



RICARDO DE SOUZA PEREIRA

*mb
nt*

PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

INTERNA POR Ca⁺⁺ EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO:

INIBIÇÃO POR TRIFLUOPERAZINA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(s) candidato a) Ricardo de Souza Pereira e aprovada pela Comissão Julgadora. Campinas 10/6/92

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia, área de Bioquímica

ORIENTADOR Prof. Dr. ANIBAL EUGÊNIO VERGESI[†]

ten

Campinas - São Paulo

1992

P414p
17146/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ec 11/10/92

17146

Dedico aos meus pais e à
Cristina pelo imenso apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar meu caminho e me dar forças e esperanças para continuar.

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi por sua orientação e pelo exemplo de seriedade como pesquisador.

À Ana Paula Bertocchi pela troca de informações, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Washington Luís Tafuri e ao Prof. Elísio Evangelista por terem me ajudado nos meus primeiros passos.

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr. por sua ajuda no princípio deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Nilce Meirelles pela colaboração e pela troca de idéias.

À Prof^a Dr^a Lúcia Pereira da Silva pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Aos amigos e ex-colegas Armando Mendes e Inês Juliana por seus sinceros laços de amizade.

Aos amigos Roger, Márcia, Valderez, André e Helena pelo apoio e amizade.

À Regina Célia Rosetto por sua amizade e colaboração técnica.

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

Aos funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente deram-me seu apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Mitocôndrias de fígado de rato quando acumulam Ca^{2+} na presença de um prooxidante como diamida ou *t*-butilhidroperóxido apresentam um inchamento de grande amplitude e colapso do potencial de membrana ($\Delta\psi$). Trifluoperazina, um neuroléptico da classe dos fenotiazínicos, em concentrações (15 - 45 μM) as quais não inibem a respiração ou o influxo de Ca^{2+} para a mitocôndria, protege significativamente esta organela contra os efeitos deletérios do cátion mais um prooxidante. Em contraste a isto, em concentrações mais altas do que 100 μM a droga potencializa estes efeitos deletérios do cálcio e prooxidantes e tem efeito de danificar *per se* a membrana mitocondrial interna. É proposto que a proteção conferida pela droga é mediada por mudanças na estrutura tridimensional de proteínas de membrana e que isto acarrete diminuição da produção de agregados proteicos, interligados por pontes dissulfeto, que ocorrem quando suspensões mitocondriais acumulam cálcio sob condições de estresse oxidativo. É proposto também que estes agregados estejam relacionados com o fenômeno de lipoperoxidação, pois é observado que a droga protege contra os efeitos deletérios induzidos pelo complexo citrato- Fe^{2+} .

SUMMARY

Isolated rat liver mitochondria undergo extensive swelling and disruption of membrane potential when they accumulate Ca^{2+} in the presence of a prooxidant such as diamide or *t*-butylhydroperoxide. The phenothiazinic drug trifluoperazine, at concentrations (15-45 μM) which do not inhibit either respiration or the influx of Ca^{2+} into mitochondria, significantly protects mitochondria against the deleterious effects of Ca^{2+} plus a prooxidant. In contrast, at concentrations higher than 100 μM the drug potentiates these deleterious effects of Ca^{2+} and prooxidants and presents a damaging effect *per se* on the inner mitochondrial membrane. It is proposed that the protection conferred by the drug is mediated by changes in membrane proteins structure that decrease the production of protein thiol cross-linking that occurs when mitochondria accumulate calcium under oxidant stress conditions. It is also proposed that the protein aggregates are correlated with the lipid peroxidation, because it is observed that the drug protects against the deleterious effects induced by citrate- Fe^{2+} complex.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	01
INTRODUÇÃO.....	02
I- Reações químicas dos prooxidantes.....	02
II- Movimento do cálcio através da membrana mitocondrial interna.....	08
III- Objetivos.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
Obtenção de mitocôndrias hepáticas.....	14
Dosagem de proteína mitocondrial.....	15
Meio de incubação.....	15
Medida da variação do volume mitocondrial.....	15
Determinação do potencial de membrana.....	15
Determinação dos movimentos de cálcio no meio.....	18
Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	18
Produção de lipoperóxidos em membranas.....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
I- Efeito de diferentes concentrações de trifluoperazina sobre o inchamento mitocondrial induzido por cálcio mais prooxidantes em mitocôndrias energizadas.....	21

II-	Efeito de diferentes concentrações de trifluoperazina sobre o inchamento mitocondrial induzido por cálcio mais prooxidantes em mitocôndrias desenergizadas...	23
III-	Efeito da trifluoperazina na estimulação da liberação de cálcio induzido por prooxidantes.....	25
IV-	Efeito da trifluoperazina no colapso do potencial de membrana induzido por cálcio mais prooxidantes.....	27
V-	Efeito da trifluoperazina na produção de agregados de proteínas de membrana mitocondrial por cálcio mais prooxidantes.....	31
VI-	Efeito da trifluoperazina sobre o inchamento mitocondrial induzido pelo complexo Citrato-Fe ²⁺ em mitocôndrias energizadas.....	35
VII-	Efeito da trifluoperazina na queda do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) induzido pelo complexo Citrato-Fe ²⁺	35
	CONCLUSÕES.....	38
	BIBLIOGRAFIA.....	40

ABREVIATURAS:

TFP.....Trifluoperazina

t-butOOH.....*t*-butilhidroperóxido

EGTA....Ácido etilenoglicol bis(β -aminoetileter) N,N-tetraacético

HEPES.....Ácido 4-(2-hidroxil)-1-piperazineetanosulfônico

MFR.....Mitocôndria de fígado de rato

$\Delta\Psi$Potencial elétrico de membrana

GSH.....Glutathiona reduzida

GSSG.....Glutathiona oxidada

PVC.....Cloreto de polivinila

TPP⁺.....Tetrafenilfosfônio

1- INTRODUÇÃO

Os prooxidantes são moléculas capazes de gerar espécies reativas de oxigênio ou perturbar o equilíbrio redox da célula, tornando-a susceptível às espécies reativas de oxigênio. Estas espécies têm capacidade de oxidar átomos com elétrons não compartilhados, tais como, átomos de carbonos insaturados de ácidos nucleicos e lipídeos e átomos de enxofre de grupos sulfidrilas pertencentes a aminoácidos de proteínas de membrana (COLIVER et alii, 1976), formando agregados proteicos (FAGIAN et alii, 1990).

Como exemplo de prooxidantes podemos citar diamida (ácido azodicarboxílico bis [dimetilamida]), t-butil hidroperóxido (SRIVASTAVA et alii, 1974), ácido δ -aminolevulínico (ALA) (HERMES-LIMA et alii, 1991), menadiona e aloxana (RICHTER & FREI, 1988).

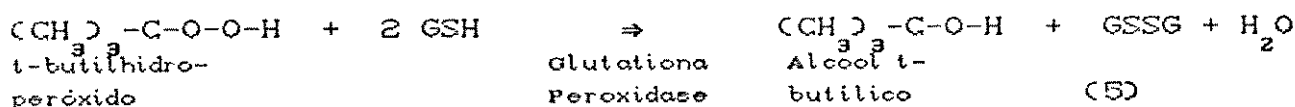
As espécies reativas de oxigênio normalmente encontradas em organismos vivos são: íon superóxido ($O_2^{\bar{}}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

I- REAÇÕES QUÍMICAS DOS PROOXIDANTES

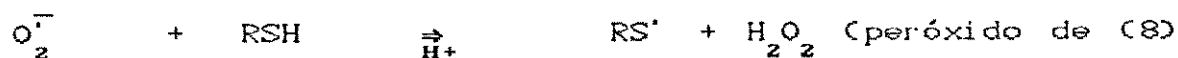
A diamida reage diretamente com os grupamentos sulfidrilas, como mostrado na seguinte reação (SRIVASTAVA et alii, 1974):



O *t*-butilhidroperóxido oxida GSH em um passo enzimático simples, por servir como substrato para a enzima Glutathiona Peroxidase, como descrito na equação seguinte:



Nas equações de (1) a (5), depois de formada a ponte dissulfeto a reação pode prosseguir da seguinte forma, gerando espécies reativas de oxigênio (SWALLOW, 1973; FLOHÉ et alli, 1976):



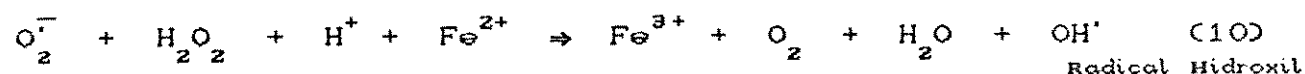
hidrogênio)



Onde R e R' representam glutathiona ou proteína de membrana.

O elétron da reação (6) vem de algum agente redutor como por exemplo NADH.

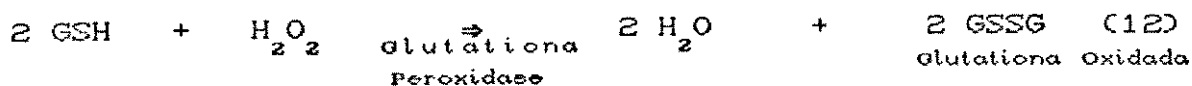
O íon peróxido e o peróxido de hidrogênio, gerados nas reações (7) e (8), podem se combinar na seguinte forma, gerando o radical hidroxil (CROSS et alli, 1987):



O íon Férrico (Fe^{3+}) pode ser reduzido a Ferroso (Fe^{2+}) pelo íon superóxido:



O peróxido de hidrogênio pode oxidar GSH servindo de substrato para a enzima glutathiona peroxidase (de maneira semelhante à que ocorre com o *t*-butilhidroperóxido) (PÓVOA, 1985):

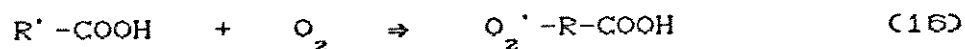
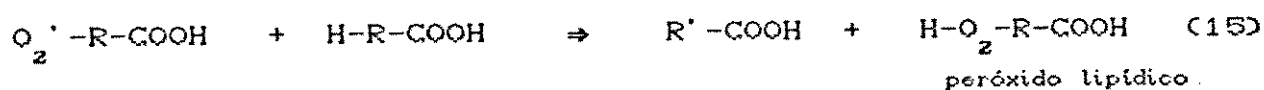


A integridade estrutural da membrana celular e das membranas das organelas intracelulares dependem de um nível apropriado de GSH. É importante regular a razão tiol/dissulfeto em proteínas, através de reações de intercâmbio, e a proteção de lipídeos contra peroxidação através da intercepção de radicais livres e a decomposição de hidroperóxidos lipídicos (KOSOWER et alli, 1969 a-d; KOSOWER & KOSOWER, 1975).

O radical hidroxil (OH[']) pode atacar lipídeos de membranas pela abstração de átomos de hidrogênio, deixando um radical carbono (R'-COOH) que combina com o oxigênio (CHALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986):



Entre outras reações, o peroxi-radical pode atacar lipídeos adjacentes na membrana para propagar a seguinte reação em cadeia (CHALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986):



Onde R corresponde a uma cadeia longa de carbonos insaturados ou

não. Além disso, peróxidos lipídicos podem se fragmentar para produzir uma grande variedade de produtos, incluindo mais radicais e aldeídos que são altamente citotóxicos, mesmo em quantidades pequenas (CHALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986).

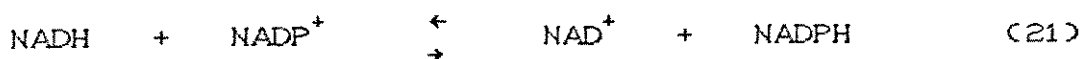
O complexo Citrato-Fe²⁺ produz peroxidação lipídica devido à formação de radical hidroxil, como delineado nas equações abaixo (MINOTTI & AUST, 1987):

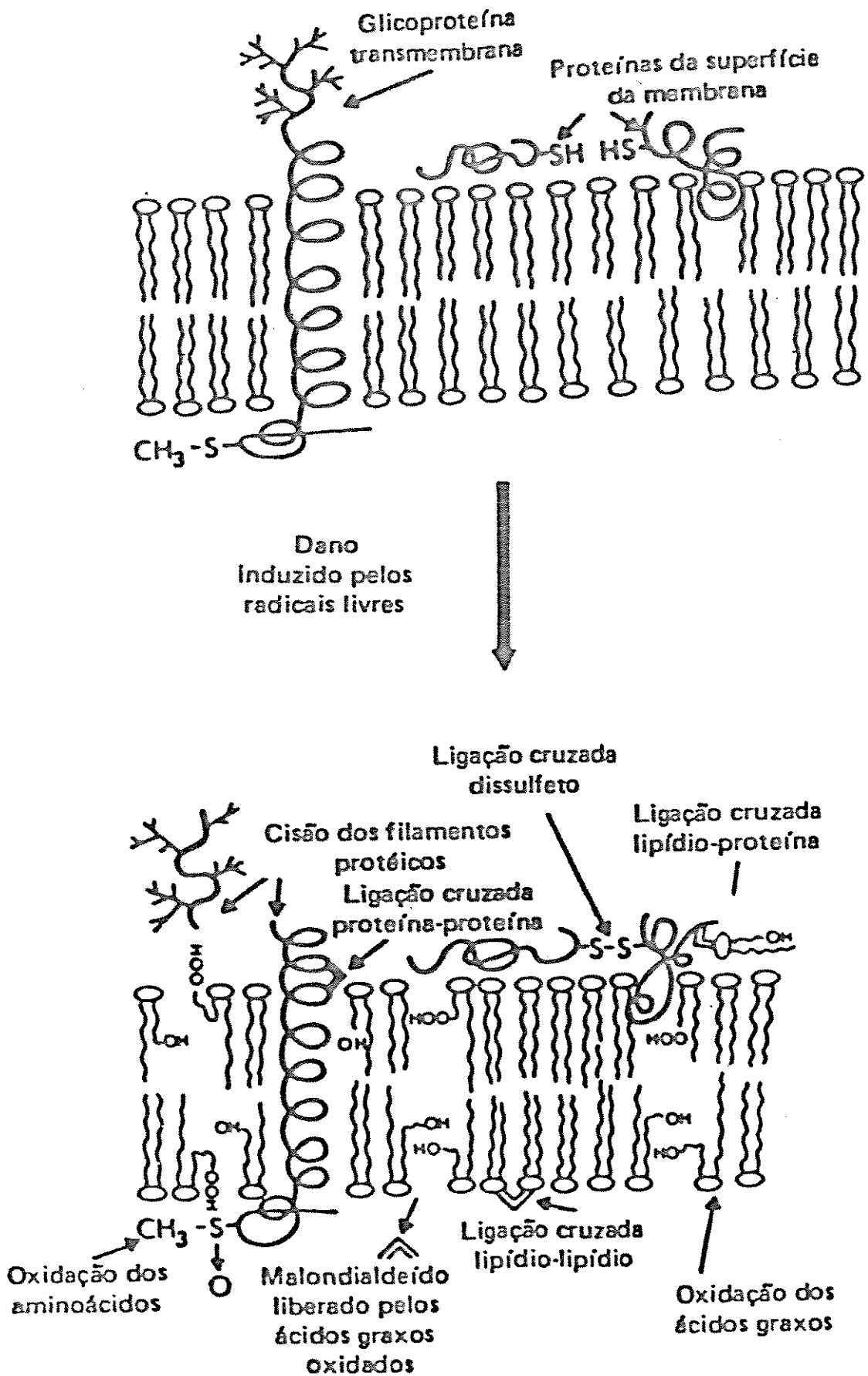


A membrana celular é danificada por ataque de espécies reativas de oxigênio, principalmente na ausência de GSH. Isto é muito bem demonstrado pelos efeitos dos azoésteres (por exemplo a diamida) nas células vermelhas do sangue sob condições específicas (KOSOWER et alli, 1969 a-d; KOSOWER & KOSOWER, 1975).

No esquema I são mostradas as alterações provocadas por radicais livres que ocorrem a nível de membrana (FREEMAN & CRAPO, 1982).

A transidrogenase NADH - NADP⁺ dependente de energia, localizada na membrana mitocondrial interna, possui um papel especial no mecanismo de defesa contra estresse oxidativo (CHOEK & RYDSTROM, 1988). Ela catalisa a transferência reversível de hidrogênio entre os nucleotídeos de piridina, de acordo com a seguinte reação:





ESQUEMA I

Esta enzima é capaz de funcionar como uma bomba de próton utilizando o gradiente eletroquímico de H^+ gerado pela respiração pelo fato de deslocar a constante de equilíbrio da reação acima na direção de produção de NADPH (HOEK & RYDSTROM, 1988). O NADPH assim formado é uma importante fonte de equivalentes redutores para a regeneração de GSH mitocondrial consumida durante a redução de H_2O_2 pelo sistema enzimático glutathiona redutase/peroxidase (OSHINO & CHANCE, 1977; HOEK & RYDSTROM, 1988).

Em geral os radicais livres são destruídos na célula por enzimas antioxidantes, como a Superóxido Dismutase (SOD) e a Catalase (FRIDOVICH, 1976; PÓVOA, 1985).

Quando há aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio, o sistema antioxidante da célula se torna ineficiente e uma situação de estresse oxidativo é criada, provocando na maioria das vezes danos celulares irreversíveis.

A toxicidade de H_2O_2 e outras espécies reativas de oxigênio é um problema biológico de grande importância, tanto sob condições fisiológicas quanto patológicas (ERNSTER, 1986). Por esta razão estas espécies estão relacionadas com a ocorrência de várias doenças no organismo, dentre as quais podemos citar: pancreatite aguda, artrite reumatóide, catarata (CROSS et alli, 1987), e em caso de isquemia, como por exemplo, gangrena provocada por frio intenso (MANSON et alli, 1991).

II - MOVIMENTO DE Ca^{2+} ATRAVÉS DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

INTERNA.

A entrada e saída de Ca^{2+} em mitocôndrias ocorre por diferentes vias (CROMPTON, 1985). Adição do cátion a uma suspensão de mitocôndrias energizadas (oxidando succinato, por exemplo) resulta na estimulação da respiração, extrusão de prótons e entrada do íon na organela. A entrada é um processo puramente eletroforético, direcionado pelo componente elétrico (potencial de membrana) do total da força motriz de prótons. Ca^{2+} é transportado com duas cargas positivas via um transportador. O transportador tem uma baixa afinidade pelo Ca^{2+} com um Km entre 5 e 30 μM , dependendo do tecido de origem da mitocôndria e da composição do meio. Vermelho de Rutênio, um complexo de Rutênio amoniacal hexavalente, inibe esta entrada (VASINGTON et alli, 1972; POZZAN et alli, 1977). Determinações do potencial elétrico ($\Delta\psi$) em mitocôndrias energizadas fornecem valores próximos de 150 mV. Assumindo este valor e considerando que a membrana é negativa na face interna, a razão entre o Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial e no citoplasma, calculada pela equação de Nernst, seria igual a 10^6 . Os valores experimentais encontrados são muito inferiores à distribuição termodinâmica esperada (DRAHOTA et alli, 1965; POZZAN et alli, 1977) e sugerem a existência de dois sistemas diferentes para o transporte de Ca^{2+} , um para a captação e outro para a liberação, independentemente regulados. Desde que na mitocôndria energizada o potencial elétrico de H^+ é sempre negativo internamente, a liberação de Ca^{2+} durante a respiração não deve ocorrer por mecanismo eletroforético mas sim eletroneutro. De

fato, tem sido demonstrada liberação de um íon Ca^{2+} em troca por dois íons Na^+ em mitocôndrias de tecidos excitáveis (CARAFOLI et alli, 1974; CROMPTON et alli, 1976) ou de um íon Ca^{2+} por dois íons H^+ em outros tipos de mitocôndrias (AKERMAN, 1978a; NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1979). Acredita-se assim que a distribuição de Ca^{2+} entre a matriz e o citoplasma seja cinética e determinada em condições de "steady-state" pela razão entre as velocidades de influxo e efluxo através de duas vias diferentes (POZZAN et alli, 1977; AKERMAN, 1978b).

Durante estudos da estequiometria entre o acúmulo de cálcio, ejeção de H^+ e captação de O_2 por mitocôndrias de coração de rato, VERGESI et alli (1978) observaram que quando succinato era usado como substrato na presença de rotenona, a retenção de cálcio pelas mitocôndrias era maior do que quando estavam oxidando substratos ligados ao NAD^+ . Alguns pesquisadores propuseram uma regulação do transporte de Ca^{2+} via o estado redox dos nucleotídeos de piridina de mitocôndria de fígado (LEHNINGER et alli, 1978) e coração (COELHO & VERGESI, 1980). De acordo com esta proposta, a liberação de Ca^{2+} mitocondrial seria favorecida pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina.

Pequenas quantidades (da ordem de nanomoles por mg de proteína) de *t*-butilhidroperóxido ou peróxido de hidrogênio induzem a oxidação de nucleotídeos de piridina mitocondrial por um sistema enzimático consistindo de glutaciona peroxidase, glutaciona redutase [NAD(P)H] e a transidrogenase dependente de energia [NAD(P)⁺ transidrogenase] (OSHINO & CHANCE, 1977; SIES & MOSS, 1978; LOTSCHER et alli, 1979). Hidroperóxidos induzem

liberação de Ca^{2+} em mitocôndria de fígado de rato (LOTSCHER et alli, 1979; BELLOMO et alli, 1982 a; BELLOMO et alli, 1982 b; JEWELL et alli, 1982; BELLOMO et alli, 1984; VERCESI, 1984).

Diamida também induz liberação de íons Ca^{2+} em mitocôndria de fígado de rato, devido à formação de pontes dissulfeto entre proteínas da membrana mitocondrial (VERCESI et alli, 1988; FAGIAN et alli, 1990).

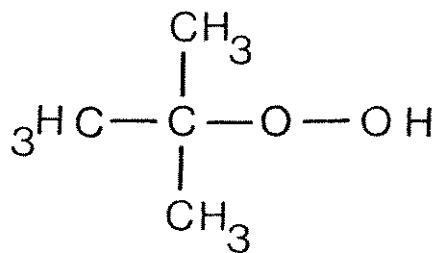
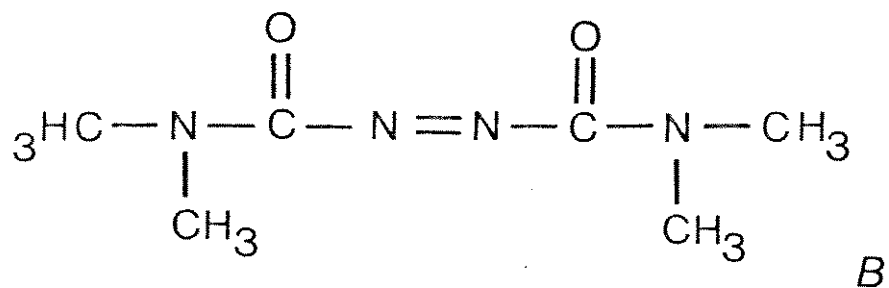
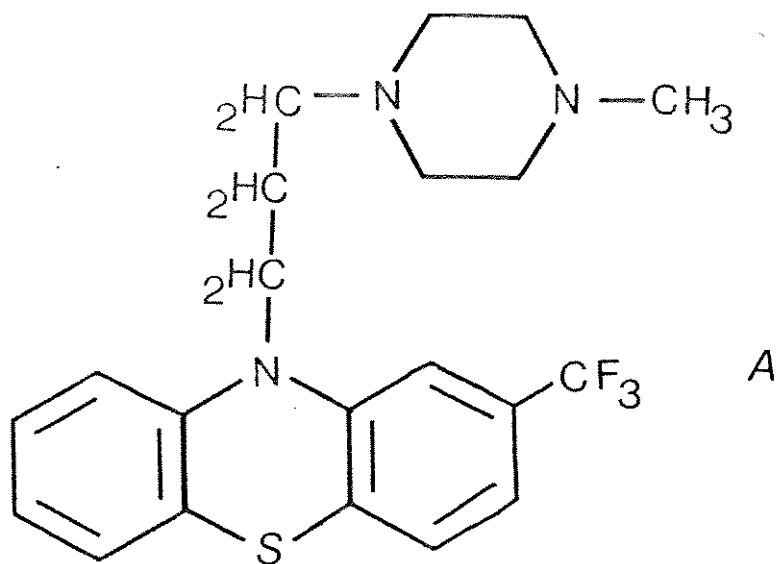
Em princípio, Ca^{2+} pode deixar a mitocôndria de três maneiras: por permeabilização inespecífica da membrana interna, por reversão do transportador e pela via de liberação específica Ca^{2+} /proton (ou Na^+). Permeabilização inespecífica e reversão da via de entrada são fenômenos pouco prováveis de acontecerem sob condições normais, mas podem tornar-se importantes durante isquemia e anoxia (BEATRICE et alli, 1980). Portanto, o cotransportador eletroneutro seria o único responsável por uma liberação de Ca^{2+} fisiologicamente relevante.

Liberação não específica de Ca^{2+} como uma consequência da perda da impermeabilidade da membrana interna é um fenômeno paralelo ao colapso do potencial de membrana, entrada de protons e inchamento mitocondrial de grande amplitude (BEATRICE et alli, 1980; VERCESI et alli, 1988).

Liberação de Ca^{2+} através da reversão da via de entrada ocorre quando o potencial de membrana cai abaixo de 130 mV (NICHOLLS, 1978), por exemplo, na presença de desacopladores. Colapso do potencial de membrana pode também ocorrer através do aumento inespecífico da permeabilidade da membrana interna.

A trifluoperazina, um antagonista de calmodulina usada na

clínica médica como neuroléptico (VALE et alli, 1983), protege patas de coelho contra lesão isquêmica em gangrena provocada por frio intenso (BEITNER et alli, 1989). Sabe-se que neste tipo de gangrena estão presentes espécies reativas de oxigênio (MANSON et alli, 1991). No esquema II são mostradas as estruturas químicas planas da trifluoperazina (A), diamida (B) e *t*-butilhidroperóxido (C).



ESQUEMA II

III- OBJETIVOS

Neste trabalho estudaremos os efeitos da trifluoperazina, em suspensão de mitocôndrias de fígado de rato tratada pelos prooxidantes diamida ou *t*-butilhidroperóxido e íons cálcio. A nossa hipótese inicial é de que esta droga possa proteger contra os danos provocados por estes prooxidantes e Ca^{2+} . Outros relatos da literatura que podem sustentar a idéia de que a droga possa proteger contra danos induzidos por prooxidantes e cálcio, é o fato de que ela protege contra a formação de pontes dissulfeto entre proteínas de membrana de eritrócitos (HOMES & PIETTE, 1970). Associando estas idéias, o nosso objetivo é usar a trifluoperazina para tentar conseguir evitar a formação das pontes de dissulfeto entre moléculas proteicas, e como conseqüência disto saber se podemos evitar a permeabilização da membrana mitocondrial e todos os fenômenos ligados a isto, tais como: colapso do potencial de membrana ($\Delta\Psi$), inchamento mitocondrial de grande amplitude, saída de Ca^{2+} e aparecimento de agregados proteicos.

BINDOLI e colaboradores (1977) demonstraram que a inibição da formação de pontes de dissulfeto pode evitar ou pelo menos retardar a lipoperoxidação em membranas. Baseado nestes dados, nós tentaremos verificar também se a Trifluoperazina pode proteger a membrana mitocondrial da lipoperoxidação induzida pelo complexo Citrato- Fe^{2+} .

2- MATERIAIS E MÉTODOS

I- OBTENÇÃO DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS:

A obtenção de mitocôndrias de fígado de rato foi baseada no método de SHNEIDER & HOGEBOOM modificado (1950).

Ratos Wistar de 4 a 6 meses pesando entre 200 - 250g e mantidos em jejum por 12 horas foram decapitados, sem injeção prévia de drogas, e o fígado retirado o mais rápido possível e depositado em uma solução contendo sacarose 250 mM, Hepes 2 mM, (pH = 7,2) e EGTA 0,5 mM num béquer em banho de gelo picado. Após o fígado ter sido triturado e lavado duas vezes com a mesma solução, procedeu-se à homogeneização com a solução citada anteriormente. O EGTA tem função de quelar o cálcio contaminante do meio e evitar os efeitos nocivos do íon durante o isolamento. O homogeneizado (obtido com homogeneizador Potter-Elvehjem) foi centrifugado por 5 minutos a 800 xg em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o sedimento novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. A mistura dos dois sobrenadantes foi centrifugada durante 10 minutos a 12.100 xg a 4°C. Nesta etapa aparece uma fina camada lipídica por cima do sobrenadante que foi removida com o auxílio de um pincel fino e de uma pipeta de Pasteur. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi resuspenso em sacarose 250 mM, tampão Hepes 1,0 mM (pH = 7,2) e EGTA 0,3 mM e novamente centrifugado por 10 minutos a 12.100 xg a 4°C. O sedimento resultante foi suspenso em meio de sacarose 250 mM, tampão Hepes 1,0 mM (pH = 7,2), mantido em banho de gelo e utilizado dentro das 6 horas subseqüentes para se evitar a inclusão, nos resultados, de

fatores ligados ao envelhecimento da preparação.

II- DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL:

A quantificação de organelas na suspensão obtida foi estabelecida em relação ao conteúdo total de proteínas, dosado segundo o método do biureto (GORNALL et alli, 1949), modificado pela adição de colato 1% (KAPLAN & PEDERSEN, 1983). Uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

III- MEIO DE INCUBAÇÃO:

O meio básico usado na incubação para as diferentes determinações em mitocôndrias de fígado de rato é composto de: sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 5 mM (pH = 7,2), rotenona 5 μ M.

IV- MEDIDA DA VARIAÇÃO DO VOLUME MITOCONDRIAL

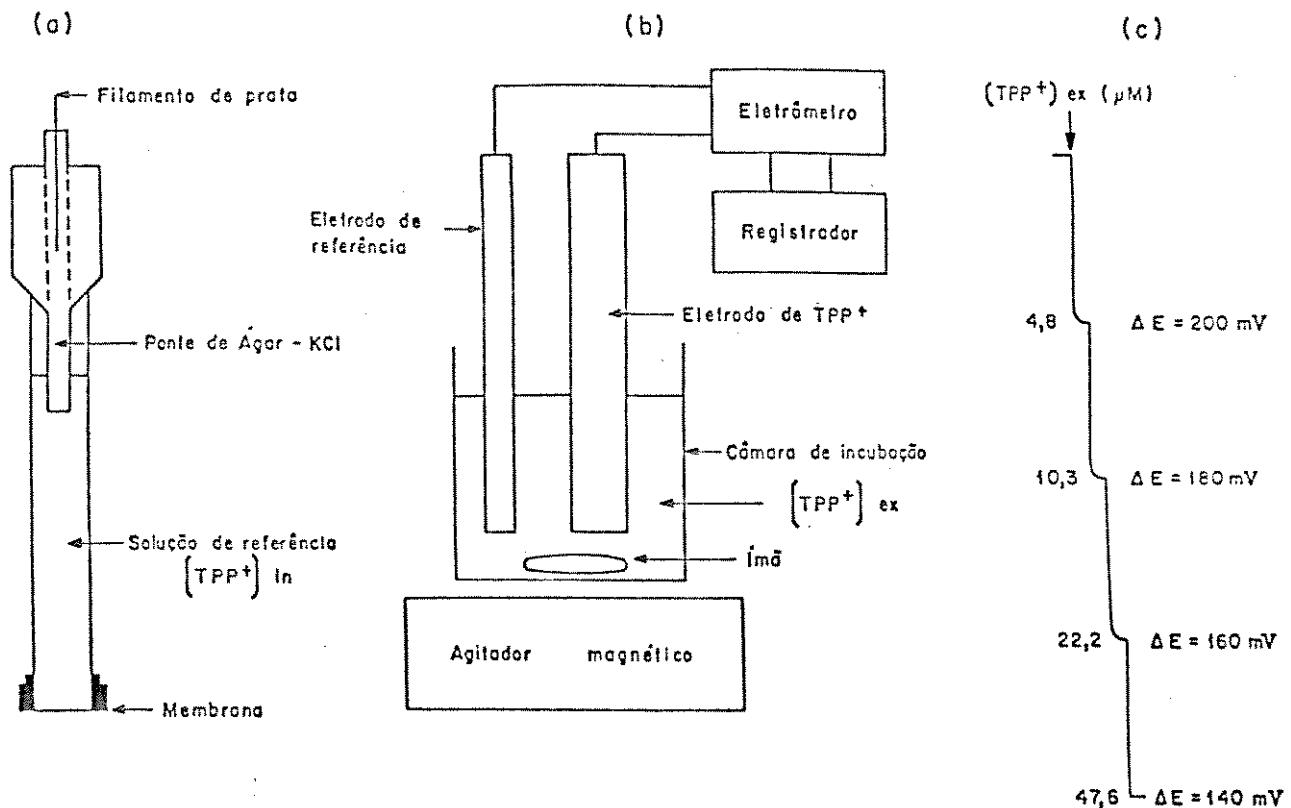
Em nossos experimentos usamos um espectrofotômetro SLM AMINCO DW 2000 ajustado para o comprimento de onda de 520 nm. Foi acoplado a este aparelho um PLOTTER para registrar as variações de volume mitocondrial, induzidas pelos prooxidantes diamida e *t*-butilhidroperóxido (*t*-butOOH) e o complexo citrato-Fe²⁺.

V- DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA:

Determinou-se o potencial de membrana a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP⁺) entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, usando-se um eletrodo específico construído em nosso laboratório de acordo com KAMO et alli (1979). Neste eletrodo utiliza-se uma membrana de cloreto de

polivinila (PVC), contendo tetrafenilborato (TPB) como trocador de íons. A membrana é preparada com a mistura de 3 ml de tetrafenilborato de sódio 10 mM, dissolvido em tetrahidrofurano com 10 ml de uma solução de cloreto de polivinila (PVC) 5% (p/v) contendo dioctilftalato 15% (v/v). A solução é colocada em uma placa de Petri (60 cm² de área) e deixada à temperatura ambiente para permitir a evaporação do solvente (tetrahidrofurano).

A membrana assim obtida é transparente e tem 0,15 a 0,2 mm de espessura. Com o auxílio do mesmo solvente empregado na obtenção da membrana, cola-se um fragmento da mesma à extremidade de um tubo de PVC (7 cm de comprimento/0,3 cm de diâmetro). Preenche-se o tubo com solução de TPP⁺ 10 mM, que servirá como solução de referência interna ($\langle \text{TPP}^+ \rangle_{in}$). Pela extremidade aberta do tubo introduz-se um outro tubo mais fino contendo em seu interior um fio de Ag/AgCl em contato com uma solução de ágar 1,5% (p/v) em KCl saturado, para viabilizar a captação do sinal produzido pelo eletrodo, conforme mostra o painel (a) do Esquema III. Antes do uso é necessário que a membrana seja ativada, mantendo-se o eletrodo por uma noite em solução de TPP⁺ 10 mM. A diferença de força eletromotriz (ΔE) entre o eletrodo de TPP⁺ e um eletrodo de referência [painel (b) do Esquema III] foi medida por um potenciômetro com um registrador conectado (UNIVERSAL POLAROGRAPH OH-105). As concentrações de TPP⁺ no meio de reação podem, então, ser monitoradas continuamente, e os valores de $\Delta \Psi$ calculados usando-se a equação abaixo:



ESQUEMA III: Esquema ilustrativo da montagem de um eletrodo de TPP^+ (a), diagrama da aparelhagem usada para medir o potencial elétrico de membranas em mitocôndrias (b) e curva de calibração do eletrodo (c).

ΔE = diferença de força eletromotriz.

$$\Delta\Psi = 2,3 \frac{R T}{F} \log \frac{(v)}{(V)} - 2,3 \frac{R T}{F} \log 10 \quad (F\Delta E / z,3RT - 1)$$

onde v, V e ΔE representam respectivamente o volume mitocondrial, volume do meio de reação e potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de TPP⁺ através da membrana do próprio eletrodo. Os valores de ΔE foram calculados pela equação:

$$\Delta E = 2,3 \frac{R T}{F} \log \langle \text{TPP}^+ \rangle_{\text{in}} / \langle \text{TPP}^+ \rangle_{\text{ex}}$$

onde, <TPP⁺>_{ex} refere-se à concentração de TPP⁺ no meio de reação e <TPP⁺>_{in} = 10 mM. Os sinais do eletrodo (ΔE) foram quantificados com auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de TPP⁺ ao meio de reação [painel (c) do Esquema III]. O volume mitocondrial considerado foi de 1,4 μl por mg de proteína mitocondrial segundo KAMO et alli (1979). Os valores obtidos desta maneira foram corrigidos de acordo com JENSEN et alli, 1986.

VI- DETERMINAÇÃO DOS MOVIMENTOS DE Ca²⁺ NO MEIO:

Variações das concentrações de Ca²⁺ livre no meio de reação foram determinadas por medidas no espectro de absorbância do Arsenazo III (SCARPA, 1979), usando o espectrofotômetro SLM AMINCO DW 2000 no par de comprimento de onda 675 - 685 nm.

VII- ELETROFORESE EM GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA

Amostras de suspensões mitocondriais com 500 μg de proteínas, incubadas por 10 minutos a 30°C em meio básico foram colhidas e

submetidas a um processo de 3 ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A seguir foi adicionado 1,5ml de H₂O deionizada, o material foi centrifugado por 2 minutos a 2000 xg em centrífuga Eppendorf Incibrás Spin I. O sedimento obtido foi resuspendido e novamente 1,5 ml de H₂O deionizada foi adicionado para nova centrifugação nas mesmas condições. Esses procedimentos tiveram por finalidade provocar o rompimento da membrana mitocondrial e liberação de proteínas da matriz. Após desprezar o sobrenadante, sedimento foi ressuspendido em 100 µl de solução contendo SDS 5%, Tris-HCl 250 mM pH 7,4, EDTA 10 mM e sacarose 1,25 M (Liu et alli, 1977). As amostras foram aquecidas a 100°C por 3 minutos e suas concentrações protéicas finais dosadas pelo método descrito por Lowry et alli (1951). Foram aplicadas 10 µg de proteínas ao gel de eletroforese, com 0,01% de azul de bromofenol como marcador de corrida. A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida-SDS em um sistema descontínuo como descrito por LAEMMLI (1970). O gel de resolução foi de 12% em acrilamida e o gel de empacotamento de 3,5%. A voltagem inicial foi de 100 mV; e logo que as amostras alcançavam o gel de resolução, a voltagem foi diminuída para 25 mV e as amostras eram deixadas por 12 horas à temperatura ambiente. O gel foi então corado com nitrato de prata como descrito por BLUM et alli (1987).

Após a coloração o gel foi secado à temperatura ambiente entre duas folhas de papel celofane, de acordo com a descrição de JUANG et alli (1984).

VIII- PRODUÇÃO DE LIPOPERÓXIDOS EM MEMBRANAS

A lipoperoxidação foi conseguida incubando a suspensão mitocondrial com 2 mM de citrato e, aos 2 minutos de reação adicionando 50 μ M de sulfato ferroso amoniacal $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2]$. Este último foi preparado poucos minutos antes de ser utilizado, para evitar sua oxidação natural a Fe^{3+} pelo oxigênio do ar segundo CASTILHO et alli (1992).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

I- EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRIFLUOPERAZINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} MAIS PROOXIDANTES EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS.

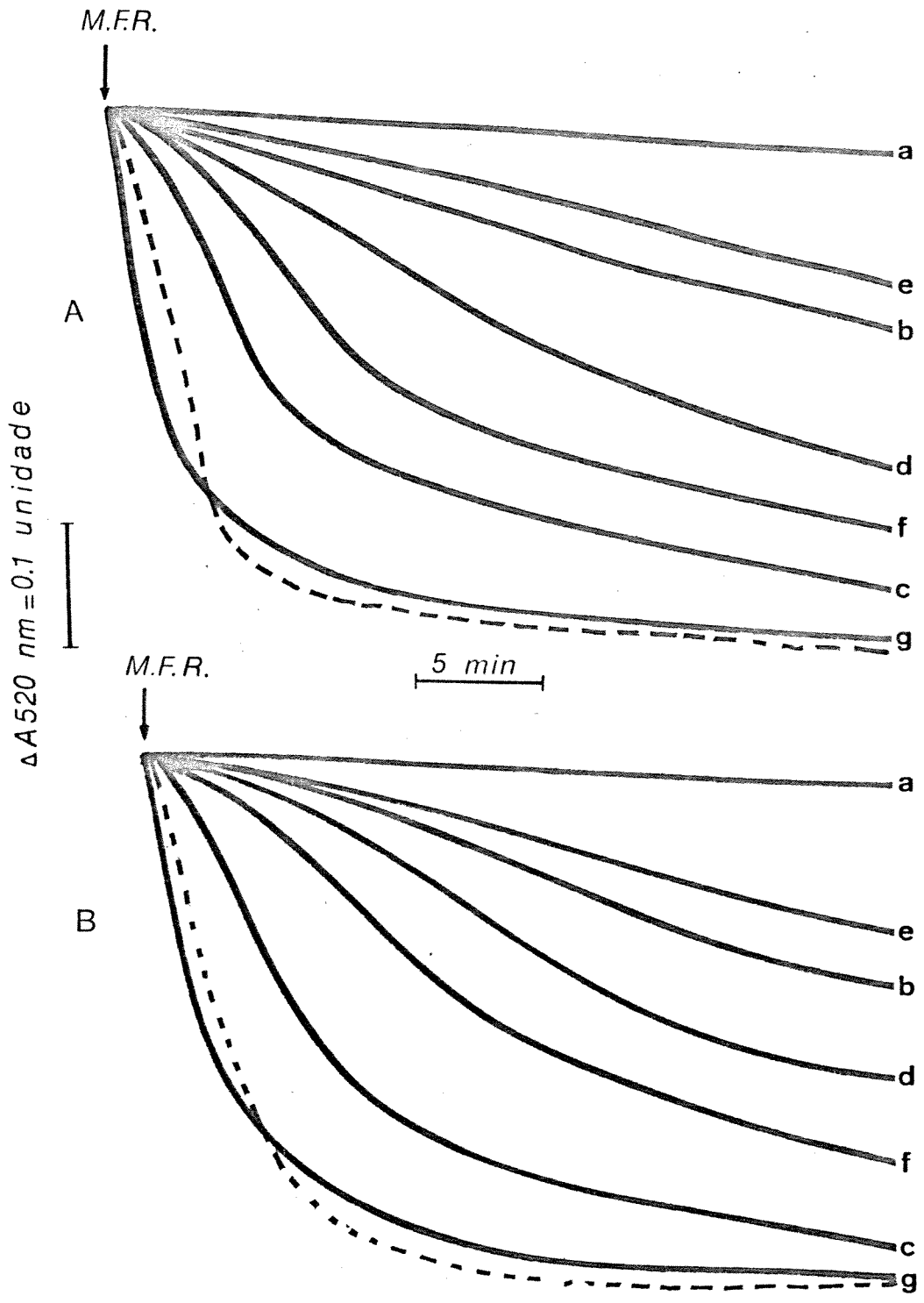
Sabe-se que diamida e *t*-butilhidroperóxido quando presentes em meio de incubação contendo mitocôndrias, mitoplastos ou partículas submitocondriais conduzem à queda do potencial de membrana e inchamento mitocondrial de grande amplitude (VERCESI et alli, 1988; FAGIAN et alli, 1990).

Os experimentos das figuras 1 e 2 mostram as diminuições de absorvância (inchamento mitocondrial) de suspensões mitocondriais energizadas e desenergizadas, respectivamente. Estas primeiras foram incubadas na presença ou ausência de 10 μM de Ca^{2+} (contaminante do meio), 300 μM de *t*-butilhidroperóxido (painel A) ou 300 μM de diamida (painel B) e diferentes concentrações de trifluoperazina. A linha *a* mostra que nenhum inchamento ocorre na ausência de Ca^{2+} e prooxidantes. A linha *b* indica a existência de uma velocidade lenta de inchamento na presença de Ca^{2+} contaminante somente, mas o traçado *c* ilustra a ocorrência de um rápido e extensivo inchamento quando Ca^{2+} contaminante e um prooxidante estavam presentes simultaneamente. Linhas *d* e *e* mostram um grau crescente de inibição na velocidade e extensão do inchamento mitocondrial quando a concentração de trifluoperazina no meio aumenta de 15 para 35 μM , respectivamente. Entretanto, a linha *f* indica que quando a concentração da droga é aumentada para 45 μM , a inibição do inchamento diminui. Isto pode sugerir que, em

Figura 1- Efeito da concentração de trifluoperazina sobre o inchamento mitocondrial induzido por *t*-butilhidroperóxido, diamida e cálcio contaminante em mitocôndrias energizadas.

Proteína mitocondrial 0,5 mg/ml foi incubada em meio básico pH = 7,2 contendo succinato 2 mM (30°C). Painel A: a) EGTA 1 mM; b) cálcio contaminante 10 μ M; c) *t*-butilhidroperóxido 300 μ M + cálcio contaminante; d) experimento c + trifluoperazina 15 μ M; e) experimento c + trifluoperazina 35 μ M; f) experimento c + trifluoperazina 45 μ M; g) experimento c + trifluoperazina 250 μ M. A linha tracejada corresponde a trifluoperazina 250 μ M na ausência de íons cálcio e *t*-butilhidroperóxido.

Painel B: As mesmas adições anteriores, sendo que o *t*-butilhidroperóxido foi substituído por diamida 300 μ M.



concentrações mais altas, trifluoperazina *per se* danifica a membrana mitocondrial. Isto é confirmado pelos experimentos da linha g indicando que numa concentração de 250 μM , a droga não só aumenta o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} mais um prooxidante, como ela induz (tanto nas condições energizadas e desenergizadas), *per se*, um swelling mitocondrial de grande amplitude (linha tracejada da figura 2). Este efeito de altas concentrações de trifluoperazina está de acordo com resultados anteriores da droga em outras membranas (LUCCHESI & SHEID, 1986) e na membrana interna mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* (VERCESI et alli, 1991). Nós acreditamos que este fenômeno esteja ligado à mudança tridimensional, pela droga, de proteínas de membrana que constituam poros que controlem a entrada e saída de íons da organela. A mudança nestas proteínas deve alterar o controle delas sobre a passagem de íons, causando uma rápida entrada destes na organela e como consequência um grande inchamento desta.

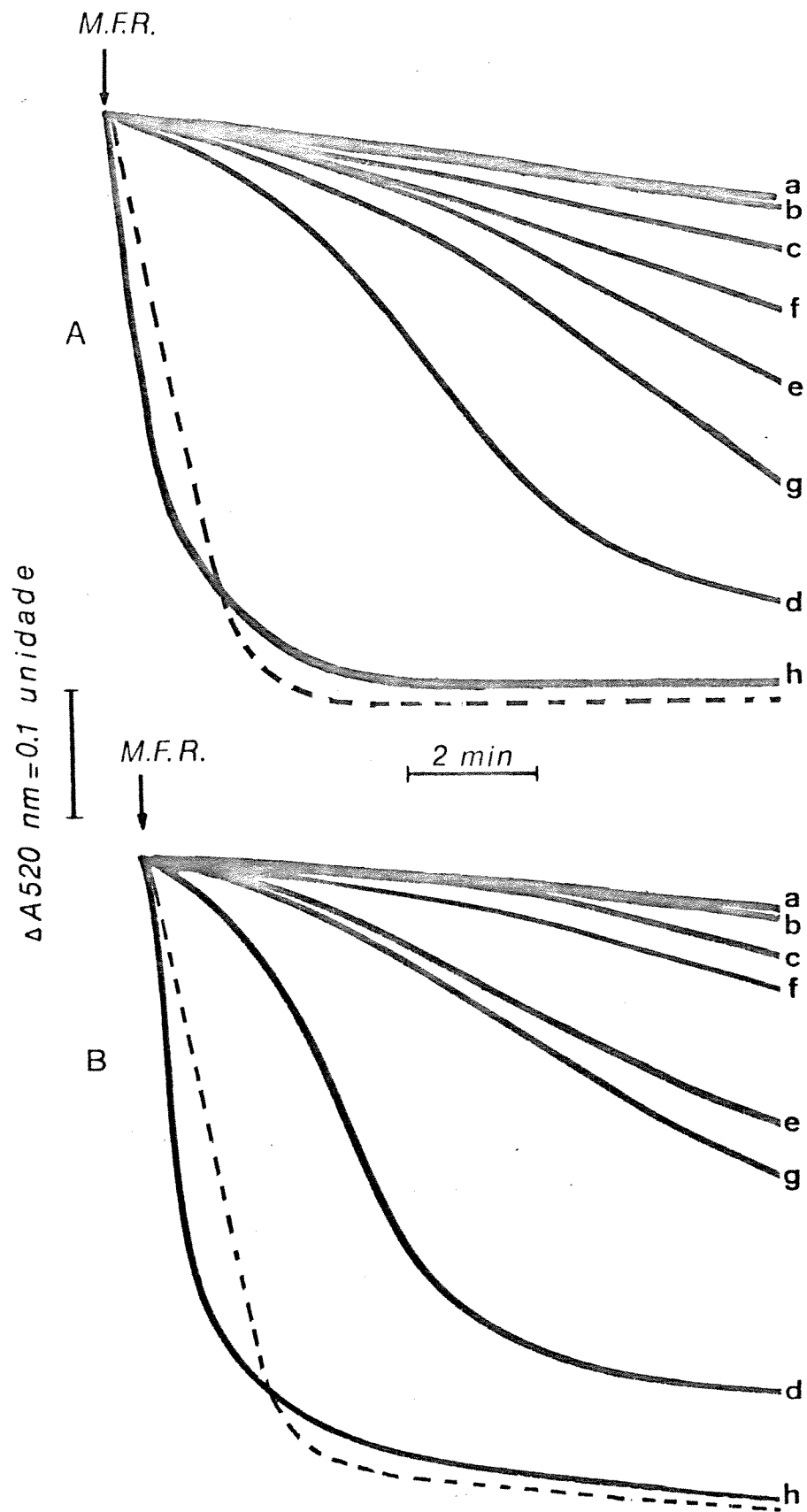
II- EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRIFLUOPERAZINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR Ca^{2+} MAIS PROOXIDANTES EM MITOCÔNDRIAS DESENERGIZADAS.

O uso de mitocôndrias desenergizadas para estudar o mecanismo de permeabilização da membrana por Ca^{2+} mais prooxidantes tem a vantagem de eliminar o envolvimento da respiração, mudanças no potencial de membrana e o efluxo e influxo do cátion através da membrana mitocondrial interna. Pelo fato de não existir potencial de membrana na mitocôndria desenergizada, o influxo de Ca^{2+} deve ser dirigido por um gradiente do cátion através da membrana

Figura 2- Efeito da concentração de trifluoperazina sobre o inchamento mitocondrial induzido por *t*-butilhidroperóxido, diamida e cálcio em mitocôndrias desenergizadas.

Proteína mitocondrial foi incubada 0,5 mg/ml em meio básico contendo Antimicina A 50 µg/ml (30°C). Painel A: a) EGTA 1 mM ; b) *t*-butilhidroperóxido 300 µM; c) cálcio 300 µM; d) cálcio 300 µM + *t*-butilhidroperóxido 300 µM; e) experimento d + trifluoperazina 15 µM; f) experimento d + trifluoperazina 35 µM; g) experimento d + trifluoperazina 45 µM; h) experimento d + trifluoperazina 250 µM. A linha tracejada corresponde a trifluoperazina 250 µM na ausência de íons cálcio e *t*-butilhidroperóxido.

Painel B: As mesmas adições anteriores, sendo que o *t*-butilhidroperóxido foi substituído por diamida 300 µM.



interna da organela (VERCESI & HOFFMANN, 1992). O experimento d da figura 2 mostra que a velocidade de inchamento de uma suspensão mitocondrial desenergizada, incubada na presença de 300 μM de Ca^{2+} mais 300 μM de *t*-butilhidroperóxido (painel A) ou 300 μM de diamida (painel B), foi extensa e rápida. Na ausência do cátion ou do prooxidante não é visto grandes alterações (linhas b e c, respectivamente). Adições de trifluoperazina nas concentrações de 15 a 35 μM inibiram o inchamento mitocondrial de maneira crescente. A partir de 45 μM a droga diminui seu poder protetor. Quando a concentração dela é aumentada para 250 μM , ela promove inchamento mitocondrial rápido e de grande amplitude. Isto é também observado mesmo na ausência do prooxidante mais Ca^{2+} .

A etapa seguinte deste trabalho foi averiguar se o efeito inibidor do inchamento seria por impedir a entrada do íon cálcio para o interior da organela, como é observado para o vermelho de rutênio (VASINGTON et alli, 1972; POZZAN et alli, 1977).

III- O EFEITO DA TRIFLUOPERAZINA NA ESTIMULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR PROOXIDANTES.

A figura 3 mostra que quando mitocôndrias são adicionadas a um meio de reação contendo succinato na presença de rotenona e 10 μM de Ca^{2+} (contaminante do meio de reação), uma rápida diminuição na concentração do cátion era observada imediatamente e continuou até que a concentração do íon fosse pouco menos que 1,0 μM . Na ausência de prooxidantes (linha a) o cálcio acumulado foi retido pela mitocôndria durante o tempo de observação (10 min). Porém na presença de diamida (linha b) ou *t*-butilhidroperóxido (linha c), todo o Ca^{2+} acumulado, mais o presente na organela (5 - 10 n

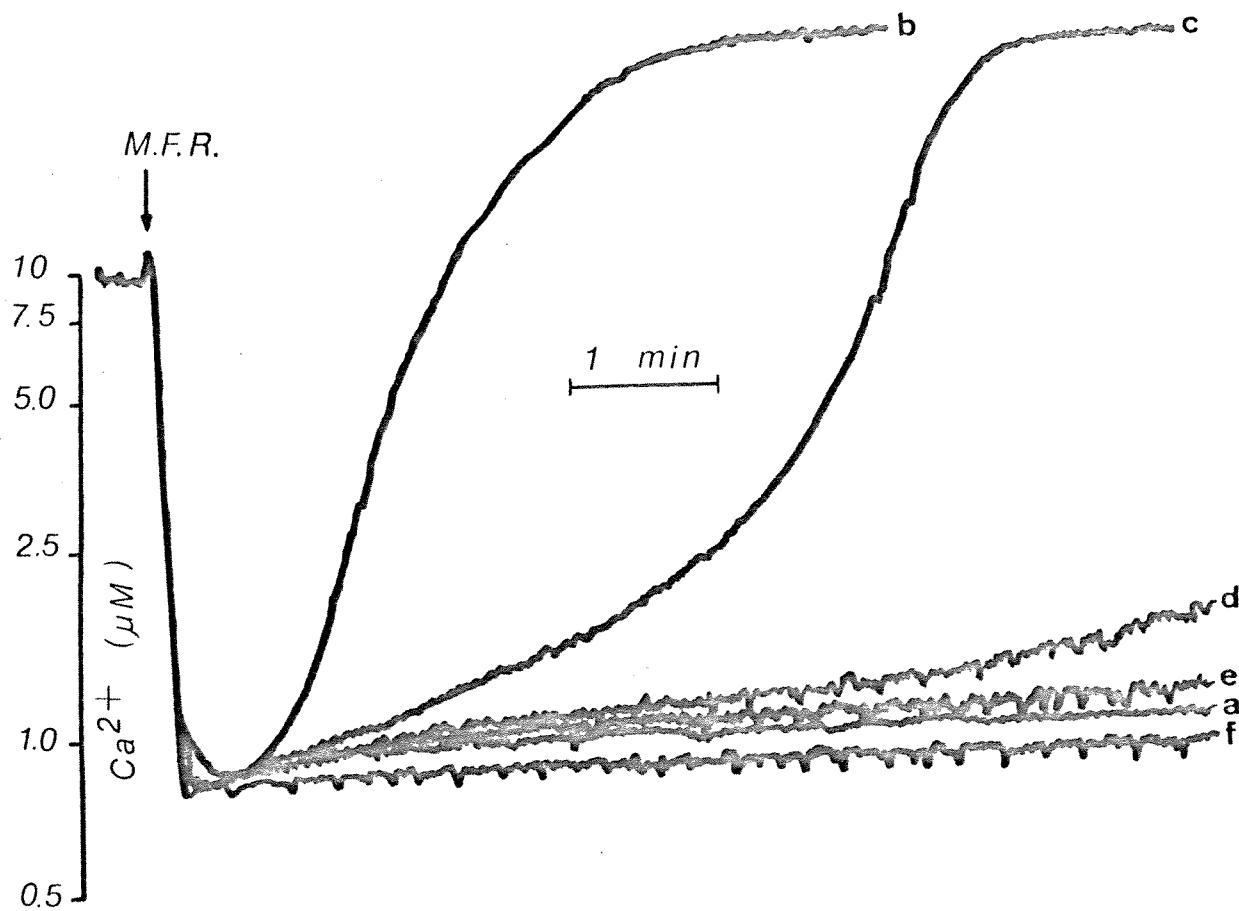


Figura 3: Efeito de trifluoperazina sobre a liberação de cálcio de mitocôndria de fígado de rato induzida por prooxidantes e Ca^{++} contaminante.

As reações foram iniciadas pela adição de 2,0 mM de succinato a 2,5 ml de meio básico. Controle sem adição de EGTA.

a) Ca^{++} contaminante 10 μM ; b) diamida 300 μM ; c) *t*-butOOH 300 μM ; d) experimento b + trifluoperazina 35 μM ; e) experimento c + trifluoperazina 35 μM ; f) experimento a + trifluoperazina 35 μM .

mol/mg), foi liberado depois de um período de aproximadamente 5 e 8 min, respectivamente. Esta liberação de cálcio mitocondrial foi quase completamente abolida por trifluoperazina 35 μM no caso da diamida (linha d) e completamente abolida no caso de t-butilhidroperóxido (linha e). A linha f mostra um experimento feito na ausência de prooxidantes e na presença de 35 μM de trifluoperazina indicando que, nesta concentração, a droga não afeta nem a velocidade nem a extensão da acumulação de Ca^{2+} pela mitocôndria. Este resultado claramente elimina a possibilidade de que a ação protetora da TFP no dano mitocondrial sob estas condições seja devido à inibição do acúmulo do cátion pela organela (VALE et alli, 1983).

Surgiu então a dúvida de que a TFP poderia estar quelando o Ca^{2+} do meio, exercendo assim um efeito semelhante ao EGTA, que é capaz de reverter o potencial de membrana colapsado nas nossas condições experimentais (PARENTONI, 1991). Fizemos então, os protocolos dos experimentos seguintes para solucionar este problema.

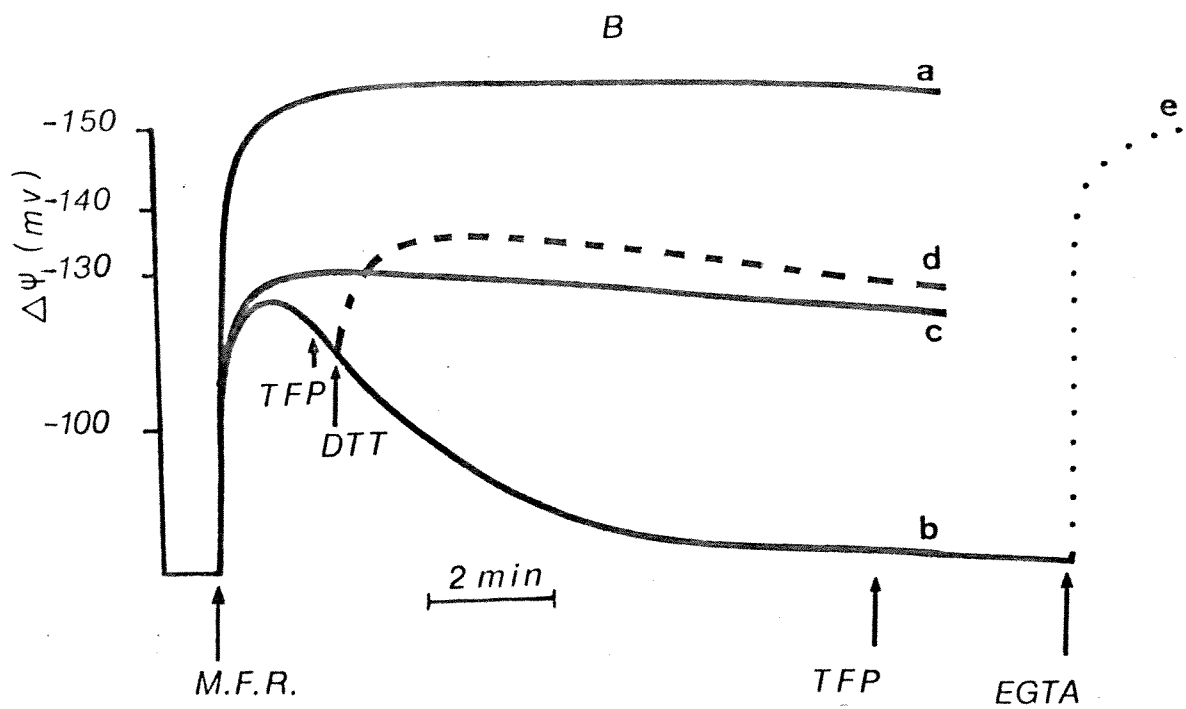
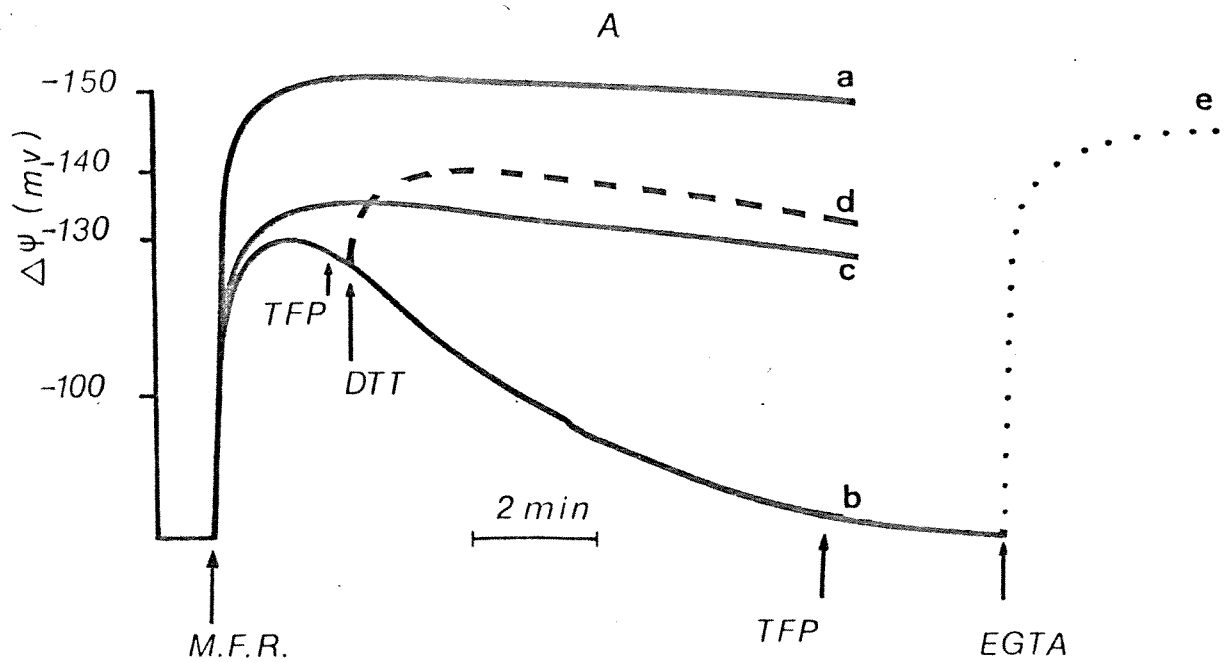
IV- EFEITO DA TRIFLUOPERAZINA SOBRE A QUEDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA INDUZIDO POR Ca^{2+} MAIS PROOXIDANTES.

Os experimentos anteriores (Figs. 1 a 3) indicam que trifluoperazina diminui os efeitos deletérios do cálcio na mitocôndria em concentrações as quais não inibe nem a respiração nem a captação do íon (PEREIRA et alli, 1992). Isto sugere que trifluoperazina pode prevenir a permeabilização da membrana mitocondrial interna induzida por Ca^{2+} e prooxidante que é seguida

Figura 4: Efeito de trifluoperazina na queda do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) induzida por prooxidantes e Ca^{++} contaminante $10 \mu\text{M}$.

Foi incubado 1 mg de proteína mitocondrial em 1,0 ml de meio básico (30°C) contendo succinato 2 mM pH = 7,2. Paineis A: a) Ca^{++} contaminante $10 \mu\text{M}$; b) experimento a + *t*-butOOH $300 \mu\text{M}$; c) experimento b + trifluoperazina $35 \mu\text{M}$; d) experimento b + ditionitrosol (DTT) adicionado onde indicado pela seta; e) experimento b + EGTA 1 mM adicionado onde indicado pela seta. As adições de trifluoperazina (TFP) foram feitas em condições idênticas ao experimento b. A primeira adição foi aos 2 minutos de incubação. A segunda adição foi aos 10 minutos de incubação. Estas duas foram em experimentos diferentes.

Painel B: As mesmas adições anteriores, sendo que o *t*-butilhidroperóxido foi substituído por diamida ($300 \mu\text{M}$).



pelo inchamento mitocondrial e queda do potencial de membrana. Esta possibilidade foi avaliada por medidas do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). A Figura 4 contém os resultados dos experimentos onde o $\Delta\Psi$ de mitocôndria de fígado de rato, tendo como substrato succinato, foi determinado em meio contendo Ca^{2+} mais *t*-butilhidroperóxido (painel A) ou diamida (painel B) na presença ou ausência de trifluoperazina. A linha *a*, obtida na presença de somente cálcio, mostra que um $\Delta\Psi$ da ordem de 150 mV foi estabelecido e mantido durante o tempo de observação. A linha *b* mostra que diamida (ou *t*-butilhidroperóxido) diminui e não mantém significativamente o valor de $\Delta\Psi$. Além disso, é mostrado que adições de ditioneitol (DTT) (traçado *d*), antes de um completo colapso do $\Delta\Psi$, ou de EGTA (traçado *e*) depois do $\Delta\Psi$ já estar completamente colapsado, causou restauração do potencial de membrana mitocondrial quando usado nas nossas condições experimentais (PARENTONI, 1991). Linha *c* mostra que, embora na presença de trifluoperazina, $\Delta\Psi$ não alcançou os valores do experimento controle, a presença da droga preveniu o colapso causado pela diamida (ou *t*-butilhidroperóxido) na presença de cálcio. Entretanto, as adições de trifluoperazina em diferentes pontos, nas mesmas condições do experimento *b*, não foram efetivas para reverter o efeito de Ca^{2+} mais um prooxidante no $\Delta\Psi$. Isto indica que a natureza do efeito da trifluoperazina neste mecanismo é diferente daqueles do ditioneitol e EGTA.

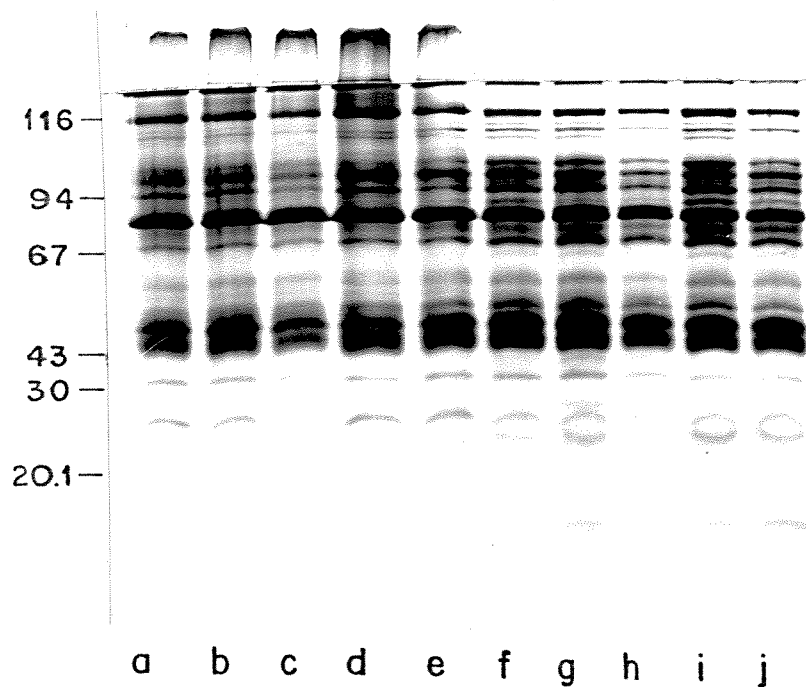


Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS de proteínas de membrana de mitocôndria de fígado de rato.

Amostras de 10 μg de proteína foram aplicadas a um gel de resolução a 12,5% (tampão descontínuo) depois de 10 min de incubação a 30°C na presença de cálcio contaminante 10 μM (a); experimento a + t-butOOH 300 μM (b); experimento b + trifluoperazina 35 μM (c); experimento a + diamida 300 μM (d); experimento d + trifluoperazina 35 μM (e). As amostras f - j correspondem às amostras a - e previamente misturadas com 0,5 % de β -mercaptoetanol antes delas serem aplicadas no gel. As amostras foram colhidas em condições idênticas às da figura 2.

V- EFEITO DA TRIFLUOPERAZINA NA PRODUÇÃO DE AGREGADOS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR Ca^{2+} MAIS PROOXIDANTES.

Este laboratório mostrou anteriormente (FAGIAN et alli, 1990), que a permeabilização da membrana mitocondrial interna por Ca^{2+} e prooxidantes está associada com a formação de agregados proteicos, devido à produção de ligações cruzadas entre grupos sulfidrilas de diferentes proteínas de membrana como indicado por eletroforese em gel de poliacrilamida. Com a finalidade de assegurar se o efeito protetor da trifluoperazina nos danos da membrana causados por prooxidantes mais Ca^{2+} podia estar relacionado com este processo de polimerização de proteínas, nós fizemos eletroforeses de proteínas de membrana mitocondrial tratadas com Ca^{2+} e prooxidantes na presença ou ausência da droga. A figura 5 mostra os resultados da eletroforese quando amostras foram colhidas depois de incubação sob as condições descritas na figura 4. Poços a, b e d mostram bandas de proteínas obtidas na presença somente de Ca^{2+} contaminante (experimento controle), Ca^{2+} contaminante mais *t*-butilhidroperóxido e Ca^{2+} contaminante mais diamida, respectivamente. Pode ser visto que na presença de prooxidantes ocorre aumento na quantidade de proteínas de alto peso molecular (maiores que 116 KDa) que aparecem na parte superior do gel de resolução. No caso da diamida isto é mais pronunciado e uma banda de proteína que não entra no gel de resolução aparece no gel de empacotamento (poço d). É visto nos poços c e e que a trifluoperazina diminui a produção destas proteínas de alto peso molecular, onde *t*-butilhidroperóxido ou diamida estavam presentes, respectivamente. Poços f-j são

idênticos aos α - e respectivamente, exceto que as amostras dos poços f - j foram misturados com β -mercaptoetanol 0,5% antes de serem aplicadas no gel. É observado que este tratamento elimina todas as bandas de proteínas com mais de 116 KDa, indicando que elas eram agregados que resultaram de ligações cruzadas entre grupos sulfidrilas. Nós supomos que o fato de algumas proteínas desaparecerem depois do tratamento com β -mercaptoetanol, seja devido elas possuírem grupamentos que não se coram pela prata, o que não ocorre quando as mesmas estão sob a forma de agregados proteicos. O poço α (somente cálcio) mostra a presença de algumas proteínas no gel de empacotamento. Isto pode ser explicado com base numa estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio por parte da mitocôndria em resposta a um acúmulo de cálcio (CHACON & ACOSTA, 1991). Isto pode explicar os efeitos deletérios do cálcio, em concentrações mais altas, e a inibição por trifluoperazina do inchamento mitocondrial induzido pelo íon (STRZELECKI et alii, 1989). Aqui nós também propomos que Ca^{2+} estimula a produção de agregados proteicos por prooxidantes devido à sua ligação a certas proteínas de membranas. Esta ligação induziria mudanças conformacionais nestas proteínas, diminuindo a distância crítica entre grupos sulfidrilas adjacentes e favorecendo a formação de dissulfetos intercadeia. Com base neste raciocínio, nós propomos que trifluoperazina diminui a produção destas pontes cruzadas de dissulfeto, sob estas condições experimentais, pelo fato da droga induzir mudanças nas proteínas de membrana, convertendo grupos -SH de "superfície" em tióis "interiorizados", como descrito por HOMES & PIETTE em 1970. Isto

preveniria a probabilidade de polimerização de proteínas e as alterações na estrutura de membrana protegendo a mitocôndria que estivesse sujeita aos efeitos deletérios do cálcio sob condições de estresse oxidativo.

Com este trabalho é possível sugerir o provável mecanismo desta droga *in vivo*. Agentes oxidantes de tióis, tais como diamida ou DIP [(Ácido diazenodicarboxílico bis (N' - metilpiperazina)], usados em concentrações bem inferiores a 1×10^{-4} M. causam um aumento de 40 vezes ou mais no potencial de placa motora. Isto significa que existe uma função para o aumento da concentração de pontes de sulfeto no processo de liberação de neurotransmissores (WERMEN et alli, 1971; KOSOWER & WERMEN, 1971; CARLEN et alli, 1976 a,b). Sabe-se que a transmissão do estímulo de um nervo para outro é devida à aderência de vesículas à membrana plasmática do neurônio e com a conseqüente liberação do conteúdo do interior destas vesículas para a placa motora. Atribuiu-se à formação de pontes de sulfeto intercadeia a responsável por tal aderência numa dinâmica normal do organismo. A TFP é uma droga que inibe o efeito de formação de pontes dissulfeto induzidas pelo prooxidante diamida, como foi visto nos resultados apresentados nesta tese. Além disto, é largamente usada na clínica médica como neuroléptico, ou seja, inibe a transmissão do impulso nervoso. Sugerimos então que a TFP tem seu mecanismo neuroléptico baseado na inibição da formação destas pontes dissulfeto.

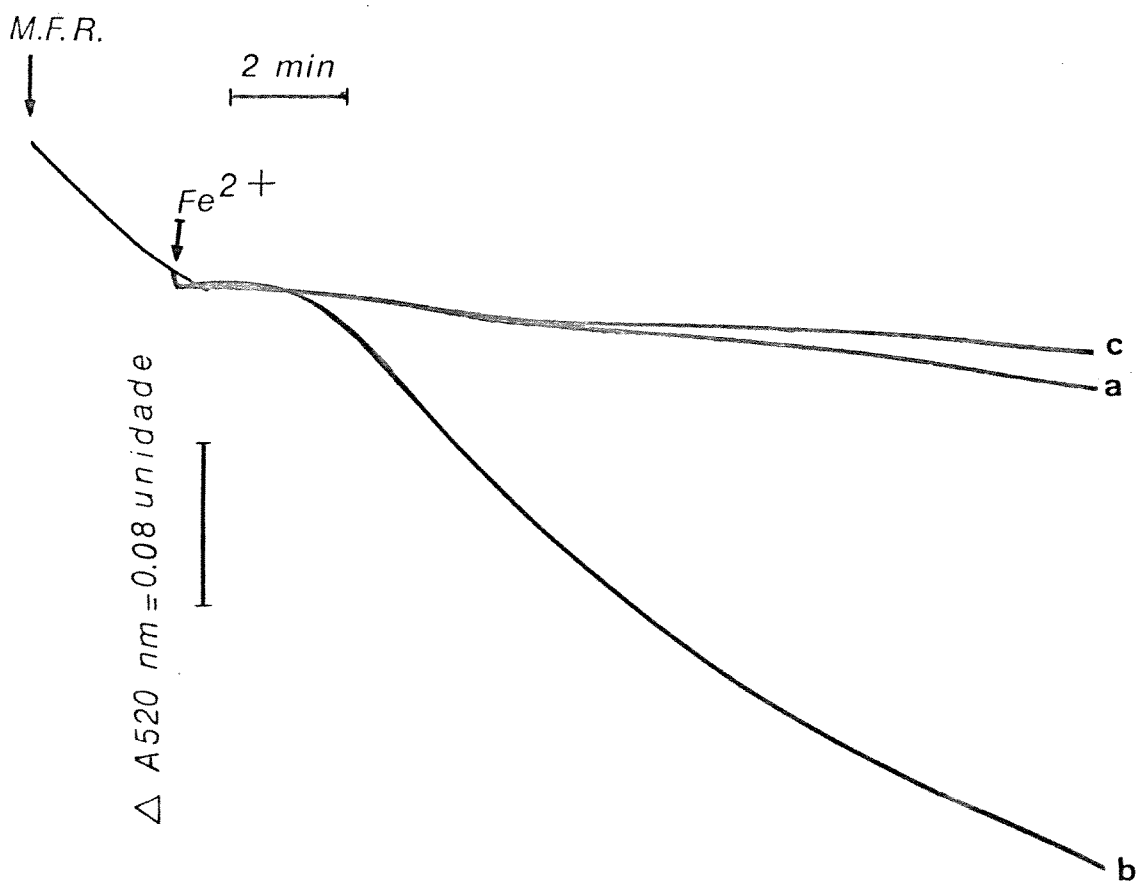


Figura 6- Efeito da concentração de trifluoperazina sobre o inchamento mitocondrial induzido pelo complexo citrato-Fe²⁺ em mitocôndrias energizadas

Proteína mitocondrial 0,5 mg/ml foi incubada em meio básico contendo succinato 2 mM (30°C) . a) citrato 2 mM; b) experimento a + Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ 50 μM aos 2 minutos de reação; c) Foi idêntico ao b mais adição de trifluoperazina na concentração de 35 μM.

VI - EFEITO DA TRIFLUOPERAZINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO PELO COMPLEXO CITRATO-Fe²⁺ EM MITOCONDRIAS ENERGIZADAS.

De acordo com Bindoli e colaboradores (1977), quando se inibe a formação de S-S entre proteínas de membrana, pode-se evitar ou pelo menos retardar a lipoperoxidação em membranas. Associando os resultados obtidos nos experimentos anteriores nós fomos estimulados a verificar se a droga protegeria a oxidação de lipídeos da membrana da mitocôndria.

Foi mostrado por este laboratório que o complexo citrato-Fe²⁺ induz permeabilização da membrana mitocondrial, devido à oxidação de lipídeos, sendo observado inchamento mitocondrial e queda do potencial de membrana (CASTILHO et alii, 1992).

A linha α da figura 6 mostra o padrão de inchamento mitocondrial induzido pelo complexo citrato-Fe²⁺. Na ausência de Fe²⁺ não é observado diminuição na absorbância (linha α). Quando a suspensão mitocondrial é incubada com TFP 35 μ M nas condições experimentais de β , nota-se que o inchamento mitocondrial não ocorre e mesmo a pequena queda de absorbância observada no controle é diminuída.

VII - EFEITO DA TRIFLUOPERAZINA NA QUEDA DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$) INDUZIDO PELO COMPLEXO CITRATO-Fe²⁺.

Os experimentos feitos anteriormente sugerem que a TFP pode prevenir a queda do potencial de membrana ($\Delta\Psi$). Esta hipótese foi

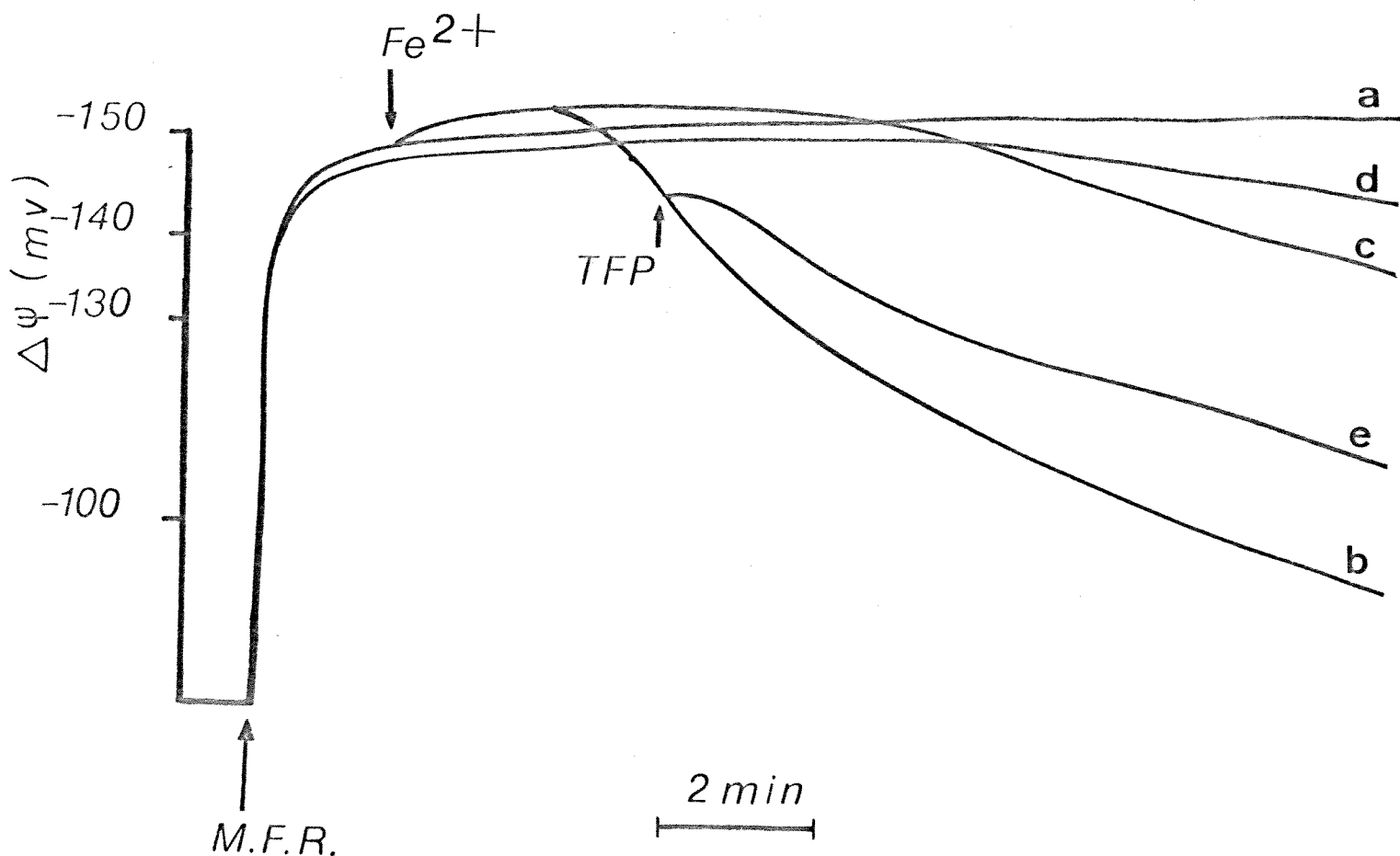


Figura 7: Efeito de trifluoperazina no colapso do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) induzido pelo complexo citrato- Fe^{2+} .

Foi incubado 1 mg de proteína mitocondrial em 1,0 ml de meio básico (30°C), contendo succinato (2 mM (pH- 7,2)). a) citrato (2 mM); b) citrato (2 mM + $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (50 μM) aos 2 minutos de reação; c) as mesmas condições de b) mais trifluoperazina 35 μM ; d) trifluoperazina 35 μM + citrato (2 mM) sem adição de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (50 μM); e) trifluoperazina 35 μM adicionada no ponto indicado pela seta.

demonstrada por medidas do $\Delta\Psi$. Na linha *a* da figura 7 é visto que suspensões mitocondriais conseguem estabelecer e manter um $\Delta\Psi$ da ordem de 150 mV na presença de Ca^{2+} contaminante e citrato 2 mM. A linha *b* mostra que quando Fe^{2+} é adicionado, aos 2 minutos de reação nas mesmas condições de *a*, ocorre queda do potencial de membrana de 150 para 100 mV. A linha *c* mostra que esta queda do $\Delta\Psi$ não é observada quando TFP (35 μM) está presente no meio de reação e que diferente do que foi observado na figura 4, $\Delta\Psi$ alcançou os valores do experimento controle. A linha *d* representa incubação com TFP nas condições da linha *a*, indicando que a droga alterou pouco o controle. Em *e* a droga foi adicionada onde indicado pela seta (aproximadamente 2 minutos depois de iniciada a queda do $\Delta\Psi$) havendo uma recuperação da ordem de cerca de 20 mV.

Baseado nestes dados nós propomos que o possível mecanismo de proteção desta droga no caso de certas patologias como gangrena provocada por frio intenso, seja por impedir a formação de S-S entre proteínas de membranas biológicas.

4- CONCLUSÕES

1- A trifluoperazina inibe o inchamento mitocondrial induzido por cálcio mais um prooxidante nas concentrações de 15 a 35 μM . A partir de 100 μM (neste trabalho mostramos apenas o experimento realizado com 250 μM de TFP), este fenotiazínico começa a provocar dano mitocondrial mesmo na ausência do cátion e do prooxidante. Nós acreditamos que isto se deva à desestabilização, pela droga das proteínas que constituem os poros controladores da passagem de íons para o interior e exterior da organela. Os resultados observados para suspensões mitocondriais desenergizadas foram semelhantes àqueles obtidos para mitocôndrias energizadas.

2- Este fenotiazínico na concentração de 35 μM inibe a liberação de cálcio induzido por prooxidantes, mas permite a entrada do cátion. Isto explica que a inibição do inchamento mitocondrial, pela droga, não é por impedir a entrada do íon na organela como se pensava anteriormente (VALE et alli, 1983).

3- A droga na concentração de 35 μM inibe o colapso do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) induzido por cálcio mais um prooxidante. Isto é devido ao fato da trifluoperazina prevenir a permeabilização da membrana mitocondrial interna por estes agentes.

4- A eletroforese de proteínas de membrana mitocondrial solubilizadas em gel de poliacrilamida mostra que a trifluoperazina na concentração de 35 μM , diminui a formação de pontes cruzadas dissulfeto intercadeia. Ela deve mudar a conformação tridimensional de algumas proteínas de membrana, convertendo grupos -SH de "superfície" em tióis "interiorizados",

como descrito por HOMES & PIETTE em 1970 para membranas de eritrócito. Isto previniria a polimerização de proteínas e as alterações na estrutura de membrana, protegendo a mitocôndria que estivesse sujeita aos efeitos deletérios do cátion sob condições de estresse oxidativo.

5- A trifluoperazina, na concentração de 35 μM , protege suspensões mitocondriais contra danos provocados pelo complexo citrato- Fe^{2+} na membrana interna. Isto talvez seja devido ao fato de que quando se inibe a formação de S-S entre proteínas de membrana, pode-se evitar ou pelo menos retardar a formação de peróxidos lipídicos nas membranas (BINDOLI et alli, 1977).

5- BIBLIOGRAFIA

AKERMAN, K. Effect of pH and Ca^{2+} on the retention of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 189, 256 - 262, 1978a.

AKERMAN, K. Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. Biochim. Biophys. Acta 502, 359 - 366, 1978b.

BEATRICE, M.C.; PALMER, J.W. & PFEIFFER, D.R. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca^{2+} by mitochondria. J. Biol. Chem. 255, 8663 - 8671, 1980.

BEITNER, R.; CHEN-ZION, M.; SOFER-BASSAUKEVITZ, Y.; MORGENSTERN, H. & BEN-PORAT, H. Treatment of frostbite with the calmodulin antagonists thioridazine and trifluoperazine. Gen. Pharmac. 20, 641 - 646, 1989.

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, 11558 - 11562, 1982-a.

BELLOMO, G.; JEWELL, S.A.; THOR, H. & ORRENIUS, S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6842 - 6846, 1982-b.

BELLOMO, G.; MARTINO, A.; RICHELMI, P.; MOORE, G.A.; JEWELL, S.A. & ORRENIUS, S. Pyridine nucleotide oxidation, Ca^{2+} cycling and membrane damage during tert-butyl hydroperoxide metabolism by rat-liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 140, 1 - 6, 1984.

BINDOLI, A.; CAVALLINI, L. & SILIPRANDI, N. Effect of thiols oxidation on lipid peroxidation in rat liver mitochondria. Chem. Biol. Interactions. 19, 383 - 386, 1977.

BLAUSTEIN, M.P.; RATZLAFF, R.W. & KENDRICK, N.K. The regulation of intracellular calcium in presynaptic nerve terminals. Ann. N. Y. Acad. Sci. 308, 195 - 211, 1978.

BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93 - 99, 1987.

CARAFOLI, E.; TIOZZO, R.; LUGLI, G. CROVETTI, F. & KRATZING, C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J.

Molec. Cell. Cardiol. 6, 361 - 371, 1974.

CARLEN, P.L.; KOSOWER, E.M. & WERMAN, R. The thiol-oxidizing agent diamide increases transmitter release by decreasing calcium requirements for neuromuscular transmission in the frog. Brain Res. 117, 257 - 276, 1976 a.

CARLEN, P.L.; KOSOWER, E.M. & WERMAN, R. Diamide acts intracellularly to enhance transmitter release: the differential permeation of diamide, DIP, DIP +1, DIP +2 across the nerve terminal membrane. Brain Res. 117, 277 - 286, 1976 b.

CASTILHO, R.F.; HERMES-LIMA, M.; MEINICKE, A.R. & VERCESI, A.E. Citrato(ATP)-Fe²⁺ induced lipid peroxidation of rat liver mitochondrial membranes. Anais da XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica. Caxambú, M.G. (impressão).

CHACON, E. & ACOSTA, D. Mitochondrial Regulation of Superoxide by Ca²⁺: An alternative mechanism for the cardiotoxicity of doxorubicin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 107, 117 - 128, 1991.

COELHO, J.L.C. & VERCESI, A.E. Retention of Ca²⁺ by rat liver mitochondria: effect of phosphate, Mg²⁺ and NADCP) redox state. Arch. Biochem. Biophys. 204, 141 - 147, 1980.

CROMPTON, M. The calcium carriers of mitochondria. In: Martonosi, A., ed. The Enzymes of biological membranes, New York: Plenum:

115 - 154, 1985.

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 - 462, 1976.

CROSS C.; HALLIWELL B.; BORISH E.; PRYOR W.; AMES D.; SAUL R.; McCORD J. & HARMAN D. "Oxygen Radicals and Human Disease" *Ann. Intern. Med.* 107, 526 - 545, 1987.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. & MASON, R.P. Generation of free radical metabolites and superoxide anion by the calcium indicators arsenazo III, antipyrilazo III and murexide in rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 258, 14920 - 14925, 1983.

DRAHOTA, Z.; CARAFOLI, E.; ROSI, C.S.; GAMBLE, R.L. & LEHNINGER, A.L. The steady state maintenance of accumulated Ca^{2+} in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 240, 2712 - 2720, 1965.

ERNSTER, L. Oxygen as an environmental poison. *Chemica Scripta.* 26, 525 - 534, 1986.

FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DA-SILVA L.; MARTINS S.I. & VERCESI A.E. Membrane protein thiol-cross linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. *J. Biol. Chem.* 265, 19955 - 19960, 1990.

- FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport. *J. Biol. Chem.* 254, 6236 - 6239, 1979.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. & LANDENSTEIN, R. In "Glutathione: Metabolism and Function" (T.M. Arias and W.B. Jakoby, eds.) Kroc Found. Ser., Vol. 6, 115 - 135. Raven, New York, 1976.
- FREEMAN B.A. & CRAPO V.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412 - 415, 1982.
- FRIDOVICH, I. In *Free Radicals in Biology*, Vol. I (Pryor, W.A., ed.), 239 - 277, Academic Press, New York), 1976.
- GORNAL, A.G.; BARDWILL, C.J. & DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751, 1949.
- GUTTERIDGE, J.M.C. Hydroxyl radical formation from the auto-reduction of a ferric citrate complex. *Free Radical Biology and Medicine.* 11, 401 - 406, 1991.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, M.C. Iron and free radical: two aspects of antioxidant protection. *TIBS.* 11, 372 - 375, 1986.
- HERMES-LIMA, M; VALLE, V.G.R.; VERCESI, A.E. & BECHARA, E.J.H.

Damage to rat liver mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta* 1056, 57 - 63, 1991.

HOEK, J.B. & RYDSTROM, J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem. J.* 254, 1 - 10, 1988.

HOMES, D.E. & PIETTE, L.H. Effects of phenothiazine derivatives on biological membranes: drug-induced changes in electron spin resonance spectra from spin-labeled erythrocyte ghost membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 173, 78 - 84, 1970.

JEWELL, S. A.; BELLOMO, G.; THOR, H.; ORRENIUS, S. & SMITH, M.T. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbance in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 217, 1257 - 1259, 1982.

JENSEN, 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, 305 - 323, 1986.

JUANG, R.; CHANG, Y.; SUNG, H. & SU, J. Oven-drying method for

- polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich. *Anal. Biochem.* 141, 348 - 350, 1984.
- KAMO, N.; MURATSUGU, M.; RUJI, H. & KOBATAKE, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady-state. *J. Membr. Biol.* 49, 105 - 21, 1979.
- KAPLAN, R.S. & PEDERSEN, P.L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 212, 279 - 288, 1983.
- KOSOWER, E.M. & WERMAN, R. Drug dependence and phenotypic masking in *E. coli*. *Nature (London) New Biol.* 233, 121 - 122, 1971.
- KOSOWER, N.S.; KOSOWER, E.M.; SALTOUN, G. & LEVI, L. Human erythrocyte membrane diffusion coefficients for diazene derivatives of the DIP series via intracellular thiol oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 62, 98 - 102, 1975.
- KOSOWER, N.S.; SONG, K.R. & KOSOWER, E.M. The methyl phenyldiazene-carboxylate (azoester). Procedure for intracellular oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 192, 1 - 7, 1969 a.
- KOSOWER, N.S.; SONG, K.R.; KOSOWER, E.M. & CORREA, W. Chemical aspects of azoester procedure for oxidation to disulfide.

Biochim. Biophys. Acta 192, 8 - 14, 1969 b.

KOSOWER, N.S.; SONG, K.R. & KOSOWER, E.M. Biological aspects of the azoester procedure for oxidation within the normal human erythrocyte Biochim. Biophys. Acta 192, 15 - 22, 1969 c.

KOSOWER, N.S.; SONG, K.R. & KOSOWER, E.M. Intracellular oxidation and membrane injury Biochim. Biophys. Acta 192, 23 - 28, 1969 d.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227, 680 - 685, 1970.

LEHNINGER, A.L.; VERCESI, A.E. & BABABUNMI, E.A. Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1690 - 1694, 1978.

LIU, S.C.; FAIRBANKS, G. & PALEK, J. Spontaneous, reversible protein cross-linking in the human erythrocyte membrane. Temperature and pH dependence. Biochemistry 16, 4066 - 4074, 1977.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FURR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 65 -275, 1951.

LOTSCHER, H.R.; WINTERHALTER, K.H.; CARAFOLI, E. & RICHTER, C.

Hydroperoxides can modulate the redox state of mitochondrial pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4340 - 4344, 1979.

MANSON, P.N.; JESUDASS, R.; MARZELLE, L.; BULKLEY, G.B.; IM, M.J. & NARAYAN, K.K. Evidence for an early free radical mediated reperfusion injury in frostbite. Free Radical Biology and Medicine 10, 7 - 11, 1991.

MINOTTI, G. & AUST, S. D. An investigation into the mechanism of citrate-Fe²⁺-dependent lipid peroxidation. Free Radical Biology & Medicine 3, 379-387, 1987.

MORENO, S.N.J.; MASON, R.P. & DO CAMPO, R. Ca²⁺ and Mg²⁺ - enhanced reduction of arsenazo III to its anion free radical metabolite and generation of superoxide anion by an outer mitochondrial membrane azoreductase. J. Biol. Chem. 259, 14609 - 14616, 1984.

MORENO, S.N.J.; MASON, R.P. & DO CAMPO, R. Reduction of the metallochromic indicators arsenazo III and antipyrilazo III to their free radical metabolites by cytoplasmic enzymes. FEBS Lett. 180, 229 - 223, 1985.

NICHOLLS, D.G. The regulation of extra mitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. Biochem. J. 176, 463 - 474, 1978.

OLIVER, J.M.; ALBERTINI, D.F. & BERLIN, R.D. Effects of glutathione - oxidizing agents on microtubule assembly and microtubule dependent surface properties of human neutrophils. J. Cell. Biol. 71, 921 - 932, 1976.

OSHINO N. & CHANCE, B. Properties of glutathione release observed during reduction of ;organic peroxide, demethylation of aminopyrine and oxidation of some substances in perfused rat liver. and their implications for the physiological function of catalase. Biochem. J. 162, 509 - 525, 1977.

PARENTONI, L.S. Efeito de Ca^{2+} e oxidantes no sistema energético mitocondrial. Tese Mestrado, Campinas, SP, 27 p., 1991.

PEREIRA, R.S.; BERTOCCHI, A.P.F. & VERCESI, A.E. The protective effect of trifluoperazine on the mitochondrial damage induced by Ca^{2+} plus prooxidants. submetido ao Biochemical Pharmacology.

PÓVOA JR. H. "Radicais Livres e Quelação" F. Med. 91, 81 - 86, 1985.

POZZAN, T.; BRAGADIN, M. & AZZONE, G.F. Desequilibrium between steady state Ca^{2+} accumulation ratio membrane potential in mitochondria: Pathway and role of Ca^{2+} efflux. Biochemistry. 16, 5618 - 5625, 1977.

RICHTER, C. & FREI, B. Ca^{2+} release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Radicals Biology & Medicine* 4, 365 - 375, 1988.

SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. *Meth. Enzymol.* 56, 301 - 338, 1979.

SCHNEIDER, W.C. & HOGEBROOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 183, 123 - 128, 1950.

SIES, H. & MOSS, K.M. A role of mitochondrial peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur. J. Biochem.* 84, 377 - 383, 1978.

SRIVASTAVA, S.K.; AWASTHI, Y.C. & BEUTLER E. Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes. *Biochem. J.* 139, 289 - 295, 1974.

STRZELECKI, T., MC GRAW, B.R. & KHAULI, R.B. Comparison of the effect of cyclosporine, verapamil and trifluoperazine on calcium-induced membrane permeability of mitochondria. *Transplantation Proceedings.* 21, 182 -183, 1989.

SWALLOW, A.J. "Radiation Chemistry". Longmans, Green, New York, 1973.

VALE, M.G.P.; MORENO A.J.M. & CARVALHO, A.P. Effects of calmodulin antagonists on the active Ca^{2+} uptake by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 214: 929 - 935, 1983.

VASINGTON, F.D.; GAZZOTTI, P.; TIOZZO, R. & CARAFOLI, E. The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.* 256, 43-54, 1972.

VERCESI, A.E. Dissociation of NAD(P)^+ -stimulated mitochondrial Ca^{2+} efflux from swelling and membrane damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 86 - 91, 1984.

VERCESI, A.E.; FERRAZ, V.L.; MACEDO, D.V. & FISKUM, G. Ca^{2+} - dependent NAD(P)^+ - induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 154, 934 - 941, 1988.

VERCESI, A.E. & HOFFMANN, M.E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. *Methods in Toxicology*, in press, 1992.

VERCESI, A.E.; HOFFMANN, M.E.; BERNARDES, C.F. & DOCAMPO, R. Regulation of intracellular calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Effects of calmidazolium and trifluoperazine. *Cell Calcium.* 12, 361 - 369, 1991.

VERCESI, A.E.; REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of

H⁺ ejection and Ca²⁺ uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem. 253: 6379 - 6385, 1978.

WERMAN, R.; CARLEN, P.L.; KUSHNIR, M. & KOSOWER, E.M. Toxicity of the photoisomers of cyclodiene insecticides to freshwater animals Nature (London) New Biol. 233, 120 - 121, 1971.