

ANA LIA MORSELLI

SECRETARIA
DE
PÓS GRADUAÇÃO

Este exemplar corresponde à
redação final da Tese defendida pela
candidata Ana Lia Morselli e
aprovada pela Comissão julgadora.
Campinas, 05-08-91. *Lucia*

ESTUDO DO PAPEL DO Ca^{++} NAS AL-
TERAÇÕES DE PERMEABILIDADE DA
MEMBRANA MITOCONDRIAL: PARTICI-
PAÇÃO DA FOSFOLIPASE A_2

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do tí-
tulo de Mestre em Biologia, área
de Bioquímica.

Orientadora

Profa. Dra. LUCIA PEREIRA DA SILVA oLC

n

Campinas - São Paulo

1991

M825e

14476/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por mais esta etapa vencida.

À minha família pelo total apoio e incentivo que recebi apesar da distância.

À Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva por sua orientação e participação na execução deste trabalho e no aprimoramento de meus conhecimentos.

À Profa. Dra. Eva G. S. Carnieri por ter me iniciado cientificamente e por seu incentivo e amizade que muito me ajudaram a chegar ao final desta etapa.

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi pela oportunidade de poder trabalhar em seu grupo de pesquisa.

À Profa. Dra. Anita J. Marsaioli do Instituto de Química da UNICAMP pela oportunidade de poder realizar parte deste trabalho em seu laboratório de pesquisa.

Ao Prof. Dr. William José da Silva do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo fornecimento das sementes de milho.

Aos Profs. Felix Guillermo Reyes Reyes, Maria Arita S. Natsuura e Satie H. Ugo pelas sugestões e críticas feitas a este trabalho.

À Profa. Denise V. de Macedo pela ajuda que tornou possível a execução de várias etapas deste trabalho e também por sua participação na minha aquisição de conhecimentos.

À Déborah por aturar-me com paciência e carinho neste último ano de convivência.

Às amigas Sonia, Lucia, Helena e Renata que não faltaram com sua amizade e apoio.

Ao Ronaldo que com sua presença tornou mais leve um período difícil.

Aos demais colegas do Laboratório de Bioenergética pelo incentivo e amizade.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica que de uma forma ou outra deram-me seu apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho procuramos estudar as alterações causadas na permeabilidade da membrana mitocondrial por agentes capazes de promover efluxo de Ca^{++} . Após incubação de mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos de rato, fígado, cérebro e rim ou de vegetais, milho e batata, em condições de "stress" oxidativo ou na presença de altas concentrações de Ca^{++} e Pi, extraíram-se dos sobrenadantes os lipídeos presentes e analisou-se qualitativamente a presença de ácidos graxos livres através de cromatografia em camada delgada em sílica gel. A integridade da membrana mitocondrial era seguida através da capacidade das mitocôndrias em captar e reter o Ca^{++} adicionado ao meio de incubação, ou através da geração e manutenção de potencial de membrana, utilizando a captação do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio. Os resultados obtidos dissociam as alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial do estímulo da atividade da fosfolipase A_2 . Assim, mitocôndrias de fígado, cérebro ou rim de rato, incubadas em condições nas quais eram bastante sensíveis à presença de Ca^{++} e Pi ou oxidantes de nucleotídeos de piridina como t-butilhidroperóxido e diamida, embora exibissem efluxo de Ca^{++} , não apresentavam, simultaneamente, aumento da atividade da fosfolipase A_2 sobre os lipídeos endógenos. Por outro lado, em mitocôndrias bastante resistentes aos agentes liberadores de Ca^{++} , como as de milho e de batata, ou as demais quando na presença de ATP e Mg^{++} exógenos, eram detectados ácidos graxos mesmo na ausência de indícios de um aumento significativo da permeabilidade da membrana mitocondrial.

SUMMARY

Intramitochondrial phospholipase activity has been correlated with Ca^{++} efflux from mitochondria incubated in the presence of different Ca^{++} releasing agents. We compared the phospholipase A_2 activity in mitochondria isolated from rat liver, brain and kidney and from corn and potato. These mitochondria show different sensitivities to the Ca^{++} releasing agents t-butylhydroperoxide, diamide and Pi. The mitochondrial membrane permeabilization was followed through the ability of a building up a membrane potential ($\Delta\psi$) by potato mitochondria, using a TPP^+ selective electrode and the release of Ca^{++} from all other mitochondria, with a Ca^{++} selective electrode. Free fatty acids were extracted from the supernatant of the mitochondrial incubations and qualitatively analyzed in thin layer chromatography. The results showed that mitochondria with high sensitivity to the Ca^{++} releasing agents showed no significant increase of free fatty acids. On the other hand, very resistant mitochondria, as those from potato and corn, accumulated free fatty acids. This led us to discard any direct correlation between the Ca^{++} efflux observed under our experimental conditions and the phospholipase A_2 activity.

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| ATP | - Trifosfato de adenosina |
| BSA | - Albumina de soro bovino |
| DTT | - Ditionitrositol |
| EGTA | - Ácido etileno glicol Bis(-aminoetil eter) NN'-tetra acético |
| GSH | - Glutaciona reduzida |
| GSSG | - Glutaciona dissulfato |
| HEPES | - Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sul fônico |
| MAL | - Malato |
| MFR | - Mitocôndria de fígado de rato |
| NAD | - Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NADP | - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| OAA | - Oxaloacetato |
| Pi | - Fosfato |
| TPP ⁺ | - Tetrafenilfosfônio |
| t-butOOH | - t-Butilhidroperóxido |
| $\Delta\mu H^+$ | - Gradiente eletroquímico de prótons |
| $\Delta\mu Ca^{++}$ | - Gradiente eletroquímico de calcio |
| $\Delta\psi$ | - Potencial elétrico transmembrana |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| Sistema de transporte de Ca^{++} em mitocôndrias animais. | 1 |
| Sistema de transporte de Ca^{++} em mitocôndrias de plantas..... | 6 |
| Alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial induzidas pelo estado redox dos nucleotídeos de piridina..... | 8 |
| Composição, função e degradação de lipídeos em mitocôndrias..... | 15 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 20 |
| Isolamento de mitocôndrias de fígado..... | 20 |
| Isolamento de mitocôndrias de cérebro..... | 21 |
| Isolamento de mitocôndrias de rim..... | 22 |
| Isolamento de mitocôndrias de batata..... | 22 |
| Isolamento de mitocôndrias de milho..... | 23 |
| Dosagem de proteína mitocondrial..... | 24 |
| Determinação do consumo de oxigênio..... | 25 |
| Determinação de Ca^{++} no meio de reação..... | 25 |
| Determinação do potencial elétrico de membrana..... | 26 |
| Meio básico e condições de incubação das mitocôndrias. | 28 |
| RESULTADOS..... | 32 |
| Efeito de Ca^{++} e oxidantes ou Pi em mitocôndrias de fígado de rato..... | 32 |
| Efeito de Ca^{++} e oxidantes ou Pi em mitocôndrias de cérebro de rato..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Efeito de Ca^{++} e oxidantes ou Pi em mitocôndrias de rim de rato..... | 45 |
| Efeito de Ca^{++} e oxidantes em mitocôndrias de batata.. | 51 |
| Efeito de Ca^{++} e oxidantes em mitocôndrias de milho... | 55 |
| DISCUSSÃO..... | 61 |
| CONCLUSÕES..... | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 68 |

INTRODUÇÃO

SISTEMA DE TRANSPORTE DE Ca^{++} EM MITOCÔNDRIAS ANIMAIS

As primeiras observações sobre o transporte de Ca^{++} em mitocôndrias foram os estudos sobre a captação de Ca^{++} por mitocôndrias de rim de rato feitos por VASINGTON & MURPHY (1962), que mostraram ser este um processo ativo.

Atualmente sabe-se que as mitocôndrias de tecidos animais captam Ca^{++} por um processo eletroforético, através de um transportador tipo "uniporter", em resposta ao potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) gerado pela cadeia transportadora de elétrons ou pela hidrólise de ATP (VASINGTON & MURPHY, 1962; LEHNINGER, 1970; ROTTENBERG & SCARPA, 1974; BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). A captação de Ca^{++} pode ser melhor entendida se a relacionarmos com a hipótese quimiosmótica da fosforilação oxidativa (MITCHELL, 1961). Tanto a passagem de elétrons através da cadeia respiratória quanto a hidrólise de ATP geram um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna, devido ao transporte vetorial de prótons da matriz para o citosol. Esse gradiente eletroquímico de prótons (ΔuH^+) é constituído por um componente químico (ΔpH) e pelo potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$), negativo no interior da organela. A relação existente entre estes dois componentes está representada pela equação:

$$\Delta uH^+ = \Delta\psi - 60\Delta pH \quad (1)$$

(MITCHELL, 1961; MITCHELL & MOYLE, 1969). Quando a mitocôndria capta Ca^{++} , ocorre neutralização de cargas negativas na matriz e conseqüente queda do potencial elétrico de membrana. A cadeia transportadora de elétrons é então estimulada para que o valor de $\Delta\mu\text{H}^+$ possa ser mantido constante, compensando-se a queda em $\Delta\psi$ com a extrusão de prótons, o que resulta em um aumento do ΔpH . Desta forma, o potencial elétrico é convertido em gradiente pró-tônico, passando a inibir a respiração e a limitar a entrada de Ca^{++} na mitocôndria (NICHOLLS, 1978). Por outro lado, se o aumento em ΔpH for evitado pela adição de ânions como fosfato, acetato ou bicarbonato, que entram na mitocôndria na forma protonada (ELDER & LEHNINGER, 1973; HARRIS, 1978), a cadeia respiratória restabelecerá o valor de $\Delta\psi$ e a mitocôndria poderá captar grande quantidade de Ca^{++} (até 2mM de Ca^{++} /mg de proteína) (CARAFOLI et alii, 1965; LEHNINGER, 1974; LEHNINGER et alii, 1978a). Quando esses ânions permeantes não são adicionados ao meio de reação, 2 nmoles de Ca^{++} já são suficientes para colapsar o potencial elétrico (AKERMAN & NICHOLLS, 1983a).

As características do transportador eletroforético de Ca^{++} já foram bem estabelecidas, e sabe-se que ele é inibido por vermelho de rutênio e lantanídeos (SCARPA & AZZONE, 1970; SELWIN et alii, 1970; ROTTENBERG & SCARPA, 1974; HEATON & NICHOLLS, 1976) e apresenta K_m para o Ca^{++} entre 5-30 μM , dependendo das condições em que as mitocôndrias são incubadas, além de transportar também outros íons divalentes como Sr^{++} , Mn^{++} e Ba^{++} , embora com menor afinidade (SARIS, 1963; CARAFOLI, 1965; DRAHOTÁ et alii, 1969; VAINIO et alii, 1970).

Apesar de existirem evidências da correlação entre $\Delta\psi$ e a entrada de Ca^{++} nas mitocôndrias (SCARPA & AZZONE, 1970; SELWYN et alii, 1970; NICHOLLS & AKERMAN, 1982), a força motriz responsável por este processo é o potencial eletroquímico de Ca^{++} , $\Delta\mu_{\text{Ca}^{++}}$ (LEHNINGER, 1970; BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et alii, 1978; SARIS & AKERMAN, 1980; TODESCHI, 1981) que está relacionado com $\Delta\psi$ de acordo com a equação:

$$\Delta\mu_{\text{Ca}^{++}} = 2\Delta\psi - 60 \log \frac{[\text{Ca}^{++}]_{\text{matriz}}}{[\text{Ca}^{++}]_{\text{meio}}} \quad (2)$$

Quando $\Delta\mu_{\text{Ca}^{++}} = 0$ atingimos uma situação de equilíbrio dinâmico ("steady state"), e de acordo com a equação (2) teremos:

$$\frac{[\text{Ca}^{++}]_{\text{matriz}}}{[\text{Ca}^{++}]_{\text{meio}}} = 10^{\Delta\psi/30} \quad (3)$$

Uma vez que nessas condições o valor de $\Delta\psi$ é aproximadamente 180mV, o gradiente de Ca^{++} livre através da membrana seria teoricamente 10^6 . Porém, os valores experimentais encontrados são muito menores que os valores obtidos pela simples aplicação da equação de Nernst (HANSFORD & CASTRO, 1982; DENTON & McCORMACK, 1980), indicando que deveria existir uma via de efluxo do Ca^{++} independente da via de captação, operando de forma eletroneutra (POZZAN et alii, 1977).

A existência de duas vias distintas para o influxo e efluxo de Ca^{++} mitocondrial, ficou evidente em experimentos mostrando o efluxo líquido do íon na presença de vermelho de rutênio, um inibidor específico da via de captação (MOORE, 1971; VASINGTON et alii, 1972; POZZAN et alii, 1977). CROMPTON et alii (1976) obser-

varam pela primeira vez que o efluxo de Ca^{++} , induzido por vermelho de rutênio em mitocôndrias de coração, era estimulado na presença de Na^+ exógeno, indicando que, de fato, deveria existir uma via de efluxo eletroneutra, que estaria trocando um íon Ca^{++} interno por dois íons Na^+ externos, nesse tipo de mitocôndria. Em mitocôndrias isoladas de fígado, o efluxo de Ca^{++} induzido por vermelho de rutênio foi estimulado por H^+ (TSOKOS et alii, 1980), sugerindo que, em mitocôndrias de tecidos não excitáveis, provavelmente a via eletroneutra de efluxo estaria trocando um íon Ca^{++} por dois íons H^+ , mantendo a eletroneutralidade.

Atualmente sabe-se que tanto as mitocôndrias de tecidos excitáveis quanto aquelas de tecidos não excitáveis, possuem as duas vias de efluxo de Ca^{++} , a dependente e a independente de sódio (CROMPTON et alii, 1978; ZOCCARATTO et alii, 1981; WINGROVE & GUNTER, 1986).

A operação simultânea das vias de captação e de efluxo permite a ocorrência de um movimento cíclico no transporte de Ca^{++} (CROMPTON et alii, 1976; AKERMAN & NICHOLLS, 1983a), regulando cineticamente a distribuição do Ca^{++} entre a matriz mitocondrial e o citosol em condições de equilíbrio. O efluxo líquido de Ca^{++} na presença de vermelho de rutênio, inibição do efluxo e a grande capacidade de acumular o íon na presença de fosfato inorgânico (P_i) (ZOCCARATO & NICHOLLS, 1982) são fortes evidências do movimento cíclico do transporte de Ca^{++} em mitocôndrias. O fosfato inorgânico provavelmente tem um papel importante no controle do transporte de Ca^{++} através da membrana mitocondrial interna, pois o fato deste ânion ser capaz de formar o complexo $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ na matriz, sugere que ele poderia ter influência na manutenção de

altas concentrações do íon na matriz mitocondrial, além de agir como ânion permeante.

A regulação das concentrações de Ca^{++} nos diferentes compartimentos intracelulares tem sido muito estudada, uma vez que muitas enzimas existentes na célula são dependentes de Ca^{++} (DENTON & McCORMACK, 1980; WILLIANSOON et alii, 1981; NICHOLLS & AKERMAN, 1982; JOSEPH et alii, 1983).

Foi sugerido, inicialmente, que o sistema de transporte de Ca^{++} em mitocôndrias regularia a concentração do íon no citosol (DRABOTA et alii, 1965; BYGRAVE, 1976; NICHOLLS, 1978; BORLE, 1981; COLL et alii, 1982). No entanto, estudos feitos por SOMLYO et alii (1981) mostraram que a concentração de Ca^{++} encontrada "in situ" era bem menor (1-3 nmol/mg de proteína) que a encontrada em estudos anteriores. Além disto, a concentração usual de Ca^{++} no citosol (0,1 a 0,2 μM) estaria bem abaixo dos valores de K_m para a captação do íon (3 a 10 μM) (HANSFORD, 1985).

Estes resultados levaram DENTON & McCORMACK (1980, 1981) a propor um papel alternativo para o transporte cíclico de Ca^{++} , que controlaria a concentração de Ca^{++} livre na matriz mitocondrial na faixa de 0,1 a 1,0 μM , regulando a atividade de três desidrogenases intramitocondriais: sistema piruvato desidrogenase, NAD isocitrato desidrogenase e 2-oxoglutarato desidrogenase. Esta regulação estaria diretamente relacionada com o metabolismo energético (McCORMACK & DENTON, 1980; DENTON et alii, 1980; HANSFORD, 1985), de tal forma que, quando ocorre aumento na concentração de Ca^{++} citosólico devido a estímulos hormonais, por exemplo, a mitocôndria tende a captar Ca^{++} e, se a concentração na matriz ultrapassar a faixa de 1,0 a 2,0 μM , essas desidrogenases são ati-

vadas, estimulando o ciclo de Krebs. Como consequência, há um aumento na produção de ATP, numa situação em que há aumento na demanda energética.

SISTEMA DE TRANSPORTE DE Ca^{++} EM MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS

Até alguns anos atrás, acreditava-se que o transporte de Ca^{++} em mitocôndrias de vegetais apresentava variações significativas quando eram comparadas mitocôndrias de diferentes espécies de plantas, e que esse sistema operava de maneira diferente daquele existente em mitocôndrias de vertebrados (DOUCE, 1985). As características que diferenciavam o sistema de captação de Ca^{++} por mitocôndrias vegetais daquele que ocorre em animais, podem ser resumidas no seguinte: 1) o influxo de Ca^{++} não estaria associado ao estímulo da cadeia respiratória e despolarização do potencial de membrana (AKERMAN & MOORE, 1983b); 2) seria dependente do substrato a ser oxidado (AKERMAN & MOORE, 1983; DAY et alii, 1978); 3) dependeria da presença de Pi para operar (MILLARD et alii, 1978; KENEFICK & HANSON, 1966; HANSON & HODGES, 1967; DAY et alii, 1978; AKERMAN & MOORE, 1983; DAY & WISKICH, 1984); 4) seria insensível a vermelho de rutênio e Mg^{++} em algumas espécies (CHEN & LEHNINGER, 1973; AKERMAN & MOORE, 1983). Além disso, o alto Km e a baixa velocidade inicial de captação do íon (FUKUMOTO & NAGAI, 1982; DIETER & MARMÉ, 1983; MOORE & AKERMAN, 1984) fizeram acreditar que o transporte de Ca^{++} em plantas superiores não teria um papel importante na homeostase do Ca^{++} (DOUCE, 1985; McCORMACK & DENTON, 1986).

No entanto, MARTINS & VERCESI (1985) desenvolveram um procedimento que resultou no isolamento de mitocôndrias vegetais funcionalmente intactas, e com essas preparações obtiveram resultados contrastando significativamente com os dados de literatura até então existentes. Mitocôndrias de milho, soja, feijão e café mostraram acúmulo de Ca^{++} acoplado à respiração, muito mais ativo (MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS et alii, 1986; CARNIERI et alii, 1987) do que já havia sido descrito por outros pesquisadores (CHEN & LEHNINGER, 1973; DAY et alii, 1978; MOORE & AKERMAN, 1984). Esses novos resultados, possivelmente decorrentes da obtenção de mitocôndrias vegetais qualitativamente superiores às demais preparações utilizadas, mostraram que a captação de Ca^{++} , em mitocôndrias das espécies vegetais estudadas, apresentava uma velocidade considerada baixa (140-180 nmol Ca^{++} /mg de proteína), era inibida por vermelho de rutênio e Mg^{++} e era acompanhada por extrusão de prótons, por pequeno aumento na velocidade de respiração e pequena queda no potencial elétrico. Os autores explicaram os três últimos fenômenos como sendo consequência da baixa atividade do transportador de influxo de Ca^{++} , comparada à atividade da bomba redox nestas mitocôndrias (MARTINS et alii, 1986). Isto foi comprovado por experimentos em que se obteve uma relação linear entre as mudanças no potencial elétrico e as velocidades de oxidação de succinato, medida através da extrusão de H^+ , durante a captação de Ca^{++} , quando a oxidação do succinato era gradualmente inibida pela adição de concentrações crescentes de malonato (CARNIERI et alii, 1987).

As mitocôndrias vegetais estudadas pelo grupo de VERCESI, mostraram ainda, capacidade em manter o Ca^{++} livre extramitocon-

drial na faixa de 1,5-2,0 μM , em condições experimentais nas quais mitocôndrias de fígado de rato mantém o Ca^{++} livre extramitocôndrial numa faixa de 0,5-0,75 μM . Ficou evidente também, a existência de uma via distinta daquela de captação para o efluxo do íon, pois a adição de Ca^{++} ou EGTA a estas mitocôndrias resultou em captação ou liberação de Ca^{++} , respectivamente, tendendo a manter o equilíbrio inicial da concentração extramitocôndrial de Ca^{++} (MARTINS & VERCESI, 1985).

A importância fisiológica do transporte de Ca^{++} em mitocôndrias de plantas ainda não foi elucidada. Estas mitocôndrias, diferentemente das mitocôndrias de vertebrados, apresentam as três desidrogenases intramitocôndriais (sistema piruvato desidrogenase, NAD isocitrato desidrogenase e 2-oxoglutarato) aparentemente insensíveis ao Ca^{++} (McCORMACK & DENTON, 1986; MARTINS em resultados não publicados), indicando que o sistema de transporte de Ca^{++} em mitocôndrias vegetais não deve estar relacionado à regulação destas enzimas. Além disso, em mitocôndrias de algumas espécies de plantas como repolho e batata por exemplo, não foi demonstrada a capacidade de captação de Ca^{++} , apesar de serem obtidas mitocôndrias acopladas, capazes de gerar e manter o potencial de membrana, e com bom controle respiratório (MARTINS & VERCESI, 1985).

ALTERAÇÕES DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL INDUZIDAS PELO ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS DE FLUORIDINA

Sabe-se atualmente que o estado redox dos nucleotídeos de

piridina, está relacionado ao fluxo de Ca^{++} mitocondrial. VERCESI et alii (1978) e LEHNINGER et alii (1978a,b) foram os primeiros pesquisadores a observarem em mitocôndrias de fígado de rato energizadas por diferentes substratos, na presença de oxidantes (oxaloacetato ou acetoacetato) ou redutores (β -hidroxibutirato, isocitrato ou glutamato), que o estado reduzido dos nucleotídeos de piridina favorecia o acúmulo de Ca^{++} pelas mitocôndrias, e o estado oxidado, por sua vez, favorecia a liberação do íon pelas organelas. Este fato foi amplamente confirmado por outros laboratórios, que trabalharam com mitocôndrias isoladas (DAWSON et alii, 1979; FISKUM & LEHNINGER, 1979; LOTSCHER et alii, 1979; 1980; BEATRICE et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; HOFSTETTER et alii, 1981; PALMER & PFEIFFER, 1981; BAUMHUTER & RICHTER, 1982; BEATRICE et alii, 1982; VERCESI & LEHNINGER, 1982; MOORE et alii, 1983; SILIPRANDI et alii, 1983; BEATRICE et alii, 1984; BELLOMO et alii, 1984a; FREI et alii, 1985a; b; 1986; BERNARDES et alii, 1986; VERCESI, 1984a; b; 1985; 1987), células intactas (CHARLTON & WENNER, 1978; KRELL et alii, 1979; BELLOMO et alii, 1982; JEWELL et alii, 1982; BELLOMO et alii, 1984b; c) e fígado perfundido (SIES et alii, 1981).

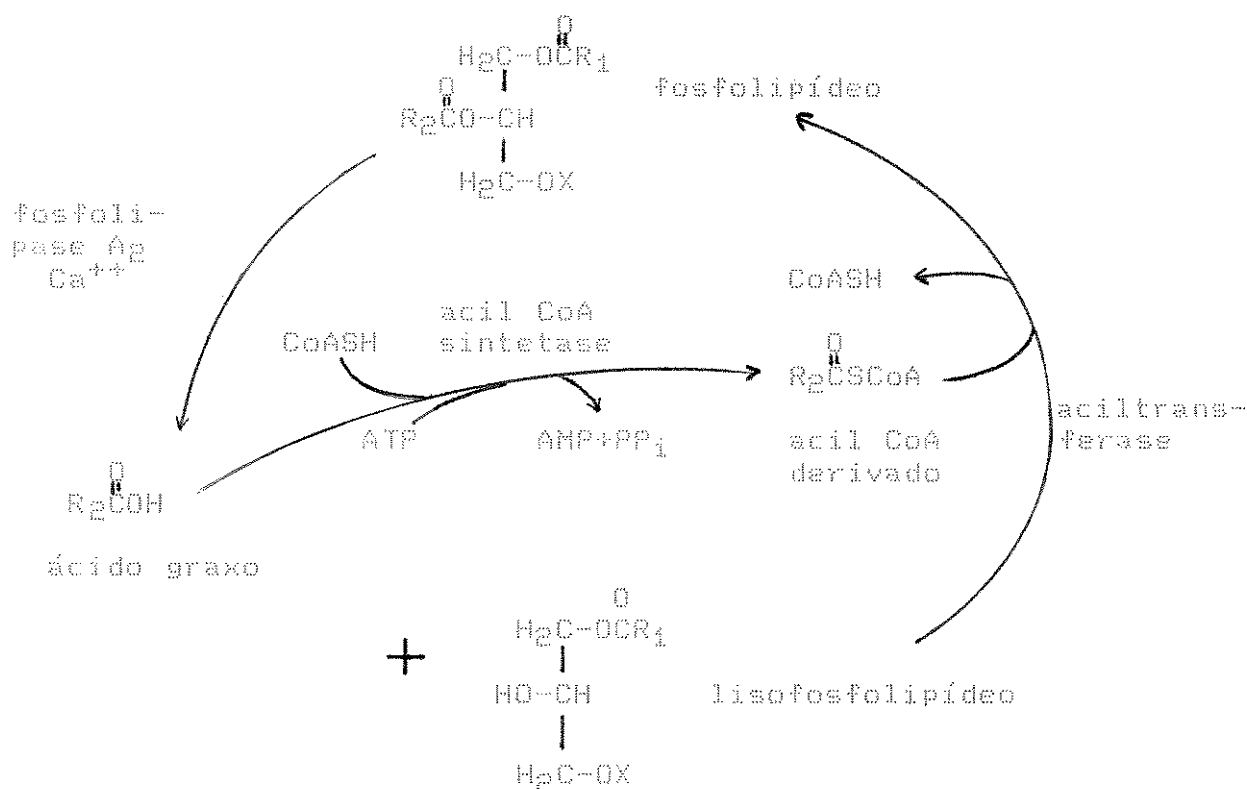
Vários trabalhos foram publicados com o objetivo de esclarecer qual nucleotídeo de piridina estaria diretamente envolvido no efluxo de Ca^{++} mitocondrial. Alguns indicavam o $NADP^+$ como sendo responsável pelo efluxo de Ca^{++} da mitocôndria (FRPIC & BYGRAVE, 1980; SIES et alii, 1981; ROTH & DIKSTEIN, 1982; VERCESI & LEHNINGER, 1982; ORRENIUS et alii, 1983; BERNARDES et alii, 1986), porém outros afirmavam que o NAD seria o nucleotídeo envolvido na liberação do íon (SANDRI et alii, 1979; PANFILI et

alii, 1980; LOTSCHER et alii, 1980. Em artigo mais recente, VERDESI (1987) demonstrou que a velocidade de efluxo de Ca^{++} mitocondrial era independente da oxidação do NADH e bastante estimulada pela oxidação do NADPH.

Existem vários compostos que causam o efluxo de Ca^{++} em mitocôndrias. Alguns destes, como agentes quelantes e inibidores da via de influxo tem sua ação explicada como decorrente da alteração que induzem no movimento cíclico de Ca^{++} através da membrana (SORDAHL, 1974; GUNTER, 1978). Outros compostos desacoplam a mitocôndria e o efluxo de Ca^{++} ocorre em razão do colapso do potencial protônico, pelo reverso da via de influxo (AKERMAN, 1978; BERNARDI et alii, 1984). E existe ainda, uma série de compostos que direta ou indiretamente afetam o estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina mitocondriais e conseqüentemente causam o efluxo de Ca^{++} mitocondrial (BEATRICE et alii, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1981; LEHNINGER et alii, 1978b; FISKUM & LEHNINGER, 1979; NICHOLLS & BRAND, 1980; BELLOMO et alii, 1982; HOFSETTER et alii, 1981; BERNARDES et alii, 1986). O interesse no mecanismo de ação deste último tipo de agentes indutores do efluxo de Ca^{++} está ligado a seu possível significado fisiológico como reguladores do fluxo desse íon em mitocôndrias (FISKUM & LEHNINGER, 1979; ROTH & DIKSHEIN, 1982). Até o momento porém, apesar das inúmeras publicações nesta área, não há concordância nem quanto ao mecanismo envolvido nesse tipo de efluxo nem quanto à sua relevância fisiológica (VERDESI & PEREIRA DA SILVA, 1984).

Há uma série de trabalhos publicados por PFEIFFER e colaboradores abordando este assunto. PFEIFFER et alii (1979) propuseram a existência de um ciclo de deacilação e reacilação de fosfo-

lipídeos de membrana iniciado pela ação da fosfolipase A_2 .



Sistema enzimático responsável pelas reações de hidrólise e reacilação de fosfolipídeos da membrana mitocondrial.

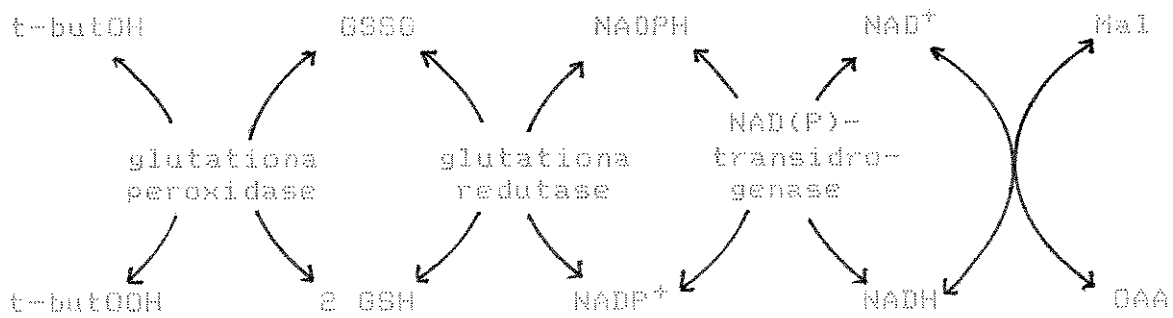
Em trabalhos posteriormente publicados, o mesmo grupo de pesquisadores apresenta a hipótese de que um grande número de metabólitos e agentes tóxicos que causam liberação do Ca^{++} mitocondrial, incluindo os agentes oxidantes de NAD(P)H e GSH, tem seu mecanismo de ação mediado pelas enzimas que compõem este ciclo de deacilação-reacilação de fosfolipídeos de membrana (BEATRICE et alii, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1981; BEATRICE et alii, 1982; 1984). As enzimas envolvidas nesse mecanismo seriam a fosfolipase A_2 , ativada por Ca^{++} , que age sobre os lipídeos da membrana, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos, que numa reação dependente de ATP ou GTP seriam transformados pela acilcoenzima A sintetase em seus acil CoA derivados e estes, por sua vez

seriam reincorporados à membrana por ação da acil CoA: lisofosfatidilaciltransferase (BEATRICE et alii, 1984), como mostrado no esquema acima.

Este ciclo teria a função de regular a permeabilidade da membrana interna (BEATRICE et alii, 1984). Assim, pequenos aumentos na concentração de lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres, seriam responsáveis por um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial para prótons, com conseqüente diminuição do potencial de membrana, permitindo a liberação de Ca^{++} pelo reverso do uniporter (McCORMACK & DENTON, 1980). Esse mecanismo permitiria, em condições fisiológicas, um controle tipo "feedback" no conteúdo de Ca^{++} mitocondrial (GUNTER et alii, 1983), possibilitando a participação da organela na regulação tanto do nível citoplasmático de Ca^{++} quanto no da matriz mitocondrial, onde modularia a atividade das enzimas do ciclo de Krebs já citadas (DENTON & McCORMACK, 1980; OKAYASU et alii, 1985). No caso de aumento da atividade da fosfolipase A_2 e/ou inibição das enzimas responsáveis pela reacilação, haveria aumento da permeabilidade inespecífica para moléculas pequenas e íons. Este segundo caso poderia estar relacionado com a etiologia de condições patológicas significativas como isquemia (STARKE et alii, 1986; MARTENS et alii, 1986), síndrome de Reye (WROGEMANN et alii, 1973), distrofia muscular progressiva (CHEAH & CHEAH, 1981a) e hipertermia maligna (BELLOMO et alii, 1984a). Explica-se assim o interesse no estudo de desenvolvimento de permeabilidade não específica da membrana mitocondrial em resposta a agentes indutores do efluxo de Ca^{++} , processo esse que sempre requer acúmulo de Ca^{++} exógeno pela mitocôndria (McCORMACK & DENTON, 1980). Haveria portanto ativação

da fosfolipase A₂ pelo aumento do Ca⁺⁺ na matriz e os agentes liberadores de Ca⁺⁺ inibiriam direta ou indiretamente a reacilação dos lisofosfolipídeos.

Existe porém uma grande controvérsia quanto ao modo de ação desses agentes indutores do efluxo de Ca⁺⁺, especialmente em relação àqueles que induzem oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais, como hidroperóxidos, que oxidam os nucleotídeos pelo sistema enzimático da glutathiona peroxidase/reductase. O hidroperóxido é reduzido pela glutathiona peroxidase às custas da glutathiona reduzida, a qual, por sua vez, é novamente reduzida pela glutathiona reductase às custas do NADPH. O NADP⁺ é reduzido pela NAD(P) transidrogenase às expensas do NADH, conforme mostrado no esquema abaixo:



Reações de óxido-redução nos sistemas responsáveis pela metabolização de hidroperóxidos.

Outros compostos que também causam oxidação de nucleotídeos de piridina são oxaloacetato e acetoacetato através de desidrogenases NADH-dependentes. Uma hipótese inicial para o mecanismo de ação desses agentes era de que um aumento na concentração de NAD(P)⁺ ativaria a via de efluxo eletroneutra Ca⁺⁺/2H⁺, conduzindo a um movimento cíclico do Ca⁺⁺ (FISKUM & LEHNINGER, 1979;

ROTH & DIKSHEIN, 1982). Nesta interpretação, a permeabilidade inespecífica seria uma consequência secundária do movimento cíclico do íon e não a causa primária do efluxo de Ca^{++} (VERCESI, 1984a; FREI et alii, 1985; FERRAZ, 1988). Trabalhos recentes porém, utilizando mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas, afastaram essa hipótese (VERCESI et al, 1988; VERCESI, 1987). PFEIFFER e colaboradores propõem que esses agentes ajam indiretamente inibindo a reacilação, por causarem um aumento na razão GSSG/GSH, devido à formação de dissulfetos mistos entre GSH e CoASH ou por formação de dissulfetos em grupos tióis essenciais da acilCoA: lisofosfatidilaciltransferase e/ou acilCoA sintetases (BEATRICE et alii, 1982, 1984; BROCKEMEIER et alii, 1985; MCCORMACK & DENTON, 1980).

Resultados preliminares do nosso laboratório porém, mostraram (1) ocorrência de efluxo de Ca^{++} por aumento da permeabilidade inespecífica da membrana mitocondrial, em condições em que a atividade da fosfolipase A_2 não foi detectada, (2) mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, que possuem uma atividade de fosfolipase A_2 cerca de 20% menor que a encontrada em mitocôndrias de fígado de rato (FISKUM et alii, 1985) são muito mais sensíveis que estas em relação aos efeitos combinados de Ca^{++} e oxidantes de nucleotídeos de piridina, (3) uma rápida transição entre a liberação de Ca^{++} e sua recaptção por adição de DTT, parece não ser compatível com o baixo "turnover" da acil CoA sintetase (RILEY & PFEIFFER, 1985). Estes resultados mostram evidências que são contrárias à hipótese de PFEIFFER em que a fosfolipase A_2 é proposta como desempenhando um papel central na permeabilização causada por esses agentes indutores do efluxo de Ca^{++} nas mito-

côndrias.

COMPOSIÇÃO, FUNÇÃO E DEGRADAÇÃO DE LIPÍDEOS EM MITOCÔNDRIAS

As mitocôndrias possuem duas membranas de estrutura complexa, a membrana externa e a interna, que embora estejam em contato, possuem funções e composição química bastante diferentes. Cada membrana celular de eucariotos apresenta um padrão de proteínas e lipídeos distintos. Assim como algumas proteínas, há lipídeos característicos de certas membranas. Nas mitocôndrias destaca-se a alta porcentagem de cardiolipina e a pequena quantidade de esteróis e esfingolipídeos. As mitocôndrias de diferentes tecidos de mamíferos apresentam bastante semelhança quanto à sua composição lipídica. Os lipídeos mais abundantes são a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, que juntos perfazem cerca de 80% do total de fosfolipídeos. A cardiolipina representa cerca de 10 a 20%, com exceção das mitocôndrias de cérebro de rato (STRICKLAND & BENSON, 1960) que apresentam uma quantidade bem menor desse fosfolipídeo.

As mitocôndrias de plantas apresentam uma composição lipídica semelhante às mitocôndrias de células de mamíferos. A diferença mais significativa refere-se a um maior conteúdo de esteróis livres e esterificados, glicosilados e acetilados (DUPERON et alii, 1975).

Na tabela I está sumarizada a composição lipídica de mitocôndrias de diferentes tecidos animais e vegetais.

TABELA I - Composição de lipídeos em mitocôndrias

| Origem | % do total | | | | | | Referências |
|--------------------|------------|-------|-------|------|----|------|---|
| | CL | PE | PC | PI | PS | Liso | |
| Fígado de rato | 12-17 | 22-36 | 34-55 | 5- 8 | 1 | 1- 2 | Zambrano et alii, 1975 Strickland & Ben- son, 1960 |
| cérebro de rato | 2 | 32 | 55 | 5 | 4 | | Strickland & Ben- son, 1960 |
| rim de rato | 9-20 | 30-37 | 36-41 | 3 | 1 | 1 | Zambrano et alii, 1975 Strickland & Ben- son, 1960 |
| coração de rato | 8 | 44 | 41 | 3 | 1 | 1 | Palmer et alii, 1981 |
| batata | 17-19 | 26-33 | 33-44 | 7-13 | | 3 | McCarty et alii, 1973 |
| feijão | 14-23 | 32-46 | 33-36 | 3- 4 | | 3 | McCarty et alii, 1973 |

CL, cardiolipina; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; Liso, lisofosfoglicé-
rídeos.

Com relação aos ácidos graxos que compõem os fosfolipídeos mais abundantes nas mitocôndrias, há cerca de 50% de ácidos gra-
xos insaturados, sendo os ácidos linoleico, linolênico e araquí-
dônico os que ocorrem em maior quantidade, tanto em mitocôndrias
animais quanto nas vegetais. A tabela II mostra a distribuição
dos ácidos graxos nas mitocôndrias de diferentes tecidos.

Os lipídeos das membranas biológicas não desempenham so-
mente papel estrutural, pois influenciam consideravelmente as
proteínas de membrana, podendo participar da regulação de proces-
sos bioquímicos.

TABELA II - Distribuição de ácidos graxos em mitocôndrias

| Origem | % do total | | | | | | | Referências |
|----------------------|------------|------|-------|------|-------|-------|------|---------------------------|
| | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 20:4 | 20:6 | |
| Fígado de rato | 14-27 | 1-3 | 17-27 | 9-14 | 10-26 | 20-29 | 3-6 | Hoch et alii 1981 |
| Coração de rato | 15 | 14 | 26 | 8 | 11 | 20 | 15 | Palmer et alii, 1981 |
| Cérebro camund. | 6 | | | 32 | 15 | 18 | 28 | Sun & Horro- chs, 1971 |
| Feijão | 12-26 | | 2-7 | 5 | 4-33 | 29-41 | | McCarty et alii, 1973 |
| Broto de couve-fl | 15 | | 3 | 10 | 12 | 60 | | Moreau et alii, 1974 |

16:0, ác.palmítico; 16:1, ác.palmitoleico; 18:0 ác.esteárico; 18:1, ác.oleico; 18:1, ác.linoleico; 18:1, ác.linolênico; 20:4, ác.arauquidônico; 20:6, ác.eicosahexaenico.

A membrana interna das mitocôndrias é especialmente rica em proteínas envolvidas no metabolismo celular, e vários trabalhos têm mostrado a influência de lipídeos nas funções mitocondriais. Na extensa revisão apresentada por DAUK, 1985, estão descritos os seguintes efeitos dos lipídeos e suas possíveis funções em mitocôndrias: (1) influência na estabilidade e comportamento osmótico das mitocôndrias; (2) na atividade respiratória e produção de energia; (3) na permeabilidade e nos processos de transporte através das membranas; (4) na síntese de proteínas mitocondriais, transporte de proteínas para dentro da mitocôndria; (5) na estruturação das membranas e interação lipídeo proteína e (6) na atividade de enzimas mitocondriais "in vivo" e "in vitro".

Estando os lipídeos das membranas mitocondriais envolvidos nos processos descritos acima, é óbvio que sua degradação leva a profundas alterações funcionais nessas organelas. Em todas as

membranas celulares estão presentes fosfolipases, EC 3.1.1.4, que são responsáveis pela hidrólise de fosfolipídeos em lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres (para revisão, ver VAN den BOSCH, 1982). A atividade de fosfolipase em mitocôndrias de fígado de rato foi detectada pela primeira vez há 26 anos, por dois grupos de pesquisa independentes, SCHERPHOF & VAN DEENEN, 1965 e ROSSI et alii, 1965. Embora essa atividade esteja presente em ambas as membranas, interna e externa (NACHBAUR et alii, 1974), ainda não se sabe se é a mesma molécula proteica presente em ambas. NACHBAUR & VIGNAIS, 1968, mostraram que a maior parte dessa atividade estava localizada na membrana externa da mitocôndria. Mais tarde, NACHBAUR et alii, 1972, determinaram o Km aparente para a fosfatidiletanolamina, chegando a um valor várias vezes menor para a enzima da membrana externa (90 μ M) do que para a membrana interna (400 μ M). A fosfolipase A_2 de mitocôndrias de fígado de rato já foi solubilizada, purificada e caracterizada (WAITE & SISSON, 1971; DE WINTER et alii, 1982; NATORI et alii, 1983). De acordo com esses autores a enzima apresenta especificidade absoluta por ligações acil-éster na posição sn-2, sendo 1-palmitoil-2-linoleoil fosfatidiletanolamina seu melhor substrato. Essa fosfolipase não é afetada por reagentes típicos, porém é completamente inibida pelo agente alquilante brometo de p-bromofenacila, e como outras fosfolipases A_2 , mostra dependência absoluta de Ca^{++} (WEGLICKI et alii, 1971; PALMER et alii, 1981; CHEAH & CHEAH, 1981b).

Em nosso trabalho propusemos investigar a atividade de fosfolipase A_2 em mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos animais e de diferentes espécies de vegetais, através da determina-

ção de seus produtos de reação, nas nossas condições experimentais, com o objetivo de dissociar o efluxo de Ca^{++} induzido por oxidantes ou PI, na presença de Ca^{++} , da atividade da fosfolipase A₂. Trabalhando com mitocôndrias que captam Ca^{++} e outras que não captam esse íon, investigamos as diferenças de sensibilidade apresentadas pelas mitocôndrias estudadas, em relação aos agentes indutores da permeabilização da membrana. Procuramos assim, entender melhor o mecanismo de ação desses agentes no processo de permeabilização inespecífica da membrana interna dessas organelas.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO

O isolamento de mitocôndrias hepáticas foi feito segundo SCHNEIDER & HOGEBOOM (1951), por centrifugação fracionada, utilizando-se ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 180-250 g, mantidos em jejum por 12 horas e sacrificados por concussão cerebral.

O fígado foi retirado rapidamente, colocado em solução contendo sacarose 250 mM, HEPES 2 mM (pH 7,2) e EGTA 0,5 mM, picado e lavado várias vezes com a mesma solução. O material foi então homogeneizado em um homogeneizador Potter-Elvehjem, usando-se a mesma solução acima citada. O homogeneizado foi centrifugado a 600 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o precipitado foi novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados a 12100 xg por 10 minutos. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a fase lipídica foi retirada, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em uma solução contendo sacarose 250 mM, HEPES 1,0 mM e EGTA 0,3 mM e novamente centrifugado a 12100 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em solução de sacarose 250 mM e HEPES 1,0 mM, resultando uma suspensão mitocondrial cuja concentração proteica estava em cerca de 100 mg/mL. Todo o processo foi realizado a uma temperatura entre 0-4°C.

ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO

As mitocôndrias de cérebro foram isoladas segundo ROSENTHAL et alii (1987) por centrifugação fracionada, utilizando-se ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 160-250 g e sacrificados por decapitação.

O tecido cerebral, retirado imediatamente, foi picado finamente com tesoura e lavado duas vezes em meio (MS) com manitol 225 mM, sacarose 75 mM, BSA 0,5 %, Hepes 5,0 mM (pH 7,2) contendo EGTA 1,0 mM. Este material foi suspenso em 10 ml deste meio contendo 5,0 mg de nagarse e homogeneizado em um homogeneizador Potter-Elvehjem. O volume do homogeneizado foi completado para 30 ml com o meio e centrifugado a 800 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o sedimento ressuspendido em 10 ml deste meio e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram então combinados e centrifugados a 17300 xg por 10 minutos. O sedimento, contendo mitocôndrias livres e sinaptossomas, foi ressuspendido em 20 ml de meio e dividido em dois tubos onde foram adicionados 10 ul de digitonina 10 % em cada um, a fim de romper a membrana dos sinaptossomas e novamente centrifugados a 17300 xg por 10 minutos e, tanto o sobrenadante quanto a camada clara do sedimento foram descartados. O sedimento escuro foi então ressuspendido em 10 ml de meio MS (sem EGTA) e novamente centrifugado a 17300 xg por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 0,1-0,2 ml deste último, obtendo-se uma suspensão mitocondrial com concentração aproximada de 80 mg/ml. Todo o processo foi realizado a uma temperatura entre 0-4°C.

ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE RIM

As mitocôndrias renais foram isoladas segundo WALLIN et alii (1987), por centrifugação fracionada, utilizando-se ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 180-250 g e sacrificados por concussão cerebral.

Os rins, retirados imediatamente, foram imersos em meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,5 mM, Hepes 1,0 mM (pH 7,2). Com auxílio de uma pinça, a película que envolve cada rim foi retirada e com uma lâmina de barbear, os rins foram abertos para que a medula fosse também extraída. O cortex foi então picado finamente com uma tesoura e lavado com o mesmo meio. O material foi homogeneizado em um homogeneizador Potter-Elvehjem e centrifugado a 500 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 8000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em meio contendo sacarose 250 mM e Hepes 1,0 mM (pH 7,2) e novamente centrifugado a 4500 xg por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 0,1 ml do último meio mencionado acima, obtendo-se uma suspensão mitocondrial com concentração de 60-100 mg de proteína/ml. Todo o processo foi realizado a uma temperatura entre 0-4°C.

ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA

Mitocôndrias de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) adquiridas no mercado, foram isoladas segundo DIOLEZ & MOREAU (1983) com algumas modificações. Os tubérculos permaneceram re-

frigerados até o momento do isolamento das mitocôndrias quando, então, foram descascadas, cortadas em cubos e suspensas em meio de extração contendo manitol 400 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2), EGTA 2 mM, BSA livre de ácidos graxos 0,1 %, cisteína 0,1 % e com pH final ajustado para 7,6. A suspensão foi triturada em uma centrífuga de alimentos Walita. O material foi filtrado em gase dobrada 4 vezes e seu pH ajustado para 7,2. O filtrado foi então centrifugado a aproximadamente a 1000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a aproximadamente a 2500 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 xg por 10 minutos. Com auxílio de um pincel, o precipitado foi ressuscitado em meio de isolamento contendo manitol 300 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2), EGTA 0,1 mM e BSA 0,1 %. A suspensão foi novamente centrifugada a 12000 xg por 10 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi homogeneizado, sem nova adição de meio de isolamento. A concentração proteica da suspensão mitocondrial variou entre 30-60 mg de proteína/ml. Todo o processo foi realizado a uma temperatura entre 0-4°C.

ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE MILHO

Mitocôndrias de milho foram isoladas segundo MARTINS & VERCESI (1985) de grãos de milho *Zea mays*, cedidas pelo Banco de Germoplasma do Departamento de Genética, IB, UNICAMP

Os grãos de milho foram escolhidos, lavados em água destilada e mantidos durante uma hora em solução de hipoclorito de sódio 50% para esterilização. Em seguida foram lavados com água deion-

zada e deixados por 2 horas em água deionizada para embebição. Os grãos foram, então, colocados para germinar em caixas plásticas desinfetadas, forradas com espuma fina e papel de filtro úmidos. As caixas, devidamente tampadas, foram colocadas em uma câmara escura com temperatura constante de 28°C, durante 4-6 dias.

Os coleóptiles foram picados com auxílio de uma tesoura e suspensos em meio de extração contendo manitol 0,4 M, Hepes 10 mM (pH 7,2), BSA livre de ácidos graxos 0,1 % e EGTA 1,0 mM e com pH final ajustado para 7,6. O material foi homogeneizado em um homogeneizador Politron (PT 10/35) durante 4 segundos no nível 5, e filtrado em gaze dobrada 4 vezes. O pH da suspensão foi ajustado para 7,2. A suspensão foi centrifugada a aproximadamente 1000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 8000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em meio de isolamento contendo manitol 0,3 M, Hepes 10 mM (pH 7,2), BSA 0,2 % e EGTA 0,1 mM. A suspensão foi novamente centrifugada a 4800 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a suspensão mitocondrial resultou numa concentração proteica entre 30-80 mg/ml. Todo o procedimento foi realizado a uma temperatura entre 0-4°C.

DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

A concentração de proteína da suspensão mitocondrial foi determinada segundo método de biureto modificado pela adição de co-lato segundo GORNAL et al (1949), usando albumina de soro bovino como padrão e determinando-se a absorbância em 540 nm.

DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

A respiração mitocondrial foi medida através do consumo de oxigênio, determinado polarograficamente através de um eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), acoplado a um registrador gráfico x,t.

As preparações mitocondriais foram avaliadas quanto à sua qualidade, em função do controle respiratório, com adição de ADP e determinação da relação entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados respiratórios 3 e 4 (CHANCE, 1959). Quando esta relação era igual ou maior que 5,0 em mitocôndrias de tecido animal e 2,5 em mitocôndrias de planta, a suspensão era considerada viável para uso.

DETERMINAÇÃO DE Ca^{++} NO MEIO DE REAÇÃO

A captação e efluxo de Ca^{++} foram analisados usando-se eletrodo específico (Radiometer F 2112 Calcium seletrode), que registra variações na concentração de Ca^{++} livre no meio de reação. O eletrodo era ligado a um amplificador de sinais e a um registrador potenciométrico.

A cada experimento, o eletrodo de Ca^{++} foi calibrado por adições de solução padrão deste íon ao meio de reação, para concentrações de Ca^{++} total acima de 10 μM , como mostrado na Figura 1. A calibração para a faixa de concentração de Ca^{++} livre, entre 0,25 e 10 μM , foi obtida adicionando-se ao meio de reação uma mistura de Ca^{++} -EGTA, usando-se o valor de $4,5 \times 10^{-6}$ M para a

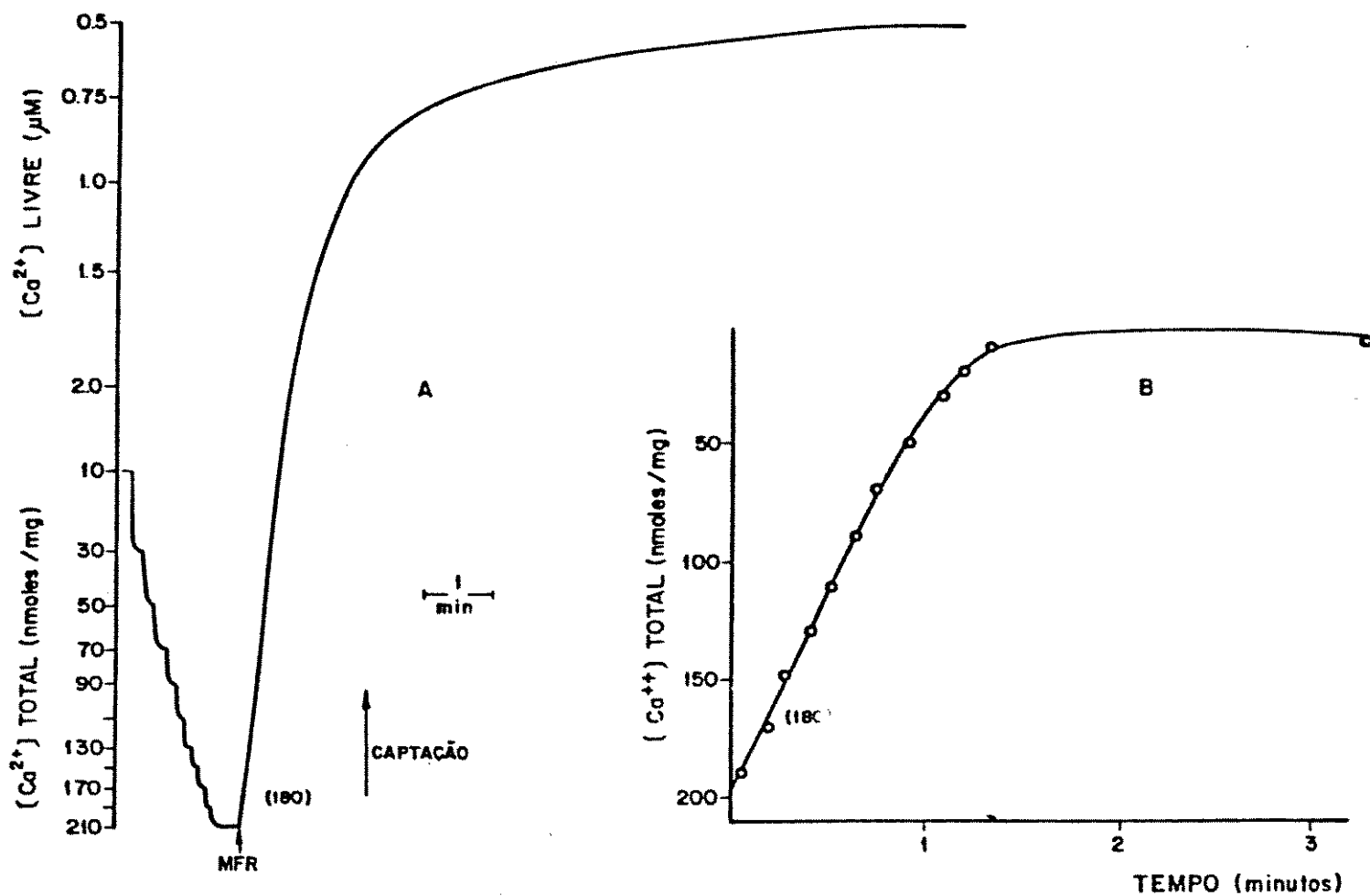


FIGURA 1 - Calibração do eletrodo seletivo de Ca^{++} (A) e gráfico linearizado dos dados de calibração (B). A adição de 200 nmol de Ca^{++} em alíquotas de 20 nmol, em meio básico de reação (1,0 ml a 25-30°C), permite observar a resposta não linear do eletrodo (A) e fornece os dados para a linearização gráfica da parte B. A calibração, em termos de Ca^{++} livre, foi feita com adição inicial de uma mistura Ca^{++} -EGTA para produzir uma concentração de Ca^{++} livre igual a 2,0 μM , seguida de adições sequenciais de EGTA para se obter os pontos correspondentes a 1,50, 1,0, 0,75 e 0,5 μM . Como exemplo, está sendo mostrado que a adição de mitocôndrias de fígado (1,0 mg) era seguida de diminuição do Ca^{++} presente no meio, a uma velocidade de 180 nmoles/mg.min até que a concentração de Ca^{++} livre extramitocondrial atingisse valores na faixa de 0,5 μM .

constante de dissociação do complexo Ca^{++} -EGTA a pH 7,2 e 30°C (FORTZEHL et alii, 1964; BECKER et alii, 1980).

A concentração de Ca^{++} contaminante do meio de reação foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (Atomic Absorption Perkin Elmer, Modelo 303). As amostras foram diluídas em uma solução de óxido de lantânio, de acordo com GOCHAM & GIVELBER (1970), e as leituras foram comparadas com os valores de uma curva padrão de Ca^{++} .

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA

O potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP^+), entre o meio de incubação e a matriz mitocondrial com eletrodo específico construído em nosso laboratório, de acordo com KAMO et alii (1979). Este eletrodo foi construído usando membrana de cloreto de polivinila (PVC) contendo tetrafenilborato (TPB^-) como trocador de íons. Uma solução de 3,0 ml de tetrafenilborato de sódio 10^{-2} M diluída em tetrahydrofurano (THF) foi adicionada a 10 ml de solução de THF contendo 0,5 g de PVC e 1,5 ml de dioctilftalato. A solução final foi colocada em uma placa de Petri de 60 cm^2 de área e o solvente evaporado à temperatura ambiente. A membrana obtida era transparente e possuía 0,15 a 0,2 mm de espessura. Um fragmento da membrana foi colado com THF em um tubo de PVC (7,0 cm de comprimento/0,3 cm de diâmetro), que por sua vez, foi preenchido com TPP^+ 10^{-2} M como solução de referência interna. Foi feito o contato desta solução a um eletrodo

de Ag-AgCl através de uma ponte de agar (1,5 % dissolvido em KCl saturado). A diferença de força eletromotriz (ΔE) entre o eletrodo de TPP⁺ e o de referência foi medida por um potenciômetro ligado a um registrador potenciométrico (Linear Instruments Corp.). As concentrações de TPP⁺ no meio de reação foram registradas continuamente e os valores de $\Delta\psi$ calculados, usando-se a equação abaixo:

$$\Delta\psi = 2,3 RT/F \log v/V - 2,3 RT/F \log (10^{\Delta E/2,3 RT} - 1)$$

onde v, V e ΔE representam respectivamente o volume mitocondrial, considerado 1,4 μ l por mg de proteína para mitocôndrias de tecidos animais (KAMO et alii, 1979) e 1,0 μ l por mg de proteína para mitocôndrias de plantas (MANDOLINO et alii, 1983; DOUCE, 1985), o volume do meio de reação e o potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de TPP⁺ ($[TPP^+]_{in}/[TPP^+]_{ex}$) através da membrana do mesmo. Os sinais do eletrodo (ΔE) foram quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de TPP⁺ ao meio de reação. Os valores de ΔE para a curva de calibração foram calculados pela equação de Nernst:

$$\Delta E = 2,3 RT/F \log ([TPP^+]_{in}/[TPP^+]_{ex})$$

onde TPP⁺_{ex} refere-se à concentração de TPP⁺ adicionado ao meio de reação (figura 2). Os valores assim obtidos, foram corrigidos de acordo com JENSEN et alii (1986).

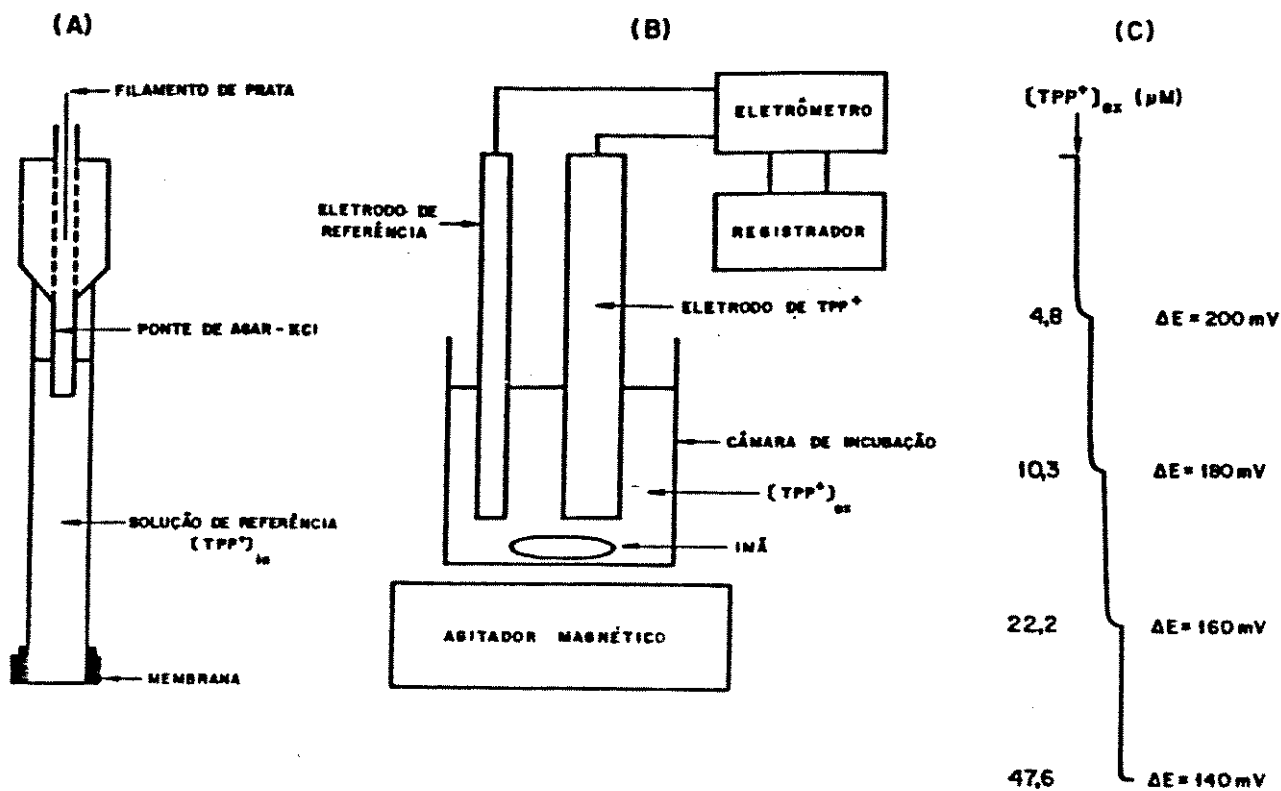


FIGURA 2 - Representação esquemática do sistema utilizado para avaliar o potencial elétrico de membrana de mitocôndrias. (A) eletrodo de TPP⁺; (B) diagrama da aparelhagem utilizada; (C) curva de calibração do eletrodo.

MEIO BÁSICO E CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS

As suspensões mitocondriais foram submetidas a incubação por períodos de 10 e 90 minutos a uma temperatura de 30°C. Para cada experimento usaram-se 2 ml de meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 3 mM (pH 7,2), succinato 2 mM, rotenona 4 µM para mitocôndrias animais e manitol 300 mM, BSA 0,1 %, KCl 20 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2), fosfato 2,5 mM, succinato 2 mM e rotenona 4 µM para mitocôndrias de plantas. A concentração de proteína usada nos experimentos com fígado e cérebro foi 3 mg/ml e em rim, batata e milho foi usado 1 mg de proteína/ml, devido ao baixo rendimento dessas preparações.

Foram estabelecidas 4 condições experimentais para a análise do efeito de oxidantes na presença de Ca^{++} . A primeira continha Ca^{++} 50 nmoles/mg de proteína adicionado ao meio de reação (controle); na segunda condição foi adicionado além do Ca^{++} , t-butil-hidroperóxido 100 µM ou diamida 1,0 mM; a terceira continha EGTA 1,0 mM adicionado ao meio e na quarta condição foi adicionado t-butil-hidroperóxido 100 µM ou diamida 1,0 mM além de EGTA 1,0 mM. Todos os experimentos foram repetidos na presença e na ausência de ATP 3 mM e Mg^{++} 4 mM.

Para o estudo do efeito de P_i na presença de altas concentrações de Ca^{++} , as mitocôndrias foram incubadas no meio básico acrescido de 200 nmoles Ca^{++} /mg proteína e P_i 2 mM, também na presença ou ausência de ATP e Mg^{++} .

A captação e retenção ou liberação de Ca^{++} pelas suspensões mitocondriais, foram acompanhadas por um eletrodo sensível a Ca^{++} , durante 10 minutos, e os ensaios em que EGTA estava presen-

te, foram feitos diretamente em tubos de ensaio. Passados os 10 minutos, as amostras eram recolhidas e 1,0 ml era tratado imediatamente para extração de lipídeos. A suspensão restante permanecia incubada por mais 80 minutos.

EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS:

A extração de lipídeos foi feita segundo método de FOLCH (1957) modificado por BROEKEMEIER (1985).

Após a incubação, a amostra da suspensão mitocondrial era centrifugada por 1 minuto e 30 segundos em centrífuga Ependorff, o sedimento era desprezado e a 1 ml do sobrenadante eram adicionados metanol-clorofórmio na proporção de 1:0,8:0,4 respectivamente. A mistura era vigorosamente agitada e então centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos em uma centrífuga clínica. A fase aquosa era desprezada e a orgânica era evaporada e ressuspendida em 50 μ l de clorofórmio, para depois ser submetida a análise qualitativa através de cromatografia de camada delgada em sílica gel, ou quantitativa através de dosagem colorimétrica.

DETECÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

Todos os resultados apresentados são representativos de pelo menos cinco determinações experimentais utilizando diferentes preparações mitocondriais.

1) Análise qualitativa: o adsorvente usado na cromatografia foi sílica gel e o solvente uma mistura de clorofórmio-metanol 5%. Usando uma micro-seringa, as amostras e o padrão (ácido linoleico cuja concentração variou entre 2,4 e 4,8 nmoles) foram aplicados em pontos alinhados nas extremidades da placa dividida em duas partes iguais de mais ou menos 10 cm cada uma. A placa foi colocada verticalmente, tendo como base uma das extremidades

com as amostras aplicadas, em uma cuba de vidro contendo o solvente orgânico em quantidade suficiente para cobrir a região da placa abaixo da linha de aplicação. Era deixado o solvente correr até a divisão da sílica, e então a outra extremidade da placa era colocada em contato com o solvente. A revelação era feita com ácido sulfúrico mais metanol, em chapa quente.

2) Análise quantitativa: foi feita segundo NIXON & CHAN (1979).

Reagentes:

- tampão fosfato: fosfato de sódio 100 mM, pH 2,5
- solução extratora: clorofórmio:n-heptano:metanol (CHM) (4:3:2, v/v)
- solução ácida para lavar tubos: 0,01 N HCl em água destilada
- reagente cúprico: preparado diariamente; 100 ml de uma solução contendo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,1 M, trietanolamina 0,2 M, NaOH 0,06 N mais 36 g de NaCl; o pH foi ajustado para 8,1
- reagente de cor: preparado diariamente; 10 ml de uma solução de 1,5-difenilcarbazida 0,4 % em etanol absoluto mais 0,1 ml de trietanolamina 1 M adicionado imediatamente antes do uso
- solução padrão: ácido palmítico 1,0 mM em solução CHM

As amostras de ácidos de graxos extraídos como descrito anteriormente e ressuspensos em 50 μl de clorofórmio, foram pipetadas em tubos de vidro com tampa, previamente lavados com solução ácida e solução sulfocrômica. Foram adicionados 50 μl de água e em seguida 4 ml de solução CHM. A mistura foi agitada por 3 minutos. Então, 1,3 ml do tampão fosfato e 0,55 ml de H_3PO_4 100 mM foram adicionados, resultando num pH final de 2,0. A mistura foi

agitada por 1 minuto e então centrifugada a 2500 rpm por 3 minutos em uma centrífuga clínica. O sobrenadante foi aspirado com o cuidado de não perturbar a fase inferior. Em seguida, 0,65 ml de HCl 0,01 N foram adicionados a cada tubo, os quais foram agitados por 1 minuto, centrifugados novamente a 2500 rpm por 3 minutos e o sobrenadante novamente aspirado. A cada tubo foram adicionados 1,3 ml de reagente cúprico e após agitação por 3 minutos foram centrifugados nas mesmas condições anteriores. Uma alíquota de 1,5 ml do sobrenadante orgânico de cada tubo, foi transferida para um tubo limpo. Foi adicionado a cada tubo 0,1 ml do reagente de cor sendo cuidadosamente misturados. Depois de 20 minutos em temperatura ambiente as absorbâncias das amostras foram lidas em 550 nm contra um branco preparado concomitantemente às amostras.

RESULTADOS

EFEITO DE Ca^{++} E OXIDANTES OU P_i EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

Mitocôndrias de fígado de rato mesmo na ausência de protetores como ATP e Mg^{++} , mostram uma grande capacidade em captar e reter concentrações de Ca^{++} relativamente elevadas, bem acima das concentrações fisiológicas do íon. Esse comportamento pode ser observado no traçado (a) da figura 3. No entanto, se nestas mesmas condições estiverem presentes oxidantes de nucleotídeos de piridina, como t-butilhidroperóxido e diamida, observa-se uma rápida liberação de Ca^{++} logo após sua captação, conforme mostram os traçados (b) e (c). Pode-se notar ainda que no caso da diamida (traçado (c)), já ocorre um efluxo de Ca^{++} acentuado, antes mesmo de ser registrada a captação de todo o Ca^{++} adicionado. O efeito protetor de ATP e Mg^{++} sobre a permeabilização da membrana mitocondrial é mostrado na figura 4. Nestas condições ocorre captação e retenção de Ca^{++} não só no experimento controle (traçado (a)) como também na presença de Ca^{++} e t-butilhidroperóxido (traçado (b)). Na presença de Ca^{++} e diamida, embora houvesse captação do íon, ATP e Mg^{++} não se mostraram capazes de prevenir totalmente a permeabilização da membrana embora o efluxo de Ca^{++} tenha sido consideravelmente retardado (traçado (c)) quando comparado aos resultados mostrados na figura 3. A permeabilidade da membrana mitocondrial também é drasticamente alterada na presença de alta concentração de Ca^{++} e P_i , como mostrado no traçado (b)

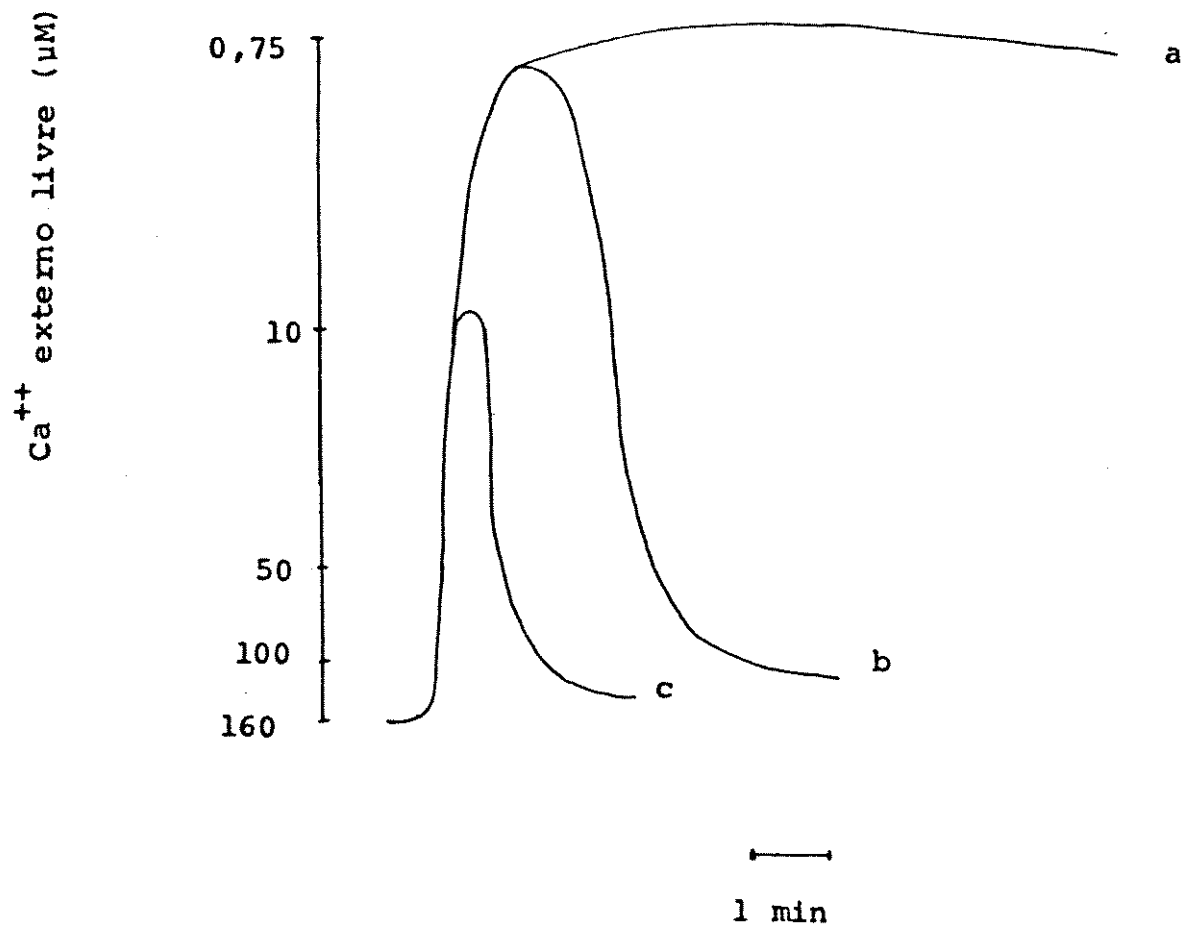


FIGURA 3 - Efeito de diamida e t-butOOH sobre o fluxo de Ca^{++} em mitocôndrias de fígado de rato na ausência de ATP e Mg^{++} . Mitocôndrias (3,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação ao qual foram adicionados 50 nmoles Ca^{++} /mg prot. (a) Ca^{++} (controle); (b) t-butOOH 100 μM ; (c) diamida 1,0 mM.

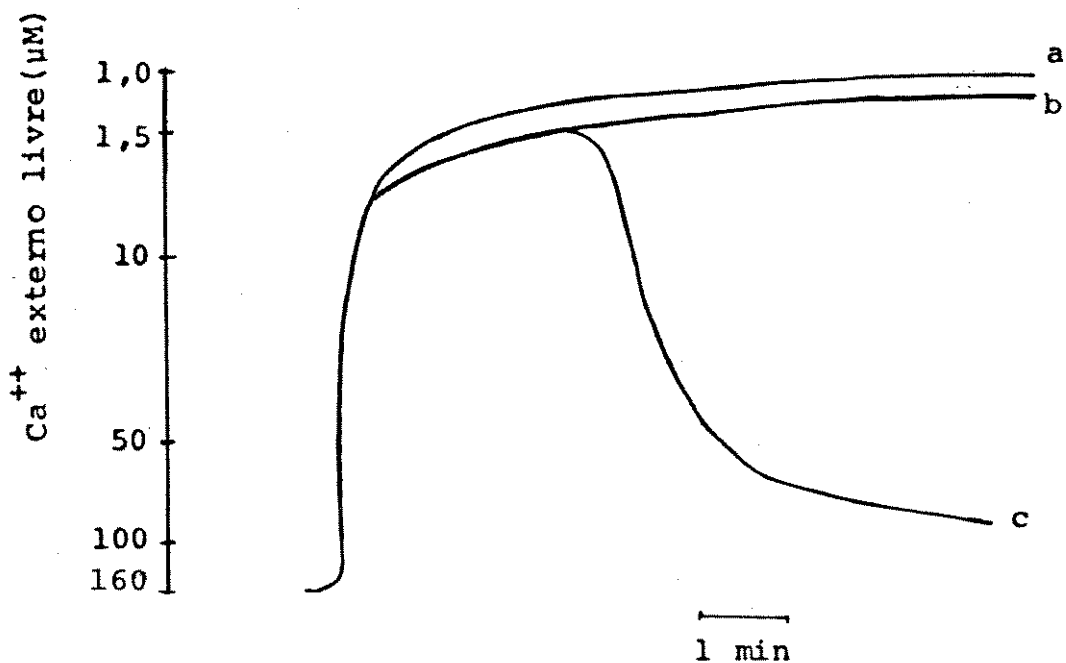


FIGURA 4 - Efeito de diamida e t-butDOH sobre o fluxo de Ca⁺⁺ em mitocôndrias de fígado de rato na presença de ATP e Mg⁺⁺. Mitocôndrias (3,0 mg prot/ml) foram incubadas nas mesmas condições da figura 3, na presença de ATP 3 mM e Mg⁺⁺ 4 mM (a) Ca⁺⁺ (controle); (b) t-butDOH 100 μM; (c) diamida 1,0 mM.

da figura 5. Nestas condições, observa-se a capacidade de ATP e Mg^{++} em prevenir a permeabilização das mitocôndrias, uma vez que o traçado (a) mostra não só a captação como também a retenção do íon.

Segundo a hipótese de envolvimento da fosfolipase A_2 , o efeito dos oxidantes de nucleotídeos de piridina sobre o aumento da permeabilidade não específica da membrana interna, é devido à perturbação no ciclo de deacilação e reacilação dos fosfolipídeos de membrana, resultando num acúmulo de ácidos graxos e lisofosfolipídeos (BEATRICE et alii, 1982, 1984; BROCKEMEIER et alii, 1985). Para testar esta hipótese, amostras de mitocôndrias incubadas por 10 e 90 minutos, sob as condições experimentais das figuras 3, 4 e 5, foram tratadas conforme descrito em materiais e métodos em no item Extração de Lipídeos, e submetidas a análise por cromatografia em camada delgada. Foram também analisadas mitocôndrias incubadas na ausência de Ca^{++} , utilizando-se o quelante EGTA como condição controle. Resultados destas análises são apresentadas na figura 6. As amostras dos painéis A e B foram incubadas nas mesmas condições experimentais, diferindo somente quanto ao tempo de incubação, 10 minutos em A e 90 minutos em B. Pode-se notar pelas amostras (a) e (b) do painel A que em ambas há um discreto acúmulo de ácidos graxos, qualitativamente semelhante, embora nestas condições, pelos traçados (a) e (b) da figura 3, observamos comportamento completamente diferente em relação ao efluxo de Ca^{++} , com os resultados mostrando que na presença de Ca^{++} e t-butilhidroperóxido (b) as mitocôndrias encontram-se permeabilizadas, tendo já ocorrido o efluxo do íon. No entanto, as análises cromatográficas apontam uma baixa atividade da

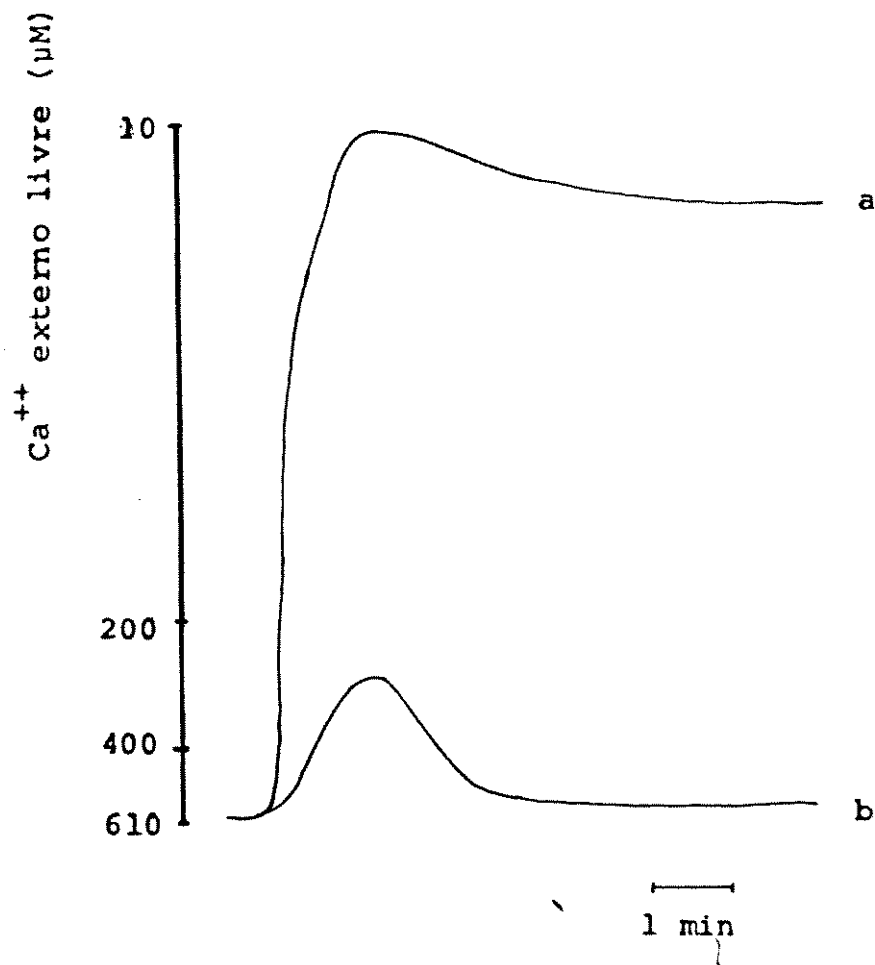


FIGURA 5 - Efeito de Ca^{++} e P_i sobre o fluxo de Ca^{++} em mitocôndrias de fígado de rato. Mitocôndrias (3,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação ao qual foram adicionados 200 nmoles Ca^{++} /mg prot e P_i 2 mM na presença (a) e na ausência (b) de ATP 3 mM e Mg^{++} 4 mM.

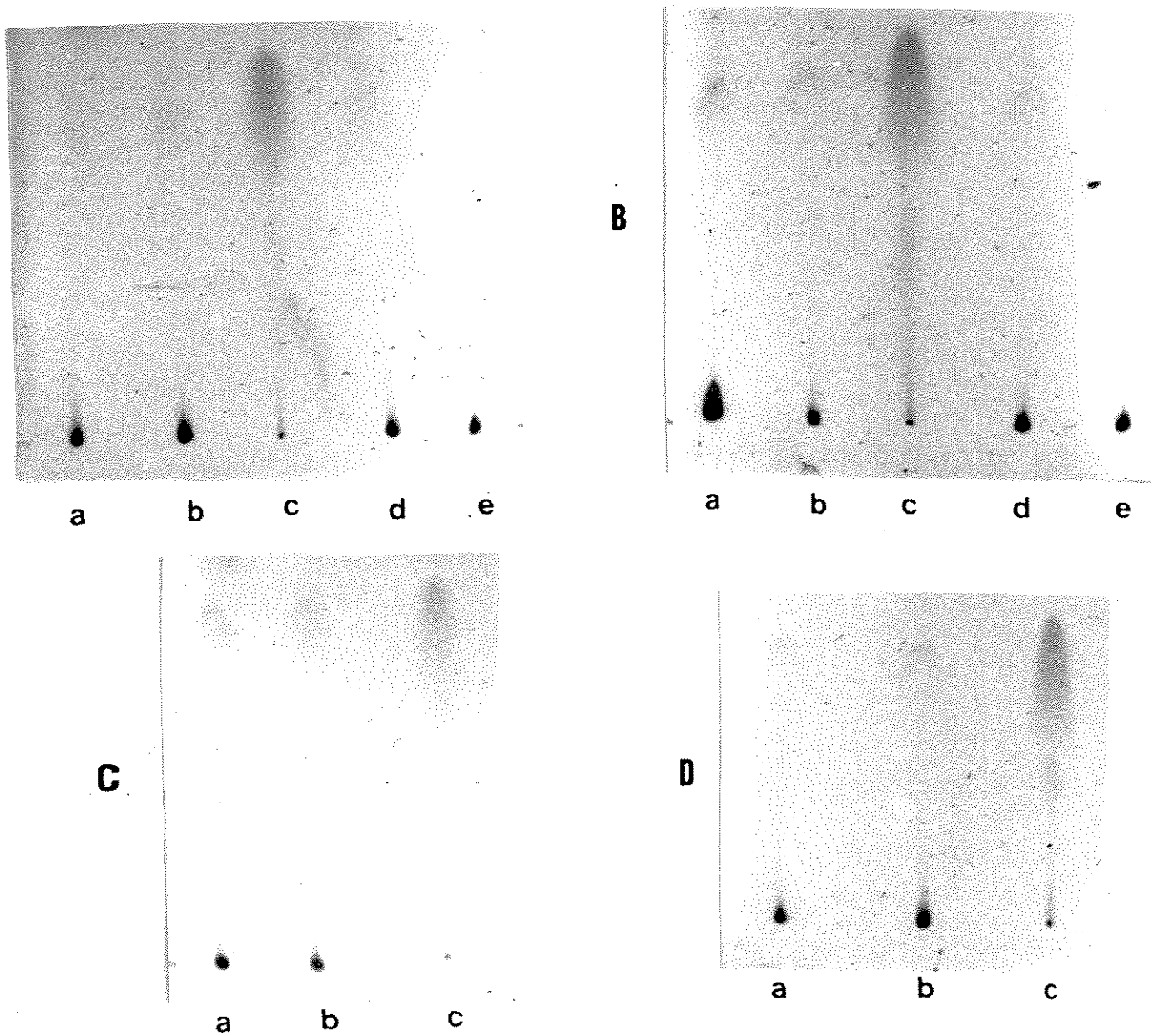


FIGURA 6 - Análise de ácidos graxos livres em cromatografia de camada delgada em sílica gel de suspensões mitocondriais de fígado de rato. Mitocôndrias (3,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação, na ausência (A, B e C) e na presença (D) de ATP 3 mM e Mg⁺⁺ 4 mM. Em A e B incubações de 10 e 90 minutos respectivamente: (a) 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot; (b) 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot + t-butOOH 100 uM; (c) padrão (ácido linoleico 4 nmol); (d) EGTA 1,0 mM; (e) EGTA 1,0 mM + t-butOOH 100 uM. Em C e D incubação de 10 minutos: (a) 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot; (b) 200 nmoles Ca⁺⁺/mg prot + Pi 2 mM; (c) padrão.

fosfolipase A₂ nestas condições. O aumento do tempo de incubação de 10 para 90 minutos indica apenas um discreto aumento do acúmulo de ácidos graxos em todas as condições estudadas. Mais evidentes são os resultados mostrados nos painéis C e D, onde as mitocôndrias foram incubadas na presença de Pi e alta concentração de Ca⁺⁺ por 10 minutos. Em C os experimentos foram feitos na ausência de ATP e Mg⁺⁺ e as amostras (a) e (b) mostram acúmulo de ácidos graxos semelhante e que não difere qualitativamente daquele observado nas mesmas condições no painel D, onde ATP e Mg⁺⁺ estavam presentes. Nestas condições, não foi evidenciado efluxo de Ca⁺⁺, conforme mostrado pelo traçado (a) da figura 5. Os resultados gerais das análises cromatográficas realizadas com as mitocôndrias de fígado incubadas nas diferentes condições experimentais estudadas, encontram-se esquematizados na tabela III.

A análise quantitativa de ácidos graxos nas mitocôndrias de fígado incubadas nas diferentes condições, na ausência de ATP e Mg⁺⁺, está mostrada na tabela IV. Os resultados confirmaram os resultados obtidos através da cromatografia. Ao fazermos a média aritmética de pelo menos 5 experimentos de cada condição, obtivemos em todas incubações pelo período de 10 minutos, o valor de aproximadamente 5,5 nmoles de ácidos graxos, com exceção daquela na presença de Ca⁺⁺ e diamida, quando esse valor foi de 7 nmoles de ácidos graxos. As amostras incubadas por 90 minutos não apresentaram diferenças significativas desses valores.

TABELA III - Detecção por cromatografia em camada delgada de ácidos graxos livres (AGL) em mitocôndrias de fígado de rato incubadas em diferentes condições experimentais. Todas as incubações foram feitas a 30°C, em meio básico de reação conforme descrito em materiais e métodos, utilizando-se uma concentração final de 3 mg de proteína mitocondrial/ml de meio. As demais adições estão especificadas na tabela.

| CONDIÇÃO | TEMPO DE INCUBAÇÃO (min) | DETECCÃO DE AGL | |
|---|-----------------------------|-----------------|-------|
| | | - ATP | + ATP |
| 1-EGTA 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 1-EGTA 1 mM + t-butOOH 100 uM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 3-EGTA 1 mM + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 4-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| -50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + t-butOOH 100 uM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 6-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | ++ | + |
| 7-200 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + Pi 2 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |

(-) não detectado; (+) detectado em concentração inferior à do padrão; (++) detectado em concentração semelhante à do padrão.

EFEITOS DE Ca⁺⁺ E OXIDANTES OU PI EM MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO DE RATO

A figura 7 mostra que mitocôndrias de cérebro de rato são muito sensíveis aos efeitos de Ca⁺⁺, traçado (d) ou Ca⁺⁺ na presença de oxidantes, traçados (e) e (f) quando ATP E Hg⁺⁺ não es-

TABELA IV - Análise quantitativa de ácidos graxos em mitocôndrias de fígado de rato incubadas em diferentes condições experimentais na ausência de ATP e Mg^{++} , como mencionado na tabela III.

| CONDICÇÃO | TEMPO DE INCUBAÇÃO (min) | nmoles AGL/ mg de prot |
|---|-----------------------------|---------------------------|
| 1-EGTA 1 mM | 10 | 6,13 |
| | 90 | 6,12 |
| 2-EGTA 1 mM + diamida 1 mM | 10 | 4,39 |
| | 90 | 6,40 |
| 3-EGTA 1 mM + t-butOOH 100 uM | 10 | 6,93 |
| | 90 | 4,87 |
| 4-50 nmoles Ca^{++} / mg prot | 10 | 6,30 |
| | 90 | 7,30 |
| 5-50 nmoles Ca^{++} / mg prot + diamida 1 mM | 10 | 7,20 |
| | 90 | 8,30 |
| 6-50 nmoles Ca^{++} / mg prot + t-butOOH 100 uM | 10 | 6,80 |
| | 90 | 6,42 |
| 7-200 nmoles Ca^{++} / mg prot + Pi 2 mM | 10 | 6,20 |
| | 90 | 5,72 |

tão presentes no meio de incubação, confirmando os resultados de FISKUM et alii (1985). Nesta condição a captação de Ca^{++} por essas mitocôndrias é parcial conforme pode ser observado nos traçados (d),(e) e (f), ocorrendo efluxo quando o oxidante adicionado era diamida (traçado (f)). Por outro lado, estas mitocôndrias mostraram-se resistentes ao Ca^{++} e oxidantes, quando ATP e Mg^{++} estavam presentes no meio, captando e retendo o Ca^{++} adicionado como mostram os traçados (a),(b) e (c). No entanto, mesmo nestas condições, a presença de oxidante causa uma diminuição da capacidade de tamponamento do Ca^{++} , como pode ser observado ao serem

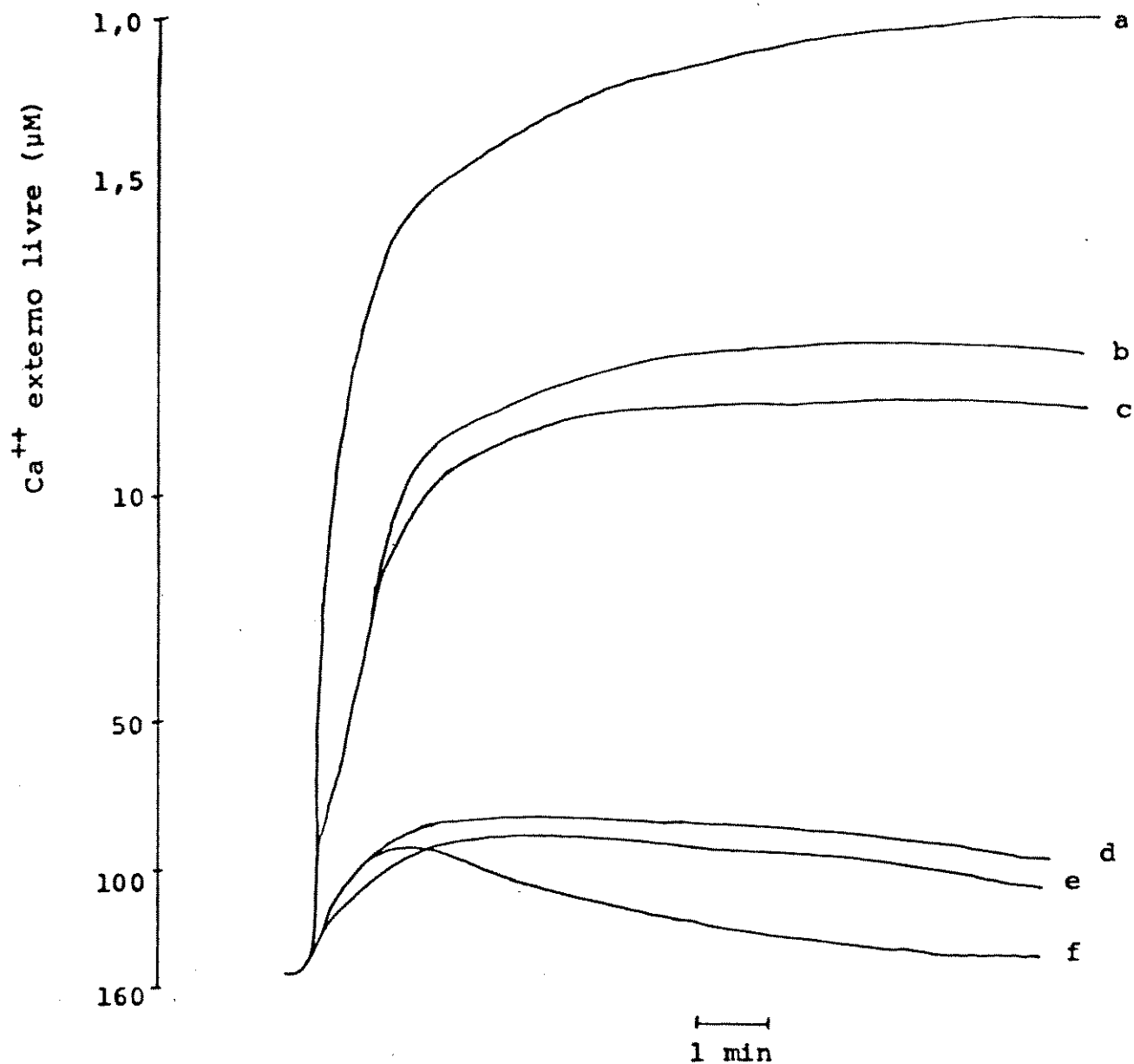


FIGURA 7 - Efeito de diamida e t-butOOH sobre o fluxo de Ca⁺⁺ em mitocôndrias de cérebro. Mitocôndrias (3,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação, na presença (a), (b) e (c) e na ausência (d), (e) e (f) de ATP 3 mM e Mg⁺⁺ 4mM. Em todos os experimentos foram adicionados 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot. (a) e (d): Ca⁺⁺ (controles); (b) e (e): t-butOOH 100 µM; (c) e (f) diamida 1,0 mM.

comparados os traçados (b) e (c) com o controle (a). O efeito de Pi na presença de uma alta concentração de Ca^{++} sobre as mitocôndrias de cérebro mostrado na figura 8, foi muito semelhante aos efeitos de Ca^{++} e oxidantes, ou seja, na presença de ATP e Mg^{++} o Pi associado à alta concentração de Ca^{++} , não interferiu na capacidade da mitocôndria em acumular e manter o Ca^{++} (traçado (a)), porém na ausência de ATP e Mg^{++} , ocorreu sua liberação antes de poder ser registrada a captação de todo o Ca^{++} adicionado.

Da mesma forma que foi feito com mitocôndrias de fígado, as amostras das mitocôndrias de cérebro, após 10 ou 90 minutos de incubação sob diferentes condições experimentais, foram tratadas adequadamente à análise dos ácidos graxos liberados.

A figura 9 mostra os resultados obtidos desta análise em cromatografia de camada delgada. Em A observamos que foi muito pequeno o acúmulo de ácidos graxos quando as mitocôndrias foram incubadas por 10 minutos na presença de Ca^{++} mais diamida, amostra (a) ou EGTA mais diamida, amostra (b) num meio isento de ATP e Mg^{++} exógenos. Já aos 90 minutos de incubação o acúmulo de ácidos graxos, nas mesmas condições, foi mais intenso como pode ser observado nas amostras (d) e (e). O painel B mostra que mesmo na presença de ATP e Mg^{++} houve um pequeno acúmulo de ácidos graxos tanto nos controles, amostras (a) e (d), quanto na presença de oxidante, amostras (b) e (e), após 10 minutos de incubação. Quando as mitocôndrias foram incubadas por 10 minutos na presença de Pi e alta concentração de Ca^{++} na ausência de ATP e Mg^{++} , não houve acúmulo de ácidos graxos, sendo detectável sua presença somente após 90 minutos de incubação, de acordo com as amostras (a) e (b) do painel C.

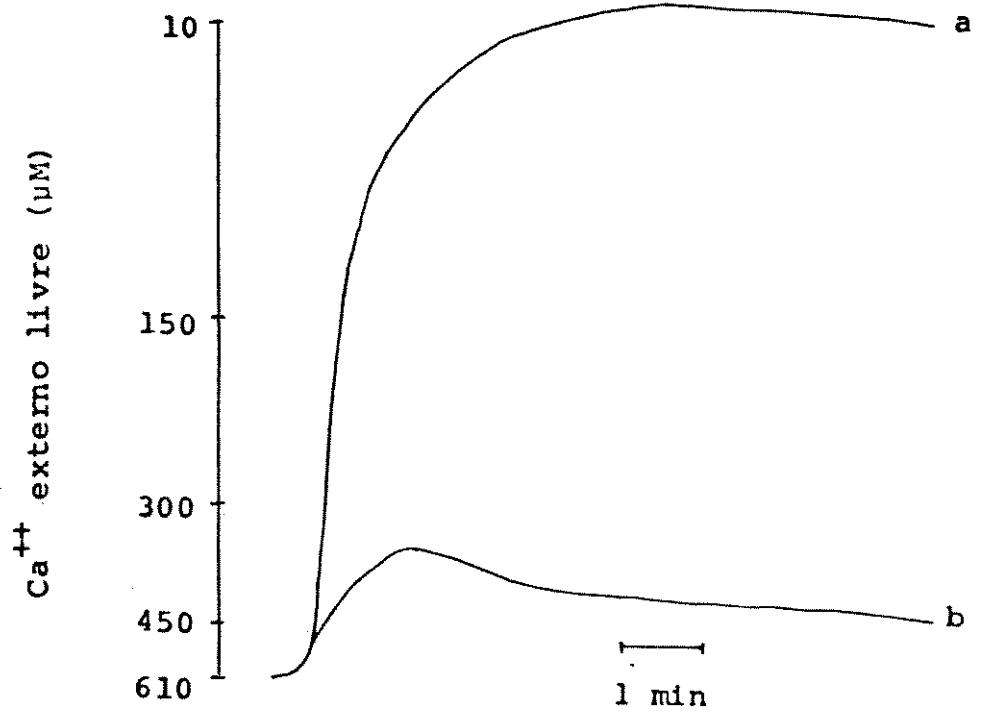


FIGURA 8 - Efeito de Ca^{++} e P_i sobre o fluxo de Ca^{++} em mitocôndrias de cérebro. Mitocôndrias (3,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação mais 200 nmoles Ca^{++} /mg prot e P_i mM, na presença (a) e na ausência (b) de ATP 3 mM e Mg^{++} 4 mM.

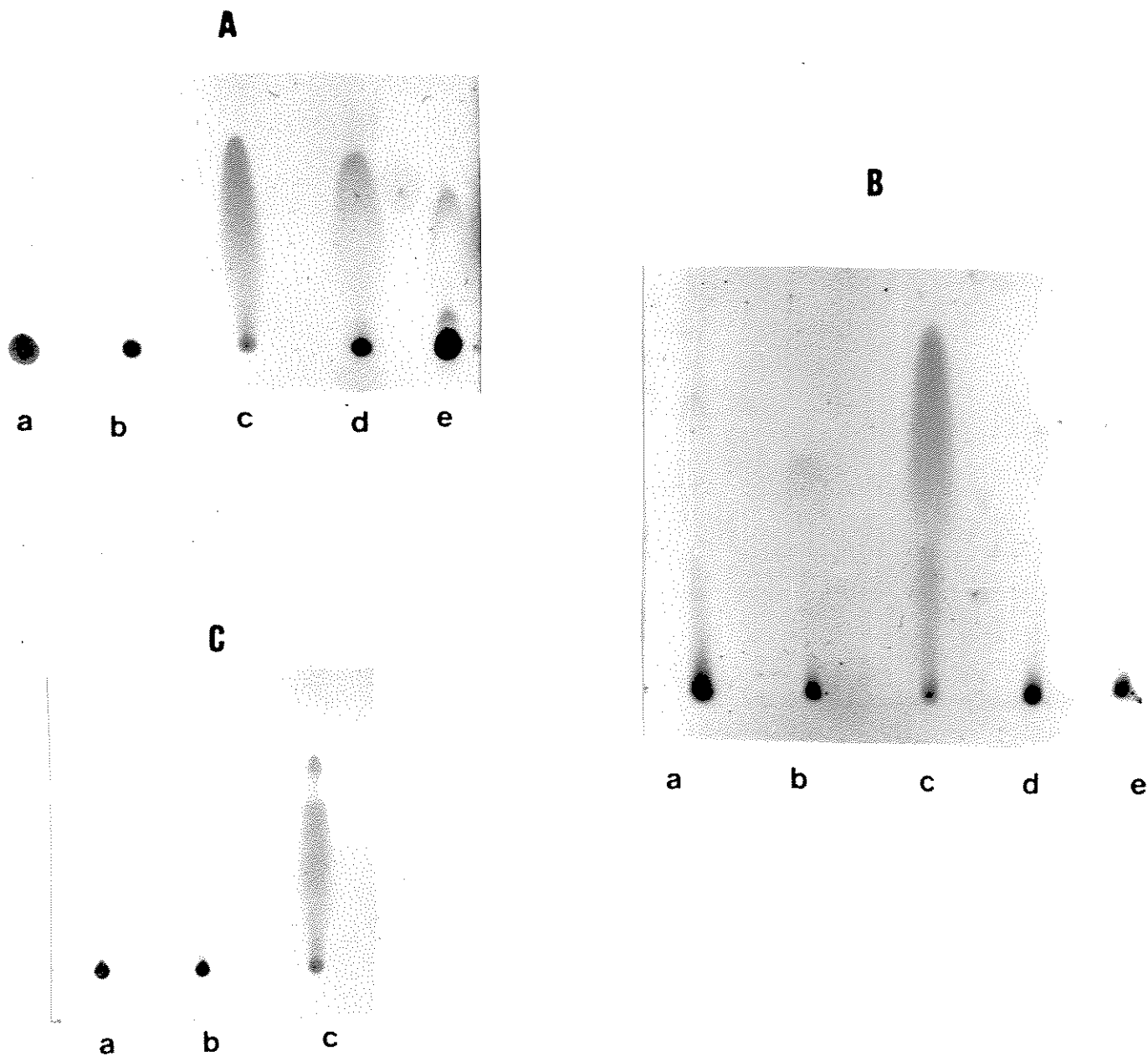


FIGURA 9 - Análise de ácidos graxos livres em cromatografia de camada delgada em sílica gel de suspensões mitocondriais de cérebro de rato. Mitocôndrias (3,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação, na ausência (A e C) ou presença (B) de ATP 3 mM e Mg⁺⁺ 4 mM. Em A: (a) 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot + diamida 1,0 mM (b) EGTA 1,0 mM + diamida 1,0 mM após 10 minutos de incubação; (c) padrão (ácido linoleico 4 nmol); (d) e (e) correspondem a (a) e (b) respectivamente, após 90 minutos de incubação. Em B: (a) 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot; (b) 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot + diamida 1,0 mM; (c) padrão; (d) EGTA 1,0 mM; (e) EGTA 1,0 mM + diamida 1,0 mM, todos após 10 minutos de incubação. Em C: (a) 200 nmoles Ca⁺⁺/mg prot + Pi 2 mM, após incubação de 10 minutos; (b) mesma condição anterior após 90 minutos de incubação; (c) padrão.

Os resultados gerais das análises cromatográficas realizadas com mitocôndrias de cérebro de rato, submetidas às diferentes condições experimentais estudadas, encontram-se resumidas na tabela V.

EFEITO DE Ca^{++} E OXIDANTES DO P_i EM MITOCÔNDRIAS DE RIM DE RATO

Na figura 10 vemos que mitocôndrias de rim de rato são também bastante sensíveis aos efeitos de Ca^{++} , acentuados pela presença de oxidantes na ausência de ATP e Mg^{++} . O traçado (a) mostra que as mitocôndrias após captação do Ca^{++} adicionado, não foram capazes de retê-lo, liberando-o depois de alguns minutos. Se além de Ca^{++} estiverem presentes oxidantes, a captação do Ca^{++} é significativamente afetada e o efluxo do íon é bastante rápido, como pode ser observado nos traçados (b) e (c). Experimentos feitos nestas mesmas condições, porém na presença de ATP e Mg^{++} , apresentam um perfil completamente diferente como mostra a figura 11. Na presença de Ca^{++} , traçado (a), e Ca^{++} mais t-butilhidroperóxido, traçado (b), as mitocôndrias captaram e mantiveram o Ca^{++} externo, enquanto que na presença de Ca^{++} e diamida, traçado (c), ocorreu efluxo de Ca^{++} após 7 minutos de incubação. Com relação ao efeito de P_i na presença de altas concentrações de Ca^{++} , as mitocôndrias de rim apresentaram comportamento extremamente semelhante àquele observado para as mitocôndrias de cérebro, tanto na presença quanto na ausência de ATP e Mg^{++} , conforme demonstram os traçados (a) e (b) respectivamente da figura 12.

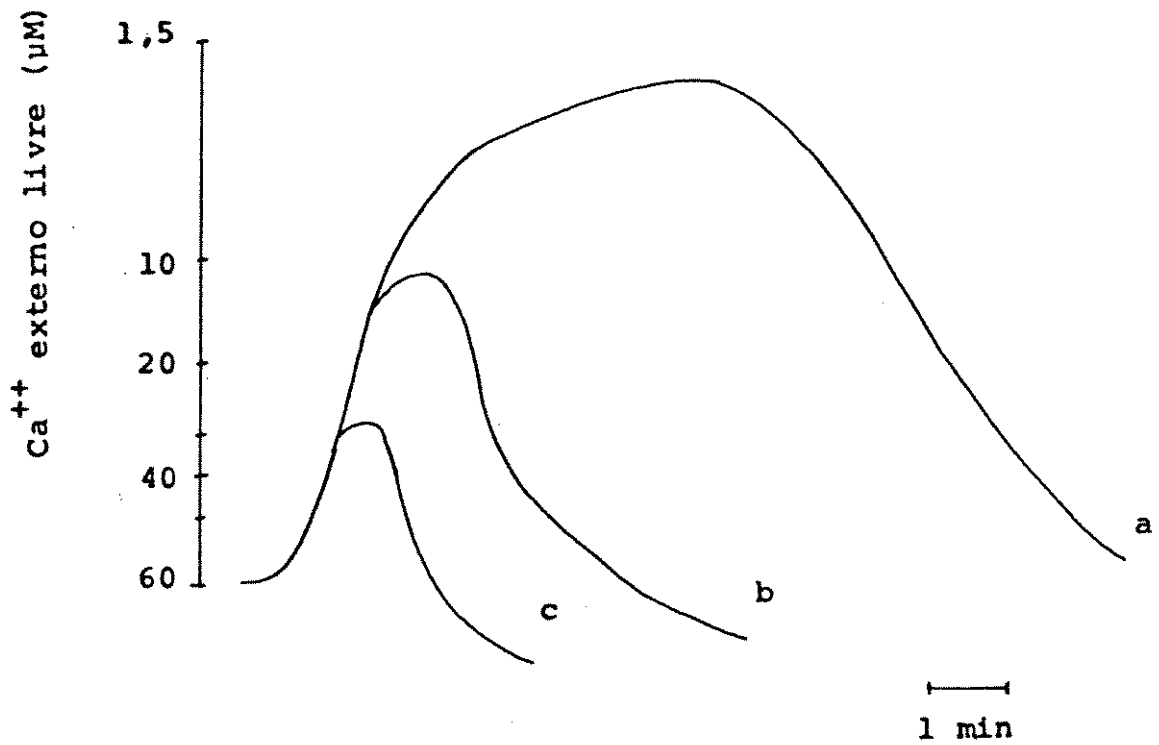


FIGURA 10 - Efeito de diamida e t-butOOH sobre o fluxo de Ca^{++} em mitocôndrias de rim de rato. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação, na ausência de ATP e Mg^{++} . Em todos os experimentos foram adicionados 50 nmoles Ca^{++} /mg prot. (a) Ca^{++} (controle); (b) t-butOOH 100 μM ; (c) diamida 1,0 mM.

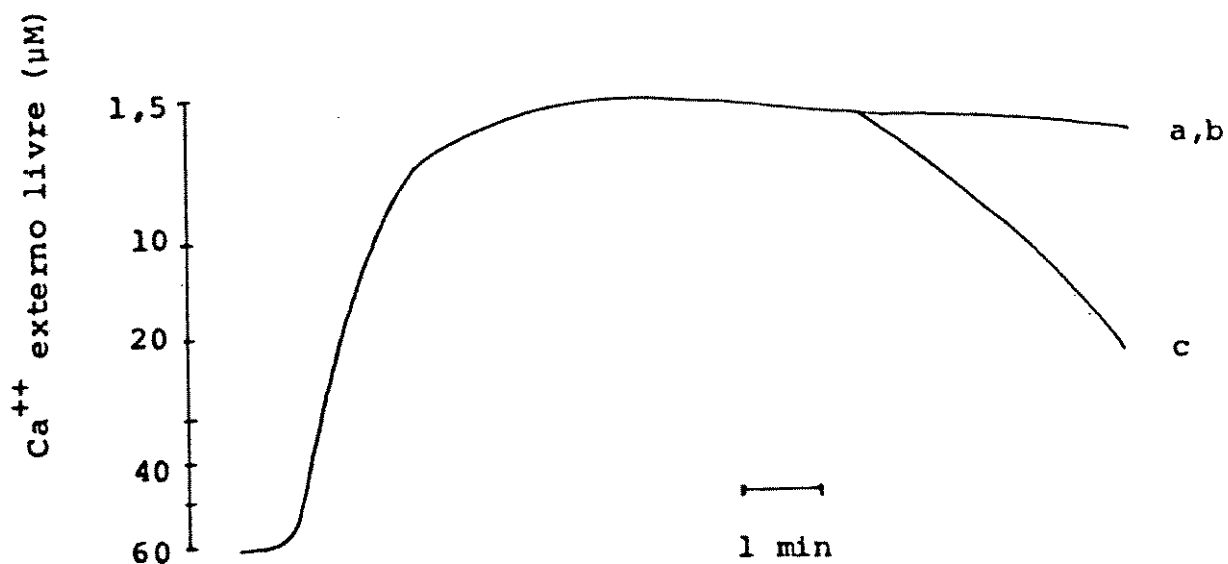


FIGURA 11 - Efeito de diamida e t-butOOH sobre o fluxo de Ca^{++} em mitocôndrias de rim rato. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação na presença de ATP 3 mM e Mg^{++} 4 mM. Em todos os experimentos foram adicionados 50 nmoles Ca^{++} /mg prot. (a) Ca^{++} (controle); (b) t-butOOH 100 μM ; (c) diamida 1,0 mM.

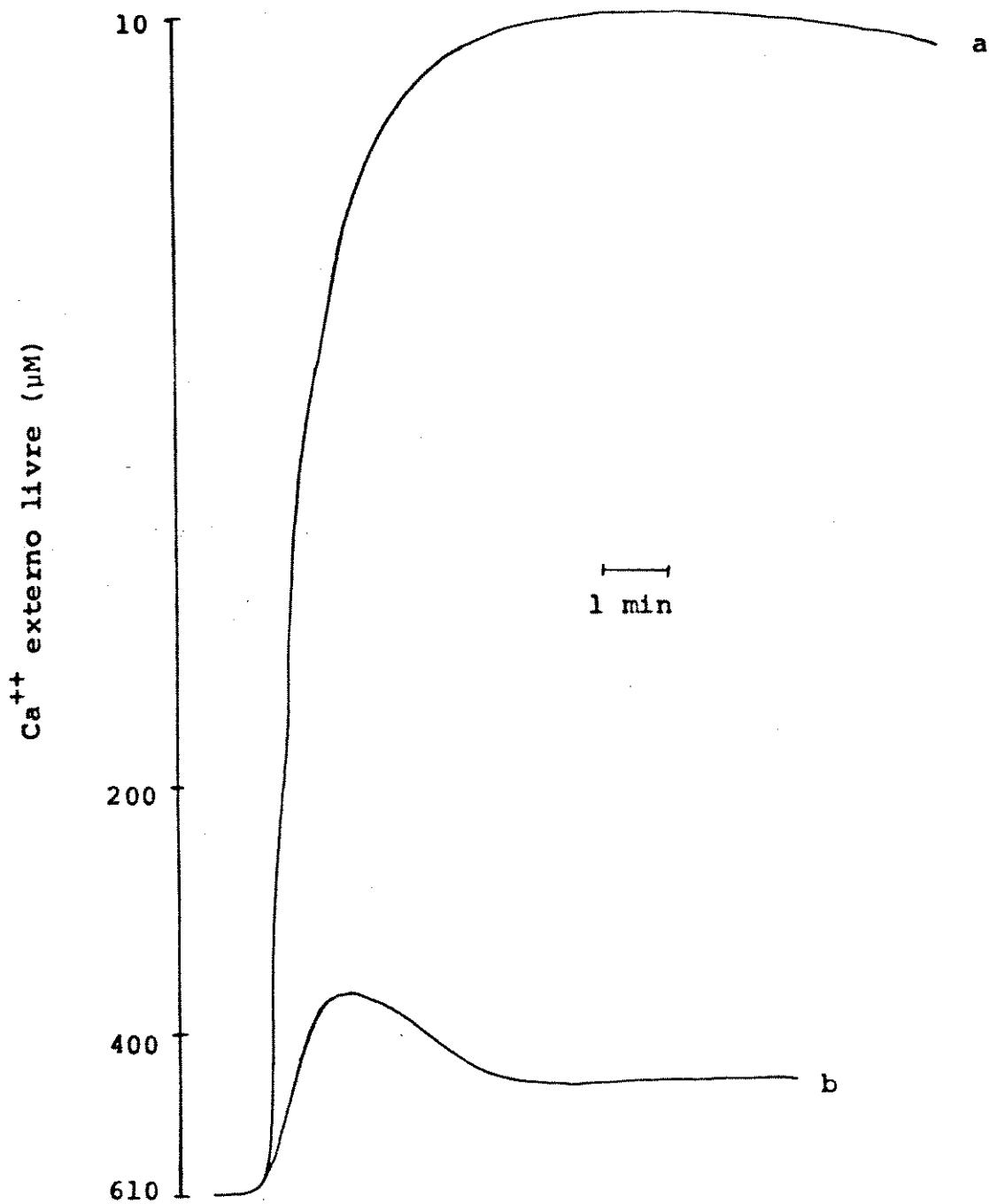


FIGURA 12 - Efeito de Ca^{++} e P_i sobre o fluxo de Ca^{++} em mitocôndrias de rim de rato. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação ao foram adicionados 200 nmoles Ca^{++} /mg prot e P_i 2 mM na presença (a) e na ausência (b) de ATP 3 mM e Mg^{++} 4 mM.

TABELA V - Detecção por cromatografia em camada delgada de ácidos graxos livres (AGL) em mitocôndrias de cérebro de rato incubadas em diferentes condições experimentais como mencionado na tabela III.

| CONDICÃO | TEMPO DE INCUBAÇÃO (min) | DETECÇÃO DE AGL | |
|--|-----------------------------|-----------------|-------|
| | | - ATP | + ATP |
| 1-EGTA 1 mM | 10 | - | - |
| | 90 | + | + |
| 2-EGTA 1 mM + t-butOOH 100 µM | 10 | + | |
| | 90 | ++ | |
| 3-EGTA 1 mM + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | ++ | ++ |
| 4-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot | 10 | - | - |
| | 90 | + | + |
| 5-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + t-butOOH 100 µM | 10 | + | - |
| | 90 | ++ | + |
| 6-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | ++ | ++ |
| 7-200 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + Pi 2 mM | 10 | - | |
| | 90 | ++ | |

(-) não detectado; (+) detectado em concentração inferior à do padrão; (++) detectado em concentração semelhante à do padrão.

Os resultados obtidos através das cromatografias feitas com mitocôndrias de rim, são mostrados na figura 13, onde observamos que estas mitocôndrias ao serem incubadas na presença de Ca⁺⁺ e diamida, amostra (a), ou Ca⁺⁺ e t-butilhidroperóxido, amostra (d), durante 10 minutos, praticamente não acumularam ácidos graxos, e mesmo após 90 minutos de incubação, nas mesmas con-

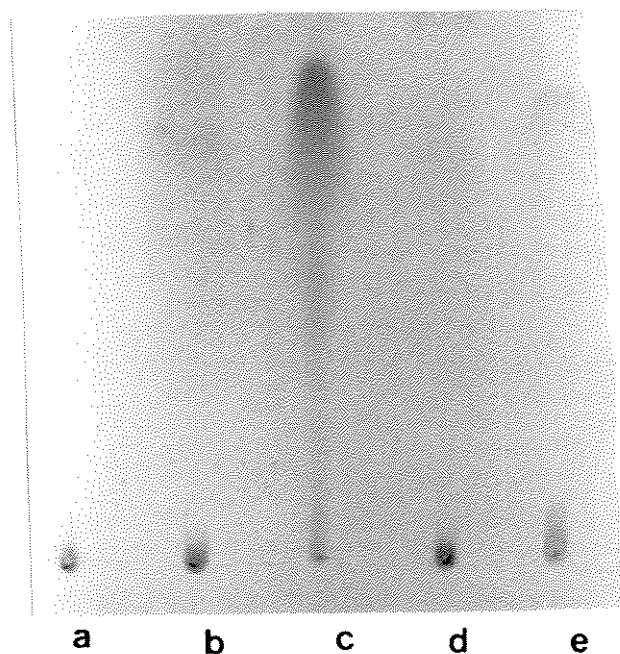


FIGURA 13 - Análise de ácidos graxos livres em cromatografia de camada delgada em sílica gel de suspensões mitocondriais de rim de rato. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação na ausência de ATP e Mg^{++} . (a) 50 nmoles Ca^{++} /mg prot + diamida 1,0 mM, incubação de 10 minutos; (b) mesma condição anterior após 90 minutos de incubação; (c) padrão (ácido linoleico 4 nmol); (d) 50 nmoles Ca^{++} /mg prot + t-butOOH 100 μ M, incubação de 10 minutos; (e) mesma condição anterior após 90 minutos de incubação.

dições, amostras (b) e (c), esse acúmulo manteve-se quase imperceptível. Os controles, ou seja, Ca^{++} ou EGTA sem adição de oxidantes, seguiram o mesmo perfil de resposta, assim como a incubação destas mitocôndrias na presença de ATP e Mg^{++} , nas mesmas condições, que também não apresentou acúmulo de ácidos graxos após 10 minutos de incubação, e muito pouco após 90 minutos, razão pela qual não estão mostradas as cromatografias. A tabela VI resume os resultados obtidos em todas as condições estudadas com estas mitocôndrias.

EFEITO DE Ca^{++} E OXIDANTES EM MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA

As mitocôndrias de batata não captam Ca^{++} do meio externo, portanto, os efeitos de Ca^{++} e oxidantes sobre estas mitocôndrias foram seguidos pelas alterações nos valores de potencial de membrana. A figura 14 mostra que as mitocôndrias de batata são muito resistentes aos efeitos do Ca^{++} e Ca^{++} mais oxidantes tanto na presença quanto na ausência de ATP e Mg^{++} . No traçado (a) observamos que quando os experimentos são feitos na presença de ATP e Mg^{++} , a adição de Ca^{++} ou Ca^{++} mais oxidantes não altera o potencial elétrico formado pelas mitocôndrias e em nada se diferenciam dos experimentos realizados após remoção do Ca^{++} por adição de EGTA. Na ausência de ATP e Mg^{++} , conforme mostra o traçado (b), o potencial formado foi um pouco menor do que no traçado (a), porém em todas as condições, com exceção daquela em que estavam

TABELA VI - Detecção por cromatografia em camada delgada de ácidos graxos livres (AGL) em mitocôndrias de rim de rato incubadas em diferentes condições experimentais como mencionado na tabela III.

| CONDIÇÃO | TEMPO DE INCUBAÇÃO (min) | DETECÇÃO DE AGL | |
|--|-----------------------------|-----------------|-------|
| | | - ATP | + ATP |
| 1-EGTA 1 mM | 10 | - | - |
| | 90 | + | + |
| 2-EGTA 1mM + t-butOOH 100 uM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 3-EGTA 1 mM + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 4-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot | 10 | - | - |
| | 90 | + | + |
| 5-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + t-butOOH 100 uM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 6-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 7-200 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + Pi 2 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |

(-) não detectado; (+) detectado em concentração inferior à do padrão; (++) detectado em concentração semelhante à do padrão.

presentes Ca⁺⁺ e diamida, as mitocôndrias foram capazes de manter o potencial formado.

A figura 15 mostra que em todas as condições em que as mitocôndrias de batata foram incubadas, apesar de não ter havido queda do potencial de membrana, conforme observado na figura 14, houve acúmulo de ácidos graxos.

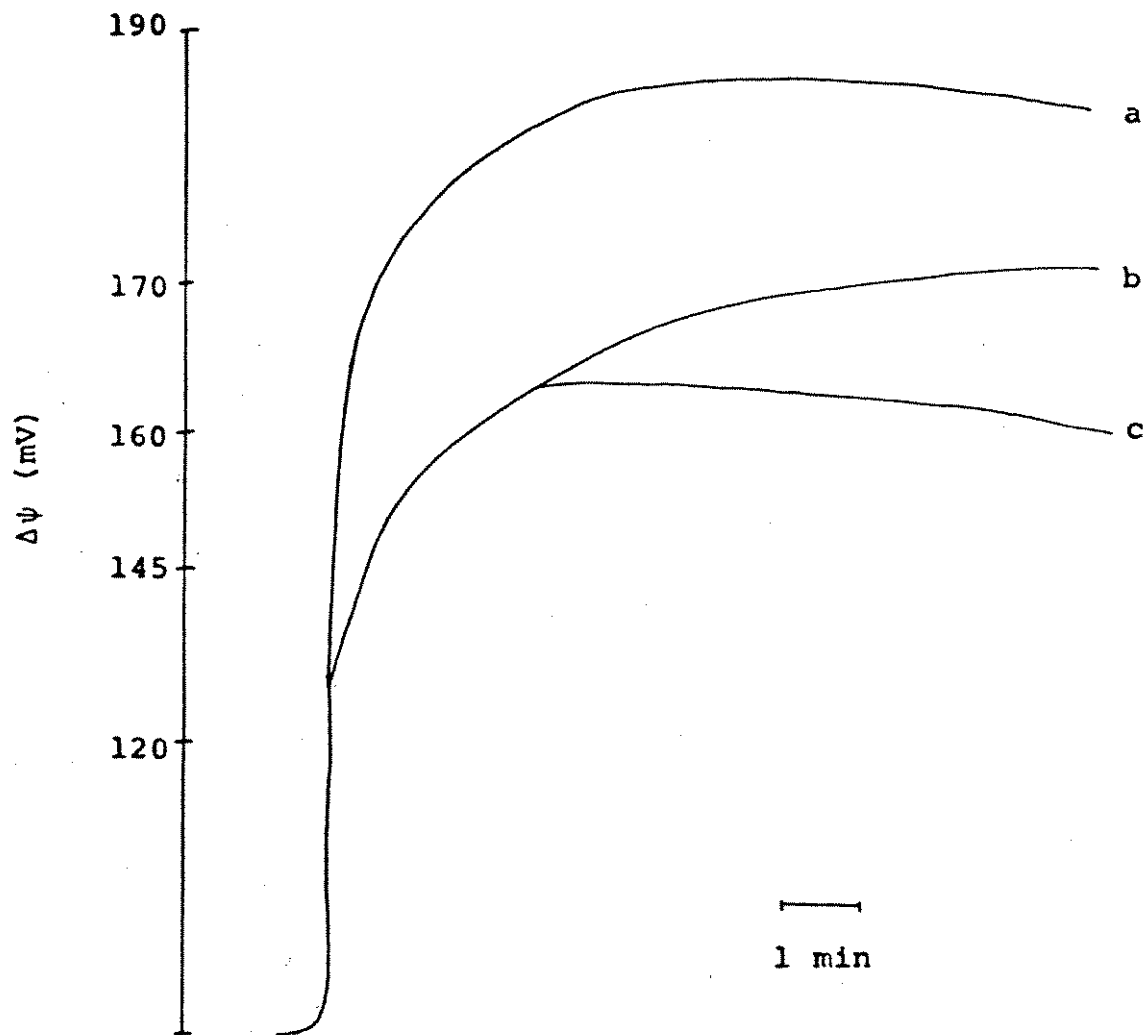


FIGURA 14 - Efeito de Ca^{++} e oxidantes no potencial de membrana de mitocôndrias de batata. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação. Na presença de ATP 3 mM e Mg^{++} 4 mM as condições de 1- EGTA 1,0 mM; 2- EGTA 1,0 mM + t-butOOH 100 μM ; 3- EGTA 1,0 mM + diamida 1,0 mM; 4- 50 nmoles Ca^{++} /mg prot; 5- 50 nmoles Ca^{++} /mg prot + t-butOOH 100 μM ; 6- 50 nmoles Ca^{++} /mg prot + diamida 1,0 mM resultaram sempre no perfil representado em (a). Com essas mesmas adições, porém na ausência de ATP e Mg^{++} exógenos, obteve-se o traçado (b), com exceção da adição de 50 nmoles Ca^{++} /mg prot e diamida 1,0 mM, representada por (c).

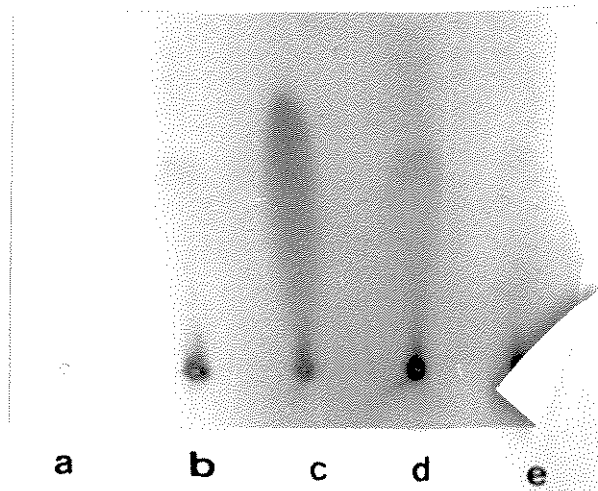


FIGURA 15 - Análise de ácidos graxos livres em cromatografia de camada delgada em sílica gel de suspensões mitocondriais de batata. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação durante 10 minutos, na presença de ATP 3 mM e Mg⁺⁺ 4mM. (a) EGTA 1,0 mM; (b) 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot; (c) padrão (ácido linoleico 4 nmol); (d) EGTA 1,0 mM + t-butOOH 100 uM; (e) 50 nmoles Ca⁺⁺/mg prot + t-butOOH 100 uM.

Os resultados das cromatografias em todas as condições estudadas com as mitocôndrias de batata estão apresentadas na tabela VII.

EFEITO DE Ca^{++} E OXIDANTES EM MITOCÔNDRIA DE MILHO

Os efeitos causados por Ca^{++} mais oxidantes na permeabilidade da membrana interna de mitocôndrias de milho, foram seguidos pelas alterações no transporte de Ca^{++} ou no potencial de membrana. A figura 16 mostra que as mitocôndrias de milho são resistentes ao Ca^{++} ou Ca^{++} mais oxidantes, uma vez que captaram Ca^{++} e não houve liberação significativa, mesmo ao serem incubadas em um meio isento de ATP e Mg^{++} exógenos. No entanto, pode-se observar pelo traçado (c), que na presença de diamida houve uma diminuição na capacidade de captação, quando comparado com o controle (a) e com o traçado (b) onde o oxidante é o t-butilhidroperóxido. Estes resultados são confirmados pelos traçados obtidos na figura 17, onde a presença de diamida, tanto na presença (traçado (d)) quanto na ausência (traçado (c)) de Ca^{++} , alterou a capacidade destas mitocôndrias em formar potencial de membrana, em meio isento de ATP e Mg^{++} exógenos.

Nessas condições, a análise de ácidos graxos por cromatografia apresentada na figura 18 mostra que as mitocôndrias de milho incubadas na presença de EDTA mais diamida, amostra (d), ou Ca^{++} mais diamida, amostra (e), por 10 minutos, apresentaram um acúmulo pequeno de ácidos graxos, semelhante ao acúmulo observado nos controles, amostras (a) e (b). Aos 90 minutos de incubação o

TABELA VII - Detecção por cromatografia em camada delgada de ácidos graxos livres (AGL) de mitocôndrias de batata incubadas em diferentes condições como mencionado na tabela III.

| CONDIÇÃO | TEMPO DE INCUBAÇÃO (min) | DETECÇÃO DE AGL | |
|--|-----------------------------|-----------------|------|
| | | - ATP | +ATP |
| 1-EGTA 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 2-EGTA 1 mM + t-butOOH 100 uM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 3-EGTA 1 mM + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 4-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 5-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + t-butOOH 100 uM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 6-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |

(-) não detectado; (+) detectado em concentração inferior à do padrão; (++) detectado em concentração semelhante à do padrão.

acúmulo de ácidos graxos foi um pouco mais intenso. As cromatografias feitas com estas mitocôndrias incubadas nas mesmas condições, porém na presença de ATP e Mg⁺⁺, apresentaram o mesmo perfil de resposta e os resultados estão esquematizados na tabela VIII.

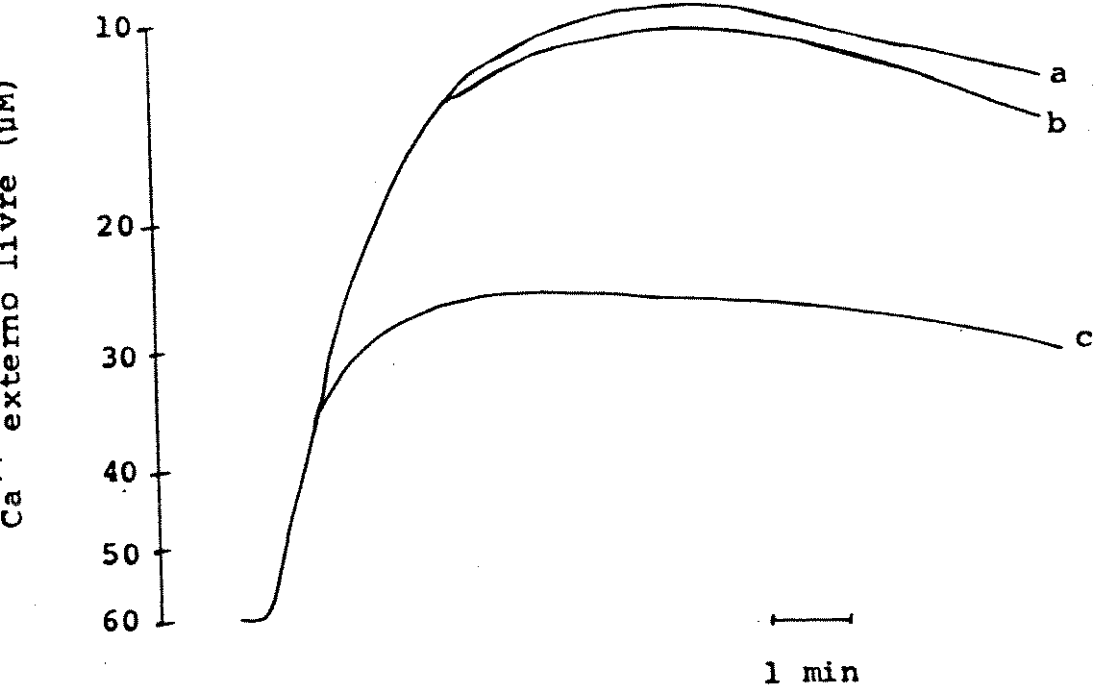


FIGURA 16 - Efeito de diamida e t-butOOH sobre o fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de milho. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação na ausência de ATP e Mg^{2+} . Em todos os experimentos foram adicionados 50 nmoles Ca^{2+} /mg prot. (a) Ca^{2+} (controle); (b) t-butOOH 100 μM ; (c) diamida 1,0 mM.

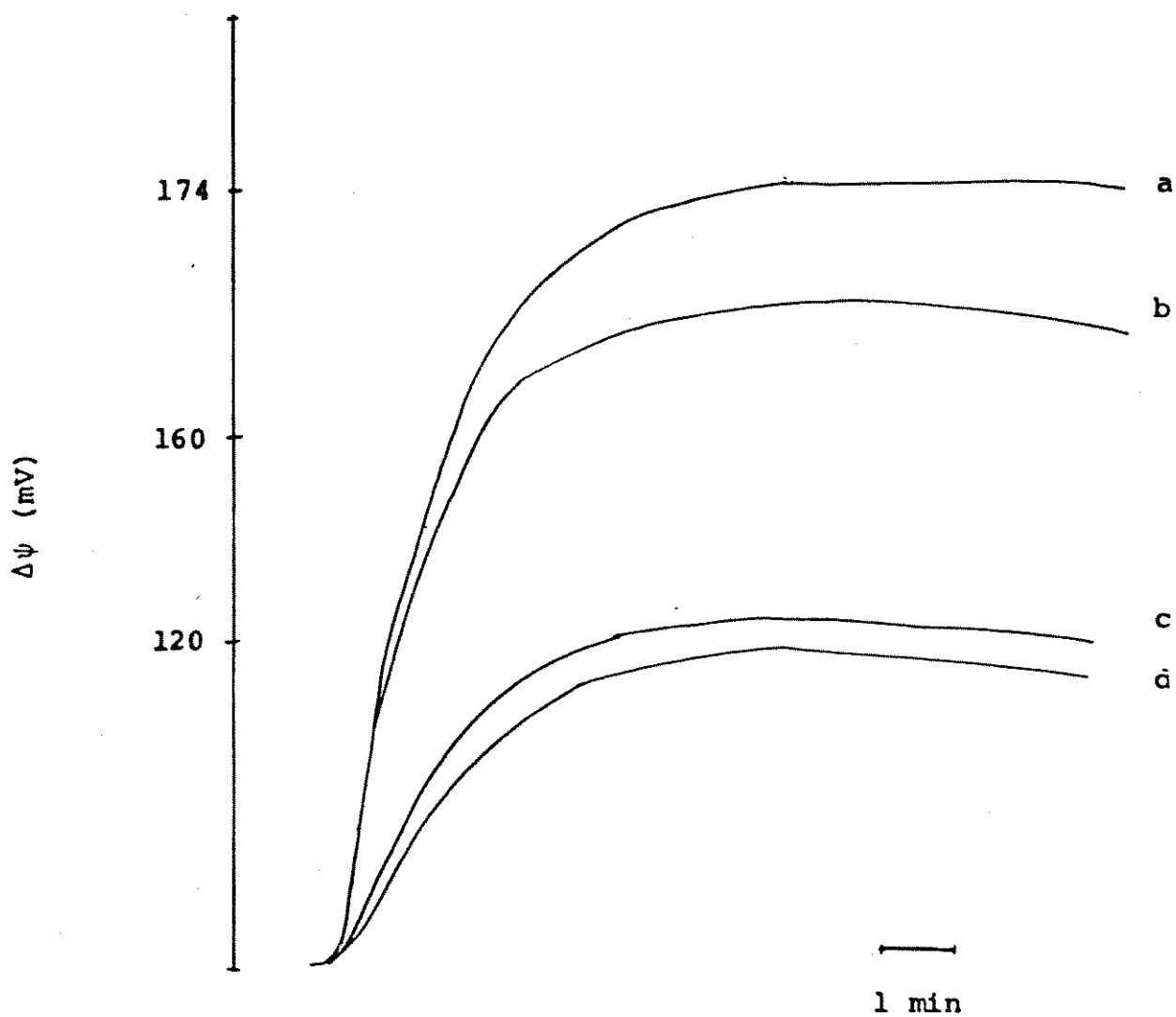


FIGURA 17 - Efeito de Ca^{++} e oxidantes no potencial de membrana de mitocôndria de milho. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação, na ausência de ATP e Mg^{++} . (a) EGTA 1,0 mM; (b) 50 nmoles Ca^{++} /mg prot); (c) EGTA 1,0 mM + diamida 1,0 mM; (d) 50 nmoles Ca^{++} /mg prot + diamida 1,0 mM.

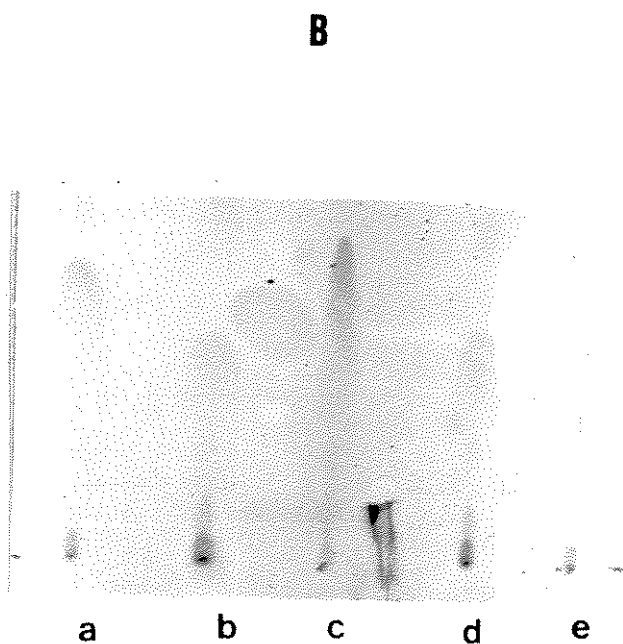
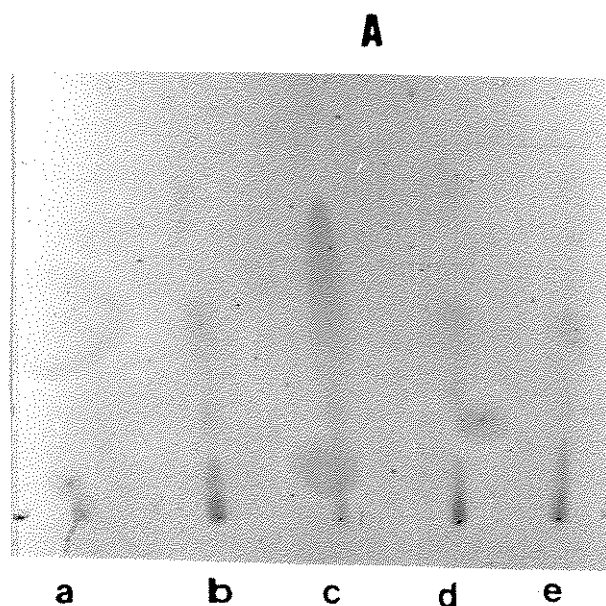


FIGURA 18 - Análise de ácidos graxos livres em cromatografia de camada delgada em sílica gel de suspensões mitocondriais de milho. Mitocôndrias (1,0 mg prot/ml) foram incubadas a 30°C em meio básico de reação na ausência de ATP e Mg^{++} com períodos de incubação de 10 (A) e 90 minutos (B). (a) EGTA 1,0 mM; (b) 50 nmoles Ca^{++} /mg prot; (c) padrão (ácido linoleico 4 nmol); (d) EGTA 1,0 mM + diamida 1,0 mM; (e) 50 nmoles Ca^{++} /mg prot + diamida 1,0 mM.

TABELA VIII - Detecção por cromatografia em camada delgada de ácidos graxos livres (AGL) de mitocôndrias de milho incubadas em diferentes condições como mencionado na tabela III.

| CONDIÇÃO | TEMPO DE INCUBAÇÃO (min) | DETECÇÃO DE AGL | |
|--|-----------------------------|-----------------|-------|
| | | - ATP | + ATP |
| 1-EGTA 1 mM | 10 | - | - |
| | 90 | + | + |
| 2-EGTA 1 mM + t-butOOH 100 uM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 3-EGTA 1 mM + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | ++ |
| 4-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot | 10 | + | + |
| | 90 | + | ++ |
| 5-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + t-butOOH 100 uM | 10 | + | + |
| | 90 | + | + |
| 6-50 nmoles Ca ⁺⁺ / mg prot + diamida 1 mM | 10 | + | + |
| | 90 | + | ++ |

(-) não detectado; (+) detectado em concentração inferior à do padrão; (++) detectado em concentração semelhante à do padrão.

DISCUSSÃO

Embora nos últimos anos vários trabalhos tenham sido publicados tentando explicar o mecanismo responsável pelo efluxo de Ca^{++} em mitocôndrias (ver revisões de RICHTER & FREI, 1988 e GUNTER & PFEIFFER, 1990), permanece ainda controversa a questão da existência de um mecanismo único responsável por esse efluxo, ou se os diferentes agentes capazes de causar a liberação do íon atuariam através de mecanismos distintos. Dentre os autores que defendem a primeira hipótese encontra-se o grupo que sugeriu o envolvimento da fosfolipase A_2 no processo de permeabilização das mitocôndrias (BEATRICE et alii, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1981; BEATRICE et alii, 1982, 1984). O presente trabalho porém, apresenta resultados que permitem dissociar o efluxo de Ca^{++} causado por agentes liberadores do íon, como oxidantes de nucleotídeos de piridina ou Pi , na presença de Ca^{++} , de um efeito direto sobre a membrana mitocondrial devido a um estímulo da atividade da fosfolipase A_2 , nas condições experimentais por nós estudadas. Essa dissociação fica mais evidente ao compararmos os resultados obtidos com as diferentes mitocôndrias utilizadas. Se analisarmos os traçados de efluxo de Ca^{++} mostrados nas figuras 3 (mitocôndrias de fígado) e 7 (mitocôndrias de cérebro), constatamos que essas últimas, na ausência de ATP e Mg^{++} , são muito mais sensíveis ao efeito deletério de Ca^{++} na presença de diamida ou t-butilhidroperóxido, do que as mitocôndrias hepáticas. No entanto, se examinarmos os resultados das figuras 6 e 9, onde são mostrados os cromatogramas para detecção de ácidos graxos livres, verificamos

que após 10 minutos de incubação, não há diferença na liberação de ácidos graxos por essas mitocôndrias. Esses resultados se repetem ao analisarmos o comportamento dessas mesmas mitocôndrias nas condições em que são incubadas na presença de alta concentração de Ca^{++} e Pi , conforme mostra a figura 5 (mitocôndrias de fígado) e figura 8 (mitocôndrias de cérebro). Pelos traçados obtidos na ausência de ATP e Mg^{++} , ambas mitocôndrias apresentam-se bastante afetadas pelas condições experimentais, indicando uma alta permeabilização da membrana, uma vez que a velocidade de efluxo é tal que supera a capacidade de registro do Ca^{++} captado. No entanto, em 10 minutos de incubação nessas condições experimentais, a análise cromatográfica dos ácidos graxos liberados por mitocôndrias de fígado mostra pouco acúmulo de ácidos graxos (figura 6) e não se detecta acúmulo de ácidos graxos nas mitocôndrias de cérebro (figura 9). As mitocôndrias de rim mostram bastante semelhança, quanto à sensibilidade aos agentes liberadores de Ca^{++} , na ausência de ATP e Mg^{++} , com as mitocôndrias de cérebro, como pode ser visto pelos traçados das figuras 10 e 12. No entanto, conforme mostra o cromatograma da figura 13, muito pouco ácido graxo é liberado nessas condições e mesmo após 90 minutos de incubação, ainda não se observa um aumento significativo na quantidade de ácido graxo acumulada por estas mitocôndrias. Analisando-se as tabelas III, IV e V, verifica-se que com exceção das mitocôndrias de cérebro, as de fígado e rim não acusaram acúmulo significativo de ácidos graxos, quando se comparam os resultados obtidos aos 10 e 90 minutos de incubação dessas mitocôndrias. Mesmo considerando que há um aumento da atividade da fosfolipase A_2 em mitocôndrias de cérebro após 90 minutos de incuba-

ção, quando são analisados os resultados da tabela IV, essa ativação da enzima não pode ser correlacionada ao aumento de permeabilidade observado nos 10 minutos de incubação iniciais, período em que são obtidos os traçados nas figuras 7 e 8 para essas mitocôndrias. Nesse caso, a atividade da fosfolipase A_2 poderia ser responsabilizada pela perda da viabilidade da preparação mitocondrial após períodos maiores de incubação, porém não pela permeabilização inicial observada nessas mitocôndrias.

As mitocôndrias de origem vegetal por nós estudadas, mostraram ser mais resistentes que as de origem animal quando expostas aos agentes liberadores de Ca^{++} . Assim, observa-se nas figuras 14 (mitocôndrias de batata) e nas figuras 16 e 17 (mitocôndrias de milho) que a adição de Ca^{++} na presença de diamida ou t-butilhidroperóxido não causou alterações tão drásticas nos traçados de potencial de membrana ou de Ca^{++} , quanto aquelas observadas nas figuras 3, 7 e 10, para as mitocôndrias de fígado, cérebro e rim de rato respectivamente. No entanto, os cromatogramas das figuras 13 e 18 e as tabelas VI e VII não mostram diferenças significativas na liberação de ácidos graxos por essas mitocôndrias em relação ao já observado para as de origem animal.

Todos os experimentos aqui relatados foram realizados também na presença de ATP e Mg^{++} , que já foram descritos como agentes protetores da membrana mitocondrial por diversos autores (NICHOLLS & BRAND, 1980; HOFSTETTER et alii, 1981; VERCESI, 1987; PFEIFFER et alii, 1979). Assim os resultados obtidos através da medida do efluxo de Ca^{++} ou da geração de potencial de membrana na presença de ATP e Mg^{++} , qualquer que fosse a origem das mitocôndrias utilizadas, confirmaram sempre esse efeito de proteção,

independentemente do agente liberador de Ca^{++} presente no meio de incubação. As figuras 4 e 5 (mitocôndrias de fígado), 7 e 8 (mitocôndrias de cérebro), 11 e 12 (mitocôndrias de rim) e 14 (mitocôndrias de batata) mostram esses resultados. Segundo a hipótese de PFEIFFER, o ATP inibiria a ação da fosfolipase A_2 por ativar as reações de reacilação dos lisofosfolipídeos, permitindo o restabelecimento da integridade da membrana mitocondrial (PFEIFFER et alii, 1979). Já ZURINI et alii (1988) propõem que esse efeito do ATP seja devido à sua capacidade em quelar Ca^{++} , que seria um cofator essencial para a ativação da fosfolipase A_2 (ZURINI et alii, 1988). Analisando-se porém os resultados dos cromatogramas nas condições em que as diferentes mitocôndrias foram incubadas na presença de ATP e mesmo quando o agente quelante EGTA era utilizado, verificamos que praticamente não houve modificações significativas na liberação de ácidos graxos pelas mitocôndrias. Esses resultados, mais uma vez suportam a idéia de que nas nossas condições, a fosfolipase A_2 não esteja primariamente envolvida no mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial. Além disso, resultados recentes de nosso laboratório, mostraram a ocorrência de lipoperoxidação quando mitocôndrias de fígado eram incubadas na presença de Ca^{++} e oxidantes de nucleotídeos de piridina (NEPOMUCENO, et alii, 1991) e no trabalho de ERDAHL et alii (1991) é sugerido que a fosfolipase A_2 seria mais ativa na hidrólise de substratos parcialmente oxidados, levando a uma hidrólise mais rápida dos fosfolipídeos de membrana. Essa correlação parece não ser evidenciada pelos nossos resultados, pelo menos durante o período inicial de incubação das mitocôndrias, onde são obtidos os resultados mostrando a ocorrência do

efluxo de Ca^{++} ou da queda de potencial de membrana, indicativos da alteração da permeabilidade mitocondrial. Assim sendo, acreditamos que, conforme já proposto por vários outros autores (ROSSI et alii, 1965; WAITE et alii, 1969; SCARPA & LINDSAY, 1972), a fosfolipase, estando envolvida no "turnover" dos fosfolipídeos de membrana, seria responsável não pelas alterações iniciais na permeabilidade das mitocôndrias, mas sim pelos danos observados no processo de envelhecimento das preparações mitocondriais, que levam progressivamente à sua inviabilidade nos processos de transdução de energia.

Outros aspectos que podem ser discutidos são o elevado pH em que a fosfolipase A_2 apresenta sua atividade ótima, ao redor de pH 9,0 segundo ZURINI et alii (1981) enquanto nossos experimentos são realizados em pH 7,2, e a diferença de atividade dessa enzima em relação à hidrólise de substratos endógenos ou exógenos. Isso explicaria os resultados de FISKUM et alii (1985), relatando uma menor atividade de fosfolipase A_2 encontrada nas mitocôndrias de cérebro quando comparadas às de fígado, em contraste com os resultados por nós apresentados nas tabelas III e IV. No entanto os nossos resultados referem-se à atividade fosfolipásica sobre os fosfolipídeos endógenos e não sobre substratos exógenos, como fosfatidiletanolamina, adicionados às mitocôndrias ou mitoplastos, como em outros trabalhos (REERS & PFEIFFER, 1987; WINTER et alii, 1987). Por outro lado, o aparecimento de ácidos graxos mesmo quando as mitocôndrias são incubadas na presença de ATP, que inibiria indiretamente a ação da fosfolipase A_2 (PFEIFFER et alii, 1979; ZURINI et alii, 1988), ou mesmo na presença do quelante de Ca^{++} , EGTA, pode ser explicado com base no

"turnover" natural dos fosfolipídeos da membrana ou na presença de ácidos graxos endógenos, que poderiam estar atravessando a membrana mitocondrial nessas condições, sem isso significar, necessariamente um aumento inespecífico na permeabilidade da membrana das mitocôndrias.

CONCLUSÕES

As principais conclusões que puderam ser obtidas pela análise de nossos resultados são:

1 - A atividade da fosfolipase A_2 não está diretamente envolvida nas alterações de permeabilidade da membrana de mitocôndrias, ocorridas nos primeiros 10 minutos de incubação em nossas condições experimentais.

2 - ATP e Mg^{++} realmente atuam como protetores da integridade da membrana mitocondrial, tanto em mitocôndrias animais, quanto nas mitocôndrias vegetais estudadas.

3 - Essa proteção não está relacionada à ativação da reação de lisofosfolipídeos, nem a um possível efeito quelante do ATP em relação aos íons Ca^{++} .

4 - As mitocôndrias de milho e batata são muito mais resistentes a agentes oxidantes, como diamida e t-butilhidroperóxido, do que as mitocôndrias de fígado, cérebro e rim de rato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERMAN, K.E.O. Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. *Biochim.Biophys.Acta*, 502:359-66, 1978.
- AKERMAN, K.E.O. & NICHOLLS, D.G. Physiological and Bioenergetic Aspects of Mitochondrial Calcium Transport. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.*, 95:149-201, 1983a.
- AKERMAN, K.E.O & MOORE, A.L. Phosphate dependent, ruthenium red insensitive Ca^{++} uptake in mung bean mitochondria. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 114:1176-81, 1983b.
- BAUMHUTER, S. & RICHTER, C. The hydroperoxide-induced release of mitochondrial calcium occurs via a distinct pathway and leaves mitochondria intact. *FEBS Lett.*, 148 (2):271-75, 1982.
- BEATRICE, M.C.; PALMER, J.W. & PFEIFFER, D.R. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca^{++} by mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 255(18):8663-71, 1980.
- BEATRICE, M.C.; STIERS, D.L. & PFEIFFER, D.R. Increased permeability of mitochondria during Ca^{++} release induced by t-butylhydroperoxide or oxalacetate. *J.Biol.Chem.*, 257(12):7161-71, 1982.
- BEATRICE, M.C.; STIERS, D.L. & PFEIFFER, D.R. The role of glutathione in the retention of Ca^{++} by liver mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 259(2):1279-87, 1984.
- BECKER, G.L. Steady state regulation of extramitochondrial Ca^{++} by rat liver mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.*, 591:234-9, 1980.
- BELLOMO, G.; JEWELL, S.A. & ORRENIUS, S. The metabolism of menadione impairs the ability of rat liver mitochondria to take up and retain calcium. *J.Biol.Chem.*, 257(19):11558-62, 1982.
- BELLOMO, G.; MARTINO, A.; RICHELMI, F.; MOORE, G.A.; JEWELL, S.A. & ORRENIUS, S. Pyridine-nucleotide oxidation, Ca^{++} cycling and membrane damage during ter-butyl hydroperoxide metabolism by liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 140:1-6, 1984a.
- BELLOMO, G.; NICOTERA, P. & ORRENIUS, S. Alterations in intracellular calcium compartmentation following inhibition of calcium efflux from isolated hepatocytes. *Eur.J.Biochem.*, 144:19-23, 1984b.
- BELLOMO, G.; THOR, H. & ORRENIUS, S. Increase in cytosolic Ca^{++} concentration during t-butylhydroperoxide metabolism

- by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca^{++} stores. **FEBS Lett.**, **148** (1):38-42, 1984c.
- BERNARDES, C.F.; PEREIRA DA SILVA, L. & VERCESI, A.E. t-Butylhydroperoxide-induced Ca^{++} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{++} and ATP. **Biochim. Biophys. Acta.**, **850**:41-8, 1986.
- BERNARDI, P.; PARADISI, V.; POZZAN, T. & AZZONE, G.F. Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: inhibition by ruthenium red. **Biochemistry.**, **23**:1645-51, 1984.
- BORLE, A.B.; Control, modulation and regulation of cell calcium. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, **53**:13-153, 1981.
- BROEKEMEIER, K.M.; SCHNID, P.C.; SCHNID, H.H.O. & PFEIFFER, D.R. Effects of phospholipase A_2 inhibitors on ruthenium red-induced Ca^{++} release from mitochondria. **J. Biol. Chem.**, **260**(2):105-13, 1985.
- BURGESS, G. M.; MKINNEU, J.S.; FABIATO, A.; LESHIE, B.A. & PUTNEY JR, J.W. Calcium pools in Saponin-permeabilized Guinea pig hepatocytes. **J. Biol. Chem.**, **258**:15336-45, 1983.
- BYGRAVE, F.L. Mitochondrial calcium transport. **Curr. Top. Bioenerg.**, **6**:259-318, 1977.
- BYGRAVE, F.L. Mitochondria and the control of intracellular calcium. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, **53**:43-79, 1978.
- CARAFOLI, E. Active accumulation of Sr^{++} by rat liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, **97**:107-17, 1965.
- CARAFOLI, E.; ROSSI, C.S. & LEHNINGER, A.L. Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria during active accumulation of Ca^{++} and phosphate. **J. Biol. Chem.**, **240**:2254-61, 1965.
- CARAFOLI, E. & CROMPTON, M. The regulation of intracellular calcium. **Curr. Top. Membr. Transp.**, **10**:151-216, 1978.
- CARNIERI, E.G.S.; MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. Ca^{++} transport by plant mitochondria: Aspects linked to the mechanism and biological role. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **20**:635-8, 1987.
- CHANCE, B. Quantitative aspects of the control of oxygen utilization. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. & O'CONNOR, C.M. **regulation of cell metabolism**. Ciba Foundation Symposium, Boston, Little Brown and Company, 1959.
- CHARLTON, R.R. & WENNER, C.E. Calcium-ion transport by intact tumour cells. **Biochem. J.**, **170**:537-44, 1978.

- CHEAH, K.S. & CHEAH, A.M. Mitochondrial calcium transport and calcium-activated phospholipase in porcine malignant hyperthermia. *Biochim.Biophys.Acta.*, **634**:70-84, 1981a.
- CHEAH, K.S. & CHEAH, A.M. Skeletal muscle mitochondrial phospholipase A₂ and the interaction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in porcine malignant hyperthermia. *Biochim.Biophys.Acta.*, **638**:40-9, 1981b.
- CHEN, C.H. & LEHNINGER, A.L. Ca⁺⁺ transport activity in mitochondria from some plant tissues. *Arch.Biochem.Biophys.*, **157**:183-96, 1973.
- COLL, K.E.; JOSEPH, S.K.; CORKEY, B.E. & WILLIANSON, I.R. Determination of the matrix free calcium concentration and kinetics of calcium efflux in liver and heart mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **257**:8696-8704, 1982.
- CROMPTON, M.; CAPANO, M. & CARAFOLI, E. The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria: a possible mechanism from the regulation of mitochondrial calcium. *Eur.J.Biochem.*, **69**:453-62, 1976.
- CROMPTON, M; CAPANO, M. & CARAFOLI, E. The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur.J.Biochem.*, **82**:25-31, 1978.
- DAUM, G. Lipids of mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.*, **822**:1-42, 1985.
- DAWSON, A.P.; SELWIN, M.J.; FULTON, D.V. Inhibition of Ca⁺⁺ efflux from mitochondria by nupercaine and tetracaine. *Nature.*, **272**:484-6, 1979.
- DAY, D.A.; BERTAGNOLLI, B.L. & HANSON, J.B. The effect of calcium on the respiratory responses of corn mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.*, **502**:289-97, 1978.
- DAY, D.A. & WISKICH, J.T. Transport process of isolated plant mitochondria. *Physiol.Veg.*, **22**:241-61, 1984.
- DENTON, R.M. & McCORMACK, J.G. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett.*, **119**:1-8, 1980.
- DENTON, R.M.; McCORMACK, J.G. & EDGEELL, N.J. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. *Biochem.J.*, **190**:107-17, 1980.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F. Effect of bovine serum albumin on membrane potential in plant mitochondria. *Physiol.Plant.*, **59**:177-82, 1983.

- DOBSON, S.J.; FORSTER, R.E.I. & STOREY, B.T. Determination of intramitochondrial pH by means of matrix carbonyic anhydrase activity measured with ^{18}O exchange. *J.Biol.Chem* 257:1705-11, 1982.
- DOUCE, R. **Mitochondria in higher plants: structure, function and biogenesis**, Academic, Orlando, Florida, 327p., 1985.
- DRAMOTA, Z. CARAFOLI, E.; ROSSI, C.S.; GAMBLE, R.L. & LEHNINGER, A.L. The steady-state maintenance of accumulated calcium in rat liver mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 240:2712-20, 1965.
- DUPERON, R.; MEANCE, J.; LARTILLOT, S. & DUPERON, P. Les composés stéroliques des mitochondries végétales recherches préliminaires sur la localisation de ces substances à l'intérieur de ces organites. *Physiol.Veg.*, 13:539-48, 1975.
- ERDAHL, W.L.; KREBSBACH, R.J. & PFEIFFER, D.R. A comparison of phospholipid degradation by oxidation and hydrolysis during the mitochondrial permeability transition. *Arch.Biochem.Biophys.*, 285:252-60, 1991.
- ELDER, J.A. & LEHNINGER, A.L. Respiration dependent transport of carbon dioxide into rat liver mitochondria. *Biochemistry*, 12:976-982, 1973.
- FERRAZ, V.L. Alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial dependentes de Ca^{++} e oxidantes de nucleotídeos de piridina endógenos. Campinas, 1988. 65p. Tese (Mestrado) Unicamp, Instituto de Biologia.
- FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. Regulated release of Ca^{++} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{++}/2\text{H}^{+}$ antiport. *J.Biol.Chem.*, 254(14):6236-9, 1979.
- FISKUM, G.; PFEIFFER, D.R.; BROEKEMEIER, K.M. & BARDOBY, B. Calcium buffering characteristics and phospholipase activities of rat brain mitochondria. *Biophys.J.*, 47:413a, 1985.
- FOLCH, J.; LEES, M. & STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol.Chem.*, 226:497-509, 1957.
- FREI, B.; WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. Quantitative and mechanistic aspects of the hydroperoxide-induced release of Ca^{++} from rat liver mitochondria. *Eur.J.Biochem.*, 149: 633-9, 1985a.
- FREI, B.; WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. Mechanism of alloxan-induced calcium release from rat liver mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 260(12):7394-7401, 1985b.

- FREI, B.; WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. Menadione(2-methyl-1,4-naphthoquinone) dependent enzymatic redox cycling and calcium release by mitochondria. *Biochemistry*, **25**:4438-43, 1986.
- GORNAL, A.G.; BARDWILL, C.I. & DAVID, M.M. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J.Biol. Chem.*, **177**:751-7, 1949.
- GOHMAN, N. & GIVELBER, H. Automated, simultaneous microdetermination of calcium and magnesium by atomic absorption. *Clinical Chemistry*, **16**(3): 229, 1970.
- GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; PUSKIN, J.S. & RUSSEL, P.R. *Biochemistry*, **17**:339-45, 1978.
- GUNTER, T.E.; CHACE, J.H.; PUSKIN, J.S. & GUNTER, K.K. Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. *Biochemistry*, **22**:6341-51, 1983.
- GUNTER, T.E. & PFEIFFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Amer.J.Physiol.*, **258**:C755-C766, 1990.
- HANSFORD, R.G. & CASTRO, F. Intramitochondrial and extramitochondrial free calcium ion concentrations of suspensions of heart mitochondria with very low, plausibly physiological, contents of total calcium. *J.Bioenerg. Biomembr.*, **14**:361-76, 1982.
- HANSFORD, R.G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev.Physiol. Biochem.Pharmacol.*, **102**:1-72, 1985.
- HANSON, J.B. & HODGES, T.K. Energy-linked reaction of plant mitochondria. *Curr.Top.Bioenerg.*, **2**:65-98, 1967.
- HARRIS, E.J. Importance of CO₂ for Ca⁺⁺ uptake by some mitochondria. *Nature*, **274**:820-821, 1978.
- HEATON, G.M. & NICHOLLS, D.G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. *Biochem.J.*, **156**:635-46, 1976.
- HOCH, F.L.; SUBRAMANIAN, C.; DHOPESHWARKAR, G.A. & MEAD, J. F. Thyroid control over biomembranes: VI. Lipids in liver mitochondria and microsomes of hypothyroid rats. *Lipids*, **16**:328-35, 1981.
- HOFSTETTER, W.; MUMLEBACH, T.; LOTSCHER, H.R.; WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. ATP prevents both hydroperoxide-induced hydrolysis of pyridine nucleotides and release of calcium in rat liver mitochondria. *Eur.J.Biochem.*, **117**:361-7, 1981.
- JENSEM, B.D.; GUNTER, K.K. & GUNTER T.E. The

- efficiencies of the component steps of oxidative phosphorylation. II Experimental determination of the efficiencies in mitochondria and examination of the equivalence of membrane potential and pH gradient in phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **248**(1):305-23, 1986.
- JEWELL, S.A.; BELLOMO, G.; THOR, H. & ORRENIUS, S. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium homeostasis. *Science*. **217**:1257-59, 1982.
- JOSEPH, S.K.; KOLL, K.E.; COOPER, R.H.; MARKS, J.S. & WILLIAMSON, J.R. Mechanisms underlying calcium homeostasis in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **258**:731-41, 1983.
- KAMO, N.; MURATSUGU, M.; HUGOH, R. & KOBATAKE, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium an relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membrane Biology*, **49**:101-21, 1979.
- KENEFIGH, D.G. & HANSON, J.B. Contracted state as an energy source for Ca^{++} binding and Ca^{++} plus inorganic phosphate accumulation by corn mitochondria. *Plant Physiol.*, **41**:1601-9, 1966.
- KRELL, H.; BAUR, H. & PFAFF, E. Transient Ca^{++} uptake and release in isolated rat liver cells during recovery from deenergized states. *Eur. J. Biochem.*, **101**:349-64, 1979.
- LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport. *Biochem. J.*, **119**:129-38, 1970.
- LEHNINGER, A.L. Role of phosphate and other proton donating anions in respiration coupled transport of Ca^{++} by mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**(4):1520-4, 1974.
- LEHNINGER, A.L.; REYNAFARJE, B.; VERCESI, A.E. & TEW, W. Transport and accumulation of calcium in mitochondria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **307**:160-76, 1978.
- LEHNINGER, A.L.; VERCESI, A.E. & BABABUNMI, E.A. Regulation of calcium release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**(4):1690-4, 1978.
- LOTSCHER, H.R.; WINTERHALTER, K.H.; CARAFOLI, E. & RICHTER, C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**(9):4340-44, 1979.
- LOTSCHER, H.R.; WINTERHALTER, K.H.; CARAFOLI, E. RICHTER, C. Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and

- release of calcium from rat liver mitochondria. *J.Biol. Chem.*, **255**(19):9325-30, 1980.
- MACEADO, D.V.; FERRAZ, V.L.; PEREIRA DA SILVA, L. & VERCESI, A.E. Ca^{++} -dependent $NAD(P)^+$ -induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. In: **Integration of Mitochondrial Functions** (Lemasters, J.J., et al eds) pp. 535-542, Plenum Publishing Corp., New York, 1988.
- MANDOLINO, G.; DE SANTIS, A. & MELANDRI. Localized coupling in oxidative phosphorylation by mitochondria from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Biochim. Biophys. Acta.*, **723**:428-39, 1983.
- MARTENS, M.C.; CHANG, C.H. & LEE, C.P. Reye's syndrome: mitochondrial swelling and Ca^{++} release induced by Reye's Plasma, allantoin, and salicylate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**(2):773-86, 1986.
- MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. Some characteristics of Ca^{++} transport in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**(3):943-8, 1985.
- MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S. & VERCESI, A.E. Characteristics of Ca^{++} transport by corn mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.*, **850**:49-56, 1986.
- MCCARTY, R.E.; DOUCE, R. & BENSON, A.A. The acyl lipids of highly purified plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **316**:266-70, 1973.
- MCCORMACK, J.G. & DENTON, R.M. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. *Biochem. J.*, **190**:95-105, 1980.
- MCCORMACK, J.G. & DENTON, R.M. Ca^{++} as a second messenger within mitochondria. *Trends. Biochem. Sci.*, **11**:258-62, 1986.
- MILLARD, D.L.; WISKICH, J.T. & ROBERTSON, R.N. Ion uptake by plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **52**:996-1004 1964.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.*, Lond., **191**:144-8, 1961.
- MITCHELL, P. & KOYLE, M. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **7**:471-84, 1969.
- MOORE, A.L. & AKERMAN, K.E.O. Calcium and plant organelles. *Plant Cell Environm.*, **7**:423-9, 1984.
- MOORE, C.L. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

42:298-305, 1971.

- MOORE, G.A.; JEWELL, S.A.; BELLOMO, G. & ORRENIUS, S. On the relationship between Ca^{++} efflux and membrane damage during t-butylhydroperide metabolism by liver, mitochondria. **FEBS Lett.**, **153**(2):289-92, 1983.
- MOREAU, F.; DUPONT, J. & LANCE, C. Phospholipid and fatty acid composition of outer and inner membranes of plant mitochondria. **Biochim.Biophys.Acta**, **345**:294-304, 1974.
- NACHBAUR, J. & VIGNAIS, F.M. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, **33**:315-20, 1968.
- NATORI, Y.; KARASAWA, K.; ARAI, I.; TAMORI-NATORI, Y. & NOJIMA, S. Partial purification and properties of phospholipase A_2 from rat liver mitochondria. **J.Biochem.**, **93**:631-7, 1983.
- NEPOMUCENO, M.F.; MACEDO, D.V. & PEREIRA-DA-SILVA, L. Lipoperoxidation associated with mitochondrial membrane permeabilization in the presence of Ca^{++} . **Brazilian J.Med. Biol.Res.** 1991. In press.
- NICHOLLS, D.G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. **Biochem.J.**, **176**:464-74, 1978.
- NICHOLLS, D.G. & BRAND, M.D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. **Biochem.J.**, **188**:113-8 1980.
- NICHOLLS, D.G. & AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochim.Biophys.Acta.**, **638**:57-88, 1982.
- OKAYASU, T.; CURTIS, M.T. & FARBER, J.L. Structural alterations of the inner mitochondrial membrane in ischemia liver cell injury. **Arch.Biochem.Biophys.**, **236**(2): 438-45, 1985.
- ORRENIUS, S.; JEWELL, S.A.; BELLOMO, G.; THOR, H.; JONES, D. P. & SMITH, M.T. Regulation of Calcium compartmentation in the hepatocyte. A critical role of glutathione. LARSSON, A. et alii (eds). **Functions of glutathione biochemical, physiological and clinical aspects.** Raven Press, New York, p. 2261-71, 1983.
- PALMER, J.W. & PFEIFFER, D.R. The control of Ca^{++} release from heart mitochondria. **J.Biol.Chem.**, **256**(13):6742-50, 1981.
- PALMER, J.W.; SCHMID, P.C.; PFEIFFER, D.R. & SCHMID, H.H.O. Lipids and lipolytic enzyme activities of rat heart mitochondria. **Arch.Biochem.Biophys.**, **211**:674-82, 1981.

- PANFILI, E.; SOTTOCASA, G.L.; SANDRI, G. & LIUT, G. The Ca^{++} binding glycoprotein as the site of metabolic regulation of mitochondrial Ca^{++} movements. *Eur.J.Biochem.*, **105**:205-10, 1980.
- PFEIFFER, D.R.; SCHMID, P.C.; BEATRICE, M.C. & SCHMID, H.H. O. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca^{++} plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. *J.Biol.Chem.*, **254**(22): 11485-94, 1979.
- PORTZEHL, H.; CALDWELL, P.C. & RUEGG, J.G. The dependence of contraction and relaxation of muscle fibers from crab *Maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions. *Biochim.Biophys.Acta.*, **79**:581-91, 1964.
- POZZAN, T.; BRAGADIN, M. & AZZONE, G.F. Disequilibrium between steady state Ca^{++} accumulation ratio and membrane potential in mitochondria: Pathway and role of Ca^{++} efflux. *Biochemistry*, **16**:5618-25, 1977.
- PRPIC, V. & BYGRAVE, F.L. On the interrelationship between glucagon action, the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides and calcium retention by rat liver mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **255**(13):6193-99, 1980.
- REERS, M. & PFEIFFER, D.R. Inhibition of mitochondrial phospholipase A_2 by mono- and dilysocardioline. *Biochemistry.*, **26**:8038-41, 1987.
- RICHTER, C. & FREI, B. Ca^{++} release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Radical Biol. Med.*, **4**:365-75, 1988.
- ROSENTHAL, R.E.; HAMUD, F.; FISKUM, G.; VARGUESE, P.J. & SHARPE, S. Cerebral ischemia and reperfusion prevention of brain mitochondrial injury by lidoplagine.
- ROSSI, C.R.; SARTORELLI, L.; TATO, L.; BARETTA, L. & SILIPRANDI, N. Phospholipase A activity of rat-liver mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.*, **98**:207-9, 1965.
- ROTH, Z. & DIKSTEIN, S. Inhibition of ruthenium red-insensitive mitochondrial Ca^{++} release and its pyridine nucleotides specificity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **105** (3):991-6, 1982.
- ROTTENBERG, H. & SCARFA, A. Calcium uptake and membrane potential mitochondria. *Biochemistry*, **13**(23):4811-7, 1974.
- SANDRI, E.; SOTTOCASA, G.; PANFILI, E. & LIUT, G. The ability of the mitochondrial Ca^{++} -binding glycoprotein to restore Ca^{++} transport in glycoprotein-depleted rat liver mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.*, **558**:214-20, 1979.
- SARIS, N.E. The calcium pump in mitochondria. *Comments.Phys. Math.Soc.Sci.Finn.* (suppl), **28**:1-59, 1963.

- SARIS, N.E. & AKERMAN, K.E.O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. *Cur.Tops.Bioenerg.*, **10**:103-79, 1980.
- SCARPA, A. & AZZONE, G.F. The mechanism of ion translocation in mitochondria-coupling of K^+ efflux with Ca^{++} uptake. *Eur.J.Biochem.*, **12**:328-35, 1970.
- SCARPA, A. & LINDSAY, J.G. Maintenance of energy-linked functions of rat-liver mitochondria aged in the presence of nupercaine. *Eur.J.Biochem.*, **27**:401-7, 1972.
- SCHERPHOF, G.L. & VAN DEENEN, L.L.M. Phospholipase A activity of rat-liver mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.* **98**:204-6, 1965.
- SCHNEIDER, W.C. & HOGEBOOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. *J.Biol.Chem.*, **183**:123-8, 1951.
- SELWYN, M.J.; DAWSON, A.P. & DUNNET, S.J. Calcium transport in mitochondria. *FEBS Lett.*, **10**(1):1-5, 1970.
- SIES, H.; GRAF, P. & ESTRELA, J.M. Hepatic calcium efflux during cytochrome P-450-dependent drug oxidations at the endoplasmic reticulum in intact liver. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, **78**(6):3358-62, 1981.
- SILIPRANDI, D.; SILIPRANDI, N. & TONINELLO, A. On the relationship between calcium and phosphate transport, transmembrane potential and acetoacetate-induced oxidation of pyridine nucleotide in rat liver mitochondria. *Eur.J. Biochem.*, **130**:173-5, 1983.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V.; SHUMAN, H.; SCARPA, A.; ENDO, M. & INESI, G. Mitochondria do not accumulate significant Ca^{++} concentrations in normal cells. In: BRONNER, F. & PETERLICK, M. (eds). *Calcium and phosphate transport across biomembranes*. Academic, New York, pp. 87-93, 1981.
- SORDAHL, L.A. Effects of magnesium, ruthenium red and the antibiotic ionophore A-23187 on initial rates of calcium uptake and release by heart mitochondria. *Arch.Biochem.*, **167**:104-15, 1974.
- STARKE, P.E.; HOCK, J.B. & FARBER, J.L. Calcium-dependent and calcium-independent mechanism of irreversible cell injury in cultured hepatocytes. *J.Biol.Chem.*, **261**(7):3006-12, 1986.
- STRICKLAND, E.H. & BENSON, A.A. Neutron activation paper chromatographic analysis of phosphatides in mammalian cell fractions. *Arch.Biochem.Biophys.*, **88**:344-8, 1960.
- SUN, E.Y. & HORROCKS, L.A. The acyl and alk-1-enyl groups of the major phosphoglycerides from ox brain myelin and mouse

- brain microsomal. **Lipids**, 5:1006-12, 1970.
- TEDESCHI, H. The transport of cations in mitochondria. **Biochim.Biophys.Acta.**, 639:157-96, 1981.
- TSEKOS, J.; CORNWELL, T.F. & ULASUK, G. Ca^{++} efflux from liver mitochondria induced by a decrease in extramitochondrial pH. **FEBS Lett.**, 119:297-300, 1980.
- VAINIO, H., MELA, L. & CHANCE, B. Energy dependent bivalent cation transport in rat liver mitochondria. **Eur.J.Biochem.** 12:387-91, 1970.
- VAN den BOSCH, H. In: **Phospholipids**. Eds J.N. Hawthorne, G.B. Ansell. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 1982. p. 313-57.
- VASINGTON, F.D. & MURPHY, J.V. Ca^{++} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. **J.Biol.Chem.**, 237:2670-6, 1962.
- VASINGTON, F.D.; GAZZOTTI, P.; TIOZZO, R. & CARAFOLI, E. The effect of ruthenium red on Ca^{++} transport and respiration in rat liver mitochondria. **Biochim.Biophys. Acta.**, 256(1):43-54, 1972.
- VERCESI, A.E. & LEHNINGER, A.L. Uncoupling is not obligatory for $NADP^{+}$ -induced Ca^{++} efflux from mitochondria. **Fed.Proc.**, 41(4):1434, 1982.
- VERCESI, A.E. Transporte de Ca^{++} por mitocôndrias. Características do efluxo induzido por $NAD(P)^{+}$. **Arq.Biol.Tecnol.**, 27(4):477-97, 1984c.
- VERCESI, A.E. & PEREIRA DA SILVA, L. $NADP$ redox state and mitochondrial Ca^{++} efflux: A controversial issue. **Brazilian J.Med.Biol.Res.**, 17:353-6, 1984.
- VERCESI, A.E. Dissociation of $NAD(P)^{+}$ -stimulated mitochondrial Ca^{++} efflux from swelling and membrane damage. **Arch.Biochem.Biophys.**, 232(1):86-91, 1984a.
- VERCESI, A.E. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of $NAD(P)^{+}$ -stimulated Ca^{++} efflux from mitochondria. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, 119:315-18, 1984b.
- VERCESI, A.E. Stimulation of mitochondrial Ca^{++} -efflux by $NADP^{+}$ with maintenance of respiratory control. **An.Acad.Brasil.Ciêñ.**, 57(3):369-75, 1985.
- VERCESI, A.E. The Participation of $NADP$, the Transmembrane Potential and the Energy-Linked $NAD(P)$ Transhydrogenase in the Process of Ca^{++} Efflux from Rat Liver Mitochondria. **Arch.Biochem.Biophys.**, 252:171-8, 1987.

- VERCESI, A.E.; FERRAZ, V.L.; MACEDO, D.V. & FISKUM, G. Ca⁺⁺-dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**(3):934-41, 1988.
- WAITE, M.; VAN DEENEN, L.L.M.; RUIGROK, T.J. & EBERS, P.F. Relation of mitochondrial phospholipase A activity to mitochondrial swelling. *J. Lipid Res.*, **10**:599-608, 1969.
- WAITE, M. & SISSON, P. Partial purification and characterization of the phospholipase A₂ from rat liver mitochondria. *Biochemistry.*, **10**:2377-83, 1971.
- WALLIN, A.; JONES, T.W.; VERCESI, A.E.; COTGREAVE, I.; ORNSTADT, K. & ORRENIUS, S. Toxicity of 5-pentachlorobutadienyl-L-cysteine studied with isolated rat renal cortical mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**:365-72, 1987.
- WGLICKI, W.B.; WAITE, M.; SISSON, P. & SHOHET, S.B. Myocardial phospholipase A of microsomal and mitochondrial fractions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **231**:512-19, 1971.
- WILLIAMSON, J.R.; COOPER, R.H. & HOEK, J.B. Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.*, **639**:243-95, 1981.
- WINGROVE, E.D. & GUNTER, E.G. Kinetics of mitochondrial calcium transport. II - A kinetics description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium. *J. Biol. Chem.*, **261**:15166-71, 1986.
- WINTER, J.M.; VIANEN, G.M. & VAN den BOSCH, H. Purification of rat liver mitochondrial phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta.*, **712**:332-41, 1982.
- WINTER, J.M.; LENTING, H.B.M.; NEYS, F.W. & VAN den BOSCH, H. Hydrolysis of membrane-associated phosphoglycerides by mitochondrial phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta.*, **917**:169-77, 1987.
- WROGEMANN, K.; JACOBSON, B.E. & BLANCHAER, M.C. On the mechanism of a calcium-associated defect of oxidative phosphorylation in progressive muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**:267-78, 1973.
- ZAMBRANO, F.; FLEISCHER, S. & FLEISCHER, B. Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles. *Biochim. Biophys. Acta.*, **380**:357-69, 1975.
- ZOCCARATTO, F.; RUGOLO, M.; SILIFRANDI, D. & SILIFRANDI, N. Correlated effluxes of adenine nucleotides, Mg⁺⁺, and Ca⁺⁺ induced efflux in rat liver mitochondria by external Ca⁺⁺ and phosphate. *Eur. J. Biochem.*, **114**:195-199, 1981.

ZOCCARATTO, A.E. & NICHOLLS, D. The role of phosphate in the regulation of the independent calcium efflux pathway of liver mitochondria. *Eur.J.Biochem.*, 127:333-8, 1982.

ZURINI, M.; HUGENTOBLER, G. & GAZZOTTI, P. Activity of phospholipase A₂ in inner membrane of rat liver mitochondria. *Eur.J.Biochem.*, 119:517-21, 1981.