sugeria que a TP seria consequência de danos aos lipídeos da membrana causados pela ativação da enzima fosfolipase  $\text{A}_2$  mitocondrial pelo íon, associada à queda na razão GSH/GSSG (Pfeiffer et alii, 1988; Sandri et alii, 1990). Segundo esses autores isto perturbaria o ciclo normal de deacilação-reacilação dos fosfolipídeos de membrana implicando no acúmulo dos produtos de degradação da fosfolipase  $\text{A}_2$ : ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. Estes, aumentariam a condutância da membrana a prótons, responsável pela saída de  $\text{Ca}^{2+}$  das organelas pelo reverso do uniporter (Pfeiffer et alii, 1988). Com a demonstração de que concentrações nanomolares de CsA, que inibem completamente a TP não afetam a atividade da fosfolipase  $\text{A}_2$  mitocondrial, a hipótese de um dano direto na integridade da MMI induzido pela ativação da fosfolipase  $\text{A}_2$  pelo  $\text{Ca}^{2+}$  como sendo o responsável pela TP foi completamente derrubada (Broekemeier et alii, 1989).

Outra hipótese lançada na literatura no final da década de 80 sugeria

que o processo de permeabilização da membrana estaria associado a oxidação de grupos tiólicos de algumas proteínas da membrana interna (Fagian et alii, 1990; Vercesi, 1993). Estes autores demonstraram que mitocôndrias expostas ao  $\text{Ca}^{2+}$  e agentes oxidantes, formavam agregados de proteínas de alto peso molecular na MMI, induzidos pela formação de pontes dissulfeto. De acordo com esta hipótese, defendida até hoje, a formação desses agregados proteicos seria induzida por processos radiculares mediados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (Valle et alii, 1993; Vercesi, 1993). Esta hipótese foi baseada no fato do ditioneitol (DTT), um agente redutor de grupos dissulfeto, inibia a TP induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e oxidantes. No final dos anos 80 vigorava também a proposta que a oxidação de fosfolipídeos da membrana mitocondrial poderia estar envolvida no mecanismo molecular de permeabilização da membrana induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , pois o butilhidroxitolueno (BHT) também era capaz de inibir a TP induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e oxidantes (Carbonera & Azzone, 1988). Nesta mesma linha de raciocínio foi proposto que a ação de espécies reativas de  $\text{O}_2$  intermediavam de alguma maneira este processo e que a peroxidação da MMI, poderia facilitar a hidrólise dos fosfolipídios pela enzima fosfolipase  $\text{A}_2$ , estimulada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (Erdahl et alii, 1991). No entanto, utilizando DTT, ADP, BHT entre outras drogas, Macedo e colaboradores mostraram que o ADP é mais efetivo em proteger as organelas e que provavelmente a oxidação de grupos tiólicos é a consequência e não a causa primária da abertura do PTP.

## **F. Moduladores da abertura do PTP**

Desde 1992 o grupo de Bernardi vem publicando uma série de trabalhos sugerindo fortemente que o gradiente protônico modula diretamente a abertura do PTP. Ou seja, o poro permaneceria fechado quando o  $\Delta\psi$  está alto e/ou o pH da matriz está abaixo de 7.0 e se abriria com a despolarização

da membrana (Bernardi et alii, 1992a; Nicolli et alii, 1993; Scorrano et alii, 1997). No entanto, a evidência para a proposta de funcionamento do PTP como um canal dependente de voltagem é indireta e está baseada nos efeitos protonofóricos do FCCP. Na interpretação desses autores o FCCP induz a TP na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  porque induz colapso em  $\Delta\psi$ . Ou seja, a probabilidade de abertura do PTP seria modificada por alterações no potencial de membrana. Explicam assim a ação dos diversos compostos que potencializam ou inibem a abertura do PTP, por alterar de alguma maneira o potencial elétrico de membrana (Nicolli et alii, 1996). Reforçando esta hipótese, o grupo de Novgorodov postula que o PTP pode operar em dois estados, com seletividades diferentes: um estado permeável somente a  $\text{H}^+$  e um estado permeável à sacarose e outros solutos com massa molecular menor que 1500 Da (Novgorodov et alii, 1992; Novgorodov & Gudz, 1996).

Em oposição a esta proposta, o grupo de Vercesi também vem publicando uma série de artigos postulando que a abertura do PTP seria modulada principalmente pela oxidação de ditiois críticos de proteínas componentes da estrutura do poro. Este ataque oxidativo seria mediado pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que estaria aumentada na presença do  $\text{Ca}^{2+}$ . Segundo esses autores, o  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz aumentaria a produção de EROS pelas mitocôndrias, via mobilização de estoques intramitocondriais de  $\text{Fe}^{2+}$ , capazes de estimular a reação de Fenton com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Suportando esta hipótese, foi descrito que a catalase pode prevenir a abertura do PTP dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de peróxido exógeno (Castilho et alii, 1995). Esse grupo mostrou também que FCCP pode aumentar a formação de EROS na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Contrariando esses resultados, foi publicado recentemente pelo grupo de Bernardi recentemente demonstrou, que a abertura do PTP induzida por FCCP e  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre na ausência da formação de EROS e que a catalase tem pouca eficiência em proteger as organelas, fortalecendo a hipótese de que a despolarização da

membrana seja a causa primária da abertura do PTP (Scorrano et alii, 1997).

Resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa também não concordam com a proposta do ataque oxidativo à estrutura do poro mediado por EROS. Resultados prévios mostraram ocorrência de lipoperoxidação na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  somente quando um oxidante, como t-butilhidroperóxido (t-buOOH) era adicionado, mas não na presença de Pi, independente da concentração de Pi utilizada em conjunto com o  $\text{Ca}^{2+}$  (Nepomuceno et alii, 1991). Além disso, nessas mesmas condições, com  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi, pequenas concentrações de  $\text{FeSO}_4$  exógeno são sempre capazes de induzir altos níveis de peroxidação lipídica (Alonso et alii, 1997). Nessa mesma linha de raciocínio, quando comparamos a capacidade do ADP (nucleotídeo de adenina), CsA (droga que inibe especificamente o PTP), BHT (sequestrador de radicais livres de oxigênio) e DTT (redutor de grupamentos dissulfeto) em proteger as organelas incubadas na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  em condições oxidativas (na presença de t-buOOH) ou não (na presença de Pi), foi mostrado que para as duas condições experimentais utilizadas a presença de ADP ou CsA foi sempre mais eficiente em proteger as organelas, particularmente dos efeitos do íon, enquanto o aumento na concentração de oxidante houvesse levado a uma diminuição no poder protetor de ambos, ADP e CsA (Macedo et alii, 1993; Macedo et alii, 1997). Estes dados indicaram que o estado de poro aberto induzido pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , na ausência de oxidantes exógenos, não envolve necessariamente nem a oxidação de grupos tiólicos de proteínas ou a peroxidação de lipídeos da membrana. Nossa interpretação é que sob condições oxidativas, a formação de dissulfetos que certamente ocorre é um evento que se segue a abertura do poro induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , provavelmente como consequência da baixa no sistema de defesa antioxidante das organelas (Macedo et alii, 1997).

## G. Papel da Ciclosporina A como inibidor específico do PTP

A CsA é uma droga imunossupressora, usada na clínica médica para evitar a rejeição a órgãos transplantados (Fournier & Crevat, 1987; Crompton & Costi, 1988; Halestrap & Davidson, 1990; Petronilli et alii, 1993). Acredita-se que o alvo principal da CsA nas células seja uma classe de proteínas conhecidas como ciclofilinas, que têm a mesma atividade da enzima peptidil prolil *cis-trans* isomerase (PPIase), aparentemente envolvida no ‘folding’ proteico. Embora as ciclofilinas estejam presentes em todos os tecidos e células eucarióticas, somente na década de 90 foi detectada atividade prolil isomerase em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e coração bovino (Halestrap & Davidson, 1990); embora ainda não se saiba ao certo qual a função da ciclofilina intramitocondrial. Além da ciclofilina da matriz, recentemente Andreeva e colaboradores mostraram que existe uma proteína na membrana interna de 11-22 kDa, a qual liga CsA com alta afinidade, principalmente em condições de ADP elevado (Andreeva et alii, 1995). Reforçando a proposta de um sítio de ligação na membrana para CsA, nosso grupo de pesquisa demonstrou pela primeira vez na literatura a abertura de PTP sensível a CsA em partículas submitocondriais, destituídas dos componentes da matriz (Macedo et alii, 1997). Além disso, recentemente também mostramos que CsA é capaz de inibir a ação de diferentes isoformas de fosfolipase A<sub>2</sub> exógenas na membrana (Valente et alii, 1997).

Nucleotídeos de adenina como ADP e ATP, que são considerados protetores menos efetivos, interagem com a CsA para inibir a abertura do PTP. Nesse sentido, observou-se que mitocôndrias de fígado, quando permeabilizadas pelo Ca<sup>2+</sup>, recuperavam totalmente o potencial de membrana se tratadas com CsA + ADP na presença ou ausência de Mg<sup>2+</sup> e não somente com CsA ou ADP ou Mg<sup>2+</sup> sozinhos (Novgorodov et alii, 1992; Macedo et alii, 1997).



## H. Identidade Molecular do PTP

A técnica de Patch-Clamp, quando aplicada à membrana mitocondrial interna mostrou a existência de uma variedade de canais (Zoratti & Szabó, 1995). Dentre eles, o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) foi claramente identificado com as porinas da membrana externa. Na MMI foi identificado o canal de muticondutância ou megacanal (Petronilli et alii, 1993). Entretanto, a complexidade da MMI ainda não permitiu uma melhor identificação do megacanal. Ambos, VDAC e megacanal mostraram capacidade de serem ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  e inibidos por CsA (Zoratti & Szabó, 1995), suportando sua identidade com a do PTP. Recentemente, o grupo de Klingenberg sugeriu a identificação do AAC com o megacanal (Klingenberg, 1992). O AAC, tem sido considerado o candidato mais provável para a formação do PTP já há algum tempo (Asimakis et alii, 1977). Com os trabalhos de Le Quoc ficou evidente a capacidade desta proteína favorecer ou impedir a abertura do poro dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes autores observaram que ligantes como CAT, ATR, palmitoil-CoA e piridoxal-5-fosfato, estabilizariam a conformação 'c' do carreador, induzindo a TP por aumentar a condutividade específica para  $\text{H}^+$  e  $\text{K}^+$  da membrana, na presença de concentrações suprafisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Já o BKA, oligomicina (oligo) ADP e acil-CoA, estabilizariam a conformação 'm', levando a um efeito oposto. Foi visto também que uma alta razão  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  favoreceria a conformação 'c' do carreador (Le Quoc & Le Quoc, 1988; Le Quoc & Le Quoc, 1989; Panov, 1992; Zoratti & Szabò, 1995).

## I. Carreador ADP/ATP x PTP

A discussão mais recente sobre o tipo de relação existente entre o poro e o carreador ADP/ATP baseia-se em duas propostas. Os trabalhos pioneiros de Hunter e Haworth sugerem a existência de duas estruturas distintas embora interativas (Hunter & Haworth, 1979a,b). Em favor desta proposta, o grupo de Novgorodov demonstrou que o efeito da CsA pode ser modulado pela interação do ADP com um sítio de baixa afinidade, insensível a CAT, sugerindo uma ação sinérgica dos dois agentes para fechar o poro (Novgorodov et alii, 1992). Entretanto, resultados recentes de nosso grupo de pesquisa não confirmam a insensibilidade desse processo ao CAT. Foi mostrado que na presença de ADP e CsA, a adição de CAT induz uma queda parcial em  $\Delta\psi$ , aparentemente associada à participação do AAC no processo (Macedo et alii, 1997).

A segunda proposta foi sugerida pelo grupo de Halestrap, que o próprio carreador ADP/ATP poderia ser convertido a um poro inespecífico (Halestrap & Davidson, 1990). De acordo com esta hipótese, o poro se abriria na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  quando a ciclofilina da matriz mitocondrial, estiver ligada ao carreador ADP/ATP. Esta ligação estaria facilitada na presença de CAT. A proposta é que a ligação, ciclosporina-ciclofilina evitaria a interação desta última com o carreador e consequentemente previniria sua transformação em um poro inespecífico dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Halestrap & Davidson, 1990). Reforçando a participação do AAC, resultados recentes de nosso grupo indicam que, em uma situação de baixo  $\Delta\psi$ , o  $\text{Ca}^{2+}$  induz uma aparente diminuição na atividade do AAC, revertida por CsA. Entretanto, a demonstração de abertura de PTP sensível a CsA em partículas submitocondriais aparentemente descarta a necessidade da ligação AAC/ciclofilina matricial para sua abertura (Macedo et alii, 1993).

---

## **OBJETIVOS**

Embora, sendo estudado há cerca de 40 anos, o processo de abertura do PTP dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias isoladas, sempre foi observado na presença de concentrações suprafisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , geralmente acima de  $10\mu\text{M}$ . Como estas organelas dificilmente estarão expostas a uma concentração dessas de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior das células, nunca foi possível afastar completamente a hipótese de estarmos todos estudando um artefato provocado pelas altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizadas nos estudos “in vitro”. Por outro lado, condições de baixo  $\Delta\psi$  facilitam a abertura do PTP (Scorrano et alii, 1997) e uma das situações em que se propõe haver abertura de PTP é na reperfusão, após uma isquemia prolongada (Griffiths & Halestrap, 1995).

Um dos objetivos do presente trabalho foi verificar a ocorrência de abertura de PTP na presença de concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (0 - 500 nM), em condições que simulassem “in vitro” as *consequências* de um processo de isquemia/reperfusão para as mitocôndrias.

Outro objetivo do trabalho foi verificar o envolvimento do AAC na formação do PTP nestas mesmas condições experimentais, uma vez que dados anteriores de nosso grupo, sugeriram que a pré-incubação de mitocôndrias desenergizadas na presença de alto  $\text{Ca}^{2+}$  ( $50\mu\text{M}$ ) induzia uma aparente diminuição no conteúdo de AAC ativos na membrana mitocondrial, verificada após a energização das organelas (Macedo et alii, 1993). Procuramos determinar se concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , eram suficientes para induzir abertura do PTP e interferir com o AAC, conforme indicavam nossos dados com altas concentrações do íon (Macedo et alii, 1997).

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **A - Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato**

As mitocôndrias de fígado de rato (MFR) foram isoladas conforme descrito na literatura, utilizando-se fêmeas de ratos adultos Wistar, pesando cerca de 200 g e mantidas em jejum por 12 horas (Schneider & Hogeboom, 1950).

Após o animal ser sacrificado por destroncamento cervical, retirou-se o fígado, picou-se com tesoura, em meio de isolamento I (sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,5 mM, pH 7,4). Após, homogenizou-se em homogeneizador Potter-Elvehjem por 2 minutos. Centrifugou-se, em centrífuga Beckman modelo J2-21 (rotor JA20), por 10 minutos a 700 x g. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 12.100 x g por 10 minutos. O precipitado formado foi ressuspensão em meio II (sacarose 250 mM e HEPES 10 mM pH 7,4). A suspensão formada foi centrifugada a 14.600 x g por 10 minutos. A suspensão mitocondrial foi obtida a partir da ressuspensão da fração precipitada, com o volume mínimo possível de meio II. Todo este procedimento foi feito mantendo-se a temperatura entre 0 e 4° C.

A concentração mitocondrial foi determinada em termos de concentração de proteína, pelo método do biureto, modificado pela adição de colato a 1 % (p/v) (Gornall et alii, 1949; Kaplan & Pedersen, 1983). Para a obtenção da curva padrão foi utilizada soroalbumina bovina (BSA). As

leituras de absorbância foram feitas a 540 nm em espectrofotômetro Beckman modelo DU 640.

## **B- Determinação do consumo de O<sub>2</sub>**

O consumo de O<sub>2</sub> pela suspensão mitocondrial foi determinado polarograficamente, utilizando-se um eletrodo tipo Clark, acoplado a um registrador gráfico.

Numa cela de vidro vedada, com agitação magnética, contendo 1,8 mL de capacidade total, colocou-se o meio para determinação do controle respiratório (sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, Pi 3 mM, succinato 5 mM, pH 7,4) e adicionou-se a suspensão de mitocôndrias em volume suficiente para uma concentração final de 1 mg/mL. Registrou-se o estado respiratório 4 (estado basal). Após 3 minutos adicionou-se ADP 300 µM registrando o estado respiratório 3, onde ocorre aceleração do consumo de O<sub>2</sub> devido a fosforilação oxidativa. Depois de todo o ADP ter sido consumido, a respiração das mitocôndrias volta ao estado respiratório 4. As velocidades de consumo de O<sub>2</sub> nos dois estados foram utilizadas para o cálculo do controle respiratório (CR). O CR é definido como a razão entre o consumo de O<sub>2</sub> no estado 3 (respiração estimulada pela adição de ADP) e o consumo de O<sub>2</sub> no estado 4 (estado basal). A preparação mitocondrial foi considerada adequada para os experimentos quando o controle respiratório era maior que 4 (Nicholls & Akerman, 1982).

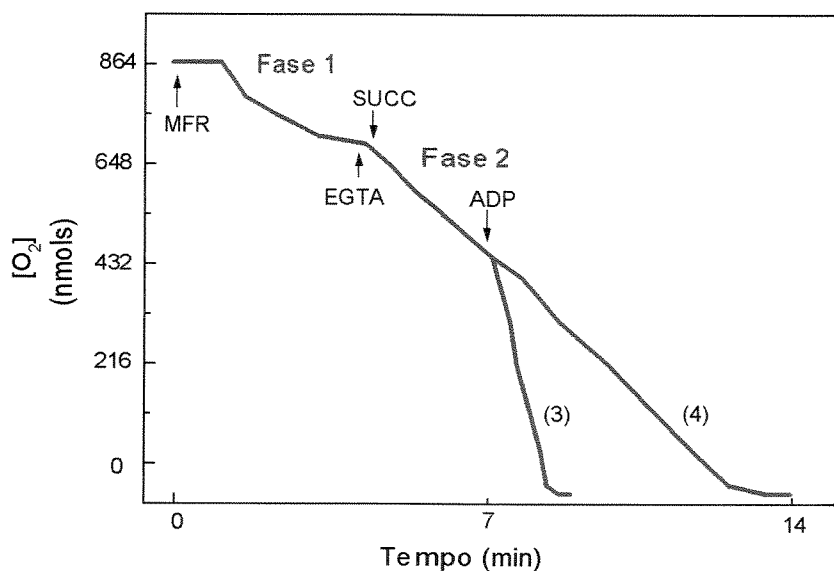
### **C. Simulação das consequências do processo de Isquemia/Reperusão em condições fisiopatológicas de $\text{Ca}^{2+}$**

Para simular as consequências do processo de isquemia seguida de reperusão, em mitocôndrias isoladas, as organelas foram incubadas em duas condições experimentais distintas, denominadas **fases I e II** seguindo-se a velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  conforme mostra a figura 3.

**Fase I.** Mitocôndrias foram pré-incubadas (1mg/mL) por diferentes períodos de tempo (0 - 15 min) e em diferentes temperaturas (25°C-37°C) na ausência de substrato respiratório exógeno, em meio padrão contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, Tris-HCl 10mM, Pi 5mM, pH 7.25 e diferentes concentrações finais de  $\text{Ca}^{2+}$  livre (0 - 500 nM) obtidas a partir de um tampão  $\text{Ca}^{2+}$  - EGTA, calculado segundo Portzehl. (Portzehl et alii, 1964). Não utilizamos rotenona nestes experimentos com o propósito de trabalharmos na presença de substratos endógenos. O experimento controle, na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , foi obtido com a adição de EGTA 2mM desde o início da pré-incubação. O efeito da CsA foi estudado utilizando-se uma concentração 1 $\mu$ M da droga, adicionada ao meio desde o início da pré-incubação.

**Fase II.** Ao final de cada período de pré-incubação, o  $\text{Ca}^{2+}$  foi quelado pela adição de EGTA 2 mM e após 2 minutos iniciou-se o estado respiratório 4 pela energização das mitocôndrias com a adição de succinato 5 mM. Após 2 minutos na presença do succinato, foi adicionado ADP 1mM para obtermos o estado respiratório dependente de ADP ( $v_3$ ).

Este protocolo experimental está detalhado na figura 3. As demais adições estão descritas nas legendas das figuras. O controle respiratório (CR) foi obtido a partir da razão  $v_3/v_4$ . Os resultados apresentados possuem média e desvio padrão de pelo menos três experimentos utilizando três preparações distintas.



**Figura 3. Procedimento padrão para simular o processo de Isquemia/Reperusão nas mitocôndrias.** Estado respiratório 3 após adição de ADP (3) e estado respiratório 4 na presença de succinato (4).

#### **D. Determinação das variações do volume mitocondrial (Inchamento mitocondrial).**

Como as suspensões mitocondriais são turvas, elas espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença do índice de refração entre a matriz e o meio. Qualquer processo que diminua esta diferença irá

diminuir a luz espalhada (Nicholls & Akerman, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e o do meio, com a consequente diminuição da luz espalhada. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da MMI. As mitocôndrias prestam-se bem para a aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramentos de suas pregas. O acompanhamento deste processo foi feito em função da diminuição da absorbância em um espectrofotômetro, ajustado para um comprimento de onda de 520 nm, conectado a um registrador potenciométrico.

Os experimentos para determinar o inchamento mitocondrial foram realizados nas mesmas condições experimentais já citadas no item C, variando somente o tempo de pré-incubação (0 - 30 minutos).

#### **E. Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ )**

A formação do  $\Delta\psi$  foi seguida pela captação de  $\text{TPP}^+$  pelas mitocôndrias, utilizando-se em eletrodo sensível ao  $\text{TPP}^+$  construído segundo Kamo. (Kamo et alii, 1979). As condições experimentais foram as mesmas que as descritas no item C.



#### **F. Determinação da concentração de carreadores ADP/ATP ativos na Membrana Mitocondrial Interna através da titulação com CAT.**

A concentração de carreadores ativos (AAC) na membrana foi determinada usando-se o inibidor não-competitivo, CAT, que se liga ao carreador com uma estequiometria de 1:1 (Scherer & Klingenberg, 1974). Desta forma, podemos determinar o conteúdo de carreadores ativos na MMI pela titulação do estado respiratório 3 avaliando a inibição observada após a adição de diferentes concentrações de CAT (Henke & Jung, 1991).

Nestes experimentos, pré-incubamos mitocôndrias desenergizadas por 5 minutos na presença de uma concentração fixa de  $\text{Ca}^{2+}$  (250 nM) obtida a partir do tampão  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA (Portzehl et alii, 1964) nas mesmas condições mostradas na figura 3. O CAT nas concentrações entre 0,03 a 0,25  $\mu\text{M}$  foi adicionado imediatamente antes do ADP.

#### **G. Extração e dosagem de nucleotídeos de adenina.**

Após pré-incubação por diferentes tempos (0-15 min) 6 mL de uma suspensão mitocondrial contendo 1 mg de proteína/mL, na presença de 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  livre. Após o período de pré-incubação, foi adicionado as amostras oligomicina 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , AA 1  $\mu\text{M}$ , EGTA 2 mM e CsA 1  $\mu\text{M}$ . Estas amostras, foram centrifugadas por 10 minutos a 15.500 xg e o sedimento ressuspenso em 1 mL de meio padrão como descrito no item C. Os nucleotídeos foram extraídos do sobrenadante resultante, pelo método do fenol-clorofórmio álcool isoamílico, segundo Noack e colaboradores,

incorporando um segundo passo de extração com dietiléter, descrito a seguir (Noack et alii, 1992).

Extração: 1mL do sobrenadante resultante (aproximadamente 5 mg/mL) foi rapidamente adicionados a 4 mL de uma mistura mantida em banho de gelo de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico (34:24:1,v/v/v) contendo 0,6 mL de uma solução aquosa de EDTA (40 mM, pH 7,4) . Após 90 segundos de vigorosa agitação a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 900 xg, para se obter a separação das fases; a camada aquosa superior foi retirada com uma pipeta Pasteur e adicionada a 1 mL de dietiléter saturado com água. Após duas agitações por 30 segundos e 3 minutos de centrifugação nas mesmas condições, a camada aquosa inferior foi colocada em nitrogênio líquido e armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise dos nucleotídeos em HPLC.

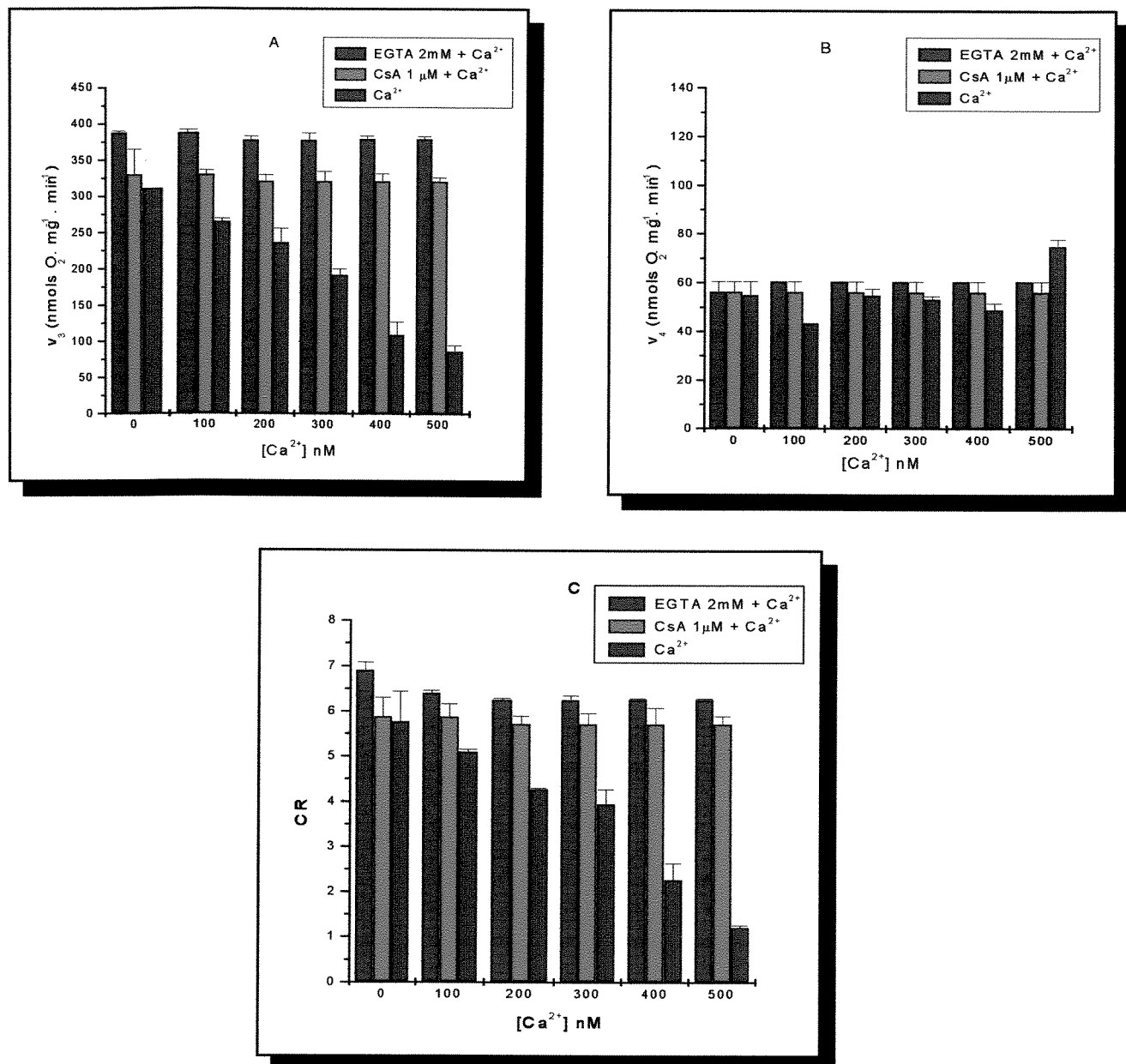
Análise dos nucleotídeos por HPLC: A amostra foi submetida a uma cromatografia de fase reversa de acordo com Stocchi e colaboradores (Stocchi et alii,1985). Foi utilizado um aparelho para HPLC Gilson, uma coluna de 250 x 4mm, 5  $\mu\text{M}$ , RP C 18 (Merk) e um detector de UV/fluorescência a 254 nm. Os nucleotídeos foram eluídos com tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M, pH 5,95 com o seguinte gradiente de metanol: 5 min: 0%  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; 5 min: 12%  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; 1 min: 40%  $\text{CH}_3\text{OH}$ , a um fluxo de 1,3 mL/min.

---

## **RESULTADOS**

### **Consumo de $O_2$ por mitocôndrias pré-incubadas com diferentes concentrações de $Ca^{2+}$ .**

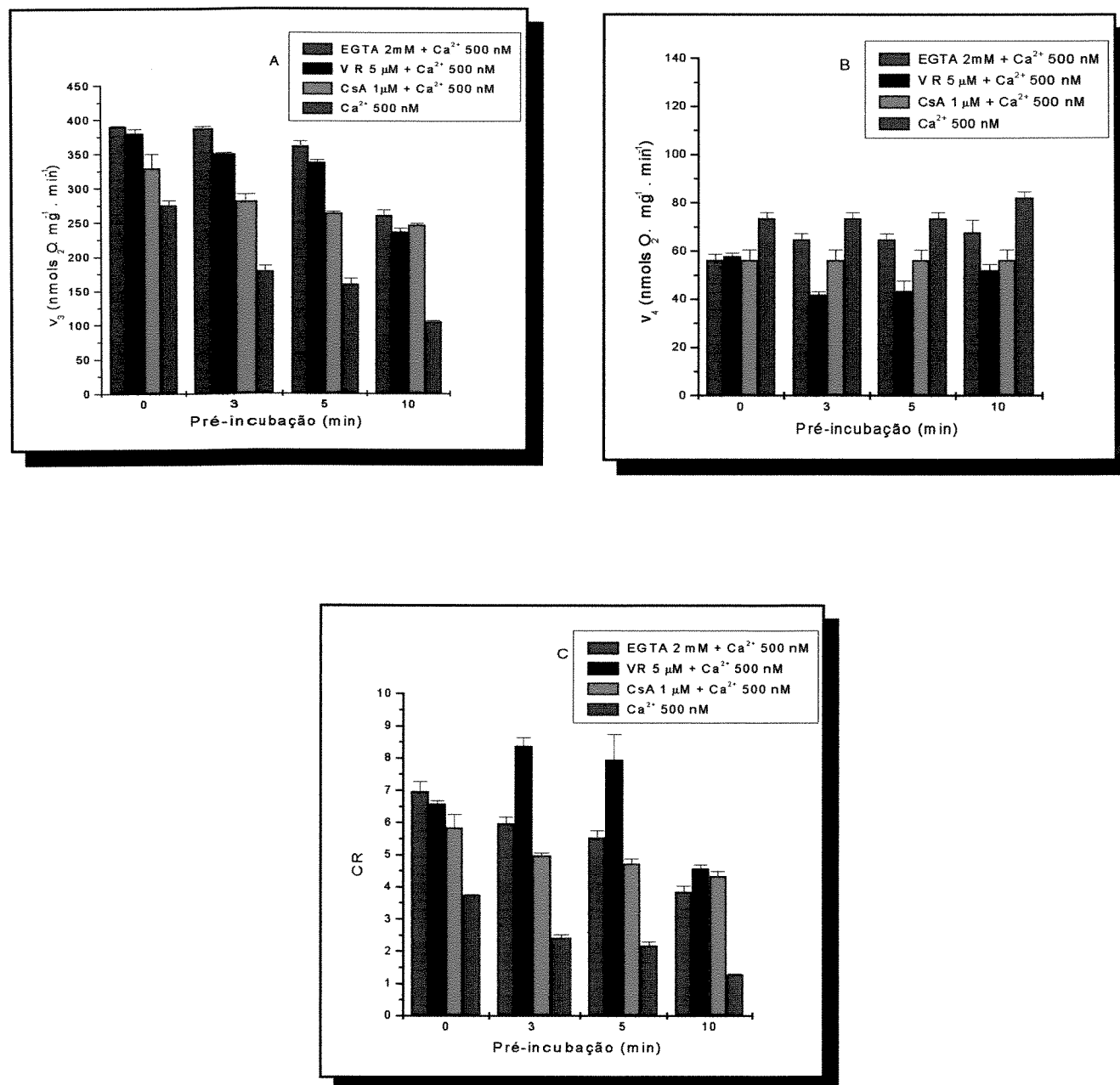
A figura 4 mostra que após 10 minutos de preincubação, o aumento na concentração de  $Ca^{2+}$ , na faixa de 0 a 500 nM induz um efeito mais pronunciado sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado respiratório 3 ( $v_3$ ) (Figura 4A) do que sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado respiratório 4 ( $v_4$ ) (Figura 4B), levando a uma queda nos valores do controle respiratório (CR) (Figura 4C). Podemos observar pela figura 4A que aproximadamente 300 nM de  $Ca^{2+}$  livre no meio de reação é suficiente para inibir cerca de 50 % de  $v_3$ , quando comparado aos experimentos controle, realizados nas mesmas concentrações de  $Ca^{2+}$ , porém na presença de EGTA 2 mM (para quelar o  $Ca^{2+}$  livre), ou de CsA 1  $\mu$ M (para impedir a abertura do PTP). Quando aumentamos a concentração de  $Ca^{2+}$  livre para 500 nM a inibição observada foi praticamente de 100 %, pois neste caso,  $v_3$  ficou igual ou muito próximo de  $v_4$ . Por outro lado, a figura 4B mostra que na faixa de concentração de  $Ca^{2+}$  utilizada nos nossos experimentos a velocidade de consumo de oxigênio no estado respiratório 4 começa a ser afetada somente na presença de 500 nM de  $Ca^{2+}$  livre no meio de reação, sofrendo um ligeiro estímulo. Esses dados mostram que a ação do  $Ca^{2+}$  sobre a membrana induzindo uma diminuição nos valores do controle respiratório ( $v_3/v_4$ ) de cerca de 50 % a partir de aproximadamente 300 nM de  $Ca^{2+}$  (Figura 4C) deve ser devido principalmente ao efeito exercido pelo  $Ca^{2+}$  sobre  $v_3$ .



**Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de Ca<sup>2+</sup> sobre o consumo de O<sub>2</sub> após 10 minutos de pré-incubação.** MFR (1mg/mL) foram pré-incubadas a 25°C por 10 minutos em meio padrão na presença de diferentes concentrações de Ca<sup>2+</sup> (0-500 nM), obtido como descrito em Materiais e Métodos. (A) consumo de O<sub>2</sub> no estado respiratório 3 (v<sub>3</sub>); (B) consumo de O<sub>2</sub> no estado respiratório 4 (v<sub>4</sub>); (C) controle respiratório (CR) (v<sub>3</sub>/v<sub>4</sub>).

### **O aumento no tempo de pré-incubação na presença de $\text{Ca}^{2+}$ potencializa o efeito do íon sobre o consumo de $\text{O}_2$**

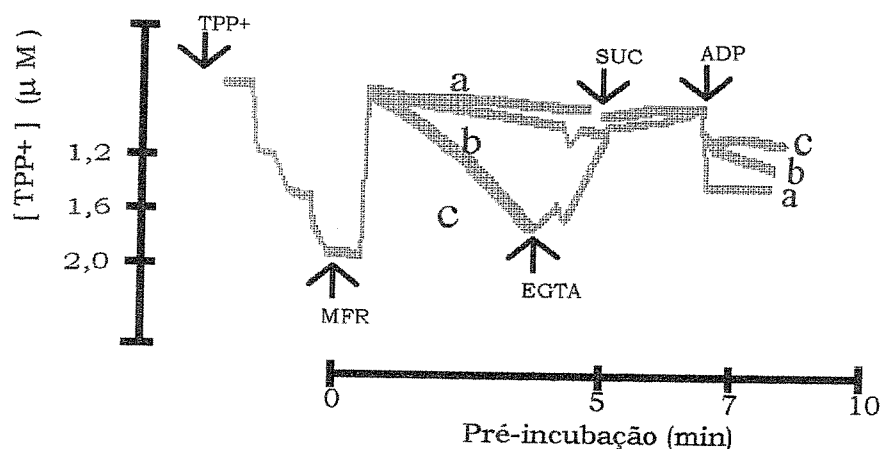
A figura 5 mostra o efeito de 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando variamos o período de pré-incubação das organelas de 0-10 minutos, antes da adição do substrato respiratório. Podemos observar nesta figura que mesmo na ausência de pré-incubação, ou seja, na presença de succinato desde o início do experimento essa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  já provoca uma ligeira inibição em  $v_3$ , que vai se acentuando com o aumento do período de pré-incubação com o íon. O efeito do aumento da inibição em  $v_3$  com o aumento no tempo de pré-incubação com o  $\text{Ca}^{2+}$  é prevenido se as mitocôndrias forem incubadas na presença de EGTA 2 mM, vermelho de rutênio (VR) 5  $\mu\text{M}$  (para inibir a via de captação do íon) ou CsA 1  $\mu\text{M}$ . A figura 5B mostra um ligeiro estímulo desta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , com o aumento do tempo de pré-incubação, sobre  $v_4$ . Este efeito também é abolido pelos inibidores citados acima. Da mesma forma que no experimento anterior, o aumento no período de preincubação das organelas na presença de 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$ , sem a adição de substrato exógeno, levou a uma diminuição nos valores do CR (Figura 5C) devido principalmente ao efeito sobre  $v_3$ . Esses resultados indicam que quanto maior o tempo de exposição das organelas com o íon, principalmente na ausência de substrato respiratório exógeno, maior a inibição observada sobre  $v_3$ , fenômeno sensível a CsA e dependente da entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias. Nota-se ainda que na presença de VR o CR está significativamente maior, devido à diminuição observada em  $v_4$  aos 3 e 5 minutos de incubação. Entretanto, nossos dados não permitem uma explicação adequada para esse fenômeno.



**Figura 5.** Aumento do tempo de pré-incubação das organelas com  $Ca^{2+}$  sobre o consumo de  $O_2$ . MFR (1mg/mL) foram pré-incubadas a 25° C por diferentes tempos (0 – 10 min) em meio padrão contendo 500 nM de  $Ca^{2+}$  livre obtido como descrito em Materiais e Métodos. (A) consumo de  $O_2$  no estado respiratório 3 ( $v_3$ ); (B) consumo de  $O_2$  no estado respiratório 4 ( $v_4$ ); (C) controle respiratório (CR) ( $v_3/v_4$ ).

## Permeabilidade da Membrana Mitocondrial Interna a Prótons

A figura 6 mostra as variações no potencial elétrico de membrana nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 5. Ou seja, 5 minutos de pré-incubação da suspensão mitocondrial na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  500nM e EGTA 2mM (traçado a),  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM e CsA 1  $\mu\text{M}$  (traçado b) ou somente  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM (traçado c); posterior adição de succinato 5 mM e após 2 minutos, ADP 1 mM. A variação no potencial de membrana foi verificada pela captação do cátion tetrafenilfosfônio ( $\text{TPP}^+$ ), que entra nas mitocôndrias em resposta ao potencial elétrico formado. Podemos verificar que durante os 5 minutos de pré-incubação, somente na situação c (na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ ) houve liberação de  $\text{TPP}^+$  pelas organelas, indicando estar havendo dissipação do  $\Delta\psi$  nesta condição. A posterior adição de EGTA 2mM (para paralisar o efeito do íon) levou a um ligeiro estímulo na captação de  $\text{TPP}^+$ , que foi acelerada após a adição de succinato, registrando formação de  $\Delta\psi$  nesta condição. Nas situações a e b (na presença de EGTA e CsA) podemos observar formação de  $\Delta\psi$  durante o período de preincubação, provavelmente sustentado pelos substratos endógenos e manutenção dos mesmos níveis de  $\text{TPP}^+$  captado, após a adição de succinato. Estes resultados estão de acordo com os efeitos observados nos experimentos anteriores, onde registramos que o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias no estado respiratório 4 (após a adição de succinato) é apenas ligeiramente afetado na presença do  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\Delta\psi$  formado com a adição de succinato, nas três condições experimentais estudadas volta a cair após a adição de ADP. Entretanto, esta queda é menos pronunciada na situação c, corroborando os efeitos do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre  $v_3$  mostrados nas figuras anteriores. Estes dados, no seu conjunto, indicam que apenas durante o período de pré-incubação na presença do  $\text{Ca}^{2+}$  acontece efetivamente um aumento na MMI da permeabilidade a  $\text{H}^+$ , totalmente prevenido na presença de EGTA ou CsA.



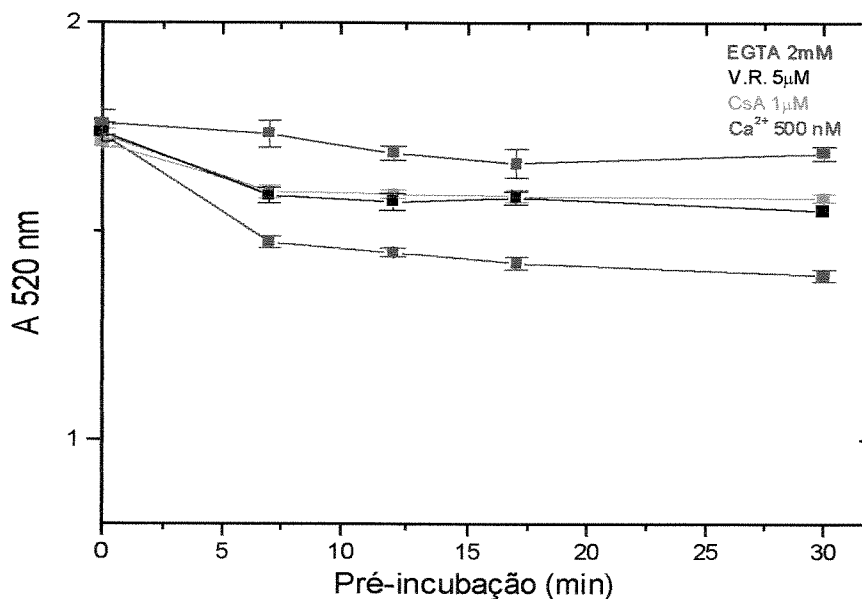
**Figura 6. Variação do potencial elétrico de membrana.** MFR (1mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos a 25° C na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM em meio padrão como descrito em Materiais e Métodos. (a) EGTA 2 mM +  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM, (b) CsA 1  $\mu\text{M}$  +  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM e (c)  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM. EGTA 2mM, succinato 5mM e ADP 1mM foram adicionados nas três situações onde indicado na figura.

### Permeabilidade Inespecífica da Membrana Mitocondrial.

Uma das maneiras de se verificar se está ocorrendo um aumento inespecífico na permeabilidade da membrana mitocondrial interna é verificar se está havendo entrada do suporte osmótico do meio de reação para o interior das organelas, com concomitante saída de outros compostos. Isto pode ser registrado pela diminuição na absorbância da suspensão mitocondrial a 520 nm (Nicholls & Akerman, 1982). Os resultados apresentados na figura 7, onde acompanhamos o inchamento da suspensão mitocondrial a 520 nm após a adição de succinato 5 mM mostram que o aumento no tempo de pré-incubação na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM (0-30 min) é insuficiente para induzir uma total permeabilização da membrana mitocondrial, obtida pela adição de  $\text{H}_2\text{O}$  ao meio de reação. Estes dados indicam que durante o período de pré-incubação ocorre um inchamento mitocondrial de baixa amplitude. É bom



ressaltar que também este efeito é totalmente abolido na presença de EGTA e parcialmente abolido na presença de VR ou CsA .

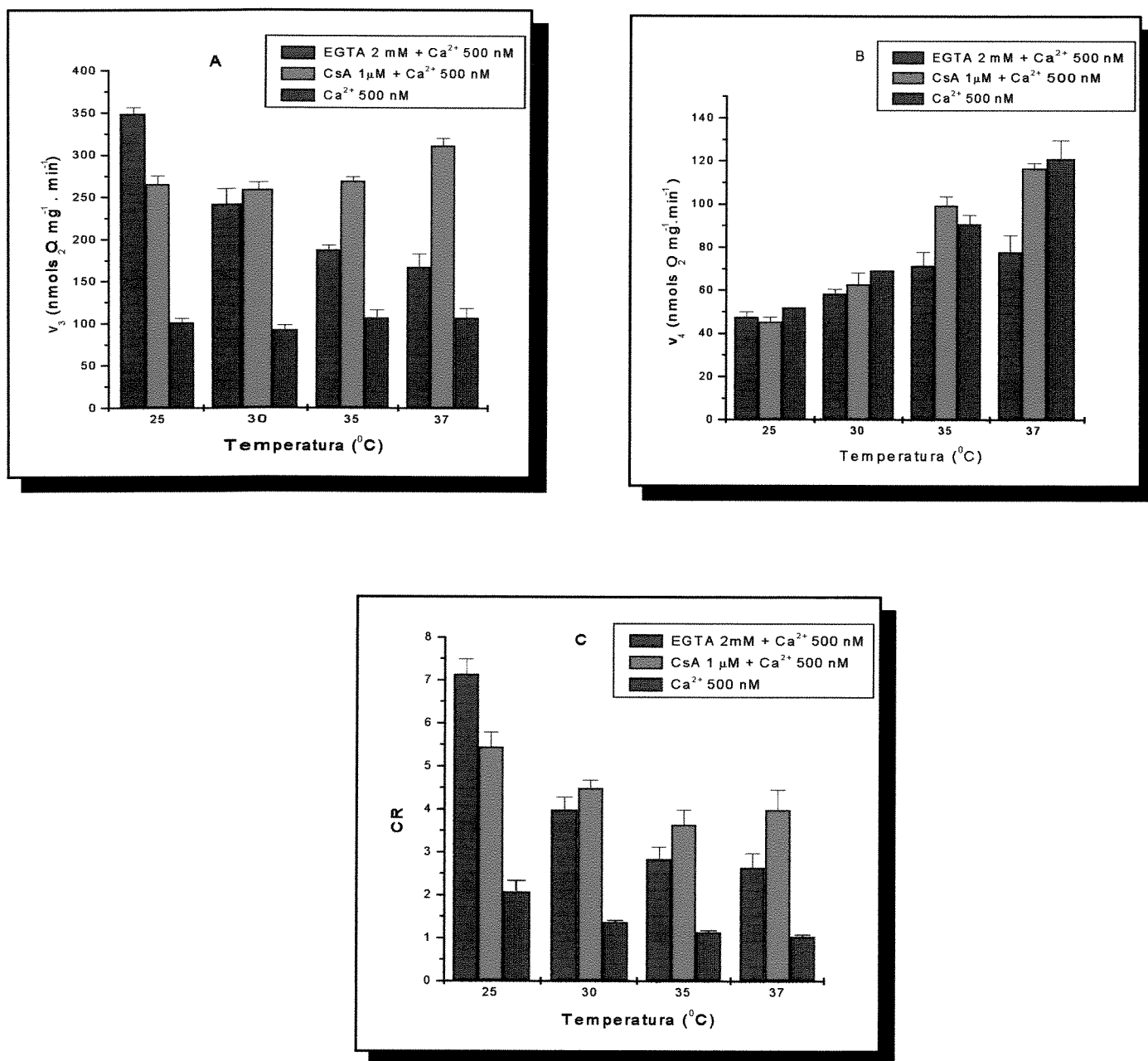


**Figura 7. Efeito do aumento no tempo de pré-incubação com  $\text{Ca}^{2+}$  sobre o inchamento mitocondrial.** MFR (1mg/mL) foram pré-incubadas por diferentes tempos (0 - 30 min) na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM em meio padrão como descrito em Materiais e Métodos. Quando presentes, EGTA 2mM, V.R. 5  $\mu\text{M}$  e CsA 1  $\mu\text{M}$ , foram adicionados desde o início da pré-incubação e os valores de absorbância foram medidos a 520 nm, após as adições de EGTA 2mM e succinato 5 mM.

### Efeito da Temperatura sobre o Consumo de $\text{O}_2$ por Mitocôndrias pré-incubadas com $\text{Ca}^{2+}$ .

Os experimentos mostrados anteriormente foram feitos a 25°C. Já os experimentos da figura 8 mostram o efeito do aumento na temperatura do meio de reação (25-37°C) sobre  $v_3$  (figura 8A),  $v_4$  (figura 8B), e CR (figura 8C), nas mesmas condições experimentais descritas na figura 5. Podemos observar na figura 8A que o aumento na temperatura do meio só tem efeito na

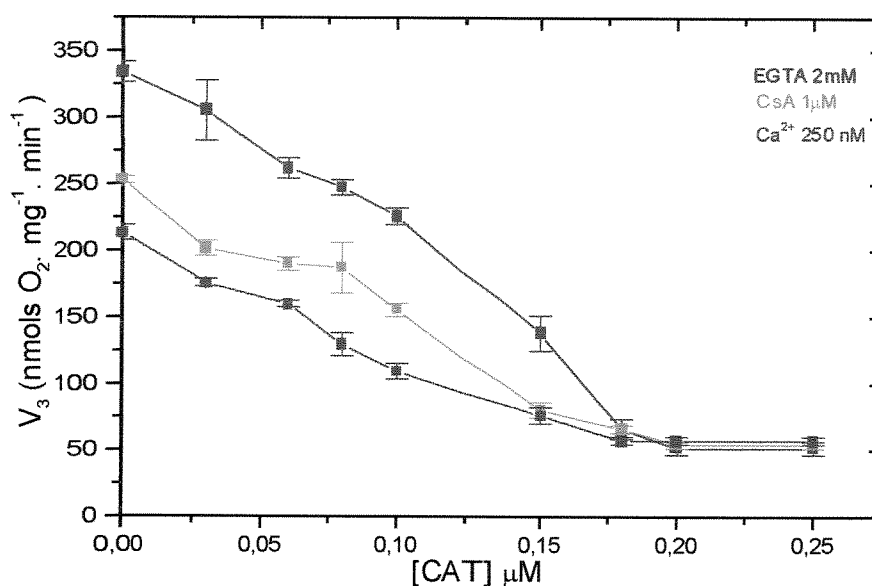
situação onde não há  $\text{Ca}^{2+}$  (na presença de EGTA). Ou seja, na presença de 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  a inibição observada em  $v_3$  aos 25°C praticamente não se alterou com o aumento da temperatura até 37°C. O mesmo aconteceu na presença de CsA 1  $\mu\text{M}$  que além de prevenir qualquer efeito do aumento da temperatura sobre  $v_3$  também se mostrou capaz de impedir o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre  $v_3$ , mostrado na figura 4. Entretanto, a retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  pela ação quelante do EGTA tornou a fosforilação oxidativa mais suscetível à inibição com o aumento da temperatura (figura 8A). Por outro lado, a figura 8 B mostra que o aumento na temperatura provoca um estímulo em  $v_4$  em todas as situações estudadas, levando conseqüentemente a uma diminuição nos valores do CR, que é mais acentuada quando as organelas estão incubadas na presença de EGTA (figura 8C).



**Figura 8. Efeito da variação da temperatura sobre o consumo de O<sub>2</sub>.** MFR (1mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos nas mesmas condições descritas em materiais e métodos, na presença de 500 nM de Ca<sup>2+</sup> em diferentes temperaturas (25°C - 37°C). (A) consumo de O<sub>2</sub> no estado respiratório 3 (v<sub>3</sub>); (B) consumo de O<sub>2</sub> no estado respiratório 4 (v<sub>4</sub>); (C) controle respiratório (CR) (v<sub>3</sub>/v<sub>4</sub>).

**O conteúdo de AAC ativos na Membrana Mitocondrial não é afetado pela pré-incubação com  $\text{Ca}^{2+}$ .**

Uma das formas de se verificar o conteúdo de carreadores ativos na MMI é através de sua titulação com carboxiatractilato (CAT). O CAT inibe o AAC, com uma estequiometria 1:1, sendo, portanto indicado para esta quantificação (Scherer & Klingenberg, 1974). Os experimentos mostrados na figura 9 mostram que nas nossas condições experimentais, na presença de 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  o aumento na concentração de CAT (0 – 0,25  $\mu\text{M}$ ) induziu, nas três situações estudadas, uma inibição total em  $v_3$  com aproximadamente a mesma concentração de CAT (0,18  $\mu\text{M}$ ). Estes dados indicam que a presença do  $\text{Ca}^{2+}$  não é suficiente para induzir diminuição no número de carreadores ativos na membrana, sugerindo não estar havendo mobilização destes carreadores para fazer parte da estrutura do PTP, pois registramos a inibição total em  $v_3$  com aproximadamente a mesma concentração de CAT. Por outro lado, se observarmos a ordenada do gráfico da figura 9 podemos verificar que o  $\text{Ca}^{2+}$  “per se” tem um efeito sobre  $v_3$ , conforme já mostrado nas figuras anteriores. Ou seja, aparentemente o íon está sendo capaz, de alguma maneira de diminuir a atividade de troca do carreador.



**Figura 9. Titulação da respiração dependente de ADP ( $v_3$ ) com CAT.** MFR (1mg/mL) foram pré-incubadas a 25° C por 5 minutos nas mesmas condições descritas em materiais e métodos com  $\text{Ca}^{2+}$  250 nM + EGTA 2 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  250 nM + CsA 1 $\mu\text{M}$ , e  $\text{Ca}^{2+}$  250 nM. A adição de concentrações crescentes de CAT (0, 0.03, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15, 0.18, 0.2 e 0.25  $\mu\text{M}$ ) foi feita 30 segundos antes da adição de ADP 1mM.

### **Dosagem de Nucleotídeos de Adenina no interior das Mitocôndrias após a pré-incubação com $\text{Ca}^{2+}$ .**

Os resultados apresentados na tabela 1 mostram indiretamente o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a concentração de ATP e ADP presentes no interior das organelas e extraídos após diferentes períodos de preincubação (0, 5 e 15 minutos) das mitocôndrias na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM. Os resultados são indiretos porque os dados apresentados se referem à concentração de ATP e ADP presentes no sobrenadante das amostras. Verifica-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  induz perda de nucleotídeos de adenina do interior das organelas, pois podemos notar claramente que, na presença de EGTA, praticamente não encontramos nucleotídeos de adenina no meio exterior. Podemos notar também, que o aumento no tempo de pré-incubação aumenta a quantidade de nucleotídeos

perdidos, principalmente ATP. Esses dados são ainda preliminares e faltam os resultados na presença de CsA. Porém, eles sugerem que a inibição em  $v_3$  induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  possa ser devida à perda de nucleotídeos de adenina endógenos. Estes dados, em conjunto com os resultados apresentados nas figuras 4, 5 e 8 sugerem também que a perda de nucleotídeos de adenina observada nas nossas condições experimentais ocorra pelo carreador.

	ATP externo (nmols)		ADP externo (nmols)	
Pré-incubação (min)	$\text{Ca}^{2+}$	EGTA	$\text{Ca}^{2+}$	EGTA
0	3,509	0,778	0,269	0,136
5	4,234	0,877	2,525	0,242
15	7,408	1,097	2,223	0,267

**Tabela 1. Perda de nucleotídeos de adenina induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  500 nM em diferentes tempos de pré-incubação.** MFR (1mg/mL) foram pré-incubadas a 25° C por diferentes tempos (0 -15 min) em meio padrão conforme descrito em materiais e métodos. Após o tempo de pré-incubação, a suspensão mitocondrial foi centrifugada e a quantidade de ADP e ATP foi medida no sobrenadante da amostra.

---

## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o  $\text{Ca}^{2+}$  exerce um efeito, sensível a CsA, bem mais acentuado na velocidade de consumo de oxigênio no estado respiratório 3 que no estado 4, levando a uma diminuição dose-dependente do CR (Figura 4). Nossos dados mostraram também que esta inibição em  $v_3$  é ainda mais acentuada nas seguintes condições: com o aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  acima de 300 nM e com o aumento do tempo de incubação das organelas com o íon na ausência de substrato exógeno (Figura 5). Sabe-se que um excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, da ordem de 300 nM é suficiente para que as mitocôndrias comecem a acumular  $\text{Ca}^{2+}$ , quando energizadas (Gunter et alii, 1994). Embora nossas condições de pré-incubação não contenham substrato respiratório exógeno, não podemos nos esquecer da existência de substratos endógenos, que garantiriam a entrada do íon. A inibição pelo VR, inibidor da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas organelas através do uniporter, assim como o efeito do quelante EGTA corroboram a necessidade do íon entrar nas organelas para exercer seu efeito inibitório sobre o CR. Embora já tenha sido demonstrado anteriormente que o  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial inibe a fosforilação oxidativa, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido e existem várias hipóteses para explicá-lo. Dentre as propostas para explicar tal inibição estão a inibição no AAC (Malmstrom & Carafoli, 1977), indução na perda de nucleotídeos internos (Wilson & Asimakis, 1987), inibição da ATP sintetase (Sánchez, 1983), entre outras. Entretanto, todos esses autores usaram altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  em seus estudos. Nosso trabalho mostra que também concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  são capazes de causar inibição da fosforilação oxidativa em mitocôndrias

isoladas de fígado de rato e nossa interpretação é que esta inibição ocorra devido à abertura do PTP, induzida por estas baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ . Senão vejamos, a CsA, que é um reconhecido inibidor específico da abertura do PTP inibe ambos, a ação do  $\text{Ca}^{2+}$  e do aumento no tempo de incubação com o íon sobre o CR. Estes dados sugerem fortemente que o efeito do íon, nesta faixa de concentração, reflete abertura ou mobilização de PTP na membrana mitocondrial.

Por sua vez, os dados apresentados na figura 8 mostram que o aumento da temperatura no meio de reação (25 - 37°C) induziu um estímulo na velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  no estado respiratório 4 nas três situações experimentais estudadas. Este estímulo provavelmente seja reflexo do aumento na fluidez da membrana que certamente ocorre com o aumento da temperatura. Esses resultados também mostraram que o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre  $v_3$ , independente da presença de CsA, não foi alterado com o aumento da temperatura, indicando que a abertura do PTP, sensível a CsA não é um processo dependente de temperatura para ocorrer. Um outro dado interessante é o efeito do aumento da temperatura observado na presença de EGTA, ou seja, da ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a pré-incubação, levando a uma diminuição acentuada sobre  $v_3$ . Este efeito talvez possa ser explicado pela falta de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado aos sítios externos das mitocôndrias, uma vez que segundo Bernardi quando esses sítios são ocupados pelo íon ocorre uma menor predisposição da abertura do PTP (Bernardi, 1992b).

Quando analisamos indiretamente a permeabilidade da membrana a  $\text{H}^+$ , através da captação de  $\text{TPP}^+$  pelas mitocôndrias (Figura 6) podemos observar que a presença de EGTA ou CsA, em conjunto com o  $\text{Ca}^{2+}$  impediram a queda em  $\Delta\psi$ , mantido às custas dos substratos endógenos. No entanto, quando as organelas foram pré-incubadas somente na presença do íon podemos observar claramente a liberação de  $\text{TPP}^+$ , sinalizando que durante a fase de pré-incubação ocorre a despolarização da membrana mitocondrial



pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Por outro lado, nas três situações analisadas, após a adição de succinato, não houve alteração na captação de  $\text{TPP}^+$ , que foi ligeiramente maior na presença de EGTA. Esses dados sugerem que nesta fase, de simulação de um processo de “reperfusão”, não há um efeito muito pronunciado do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a membrana, pelo menos nas concentrações utilizadas neste trabalho. Estes resultados estão em concordância com os mostrados nas figuras 4B e 5B, com um ligeiro efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  no consumo de oxigênio do estado respiratório 4. O mais interessante entretanto, é que eles sugerem que a presença do  $\text{Ca}^{2+}$  no interior das organelas, provavelmente ligado à membrana seja importante para induzir sua imediata despolarização. Como a presença de CsA previne a despolarização induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , podemos inferir que esta é, de fato, uma condição primária para ocorrer formação do PTP. Esses dados corroboram a proposta de uma natureza do PTP do tipo ‘canal dependente de voltagem’ com a despolarização da membrana sendo o passo chave para sua abertura (Bernardi, 1992b). Além disso, a prevenção do o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a despolarização da membrana pela CsA sugere que possa ser a mesma proteína que liga ambos, CsA e  $\text{Ca}^{2+}$ , embora nossos resultados não permitam a identificação desta proteína. As hipóteses lançadas na literatura sobre este assunto, estão melhor apresentadas na Introdução do presente trabalho. Por outro lado, os resultados da figura 7 mostram que nossa condição experimental (com concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) não é suficiente para induzir uma permeabilização maior da membrana. No entanto, é importante salientar que sempre detectamos um inchamento de baixa amplitude na presença do íon. Esses dados, aparentemente estão em contradição com a proposta de Halestrap (Griffiths & Halestrap, 1995). Este autor descreveu que a abertura do PTP ocorre somente após a reperfusão e não na isquemia propriamente dita. Entretanto, a diferença entre as duas condições experimentais é que no caso do autor citado acima, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizada era muito alta

(100 $\mu$ M) e a abertura do PTP era seguida pela entrada de sacarose marcada no interior das organelas. Ou seja, uma condição onde as organelas já estão totalmente permeabilizadas. Nos experimentos aqui descritos, que simulam as consequências de um processo de isquemia/reperfusão para as mitocôndrias na presença de concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  mostramos que a abertura de PTP, sensível a CsA ocorre na membrana sem um efeito muito pronunciado sobre a permeabilização das organelas. Portanto, acreditamos que estamos estudando estágios diferentes da abertura do PTP.

Resumindo, a ação do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre as mitocôndrias mostradas neste trabalho incluem: i) diminuição em  $v_3$  e ligeiro estímulo em  $v_4$ , levando à queda no CR; ii) aumento na permeabilidade da membrana à  $\text{H}^+$  e iii) inchamento de baixa amplitude, sendo todos esses efeitos prevenidos pela presença de EGTA, VR ou CsA. Embora muitos trabalhos da literatura tenham mostrado algumas destas interrelações (ver revisão por Zoratti & Szabò,1995), a originalidade do nosso trabalho está em mostrar, pela primeira vez, a ocorrência da abertura do PTP “in vitro” nestas concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (0-500 nM). Este é um resultado importante porque, até então, nunca tinha sido possível excluir totalmente a possibilidade de se estar estudando um artefato, devido a alta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizada pelos diversos autores nos estudos “in vitro” com mitocôndrias (ver revisão por Zoratti & Szabò,1995).

Dados anteriores de nosso grupo de pesquisa já haviam mostrado que a pré-incubação com  $\text{Ca}^{2+}$ , em concentrações suprafisiológicas, induzia uma diminuição na velocidade de consumo de oxigênio no estado respiratório 3, aparentemente associada à queda na atividade do AAC na membrana (Macedo et alii,1993). Com o objetivo de verificar se e como a abertura do PTP, nas nossas condições experimentais, influenciava a atividade do AAC realizamos os experimentos envolvendo titulação do número de carreadores ativos com CAT além da extração e dosagem de nucleotídeos de adenina

liberados durante o período de pré-incubação das mitocôndrias com  $\text{Ca}^{2+}$ . A titulação da respiração com CAT, adicionado imediatamente antes da adição de ADP foi feita com o objetivo de verificar se havia uma possível mobilização de AAC ativos para fazer parte da estrutura do PTP. Pudemos verificar que as diferentes condições experimentais aqui utilizadas não alteraram a concentração de CAT (cerca de  $0,18 \mu\text{M}$ ) necessária para obter a inibição máxima em  $v_3$ , descartando esta possibilidade. Entretanto, analisando o gráfico mostrado na figura 9 pudemos observar que a atividade do AAC é inibida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Nesse sentido, como esta proteína catalisa uma troca obrigatória, realizamos a extração e dosagem dos nucleotídeos de adenina com o intuito de verificar se a inibição na atividade do AAC induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  não era devida a uma falta de substratos endógenos, liberados durante a abertura do PTP. Os resultados apresentados na tabela I mostram que é justamente isto que ocorre, pois a abertura do PTP, favorecida em condições de baixo  $\Delta\psi$ , induz a liberação de nucleotídeos de adenina do interior das organelas. É importante salientar que esses valores estão em concordância com os da literatura (Asimakis & Aprille, 1979). A saída de moléculas grandes como os substratos do AAC, por sua vez, explicariam o inchamento de baixa amplitude observado nas nossas condições experimentais e mostrado na figura 7. Há algum tempo já foi demonstrado que o  $\text{Ca}^{2+}$  induz efluxo de nucleotídeos de adenina das mitocôndrias (Harris et alii, 1979), sendo esta inclusive uma das hipóteses existentes para explicar a inibição da fosforilação oxidativa pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (Fagian et alii, 1986). A originalidade do nosso trabalho está em mostrar este efluxo em condições onde ainda não há aumento inespecífico da permeabilidade da membrana, associado a um dano irreversível. Essas condições experimentais são sem sombra de dúvida muito mais próximas das que ocorrem “in vivo” e, neste caso, observamos apenas um inchamento de baixa amplitude. Por outro lado, nossos resultados sugerem que a despolarização da membrana seja a condição necessária para ocorrer

saída aparentemente seletiva de nucleotídeos de adenina do interior das mitocôndrias. Se considerarmos que este fenômeno de abertura do PTP faz parte de um mecanismo disparado com concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , conforme proposto na literatura (Novgorodov & Gudzenko, 1996), podemos sugerir que talvez esta seja uma forma das mitocôndrias liberarem ATP para o citosol, pois sua necessidade no exterior das organelas é aumentada em situações de anóxia celular..

Embora o AAC seja uma proteína pequena, de cerca de somente 300 resíduos de aminoácidos, deve estabelecer uma via de translocação ampla, pois faz o transporte de moléculas grandes, como seus substratos ADP e ATP. Desta forma, qualquer condição durante a troca, onde um dos lados não esteja totalmente fechado pode resultar, comparativamente, na abertura de um amplo poro (Klingenberg, 1996). As primeiras indicações desta ‘parafunção’ do AAC, como poro, vieram de estudos mostrando efluxo de nucleotídeos de adenina pelas mitocôndrias induzido por ATR ou CAT e inibido por BKA (Meisner & Klingenberg, 1968) e efluxo de  $\text{H}^+$  e  $\text{K}^+$  pelo carreador induzido por CAT (Panov et alii, 1980). A sugestão de Panov e colaboradores é que o AAC se comporte como um poro regulado que dependendo da condição aumenta ou a condutividade específica para  $\text{H}^+$  e  $\text{K}^+$ , ou a condutividade não específica da membrana para outros metabólitos celulares (Panov, 1992). Isto vem de encontro com o postulado pelo grupo de Novgorodov, que a permeação a  $\text{H}^+$  precede a permeação à sacarose e que a abertura do PTP deve se dar em dois estágios, numa primeira fase, permitindo somente a passagem de  $\text{H}^+$  e talvez  $\text{K}^+$ , posteriormente passando a uma outra conformação, admitindo moléculas grandes, com massa molecular menor ou igual a 1500 Da (Novgorodov et alii, 1996).

Nossa interpretação é que o estágio inicial da abertura do PTP dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  provoque um aumento na permeabilidade da membrana a

prótons, que leva necessariamente à despolarização da membrana. Esta despolarização advém da ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  a seus sítios internos na membrana mitocondrial. A CsA previne a despolarização da membrana, sugerindo que o  $\text{Ca}^{2+}$  deva se ligar à mesma proteína que liga CsA, ou muito próximo dela, para exercer sua ação na membrana. Por sua vez, a membrana despolarizada e com o  $\text{Ca}^{2+}$  ligado a seus sítios internos seria uma condição que favorece a saída de nucleotídeos de adenina das mitocôndrias. Esta saída aparentemente ocorre pelo AAC, que se inativa pela falta de nucleotídeos endógenos para realizar sua função de transporte. Ou seja, o AAC está diretamente envolvido nos estágios iniciais de abertura do PTP. Reforçando esta interpretação recentemente foi demonstrado, através do uso do AAC isolado e reconstituído, que esta proteína pode se converter reversivelmente em um amplo canal, aparentemente seletivo a cátions (Brustovetsky & Klingenberg, 1996). Como esta abertura requer  $\text{Ca}^{2+}$ , é sensível aos inibidores específicos do AAC e ao ADP e não ocorre em pH baixo, foi sugerido o AAC como o principal componente do PTP na membrana mitocondrial (Brustovetsky & Klingenberg, 1996). Nossos resultados corroboram esta proposta, principalmente por mostrar, como aqui fizemos, os efeitos de concentrações fisiopatológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  na abertura do PTP.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDEEVA, L., TANVEER. A. AND CROMPTON M.(1995) Evidence for the involvement of a membrane associated cyclosporin A-binding protein in the  $\text{Ca}^{2+}$  activated inner membrane pore of heart mitochondria. *Eur. J.Biochem.* **230**: 1125-1132.
- AKERMAN, K.E.O., M.K.F. WILKSTROM, AND N.E.Saris. (1977) Effect of inhibitors on the sigmoidicity of the calcium ion transport kinetics in rat liver mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.* **464**:287-294.
- AKERMAN, K.E.O. (1978) Effect of pH and  $\text{Ca}^{2+}$  on the retention of  $\text{Ca}^{2+}$  by rat liver mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* **189**:256-262.
- AKERMAN, K.E.O. AND NICHOLLS, D.G. (1983) Physiological and bioenergetics aspects of mitochondrial calcium transport. *Physiol.Biochem. Pharmacol.* **95**:149-201.
- ALONSO, A, ALVES, A A , PEREIRA-DA-SILVA, L. AND MACEDO, D.V. (1997) Rat liver mitochondrial membrane: role of  $\text{Fe}^{2+}$  in the initiation of lipid peroxidation. *Free. Rad..Biol.Med.* (Submetido).

- ASIMAKIS, G.K. AND SORDHAL, L.A.(1977) Effects of atractilaside and palmitoyl Coenzyme A on calcium transport in cardiac mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* **179**: 200.
- ASIMAKIS, G.K. AND APRILLE, J.R. (1979) In Vitro Alteration of the Size of the Liver Mitochondrial Adenine Nucleotide Pool: Correlation with Respiratory Functions. *Arch.Biochem.Biophys.***203**: 307-316.
- BERNARDI, P., AND AZZONE, G.F. (1979)  $\Delta$ pH induced calcium fluxes in rat liver mitochondria.*Eur.J.Biochem.* **102**:555-562.
- BERNARDI, P., VASSANELLI, S.VERONESE, P.COLONNA, R.SZABO, I. AND M. ZORATTI. (1992 a) Modulation of the mitochondrial permeability pore. Effect of protons and divalent cations. *J.Biol.Chem.* **267**:2934-2939.
- BERNARDI, P.(1992 b) Modulation of mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton eletrochemical gradient. *J.Biol.Chem.* **267**:8834-8839.
- BERNARDI, P. VERONESE,P. AND PETRONILLI, V. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sentitive permeability transition pore.*J.Biol.Chem.* **268**:1005-1010.

- BROEKEMEIER, K.M., DEMPSEY, M.E. AND PFEIFFER, D.R.(1989) Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner permeability transition in liver mitochondria. *J.Biol.Chem.* **264**: 7829-7830.
- BOND, M.(1988) Elevated cellular calcium in disease states:cause or effect? *Cell Calcium.* **9**: 201-203.
- BRAND, M.D.(1985) Electroneutral efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  from liver mitochondria. *Biochem.J* **225**:413-419.
- BRUSTOVETSKY,N. AND KLINGENBERG, M. (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochemistry.* **35**: 8483-8488.
- CARAFOLI, E.(1987) Intracellular calcium homeostases. *Am.Rev.Biochem.* **56**: 395- 433.
- CARBONERA,D. AND AZZONE,G.F. (1988) Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress. *Biochim.Biophys.Acta.* **943**: 245-255.
- CASTILHO,R.F., KOWALTOWSKI A.J., MEINICKE,AR., ALMEIDA, A. M., SOUZA-PINTO, N.C., FAGIAN, M.M., GRIJALBA,M.T., BECHARA, E.J.H., VERCESI, A E. (1995) Mitochondrial oxidative damage promoted by synergism between  $\text{Ca}^{2+}$  and prooxidants: inner



membrane permeabilization and mtDNA breakage. *Free Radical Research in Latin American*. **47**: 369-375.

COBBOLD, P.H., AND RINK, T.J (1987) Fluorescence and bioluminescence measurement of cytosolic free calcium. *Biochem.J.* **248**:313-328.

CROMPTON, M., KUNZI, M. AND CARAFOLI, E. (1977) The calcium induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for sodium-calcium carrier. *Eur.J.Biochem.* **79**:549-558.

CROMPTON, M. COSTI, A. AND HAYAT, L. (1987) Evidence for the presence of reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem.J.* **245**: 915-918.

CROMPTON, M. AND COSTI, A. (1988) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload. *Eur. J. Biochem.* **178**: 489-501.

DAVIS, E.J. AND LUMENG, L.J. (1975) Relationship between the phosphorylation potentials generated by liver mitochondria and respiratory state under conditions of adenosine diphosphate control. *J.Biol.Chem.* **250**: 2275-2282.

- DUDDY, S.K., KASS, G.E.N. AND ORRENIUS, S. (1989)  $\text{Ca}^{2+}$  - mobilizing hormones stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from hepatocytes. *J.Biol.Chem.* **264**:20863-20868.
- ERDAHL, W. L, KREBSBACH, J. AND PFEIFFER, D.R. (1991). A comparison of phospholipid degradation by oxidation and hydrolysis during the mitochondrial permeability transition. *Arch. Biochem. Biophys.* **2**: 252-260.
- FAGIAN,M.M., PEREIRA-DA-SILVA, L., MARTINS, I.S. AND VERCESI,A.E. (1990) Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants.*J.Biol.Chem.***265**:19955-19960.
- FOURNIER, N. DUCET, G. AND CREVAT, A. (1987) Action of cyclosporin on mitochondrial calcium fluxes.*J.Bioenerg.Biomemb.* **19**:297-303.
- FRALIX, T.A., HEINEMAN, F.W. AND BALABAN, R.S. (1991) Effect of work on intracellular calcium of the intact heart. *Am.J.Physiol.Suppl* **261**: 54-59.
- GAVIN, C.E., GUNTER, K.K. AND GUNTER. T.E. (1990) Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *Biochem.J.* **266**: 329-334.

- GORNALL, AG., BARDAWILL, C.J. AND DAVID, M.M (1949)  
Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.  
*J.Biol.Chem.* **177**: 751-766.
- GRIFFITHS, S. AND HALESTRAP, P.A. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia but open during reperfusion. *Biochem.J.* **307**: 93-98.
- GUNTER, T.E., AND PUSKIN, J.S. (1972) Manganous ion as a spin label in studies of mitochondrial uptake of manganese. *Biophys.J.* **12**: 625-635
- GUNTER, T.E., JENSEN, B.D. (1986) The efficiencies of component steps of oxidative phosphorylation. I. A simple steady state theory. *Arch.Biochem.Biophys.* **248**:289-304.
- GUNTER, T.E., RESTREPO, D. AND GUNTER, K.K. (1988) Conversion of esterified fura-2 and indo-1 to  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive forms by mitochondria. *Am.J.Physiol.* **255**: (Cell Physiol.24): C304-C310.
- GUNTER, T.E., AND PFEIFFER, D.R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transpot calcium. *Am.J.Physiol.* **258** ( Cell Physiol. 27): C755-C786.
- GUNTER, T.E., GUNTER, K.K., SHEU S.S. AND GALVIN, E.C. (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am.Physiol.Soc.* C313-C339.

HALESTRAP, A.P. AND DAVIDSON, A.M. (1990) Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by inhibitor binding to mitochondrial matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing its interaction with the adenine nucleotide translocase. *Biochem.J.* **268**: 153-160.

HANSFORD, R.G. (1985) Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* **102**: 1-72.

HARRIS, E.J., AL SHAIKHALY, M. AND BAUM, H. (1979) Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol-specific reagents and by tyroxine. *Biochem. J.* **182**: 455-464.

HENKE, W. AND JUNG, K. (1991) Ischemia decreases the content of the adenine nucleotide translocator in mitochondria of rat and kidney. *Biochim.Biophys.Acta.* **1056**: 71-75.

HUNTER, D.R. AND HAWORTH, R. (1979 a) The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria I. The protective mechanism. *Arch.Biochem.Biophys.* **195**: 453-459.

HUNTER, D.R. AND HAWORTH, R.A. (1979 b) The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. III. Transition  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Arch.Biochem.Biophys.* **195**: 468-477.

- ICHAS,F, JOUAVILLE,L.S., SIDASH S.S. MAZAT, J.P. HOLMUHAMEDOV, E.L. (1994). Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Lett.***348**: 211-215.
- KAMO,N., MURATSUGU, M., HONGO,H.R.AND KOBATAKE,J. (1979) Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state.*J.Memb.Biol.***49**: 105-121.
- KAPLAN,R.S. AND PEDERSEN P.L. (1983) Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. *Biochem.J.* **212**: 279-288.
- KAWANISHI, T., BLANK, L.M., HAROOTUNION, A.T., SMITH, M.T. AND TSIEN, R.Y. (1989)  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations induced by hormonal stimulation of individual fura-2 loaded hepatocytes. *J.Biol.Chem.* **264**: 12859-12866.
- KLINGENBERG, M. AND BUCHHOLZ, M. (1973) On the mechanism of bongkredate effect on the mitochondrial adenine nucleotide carrier as studied through the binding of ADP. *Eur.J.Biochem.* **38**: 246-358.
- KLINGENBERG, M. (1992) Structure-Function of the ADP/ATP carrier. *Biochem.Soc.Trans.* **20**: 547-358,1992.

- KRONER, H. (1986)  $\text{Ca}^{2+}$  ions, an allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* **251**: 525-535.
- LE QUÔC,K. AND LE QUÔC,D. (1988) Involvement of ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability. *Arch.Biochem.Biophys.* **265**: 249-257.
- LE QUÔC,D. AND LE QUÔC, K. (1989) Relationship between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* **273**: 466-257.
- LEMASTERS, J.J., DIGIUSEPPI, J., NIEMINEN, A.L. AND HERMAN, B. (1987) Blebbing, free  $\text{Ca}^{2+}$  and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature.* **325**: 78-81.
- LI, W.Z. SHARIAT-MADAR, M. POWERS, X. SUN, R.D.LANE, AND K.D. GARLID. (1992) Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  antiporter from beef heart mitochondria. *J.Biol.Chem.***267**: 17983-17989.
- LUKÁCS, G.L., AND FONYÓ, A. (1985)  $\text{Ba}^{2+}$  ions inhibit the release of  $\text{Ca}^{2+}$  ions from rat liver mitochondria. *Biochem.Biophys.Acta.* **819**: 160-166.
- MACEDO,D.V., FERRAZ,V.L., PEREIRA-DA-SILVA,L. AND VERCESI,A.E. (1988)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NAD(P)<sup>+</sup>-induced alterations in

membrane permeability of rat liver mitochondria. In: Integration of Mitochondrial Functions (LeMasters,J.J. et al.eds.) pp535-542. Plenum Press, New York and London.

MACEDO, D.V., NEPOMUCENO, M.F. AND PEREIRA-DA-SILVA, L. (1993) Involvement of the ADP/ATP carrier in permeabilization processes of the inner mitochondrial membrane. *Eur.J.Biochem.* **215**: 595-600,1993.

MACEDO, D.V., COSTA,C. AND PEREIRA-DA-SILVA,L. (1997) The permeability transition pore opening in intact mitochondria and submitochondrial particles. *Comp.Biochem.Physiol.* **118**: 209-216.

MALMSTROM, K. AND CARAFOLI, E. (1977) The interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  with mitochondria from human myometrium *Arch.Biochem.Biophys.* **182**: 657-666.

MCCORMACK, J.G., HALESTRAP,A.P. AND DENTON, R.M. (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism.*Physiol.Rev.* **70**: 391-425.

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

- MITCHELL, P. AND MOYLE, M. (1969) Estimation of membrane potential and Ph difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur.J.Biochem.* **7**: 471-484.
- MOORE, G.A.(1971) Specific inhibition of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport by ruthenium red. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **42**: 298-305.
- MURPHY, E., COLL, K., RICH, T.L. AND WILLIAMSON, J.R. (1980) Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. *J.Biol.Chem.* **255**: 660-668.
- NEPOMUCENO, M.F.; MACEDO, D. V. AND PEREIRA-DA-SILVA L. (1991). Lipoperoxidation associated with mitochondrial membrane permeabilization in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . *Brasilian J. Med. Biol.Res.* **24**: 833-836.
- NICOLLI, A., PETRONILLI, V. AND BERNARDI, P. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry.* **32**: 4461-4465.
- NICOLLI, A ., BASSO, E., PETRONILLI, V., WENGER M.R., AND BERNARDI, P. (1996) Interactions of Cyclophylin with the Mitochondrial Inner Membrane and Regulation of the Permeability Transition Pore, a Cyclosporin A-sensitive Channel. *J.Biol.Chem.* **26**: 2185-2192.



- NICHOLLS, D.G. AND AKERMAN, K. (1982) Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **683**: 57-88.
- NOVGORODOV, S.A, GUDZ, T.I, MILGROM, Y.M AND BRIERLEY, G.P. (1992) The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **267**: 16274-16282.
- NOVGORODOV, S.A AND GUDZ, T.I. (1996) Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**: 139-146.
- NOACK, H., WOLFRAM S.K., AND WOLFGANG, A. (1992) Evaluation of procedure for the simultaneous determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides and adenylates in organic phenol extracts from mitochondria. *Anal. Biochem.* **202**: 162-165.
- PANOV, A.V. , FILIPPOVA, S.N. AND LYAKHOVICH, V.V. (1980) Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability to  $H^+$  and  $K^+$  ions. *Arch. Biochem. Biophys.* **199**: 420-426.
- PANOV, A.V. (1992) Regulation of specific and nonspecific ion conductivities of mitochondria by adenine nucleotide translocator. *Biokhimiya.* **57**: 483-493.

- PETRONILLI, V., COLA, C. AND BERNARDI, P. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **268**: 1011-1016.
- PFEIFFER, D.R., BROEKEMEIER, K.M., IGBAUBOA, U., REERS, M. AND RILEY, W.W. (1988) Permeability pathway of  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from mitochondria:  $\text{H}^+$  specificity and reversibility of the permeability defect. In: *Cellular  $\text{Ca}^{2+}$  Regulation* (Pfeiffer et al. eds.) pp.15-23. Plenum Press New York and London.
- PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C. AND RUEGG, J.C. (1964) The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the Crab *Maia Squinado* on the internal concentration of free calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta.* **79**: 581-591.
- RASMUSSEN, H. AND WAISMAN, D.M. (1983) Modulation of cell function in the calcium messenger system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **95**: 11-148.
- REED, K.C. AND BYGRAVE, F.L.A. (1975) Kinetic study of mitochondrial calcium transport. *Eur. J. Biochem.* **55**: 497-504.
- RICHER, C. AND FREI, B. (1988)  $\text{Ca}^{2+}$  release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Rad. Biol. & Med.* **4**: 365-375.

- SCHENEIDER, W.C. AND HOGEBOM, G.H. (1950) Intracellular distribution of enzymes. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J.Biol. Chem.* **183**: 123-128.
- SCORRANO, L., PETRONILLI, V. AND BERNARDI P.(1997) On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol.Chem.* **19**:12295-122299.
- SELWYN, M.J., DAVIDSON, A.P. AND DUNNETT, S.J. (1970) Calcium transport in mitochondria.*FEBS Lett.* **10**: 1-5.
- SILIPRAND,D., TONINELLO, A., ZOCCARATO,F., RUGOLO,M. AND SILIPRAND,N. (1978) Efflux of magnesium and potassium ions from liver mitochondria induced by inorganic phosphate and diamide. *J.Bioenerg.Biomembr.* **10**: 111.
- STOCCHI, V., CUCCHIARINI,L., MAGNANI,M., CHIARANTINI,L., PALMA,P. AND CRESCENTINI,G. (1985). Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal.Biochem.* **146**: 118-124.
- TAGER, J.M., WANDERS, R.J.A., GROEN,A.K., KUNZ,W., BOHNENSACK,R., KUNSTER,U., LETKO,G., BOHME,G. DUSZYNSKI,J AND WOJTCZAK,D. (1983) Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett.* **151**:1-9.

- UNITT,J.F., MCCORMACK, G., MACLACHALAN, L.K. AND ENGLAND, P.J. (1989) Direct evidence for a role of intramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of phosphorylation in the stimulated rat heart. *Biochem.J.* **262**: 293-301.
- VALENTE, R.H., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., PEREIRA-DA-SILVA,L. AND MACEDO D.V. (1997) Phospholipase  $\text{A}_2$  isoforms from Crotalus durissus terrificus venom and their effect on isolated mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* (in press).
- VALLE, V.G.R., FAGIAN, M.M., PARENTONI,L.S., MEINICKE, A.R., AND VERCESI, A.E. (1993) The participation of reative oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. *Arch.Biochem.Biophys.* **307 (1)**: 1-7.
- VERCESI, A.E. (1993)  $\text{Ca}^{2+}$  transport and oxidative damage of mitochondria. *Brazilian.J.Med.Biol.Res.* **26**: 441-457.
- WEIDEMANN, M.J., ERDELT,H. AND KLINGENBERG,M. (1970) Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Identification of carrier sites. *Eur.J.Biochem.***16**: 313-335.
- WILLIAMS, D.A., BECKER, P.L. AND FAY, F.S. (1986) Regional changes in calcium underlying contraction of single muscle cells. *Science.* **235**: 1644-1648.

- WILSON, E.D. AND ASIMAKIS, G.K. (1987) Phosphate-induced efflux adenine nucleotides from rat-heart mitochondria: evaluation of the roles of the phosphate/hydroxyl exchanger and the dicarboxylate carrier. *Biochem. Biophys. Acta.* **893**: 470-479.
- WINGROVE, D.E., AND GUNTER, T.E.. (1986) Kinetics of mitochondrial calcium transport. II. A kinetic description of the sodium dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium. *J. Biol. Chem.* **261**: 15166-15171.
- ZORATTI, M. AND SZABÓ, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1241**: 139-176.

---

## COMUNICAÇÕES EM CONGRESSO

### • Nacionais:

El-Khatib, S; L. Pereira da Silva & D.V. Macedo. THE MITOCHONDRIAL  $\text{Ca}^{2+}$  INDUCED PERMEABILITY TRANSITION PORE AND THE ADENYLIC CARRIER.. Resumo XXIV<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu-MG, 1995.

El-Khatib, S; L. Pereira da Silva & Macedo D.V. PERMEABILITY TRANSITION PORE AND MITOCHONDRIAL ADP/ATP CARRIER XXV<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu-MG, 1996.

El-Khatib, S; L. Pereira da Silva, F.E. Sluse\* & Macedo D.V. PHYSIOPATOLOGICAL  $\text{Ca}^{2+}$  CONCENTRATIONS TRIGGER THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING XXVI<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu-MG, 1996.

\* Lab. Bioenergetique, Universite de Liège, Bélgica.

### • Internacionais:

Macedo, D.V; El-Khatib, S; L. Pereira da Silva & Sluse, F. Workshop: THE MITOCHONDRIAL  $\text{Ca}^{2+}$  INDUCED PERMEABILITY TRANSITION PORE AND THE ADENYLIC CARRIER. International Symposium on 'Ischemia-reperfusion' Syndrome. Resumo (P-72). Liège-Bélgica, 1995.

Macedo,D.V; El-Khatib, S; L. Pereira da Silva & Sluse, F.  
OCCURRENCE OF THE PTP OPENING IN PHISIOPATOLOGICAL  
CONDITIONS SIMULATED 'IN VITRO'. European Bioenergetics  
conference. EBEC. Short reports. 9 (E-19):127. Louvain-La-Neuve -  
Bélgica,1996.