



INSTITUTO DE BIOLOGIA

EFEITOS TÓXICOS DE Ca^{2+} E
OXIDANTES DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA
SOBRE MITOCONDRIAS DE FÍGADO E CÉREBRO

Denise Vaz de Macedo

C. H. exemplos...
Candidata Denise Vaz de Macedo e aprova pela comissão
Juliana

Denise
17/6/88

Denise Vaz de Macedo

EFEITOS TÓXICOS DE Ca^{2+} E OXIDANTES DE NUCLEOTÍDEOS
DE PIRIDINA SOBRE MITOCONDRIAS DE FÍGADO E CÉREBRO

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

ORIENTADOR
Prof. Dr. ANIBAL EUGÊNIO VERCESI

A GUACIRA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi pela oportunidade de poder trabalhar em seu grupo de pesquisa e por ter orientado e colaborado na elaboração deste manuscrito.

A Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva por ter colaborado na execução deste trabalho e pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

As Profas. Dra. Nilce Correa Meirelles e Dra. Ione Salgado Martins pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à Regina Celia Rosseto pela amizade e colaboração técnica.

A minha família por todo carinho e apoio recebido.

A todos os amigos, pela amizade, carinho e compreensão recebidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro na aquisição das drogas.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
Movimento de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna	02
Significado fisiológico do transporte de Ca^{2+} mitocondrial	09
Liberação de Ca^{2+} mitocondrial induzida pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina	12
MATERIAIS E MÉTODOS	23
Isolamento de mitocôndrias hepáticas	23
Isolamento de mitocôndrias de cérebro	24
Preparação de mitoplastos	25
Meios de Reação	26
Dosagem de proteína mitocondrial	27
Determinação do consumo de oxigênio	27
Determinação da concentração de Ca^{2+} livre	29
Determinação do potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$)	31
Determinação do estado redox dos nucleotídeos de piridina	34
Determinação da variação do volume mitocondrial.....	34
Determinação de ácidos graxos	36
Reagentes	38
RESULTADOS	39
Fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias hepáticas incubadas na presença de hidroperóxido: efeito de pH e concentração de acetato	39

Correlação entre potencial elétrico de membrana e efluxo de Ca^{2+} induzido por t-butil hidroperóxido	42
Correlação entre o estado energético das mitocôndrias e a oxidação dos nucleotídeos de piridina endógenos induzida por t-butil hidroperóxido	44
Mitocôndrias desenergizadas são mais sensíveis aos efeitos deletérios de Ca^{2+} na presença de t-butil hidroperóxido	46
Efeito de N-etilmaleimida sobre o efluxo de Ca^{2+} induzido por t-butil hidroperóxido	50
Reversão por ditiotreitól do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial induzido por diamida e t-butil hidroperóxido	52
Fluxo de Ca^{2+} e inchamento mitocondrial em mitocôndrias de cérebro de rato: efeito de fosfato, diamida e ATP e Mg^{2+} ..	54
Determinação de ácidos graxos livres em mitocôndrias pré-incubadas na presença de Ca^{2+} e diamida	58
Efluxo de Ca^{2+} induzido por diamida em mitoplastos hepáticos	60
DISCUSSÃO	62
RESUMO	73
SUMMARY	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ABREVIATURAS

AA	- Antimicina A
Ac ⁻	- Acetato
AcAc	- Acetoacetato
AMP	- Monofosfato de adenosina
ADP	- Difosfato de adenosina
ATP	- Trifosfato de adenosina
BSA	- Albumina de soro bovino
BOH	- β -hidroxibutirato
DIA	- Diamida
DTT	- Ditionitrositol
EGTA	- Ácido etileno glicol Bis(β -aminoetil eter)NN'-tetra acético
FCCP	- p-trifluoro-metoxicarbonil cianeto fenil hidra ^z ina
GSH	- Glutathiona reduzida
GSSG	- Glutathiona dissulfeto
HEPES	- Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico
MAL	- Malato
MCR	- Mitocôndria de cérebro de rato
MFR	- Mitocôndria de fígado de rato
MITO	- Mitoplasto

NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NEM	- N-etilmaleimida
OAA	- Oxaloacetato
OLIGO	- Oligomicina
Pi	- Fosfato
Rot	- Rotenona
Suc	- Succinato
TPP ⁺	- Tetrafenilfosfônio
t-BH	- t-Butil hidroperóxido
$\Delta\mu\text{H}^+$	- gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}}$	- gradiente eletroquímico de calcio
$\Delta\psi$	- potencial elétrico transmembrana

INTRODUÇÃO

O transporte de Ca^{2+} através de membranas biológicas é uma propriedade fundamental para a função celular, podendo ser colocado como central no processo de vida. A importância deste transporte está intimamente relacionada ao papel do Ca^{2+} como mensageiro intracelular (RASMUSSEN, 1981). Para regular seu fluxo nas células, o retículo endoplasmático e a mitocôndria captam, estocam e liberam este cátion e a membrana celular permite que ele seja captado do fluido extracelular ou ativamente liberado da célula (BARRIT, 1981). Estes mecanismos devem agir de forma integrada e regulada a fim de permitir a distribuição diferencial do íon nos diversos compartimentos intracelulares.

A despeito da grande importância destes processos de transporte, eles ainda não estão completamente elucidados. Os melhor caracterizados são a captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (DE MEIS & VIANNA, 1979) e o bombeamento para fora da célula, particularmente em membranas de eritrócitos (HOLMES, 1985), ambos mediados por ATPases específicas.

A mitocôndria, ao contrário da membrana celular e do retículo, não possui ATPase transportadora, mas capta Ca^{2+} citosólico por um processo eletroforético cuja função parece

estar relacionada com a regulação do metabolismo oxidativo da célula (McCORMACK & DENTON,1986). Desde sua descoberta simultânea por DE LUCA & ENGSTRON (1961) e VASINGTON & MURPHY (1962), este sistema de transporte através da membrana mitocondrial interna tem sido muito estudado. Todavia, o mecanismo molecular de captação e particularmente o de liberação são pouco conhecidos e ainda estão sob investigação em diversos tecidos animais (BYGRAVE,1978; DENTON & McCORMACK,1980; SARIS & ÅKERMANN,1980; FISKUM & LEHNINGER,1981; NICHOLLS & ÅKERMANN,1982; ÅKERMANN & NICHOLLS,1983; VERCESI,1984c; HANSFORD,1985; McCORMACK & DENTON,1986) e em alguns vegetais (WISKICH,1977; HANSON & DAY,1980; DAY & WISKICH,1984; MOORE & ÅKERMANN,1984; MARTINS & VERCESI,1985; DOUCE,1985; MARTINS et alii,1986; CARNIERI et alii,1987).

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

A adição de Ca^{2+} a uma suspensão mitocondrial energizada resulta na sua captação, seguida do estímulo da respiração e extrusão de prótons (CHANCE,1965; BRAND et alii,1976; REYNAFARJE & LEHNINGER,1977; VERCESI et alii,1978). Há consenso atualmente que esta captação ocorre por um processo

eletroforético, em resposta ao potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$), principal componente do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\tilde{\mu}H^+$) (MITCHELL,1961). Há também evidências experimentais de que o Ca^{2+} entra com duas cargas positivas através de um transportador sensível a vermelho de rutênio e lantanídeos (MELA,1969; VAINIO et alii,1970; SCARPA & AZZONE, 1970; MOORE,1971; VASINGTON et alii,1972; REED & BYGRAVE, 1974; LEHNINGER et alii,1978a; MARTINS & VERCESI,1985). Este transportador eletroforético tem grande afinidade pelo Ca^{2+} (K_m entre 5-30 μ M), dependendo da origem da mitocôndria e da composição do meio de reação (CROMPTON et alii,1976). Ele também liga e transporta outros cátions bivalentes com a seguinte ordem de afinidade: $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mn^{2+} > Ba^{2+}$ (SARIS,1963; CARAFOLI, 1965; DRAHOTA et alii,1969; VAINIO et alii,1970).

Esta propriedade de captação de Ca^{2+} e outros cátions bivalentes (VASINGTON & MURPHY,1962; LEHNINGER,1970; BYGRAVE,1977; CARAFOLI & CROMPTON,1978; LEHNINGER et alii, 1978a; SARIS & ÅKERMANN,1980; FISKUM & LEHNINGER,1981; TEDESCHI,1981; NICHOLLS & ÅKERMANN,1982) pode ser explicada pela hipótese quimiosmótica da fosforilação oxidativa, onde a respiração ou a hidrólise de ATP induzem transporte vetorial de prótons da matriz mitocondrial para o citosol. O gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\tilde{\mu}H^+$) assim gerado é constituído por um componente químico (ΔpH) e pelo potencial elétrico de

membrana ($\Delta\Psi$), com polaridade negativa no interior da mitocôndria, relacionados entre si de acordo com a equação: $\Delta\bar{\mu}H^+ = \Delta\Psi - 60\Delta pH$ (MITCHELL, 1961; 1969). Como a capacitância elétrica da membrana mitocondrial interna é muito baixa, o acúmulo de cerca de 1,0nmol de Ca^{2+} /mg de proteína já é suficiente para colapsar $\Delta\Psi$ se não ocorrer nenhum outro movimento iônico simultâneo (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). Assim, a captação adicional de Ca^{2+} requer a regeneração de $\Delta\Psi$ pela extrusão de prótons, que converte totalmente o potencial protônico no seu componente químico (ΔpH). Desta forma, para que seja captada uma maior quantidade de Ca^{2+} pela mitocôndria, o processo deve ocorrer na presença de ânions capazes de atravessar a membrana interna na forma protonada, a fim de neutralizar o gradiente de pH e permitir que a cadeia respiratória restabeleça o valor de $\Delta\Psi$. Entre estes ânions estão os lipofílicos, como acetato, propionato, β -hidroxibutirato, butirato e lactato (LEHNINGER, 1974). Os ânions bicarbonato e $H_2PO_4^-$ também apresentam esta propriedade. O primeiro entra na forma de HCO_3^- (SELWIN & WALKER, 1977) ou como CO_2 dissolvido e é hidratado pela ação da anidrase carbônica, resultando na acúmulo de $CaCO_3$ (ELDER & LEHNINGER, 1973). O segundo entra em co-transporte com H^+ (COTY & PEDERSEN, 1975) ocasionando a precipitação do complexo $Ca_3(PO_4)_2$ na matriz mitocondrial. Então, na presença de ânions permeantes ocorre completa repola

rização da membrana após o término da captação, não havendo assim, limite teórico para acúmulo de Ca^{2+} (LEHNINGER et alii, 1967; SARIS & ÅKERMANN, 1980; NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982).

SCARPA & AZZONE (1970) demonstraram que o Ca^{2+} também pode ser acumulado eletroforéticamente contra gradiente de concentração, na ausência de energia respiratória ou hidrólise de ATP, pelo seu acoplamento com o efluxo de K^+ mitocondrial. Este efluxo de K^+ pode ser induzido pelo ionóforo valinomicina que gera um potencial de difusão de K^+ quando as mitocôndrias são incubadas em meio de reação isentos deste cátion. Resultados semelhantes foram obtidos por SELWIN et alii (1970), que induziram captação de Ca^{2+} por mitocôndrias, em resposta ao potencial de difusão do íon tiocianato, livremente permeável através da membrana.

O Ca^{2+} é então transportado com duas cargas positivas movido pelo seu potencial eletroquímico (LEHNINGER, 1970; BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et alii, 1978a; SARIS & ÅKERMANN, 1980; TEDESCHI, 1981), de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta \mu_{\text{Ca}^{2+}} = 2 \Delta \Psi - 60 \log [\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}} / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}},$$

onde $\Delta \mu_{\text{Ca}^{2+}}$ representa o potencial eletroquímico de Ca^{2+} . Se assumirmos que a distribuição de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna segue a equação de Nernst e que o Ca^{2+} é transportado com duas cargas positivas, para um valor de $\Delta \Psi$

igual a 180mV (negativo dentro), a razão $[Ca^{2+}]_{int}/[Ca^{2+}]_{ext}$ seria aproximadamente igual a 10^6 (CARAFOLI,1979). No entanto, os valores experimentais encontrados para mitocôndrias "in situ" indicam que este gradiente varia entre 0 e 10^2 (DENTON et alii,1972; 1978; DENTON & McCORMACK,1980; HANSFORD & CASTRO,1982). Estes dados indicam a contribuição de fatores adicionais na distribuição deste íon através da membrana mitocondrial interna. De fato, foi proposto que o transportador eletroforético opera essencialmente no sentido da captação e que a liberação de Ca^{2+} deve ser mediada por um sistema paralelo (para revisão ver ÅKERMAN & NICHOLLS,1983).

A evidência para a existência destes dois caminhos independentes para o transporte de Ca^{2+} mitocondrial foi estabelecida após experimentos, que mostraram efluxo líquido de Ca^{2+} na presença de vermelho de rutênio, um inibidor específico da via de captação (MOORE,1971; VASINGTON et alii, 1972; PUSKIN et alii,1976; POZZAN et alii,1977). Na verdade, foi demonstrado que o Ca^{2+} mitocondrial pode ser liberado por uma via eletroneutra que troca um íon Ca^{2+} por dois Na^+ externos, particularmente ativa em mitocôndrias de tecidos excitáveis (CARAFOLI et alii,1974; CROMPTON et alii,1976) mas que também ocorre em mitocôndrias hepáticas com atividade limitada (NEDERGAARD,1984). Em mitocôndrias de fígado, acredita-se que o processo dominante para a liberação de Ca^{2+} opere por

uma via que troca um íon Ca^{2+} por dois H^+ externos (ÅKERMAN, 1978; NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1981; BRAND, 1985). Uma das evidências experimentais em favor deste suposto carreador ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$) é o efluxo de Ca^{2+} verificado em resposta a acidificação do meio de reação (ÅKERMAN, 1978; TSOKOS et alii, 1980). Entretanto, estes dados foram contestados por GUNTER et alii (1983) com base em resultados que indicavam uma grande variação da estequiometria $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ em função da variação do pH. Além disso, estes autores observaram que este efluxo não era estimulado quando a diminuição do pH externo foi induzida pela adição de tampão acetato em lugar de adições de HCl. Na interpretação dos mesmos, o abaixamento brusco de pH causado pelo HCl poderia levar a liberação de Ca^{2+} por subpopulações de mitocôndrias pobremente acopladas em suspensões heterogêneas (GUNTER et alii, 1983). Outra evidência experimental favorável à existência deste carreador ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$) é o influxo de Ca^{2+} em resposta à acidificação da matriz mitocondrial, causada pela adição de nigericina a mitocôndrias desenergizadas. A nigericina causa acidificação da matriz por promover a troca $\text{K}_{\text{int}}^+/\text{H}_{\text{ext}}^+$ quando as mitocôndrias são suspensas em meio contendo baixas concentrações de K^+ . Esta captação se faz na presença de vermelho de rutênio que inibe a entrada eletroforética, indicando que a mesma seria mediada pelo carreador que catalisa a troca $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, operando no senti-

do inverso (FISKUM & COCKRELL,1978; COCKRELL,1985). Esta interpretação foi também fortemente contestada por SARIS (1987) que,observou que apesar da nigericina promover a troca eletroneutra K^+/H^+ , um potencial elétrico significativo, negativo internamente, era gerado. Além disso, SARIS demonstrou que nas condições experimentais utilizadas por FISKUM & COCKRELL (1978) e COCKRELL (1985), as concentrações de vermelho de rutênio empregadas não inibiam totalmente a entrada eletroforética de Ca^{2+} .

De qualquer forma, caminhos distintos de captação e liberação resultam em um movimento cíclico e contínuo de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna que, provavelmente opera a uma velocidade muito lenta em células normais (CARAFOLI,1986) e caracterizam a existência de uma condição real de fluxo constante (CROMPTON et alii,1976; ÅKERMAN & NICHOLLS,1983). A operação simultânea destes dois fluxos em sentidos opostos fornece as bases para uma regulação cinética da distribuição de Ca^{2+} entre os compartimentos intra e extramitocondriais. De acordo com este modelo, a distribuição de Ca^{2+} em condições de fluxo constante pode ser alterada pela ativação ou inibição de um ou ambos os caminhos (NICHOLLS & ÅKERMAN,1982).

SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DO TRANSPORTE DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Até o presente, o significado deste sistema de transporte na regulação fisiológica do Ca^{2+} celular é controvertido e está sendo objeto de muito estudo. Inicialmente acreditava-se que o estoque de Ca^{2+} mitocondrial era muito grande, superior a 10nmoles/mg de proteína e que a troca de Ca^{2+} entre a mitocôndria e o citosol era quantitativamente importante. Assumiu-se assim que a mitocôndria exercia um papel relevante na regulação do Ca^{2+} celular, contribuindo possivelmente para o controle de processos que requerem rápida mobilização de Ca^{2+} , tais como o ciclo de excitação/ contração/ relaxamento muscular (CARAFOLI,1986). Também, devido à grande capacidade da mitocôndria, particularmente na presença de concentrações fisiológicas de ATP e Mg^{2+} tamponar o Ca^{2+} externo em concentrações que se aproximam das do citosol "in vivo" (BECKER et alii,1980; MURPHY et alii,1980; CHAREST et alii,1983; JOSEPH et alii,1983), levou alguns pesquisadores à conclusão de que a organela podia agir como um "sorvedouro" de Ca^{2+} , regulando sua concentração citosólica (NICHOLLS,1978; BECKER et alii,1980; SCOTT et alii,1980; FISKUM & LEHNINGER,1981). A situação parece ter mudado há poucos anos, com base principalmente no desenvolvimento de duas li-

nhas de pesquisa diferentes. Por um lado, o trabalho com sonda eletrônica de microanálise por Raio X (SOMLYO et alii, 1981) mostrou que a quantidade de Ca^{2+} "in situ" era consideravelmente menor (da ordem de 1-3nmoles/mg de proteína mitocondrial) que aquelas obtidas pelas técnicas anteriores. Isto obviamente restringiu muito a contribuição quantitativa da mitocôndria na regulação da homeostase do Ca^{2+} citosólico. Por outro lado, a introdução de marcadores fluorescentes de Ca^{2+} intracelular (TSIEN, 1981) mostrou que a concentração iônica de Ca^{2+} no citosol era menor que 200nM, ou seja, cerca de 10-50 vezes mais baixa que o Km aparente de captação de íon (CROMPTON et alii, 1976). Estes resultados são incompatíveis com as características cinéticas de influxo e efluxo que permitiriam um tamponamento preciso da concentração de Ca^{2+} citosólico pelas mitocôndrias (HANSFORD, 1985). Outros resultados (DENTON & McCORMACK, 1985; HANSFORD, 1985) demonstraram que três desidrogenases intramitocondriais com papel importante na regulação do ciclo de Krebs: 2-oxoglutarato de desidrogenase, NAD-isocitrato desidrogenase e piruvato desidrogenase, tem suas atividades reguladas por Ca^{2+} livre na faixa de concentração observada por SOMLYO et alii (1981). Com base nestes dados, estes autores propuseram que uma elevação fisiológica na concentração do Ca^{2+} citosólico, estimulado por hormônios ou outros agentes extracelulares, resultaria no au-

mento da concentração de Ca^{2+} da matriz mitocondrial, que agiria estimulando a respiração através do estímulo destas enzimas. Assim, o aumento de Ca^{2+} mitocondrial na faixa de 0-10 μM estimularia a respiração por diminuir acentuadamente o K_m para os substratos da 2-oxoglutarato desidrogenase e NAD-isocitrato desidrogenase (DENTON et alii, 1978; McCORMACK & DENTON, 1979; DENTON & McCORMACK, 1980). Além disso, nesta faixa de concentração de Ca^{2+} ocorre aumento na produção da forma ativa da piruvato desidrogenase, que existe nas formas defosforilada (ativa) e fosforilada (inativa). O aumento da enzima defosforilada ocorre devido à ativação de uma fosfatase específica (HANSFORD, 1985). De fato, foi observado recentemente em mitocôndrias isoladas de fígado (JOHNSTON & BRAND, 1987) que a elevação de Ca^{2+} na matriz, nesta faixa de concentração, causa estímulo proporcional da respiração. Estes resultados são consistentes com a proposta de que o aumento do Ca^{2+} citossólico por ação hormonal pode estimular a produção de ATP através da ativação do metabolismo oxidativo intramitocondrial (DENTON & McCORMACK, 1985).

Outra linha de investigação indica que o Ca^{2+} intramitocondrial pode inibir a fosforilação oxidativa (SORDHAL, 1974; VALLIÈRE et alii, 1975; MALMSTROM & CARAFOLI, 1977; VILLOBO & LEHNINGER, 1980; ABOU-KHALIL et alii, 1981; ROMAN et alii, 1981; MORENO-SANCHEZ, 1983). Isto levou à proposição de

um possível papel do sistema de transporte de Ca^{2+} na regulação do metabolismo energético da célula, através da modulação da atividade da enzima F_0F_1 -ATP sintetase. Entretanto, resultados recentes de nosso laboratório (FAGIAN et alii, 1986) argumentam fortemente contra este possível papel regulatório do metabolismo celular sob condições normais, sugerindo que esta inibição seja um fator adicional no mecanismo de toxicidade celular, associado ao aumento patológico da concentração de Ca^{2+} citosólico.

LIBERAÇÃO DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL INDUZIDA PELO ESTADO OXIDADO DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA

Os primeiros trabalhos que mostraram uma correlação entre fluxo de Ca^{2+} mitocondrial e estado redox dos nucleotídeos de piridina foram os de VERCESI et alii (1978) e LEHNINGER et alii (1978b). Trabalhos com mitocôndrias isoladas de fígado (LEHNINGER et alii, 1978b) e de coração (COELHO & VERCESI, 1980) demonstraram que a liberação de Ca^{2+} era estimulada pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina endógenos, enquanto sua retenção era favorecida pelo estado reduzido dos mesmos. Este fato foi subsequentemente confirmado por outros laboratórios, não somente com mitocôndrias isoladas (DAWSON et alii, 1979; FISKUM & LEHNINGER, 1979; LOTSCHER et alii, 1979; 1980; ARSHAD & HOLDSWORTH, 1980; BEATRICE et

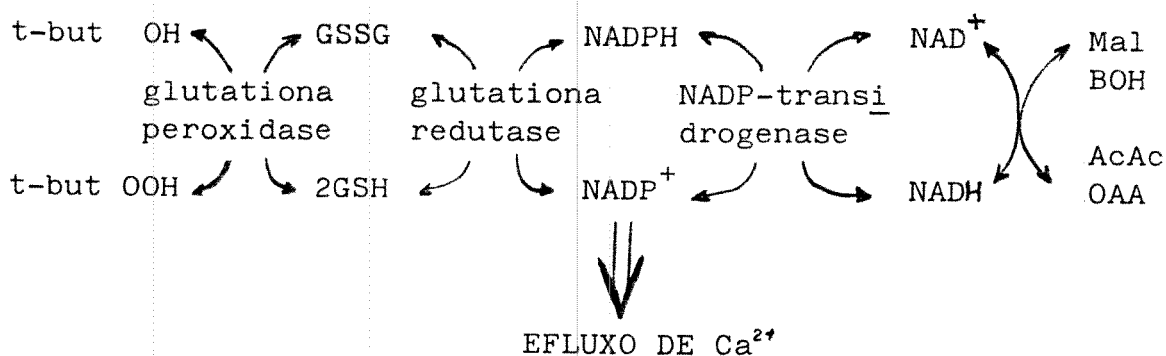
alii,1980; NICHOLLS & BRAND,1980; PANFILI et alii,1980; HOFSTETTER et alii,1981; PALMER & PFEIFFER,1981; BARDSLEY & BRAND, 1982; BAUMHUTER & RICHTER,1982; BEATRICE et alii,1982; VERCESI & LEHNINGER,1982; MOORE et alii,1983; SILIPRANDI et alii, 1983; BEATRICE et alii,1984; BELLOMO et alii,1984a; FREI et alii,1985a,b; 1986; BERNARDES et alii,1986; VERCESI,1984a,b; 1985; 1987) mas também em células intactas (LANDRY & LEHNINGER,1976; CHARLTON & WENNER,1978; KRELL et alii,1979; BELLOMO et alii,1982; JEWELL et alii,1982; BELLOMO et alii,1984b; 1984c) e fígado perfundido (SIES et alii,1981). Apesar do grande número de trabalhos sobre este assunto, há ainda indefinição sobre qual dos nucleotídeos de piridina seria o responsável por este processo. Embora uma série de artigos tenha colocado o NADP^+ como responsável por este efluxo de Ca^{2+} (PRPIC & BYGRAVE,1980; SIES et alii,1981; ROTH & DIKSTEIN, 1982; VERCESI & LEHNINGER,1982; ORRENIUS et alii,1983; BERNARDES et alii,1986), os resultados são indiretos e de difícil interpretação. Assim, outros experimentos, como os de SANDRY et alii (1979) e PANFILI et alii (1980) além dos de LOTSCHER et alii (1980) e HOFSTETTER et alii (1981), que implicam respectivamente o envolvimento de proteínas que ligam NAD^+ ou que reagem com NAD^+ , sugerem que este nucleotídeo seja o mais importante neste processo. No entanto, VERCESI (1987), através de experimentos onde o estado redox destes

dois nucleotídeos foram manipulados separadamente, demonstrou que a velocidade de efluxo de Ca^{2+} era independente da oxidação do NADH, mas acelerada várias vezes pela oxidação do NADPH. Estes estudos indicaram ainda que a atividade da enzima NADP-transidrogenase, localizada na membrana interna (RYDSTROM, 1977), parece ser um elemento chave na determinação do estado redox dos nucleotídeos de piridina por catalisar a reação reversível, dependente de energia, equacionada abaixo:



Há várias formas de se obter mudanças no estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina mitocondriais. Mudanças de cerca de 1,0 unidade no pH interno causam um aumento de 10 a 30 vezes na razão $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ (RICHTER & FREI, 1985). Além disso, podem-se utilizar substratos redutores tais como β -hidroxibutirato, piruvato, malato, isocitrato e glutamato ou oxidantes como oxaloacetato, acetoacetato e hidroperóxidos (para revisão ver RICHTER & FREI, 1985). O t-butil hidroperóxido é considerado um ótimo oxidante de NAD(P)H mitocondrial por possuir um resíduo orgânico suficientemente volumoso para excluir sua reatividade com a catalase (SIES, 1985). Pequenas quantidades de t-butil hidroperóxido induzem oxidação dos nucleotídeos de piridina devido à atividade de uma cascata enzimática que envolve a ação das enzimas glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e NADP-transidrogenase,

usando NAD(P)H como redutor (OSHINO & CHANCE,1977; SIES & MOSS,1978) de acordo com o esquema abaixo:



O metabolismo do hidróperóxido pelo sistema enzimático glutatona peroxidase/glutatona redutase, presente no citosol e na matriz mitocondrial, resulta simultaneamente na redução do t-butil hidróperóxido e oxidação da glutatona reduzida (GSH) a glutatona dissulfeto (GSSG), que sofre subsequente redução pela glutatona redutase, às custas de equivalentes redutores na forma de NAD(P)H diminuindo a razão NAD(P)H/NAD(P)⁺ (LOTSCHER et alii,1979; ORRENIUS et alii, 1983; BELLOMO et alii,1984a). Como sugerido inicialmente por LEHNINGER et alii (1978b), esta oxidação do NAD(P)H mitocondrial leva à liberação de Ca²⁺ pela organela. Segundo BELLOMO et alii (1984a), a velocidade do primeiro passo da metabolização do t-butil hidróperóxido e seus eventos subsequentes são limitados pela quantidade de GSH presente nas diferentes preparações mitocondriais. De fato, LOTSCHER et alii (1979) observaram que, se as mitocôndrias fossem isoladas de fígados de ratos mantidos em uma dieta livre de selênio, situação em

que a atividade da enzima glutathione peroxidase é muito baixa (LAWRENCE & BURK, 1976), não ocorria esta liberação de Ca^{2+} induzida pelo t-butil hidroperóxido. BEATRICE et alii (1984) propuseram ainda que para o estímulo desta liberação, a oxidação de GSH a GSSG era mais importante que a oxidação dos nucleotídeos de piridina, opinião compartilhada por outros grupos (JEWELL et alii, 1982; RILEY & PFEIFFER, 1985; VERCESI, 1987; RAPUANO & MADDAIAH, 1988). Todavia, MOORE et alii (1986), trabalhando com mitocôndrias isoladas de animais mantidos em dieta deficiente em selênio, observaram que menadiona induzia liberação de Ca^{2+} após completa oxidação de NAD(P)H quando somente cerca de 40% de GSH estava oxidado.

Os inúmeros trabalhos publicados abordando este assunto foram realizados nas mais diversas condições experimentais, contribuindo para propostas discordantes tanto quanto ao mecanismo molecular envolvido na indução deste efluxo quanto à sua relevância fisiológica. Alguns autores (FISKUM & LEHNINGER, 1979; RICHTER & FREI, 1985; MASINI et alii, 1986; FREI et alii, 1986), utilizando agentes capazes de causar liberação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias, sugeriram que o estado oxidado dos nucleotídeos de piridina estimula a via eletro-neutra de efluxo de Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$). Sugeriram também que a queda no potencial de membrana e as alterações de permeabilidade, paralelas ao efluxo do íon, seriam consequência de um

rápido e prolongado movimento cíclico de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna. Ou seja, dependendo das condições experimentais utilizadas, este efluxo pode ocorrer com alto potencial de membrana, sendo considerado um mecanismo com características e propriedades compatíveis às de um processo fisiológico de regulação (RICHTER & FREI, 1985). Por outro lado, outros autores (BEATRICE et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1981; BARDSLEY & BRAND, 1982; BEATRICE et alii, 1982; RILEY & PFEIFFER, 1986) postularam que esta liberação estimulada por NAD(P)^+ está associada a um aumento não específico na permeabilidade de membrana, resultando em queda de $\Delta\Psi$, inchamento mitocondrial e liberação de outros componentes da matriz, tais como nucleotídeos de adenina, Mg^{2+} e K^+ . Ainda, outros autores sugeriram que este mecanismo pode estar envolvido na perturbação da homeostase de Ca^{2+} e diminuição da viabilidade da célula durante "stress oxidativo" ou outras situações patológicas, nas quais uma depleção de glutatona reduzida na mitocôndria estaria associada a um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular (THOR et alii, 1982; JONES et alii, 1983; ORRENIUS et alii, 1987).

Com toda esta divergência de resultados e opiniões, o mecanismo molecular da liberação de Ca^{2+} induzida pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina também é bastante controverso. Existem algumas propostas principais defendi-

das por diferentes grupos de pesquisa. Dos mecanismos propostos, dois incorporam a oxidação dos nucleotídeos de piridina como uma condição necessária para o efluxo de Ca^{2+} e um terceiro postula que a oxidação de GSH a GSSG, independente do estado redox dos nucleotídeos de piridina leva à liberação de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna:

1. Alguns autores observaram liberação de Ca^{2+} por mitocôndrias de fígado e de cérebro quando os nucleotídeos eram oxidados e hidrolisados a ADP-ribose, nicotinamida e 5'AMP, por uma NADase, sensível a ATP, presente na matriz mitocondrial (LOTSCHER et alii, 1980; RICHTER et alii, 1983; SATRUSTEGUI & RICHTER, 1984; FREI et alii, 1985a,b; 1986). Eles propuseram então que a formação de ADP-ribose causaria a modificação de uma única proteína localizada na membrana interna, que estaria envolvida no mecanismo molecular de liberação de Ca^{2+} (para revisão ver RICHTER & FREI, 1985). Os experimentos de MOSER et alii (1983) que mostraram que esta NADase (NAD^+ -glicohidrolase), responsável pela hidrólise dos nucleotídeos de piridina também catalisa sua síntese, explicam a reversibilidade de hidrólise de NAD(P)^+ encontrada por LOTSCHER et alii (1980) na presença de nicotinamida. Por outro lado, foi observado que somente ocorre perda líquida dos nucleotídeos de piridina quando as mitocôndrias captam grandes quantidades de Ca^{2+} (aproximadamente 120nmoles/mg de proteína mitocon

drial) e não quando a quantidade de Ca^{2+} e o movimento cíclico são limitados (FREI et alii, 1985a).

2. Outros autores (SANDRI et alii, 1979; PANFILI et alii, 1980) propuseram que a ligação do NAD^+ à glicoproteína considerada por SOTTOCASA et alii (1972) como transportadora de Ca^{2+} , promoveria a regulação metabólica do fluxo do íon através da membrana mitocondrial. Estes autores mostraram evidências de que esta glicoproteína possui quatro sítios de ligação para NAD^+ e que sua afinidade pelo Ca^{2+} era alterada pela ligação dos mesmos. Foi ainda observado que o efluxo de Ca^{2+} induzido pela adição de oxidantes de NAD(P)H era inibido por anticorpos obtidos contra esta glicoproteína. Com estes dados, propuseram a participação desta glicoproteína na regulação da distribuição do Ca^{2+} mitocondrial em condições que houvesse alterações na relação $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$.

3. A terceira hipótese implica no mecanismo uma perda não específica do íon, que seria causada pela remoção de lipídeos da membrana (RILEY & PFEIFFER, 1985). De acordo com esta hipótese, o equilíbrio do ciclo da reação envolvendo deacilação e reacilação de fosfolipídeos da membrana seria perturbado na presença de oxidantes de NAD(P)H ou outros agentes que induzem perda de Ca^{2+} mitocondrial. Assim, o Ca^{2+} da matriz aumentaria a atividade da fosfolipase A_2 , associada à membrana interna, e a queda na razão GSH/GSSG diminuiria a atividade

da acil CoA lisofosfolípídeo acil transferase. Isto resultaria no acúmulo de ácidos graxos livres e lisofosfolípídeos que causariam um aumento não específico na permeabilidade da membrana, dissipação em $\Delta\psi$ e liberação de Ca^{2+} e outros componentes da matriz. A inibição da acil CoA transferase quando os nucleotídeos estão oxidados seria ocasionada por uma diminuição na disponibilidade de GSH, necessário para manter a atividade da enzima, devido à formação de dissulfetos mistos entre GSSG e CoA-SH ou por formação de S-S em grupos sulfidrila essenciais da acil CoA transferase e/ou acil CoA sintetases (RILEY & PFEIFFER,1985). De fato, foi demonstrado que vários inibidores desta enzima induzem efluxo de Ca^{2+} da mitocôndria (RILEY & PFEIFFER,1986) mesmo em condições em que não ocorre oxidação de NAD(P)H.

Alternativamente, VERCESI (1984b) propôs que o acúmulo de GSSG, associado à oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais, poderia levar à oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana envolvidos na manutenção de sua integridade. Esta proposta está baseada na similaridade de efeitos de oxidantes de NAD(P)H e diamida, um oxidante de grupos -SH vicinais de membrana (KURANTSI-MILLS & LESSIN, 1981) sobre ambos, conformação e efluxo de Ca^{2+} mitocondrial (VERCESI,1984b). Na realidade, há evidências do envolvimento de grupos sulfidrila no controle da permeabilidade seletiva

da membrana mitocondrial (LÉ QUOC & LÉ QUOC,1985) e que o NAD(P)H mantém tanto glutathione quanto grupos -SH de membrana no estado reduzido (HARRIS et alii,1979; BELLOMO et alii, 1982). Estes grupos reduzidos seriam capazes de ligar Mg^{2+} e ADP, mantendo desta forma a permeabilidade específica da membrana (HARRIS et alii,1979), pois os nucleotídeos de adenina Mg^{2+} e grupos -SH são fundamentais para manter a barreira de permeabilidade da mitocôndria (COELHO & VERCESI,1980; SILI-PRANDI et alii,1983).

Durante o curso dos trabalhos em nosso laboratório, foram estabelecidas condições experimentais sob as quais a liberação de Ca^{2+} induzida pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina foi completamente reversível (VERCESI,1984b; BERNARDES et alii,1986; VALLE et alii,1986; VERCESI,1987). Estas condições incluíram o uso de meios de incubação contendo concentrações fisiológicas de ATP e Mg^{2+} , baixas concentrações de Ca^{2+} , acetato ao invés de fosfato como ânion permeante e adição de concentrações limitadas de t-butil hidroperóxido para causar somente uma oxidação transitória dos nucleotídeos de piridina. Sob tais condições, mitocôndrias de fígado de rato, respirando com succinato apresentaram um aumento transiente na concentração de Ca^{2+} extramitocondrial em condições de fluxo constante, concomitante com a oxidação de NAD(P)H e em paralelo com uma pequena diminuição em $\Delta\Psi$, au-

mento na velocidade de respiração e inchamento mitocondrial. Com exceção do inchamento mitocondrial, todos os outros eventos eram reversíveis. Estes resultados foram amplamente confirmados pelos experimentos de RIZZUTO et alii (1987) que analisaram o mecanismo pelo qual vários agentes, tais como, hidroperóxidos, fosfato, diamida, menadiona além do fator idade da preparação mitocondrial, induzem liberação de Ca^{2+} por mitocôndrias de fígado de rato.

No presente trabalho procuramos estabelecer a correlação entre extensão do efluxo transitório de Ca^{2+} induzido por hidroperóxido e uma série de fatores relacionados com as condições experimentais utilizadas em nosso e em outros laboratórios, tais como pH, concentração de acetato, fonte de energia, amplitude do potencial de membrana, etc. Foi possível concluir que vários destes fatores afetam profundamente os resultados obtidos e certamente explicam a discordância existente entre diversos laboratórios que estudam este mecanismo em diferentes condições experimentais. Além disso, os resultados deste trabalho forneceram subsídios para uma proposta de como os danos mitocondriais causados por alto Ca^{2+} citosólico e diminuição nos níveis de nucleotídeos de adenina e glutathiona reduzida que ocorrem em algumas condições patológicas como isquemia, por exemplo, podem estar envolvidos no mecanismo de lesão irreversível da célula.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ISOLAMENTO DE MITOCONDRIAS HEPÁTICAS

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo SCHNEIDER & HOGEBOM (1951), por centrifugação fracionada, de ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 180-250g, mantidos em jejum por 12 horas e sacrificados por concussão cerebral.

O fígado, retirado imediatamente após a morte do animal, foi lavado em solução de sacarose 250mM contendo EGTA 1,0mM tamponada com Hepes 2,0mM, pH 7,2, picado finamente com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. Este material passou por uma primeira centrifugação a 800xg por 5 minutos. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o sedimento foi novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados a 12100xg por 10 minutos. A fase lipídica superior foi retirada com uma pipeta Pasteur, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em uma solução de sacarose 250mM contendo EGTA 0,3mM tamponada com Hepes 1,0mM e novamente centrifugado a 12100xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em solução de sacarose 250mM (sem EGTA), obtendo-se uma suspensão mitocondrial com concentração aproximada de 100mg de proteína/ml. To

do o processo foi realizado a uma temperatura entre 0-4°C.

2. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO

As mitocôndrias cerebrais foram isoladas segundo ROSENTHAL et alii (1987) por centrifugação fracionada, de ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 180-250g e sacrificados por decapitação.

O tecido cerebral, retirado imediatamente, foi picado finamente com tesoura e lavado duas vezes em meio (MS) com manitol 225mM, sacarose 75mM, BSA 2% tamponado com Hepes 5,0 mM, pH 7,2 contendo EGTA 1,0mM. Este material foi suspenso em 10ml deste meio contendo 5,0mg de nagarse, uma protease, e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O volume do homogeneizado foi completado para 30ml com meio MS + EGTA e centrifugado a 755xg por 5 minutos. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o sedimento ressuspenso em 10ml deste meio e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram então combinados e centrifugados a 17300xg por 10 minutos. O sedimento, contendo mitocôndrias livres e sinaptossomas, foi ressuspenso em 20ml de meio MS + EGTA e dividido em dois tubos onde foram adicionados 10µl de digitoni

na 10% em cada um, a fim de romper a membrana dos sinaptossomas e novamente centrifugados a 17300xg por 10 minutos e, tanto o sobrenadante quanto a camada clara do sedimento foram descartados. O sedimento escuro foi então ressuspense em 10ml de meio MS (sem EGTA) e novamente centrifugado a 17300 xg por 10 minutos. O sedimento foi ressuspense em 0,1-0,2 ml de meio MS, obtendo-se uma suspensão mitocondrial com concentração aproximada de 80mg de proteína/ml. Todo o processo foi realizado a uma temperatura entre 0-4°C.

3. PREPARAÇÃO DE MITOPLASTOS (membrana interna + matriz)

A fração de mitoplasto foi preparada segundo PEDERSEN et alii (1978) de uma suspensão mitocondrial de fígado com concentração aproximada de 100mg de proteína por ml de meio.

Foi adicionado 1,0ml da suspensão mitocondrial a 1,0ml de meio H (manitol 225mM, sacarose 75mM, BSA 0,2% tamponado com Hepes 5,0mM, pH 7,2, contendo digitonina 10%). Este material, mantido em banho de gelo, foi agitado lentamente por 10 minutos, diluído pela adição de 5,0ml de meio H e centrifugado a 12100xg por 10 minutos. O sobrena

dante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 3,0ml de meio H e novamente centrifugado a 12100xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio H, obtendo-se uma fração de mitoplasto de concentração aproximada de 75-85mg de proteína/ml de meio.

MEIOS DE REAÇÃO

Os meios de reação usados nas diferentes determinações em mitocôndrias hepáticas continham basicamente sacaro-se 125mM, KCl 65mM e tampão Hepes 3,0mM, pH7,0. Para as determinações em mitocôndrias de cérebro os meios de reação continham basicamente KCl 130mM, BSA 2,0% e tampão Hepes 5,0mM, pH 7,2. Os experimentos foram realizados a 30°C, em câmaras de vidro termostatizadas, com agitação magnética ou cubetas de quartzo quando foi determinada absorbância ou fluorescência. Outras adições feitas ao meio de incubação estão especificadas nas legendas de cada figura. As figuras mostradas neste trabalho são as mais representativas de uma série de pelo menos cinco experimentos. As concentrações de t-Butil hidroperóxido utilizadas para causar liberação reversível de Ca^{2+} mitocondrial eram determinadas diariamente e variavam de preparação para preparação, provavelmente, em função do diferente poder redutor das mesmas.

5. DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

A concentração de proteína da suspensão mitocondrial foi determinada segundo KIES & MURPHY (1960), pela diferença de absorbância da solução proteica em 5,0mM NaOH, nos comprimentos de onda 215 e 225nm, usando-se albumina bovina cristalina como padrão. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro Beckman DU-2.

6. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

A respiração mitocondrial foi medida através do consumo de oxigênio, determinado polarograficamente com eletrodo específico tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) ligado a um oxígrafo Gilson.

A qualidade da preparação mitocondrial foi deduzida em função dos valores do controle respiratório, obtido após o término do processo de isolamento. O controle respiratório é definido como a razão entre a velocidade de consumo de O_2 no estado respiratório 4 (respiração de repouso subsequente ao término da fosforilação do ADP) e a velocidade de

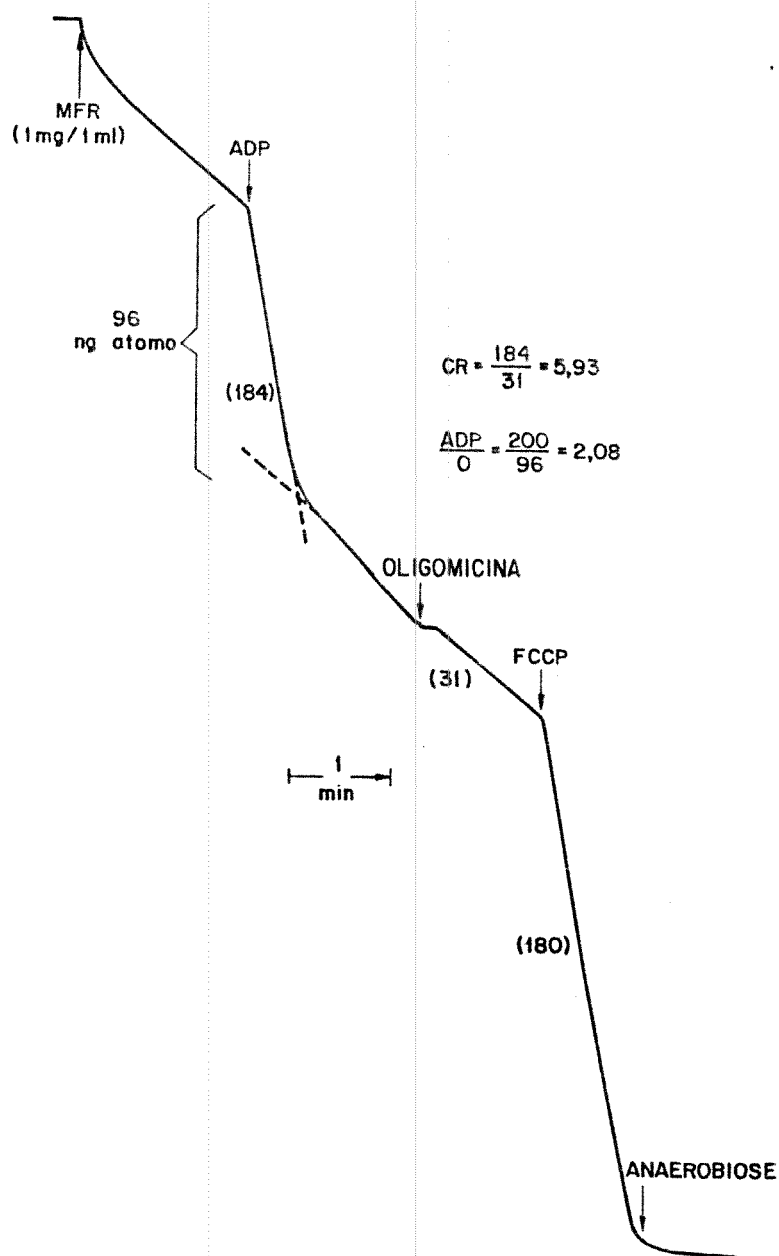


Figura 1. Velocidade de oxidação do succinato nos estados respiratórios 3 e 4 para mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Valores de controle respiratório e razão ADP/O. A reação foi iniciada pela adição de 1,0mg de proteína mitocondrial a 1,0ml de meio contendo suc 2,0mM, rot 4,0 μ M, MgCl₂ 1,0mM, EGTA 0,5mM e Pi 2,0mM. ADP foi adicionado em pulso de 200nmol. As velocidades respiratórias foram obtidas a partir da adição de ADP. As razões ADP/O foram calculadas a partir do consumo de oxigênio extra provocado pela adição de ADP.

respiração de fosforilação obtida após a adição de ADP (estado respiratório 3) (CHANCE & WILLIAMS, 1956). A suspensão mitocondrial foi considerada viável para uso quando esta razão foi igual ou superior a 5,0 (Figura 1). A figura 1 também mostra a razão ADP/O, calculada a partir do consumo de oxigênio extra provocado pela adição de ADP.

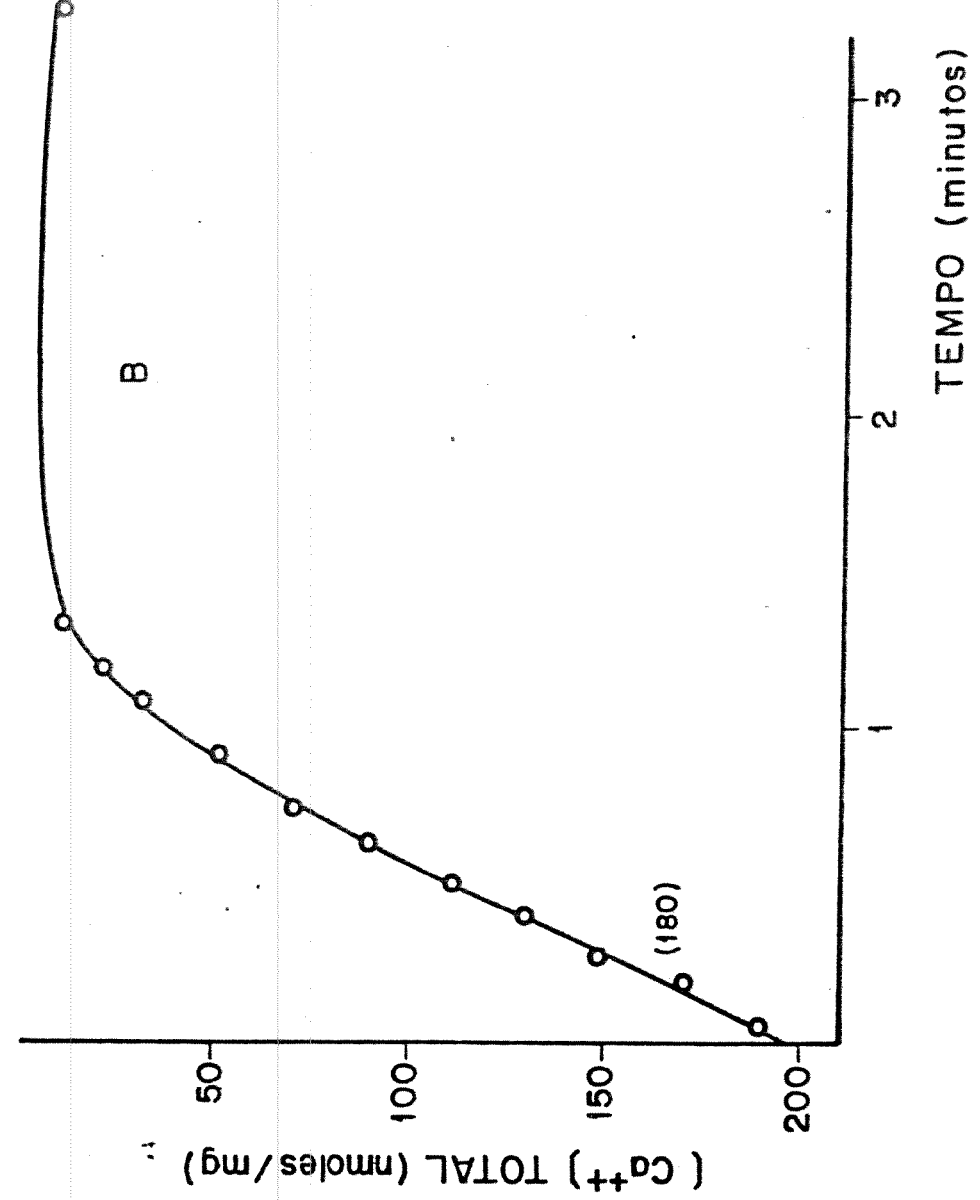
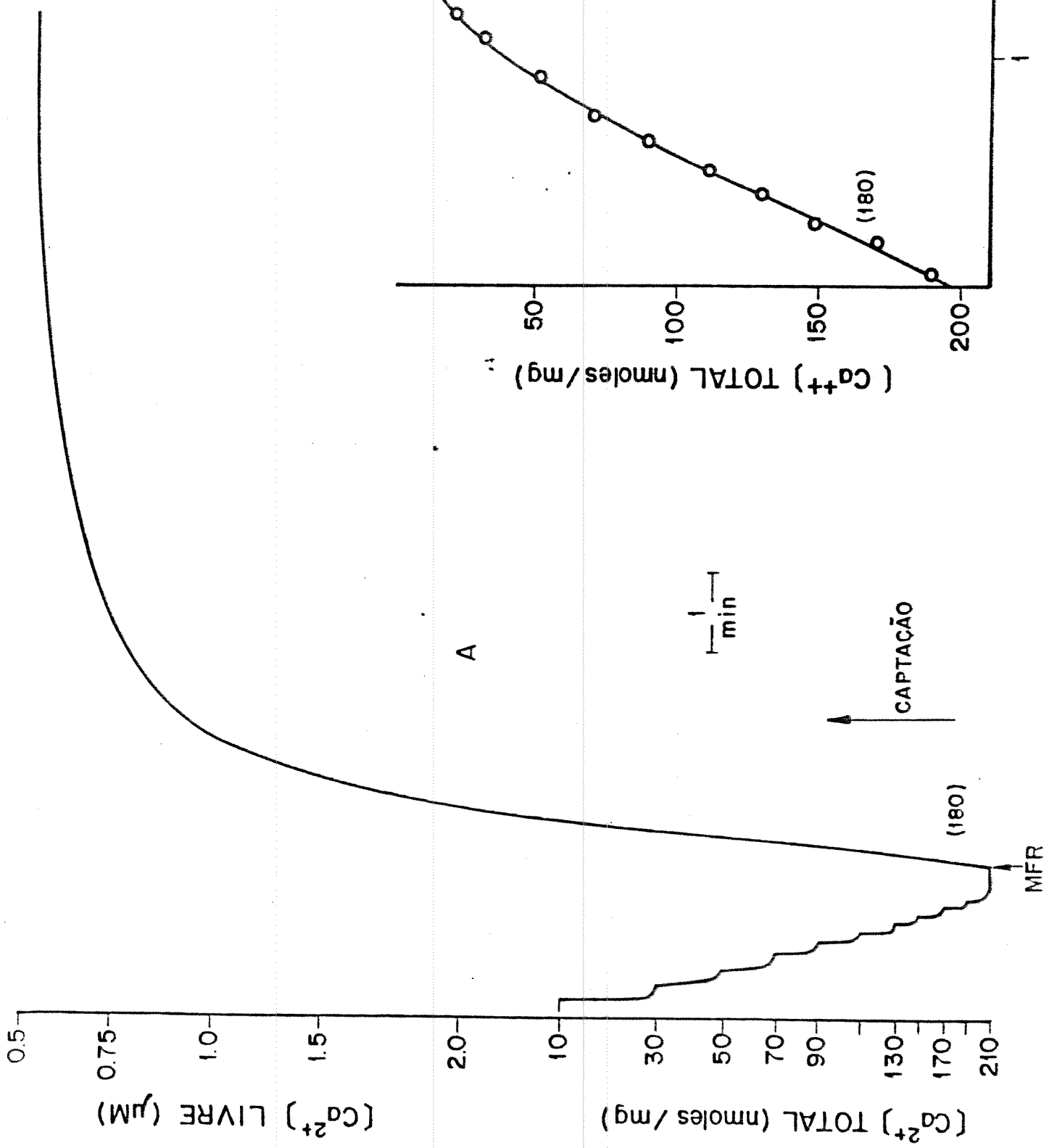
7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} LIVRE

As variações nas concentrações de Ca^{2+} livre no meio de incubação foram acompanhadas por eletrodo seletivo (Calcium Selectrode F2112, Radiometer) (MADEIRA, 1975). Os sinais foram amplificados através de um acessório de alta impedância (Sargent-Welch Scientific Co.), ligado a um registrador potenciométrico.

Em cada experimento, o eletrodo de Ca^{2+} foi calibrado com adições de solução padrão de Ca^{2+} ao meio de reação para concentrações de Ca^{2+} total acima de $10\mu\text{M}$, como mostrado na figura 2. Na calibração para a faixa de concentração de Ca^{2+} livre de $0,25\text{--}2,0\mu\text{M}$ foi adicionado ao meio de reação uma mistura de Ca^{2+} /EGTA, usando-se o valor da constante de dissociação de $4,5 \times 10^6 \text{ M}$ para o cálculo das concentrações de Ca^{2+} .

Figura 2. Calibração do eletrodo seletivo de Ca^{2+} (A) e gráfico linearizado a partir dos dados da calibração (B).

A adição de 200nmoles de Ca^{2+} em pulsos de 20nmoles ao meio básico de reação (1,0ml, 25-28°C) permite observar a resposta não linear do eletrodo e fornece os dados para linearização gráfica da figura (B). A calibração em termos de Ca^{2+} livre foi feita com adição inicial de uma mistura Ca^{2+} /EGTA para produzir uma concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação igual a 2,0 μM , seguida de adições sequenciais de EGTA para se obter os pontos correspondentes a 1,5 e 1,0 ou menores quando necessário. Como exemplo está sendo mostrado que a adição de mitocôndrias de fígado (1,0mg) era seguida de diminuição do Ca^{2+} presente no meio, a uma velocidade de 180nmoles. $\text{mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ até que a concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial atingisse valores na faixa de 1,5 μM .



livre a cada adição, pH7,2 e 30°C (PORTZEHL et alii, 1964 ; BECKER et alii,1980).

A concentração de Ca^{2+} contaminante do meio de reação foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (Atomic Absorption Perkin Elmer, Modelo 303). As amostras foram diluídas em uma mistura de Óxido de lantânio, HCl, n-butanol e água, de acordo com GOCHMAN & GIVELVER (1970) e as leituras foram comparadas com os valores obtidos em uma curva padrão de Ca^{2+} .

8. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ($\Delta\psi$)

O potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP^+), entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, com eletrodo específico construído no laboratório de Bioenergética, Departamento de Bioquímica, IB-Unicamp, de acordo com KAMO et alii (1979). Neste eletrodo utiliza-se uma membrana de cloreto de polivinila (PVC), contendo tetrafenilborato (TPB^-) como trocador de íons. Esta membrana foi preparada adicionando-se 3,0ml de tetrafenilborato de sódio 10mM (dissolvidos em tetrahidrofurano) a 10ml de tetrahidrofurano contendo 0,5g de cloreto de polivinila e 1,5 ml de

dioctilftalato. O solvente (tetrahidrofurano) foi então evaporado lentamente à temperatura ambiente em placa de Petri (60cm² de área). A membrana assim obtida é transparente e tem de 0,15-0,20cm de espessura. Um fragmento desta membrana foi colado com tetrahidrofurano à extremidade de um tubo de PVC (7,0cm de comprimento/0,3cm de diâmetro) que, por sua vez, foi preenchido com TPP⁺ 10mM ($|TPP^+|_{in}$). O contato entre esta solução de TPP⁺ com eletrodo Ag/AgCl foi feito através de uma ponte de ágar (1,5% dissolvido em KCl saturado). A diferença de força eletromotriz (ΔE) entre o eletrodo de TPP⁺ e um eletrodo de referência foi medida por um potenciômetro (Beckman Expandomatic SS-2) ligado a um registrador potenciométrico (linear Instruments Corp.). As concentrações de TPP⁺ no meio de reação foram monitoradas continuamente e os valores de $\Delta\psi$ calculados, usando-se a equação abaixo:

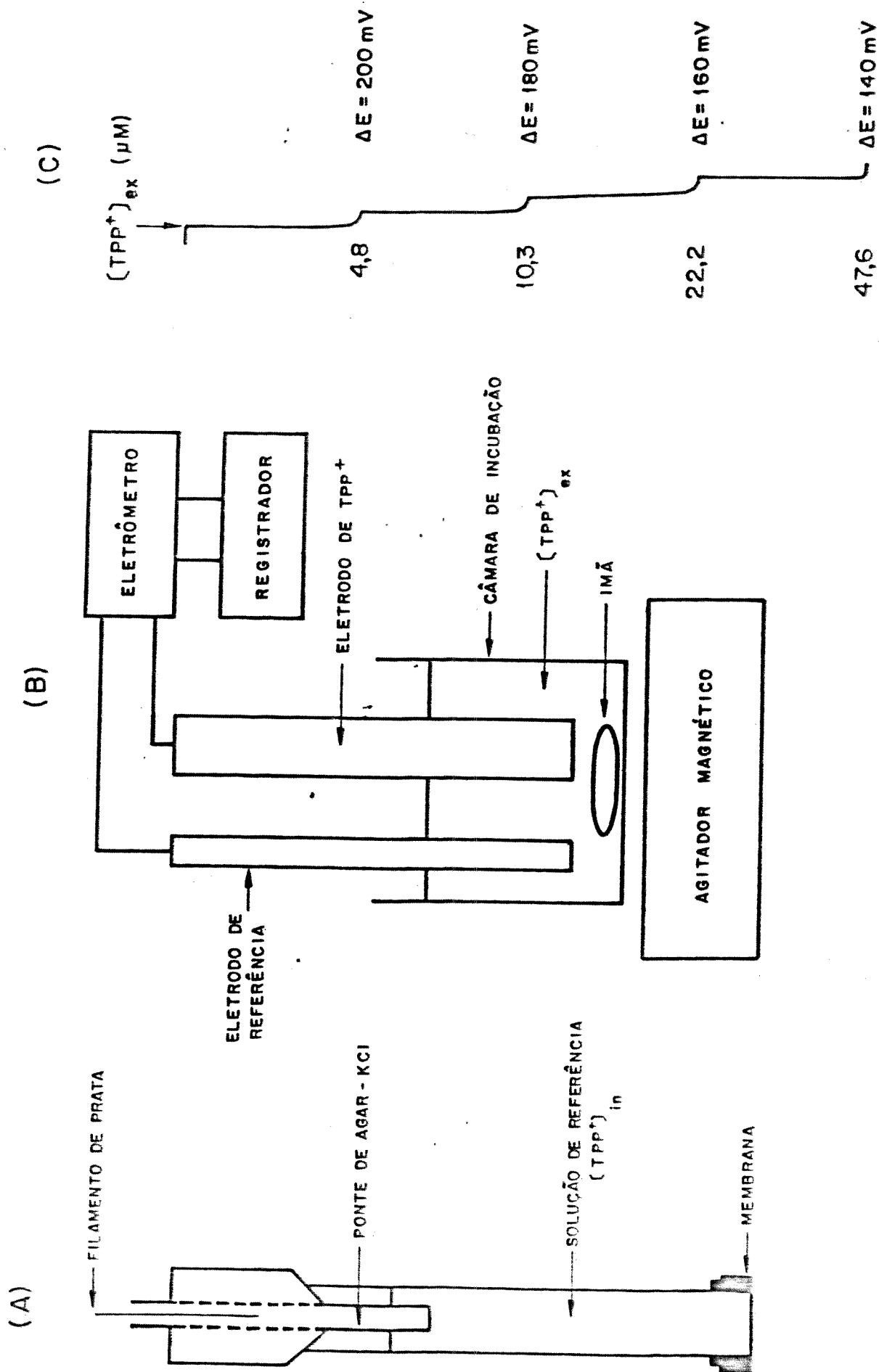
$$\Delta\psi = 2,3RT/F \log v/V - 2,3RT/F \log(10^{F\Delta E/2,3RT} - 1)$$

onde v,V e ΔE representam respectivamente o volume mitocondrial, 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 (Figura 3). Os valores de ΔE na calibração foram calculados pela equação:

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

onde TPP⁺_{ex} refere-se à concentração de TPP⁺ no meio de reação.

Figura 3. Construção de um eletrodo de TPP^+ (A) ;diagrama dos aparelhos usados para medir o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias (B) ; curva de calibração do eletrodo (C).



ção. 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 (Figura 3c). O volume mitocondrial considerado foi de 1,4 μ l por mg de proteína (KAMO et alii, 1979).

9. DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA

Uma vez que só a forma reduzida dos nucleotídeos de piridina apresentam fluorescência (WILLIAMSON & CORKEY, 1969), sua oxidação ou re-redução na suspensão mitocondrial foi determinada excitando-se a suspensão em 366nm e medindo-se a emissão em 450nm, em um espectrofluorímetro Aminco Bowman ligado a um registrador potenciométrico.

10. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DO VOLUME MITOCONDRIAL

Suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença no índice de refração entre o conteúdo da matriz e o meio, e

qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada (NICHOLLS, 1982). Um aumento no volume da matriz mitocondrial associado com a entrada de solutos permeáveis resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e o do meio, com consequente diminuição do espalhamento de luz. Esta propriedade das mitocôndrias "in vitro" fornece um método qualitativo e quantitativo simples para se estudar fluxos de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias se prestam bem para a aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes mudanças de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramento de seus pregueamentos. O acompanhamento deste processo pode ser feito tanto em função da diminuição da luz transmitida em um espectrofotômetro normal, como, de forma mais sensível, usando-se um fluorímetro ajustado para medir a luz espalhada pela suspensão (LS="Light Scattering"), diretamente num ângulo de 90° entre a incidência do feixe de luz e a célula fotoelétrica. Esta técnica tem sido bastante usada porque é um método simples, bastante sensível, rápido e que fornece um registro contínuo da cinética do inchamento (BEAVIS et alii, 1985).

Em nossos experimentos usamos um espectrofluorímetro Aminco Bowman ajustado para um comprimento de onda de 520nm para a excitação e a emissão conforme HUNTER & HAWORTH

(1979). Foi conectado um registrador ao fluorímetro para registrar as variações de volume mitocondrial.

11. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A solubilidade de moléculas de fosfolipídeos em solventes orgânicos depende da natureza da cadeia do ácido graxo (comprimento e saturação) e da presença, no mesmo solvente, de outras moléculas de lipídeos com diferentes solubilidades. Fosfolipídeos naturais são geralmente considerados insolúveis em acetona gelada e solúveis em outros solventes orgânicos como clorofórmio, por exemplo. Uma extração eficiente de lipídeos de membranas pode ser obtida pela homogeneização em mistura de clorofórmio/metanol em um sistema de uma fase. Com base nestes princípios, seguimos o método de FOLCH et alii (1957), modificado e adaptado para membranas mitocondriais, conforme descrito por BROEKEMEIER et alii (1985).

As suspensões mitocondriais tratadas com cálcio e diamida (amostra) e sem cálcio e diamida e com EGTA (controle) foram submetidas ao inchamento por um período de 10, 60 e 120 minutos. A reação da fosfolipase A_2 foi interrompida

através da adição de EGTA e abaixamento de temperatura (0°C). Os lipídeos foram então extraídos por adição de metanol (3:4 de volume) seguida da adição de clorofórmio (3:8 de volume da incubação original). As amostras foram centrifugadas a 11500xg por 10 minutos, o sedimento e a fase aquosa foram desprezados e a fase orgânica foi submetida ao método de separação por cromatografia de camada delgada (CCD).

Uma camada bem fina de sílica gel é o mais comum adsorvente usado em CCD e deve conter sulfato de cálcio como um ligante para proporcionar uma melhor aderência da camada à placa de vidro. Com auxílio de uma seringa aplicam-se as amostras, em pequenos pontos alinhados e separados uns dos outros por espaços de aproximadamente 0,5cm, numa das extremidades da placa. Esta é, então, depositada verticalmente, com a base contendo as amostras, num tanque com solvente eluente bastante para cobrir a placa ligeiramente abaixo da altura da linha de aplicação das amostras. O solvente move-se em direção ao topo da placa por capilaridade carregando os componentes da amostra em velocidades diferentes, de acordo com o grau de retenção pelo adsorvente. Quando o solvente se aproxima do topo da placa, esta deve ser removida do tanque e posta para secar, após o que são reveladas com ácido sulfúrico em chapa quente. Foi feita uma curva padrão com ácido oleico nas mesmas condições da amostra para se estimar o

grau de retenção dos ácidos graxos. Outros padrões (linoleico, palmítico e esteárico) apresentam o mesmo Rf neste tipo de cromatografia.

12. REAGENTES

Diamida, succinato, malato, glutamato, EGTA, rotenona, antimicina A, ATP, ADP, tetrafenilborato de sódio e tetrahidrofurano foram obtidos da Sigma Company. Cloreto de polivinila foi obtido da Aldrich Chemical Company. t- Butil hidroperóxido da Boehringer-Ingelheim e cloreto de cálcio da Merck AG-Darmstad.

Os demais reagentes utilizados foram produtos comerciais do mais alto grau de pureza disponível. Sempre que possível os reagentes foram usados na forma de sais de potássio.

RESULTADOS

FLUXO DE Ca^{2+} EM MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS INCUBADAS NA PRESENÇA DE HIDROPERÓXIDO: EFEITO DE pH E CONCENTRAÇÃO DE ACETATO

Trabalhos anteriores deste laboratório estabeleceram as condições experimentais em que o efluxo de Ca^{2+} induzido pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina foi totalmente reversível (BERNARDES et alii, 1986). Os experimentos das figuras 4 e 5 tiveram como objetivo estabelecer o pH e a concentração de acetato em que este efluxo transitório de Ca^{2+} induzido pelo t-butil hidroperóxido é mais pronunciado. O experimento da figura 4 foi realizado na presença de 75 μM de t-butil hidroperóxido e 40 nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína mitocondrial. As mitocôndrias foram energizadas por ATP e pela respiração endógena. O ajuste de pH foi feito através de adições de HCl 0,1M ou KOH 0,1N, antes da adição da suspensão mitocondrial. Estes experimentos mostram que a velocidade inicial de captação de Ca^{2+} não foi alterada quando o pH do meio variou de 6,8 a 7,4. Porém, o efluxo transiente se tornou mais pronunciado, de menor duração e iniciou-se mais precocemente com o abaixamento de pH na faixa

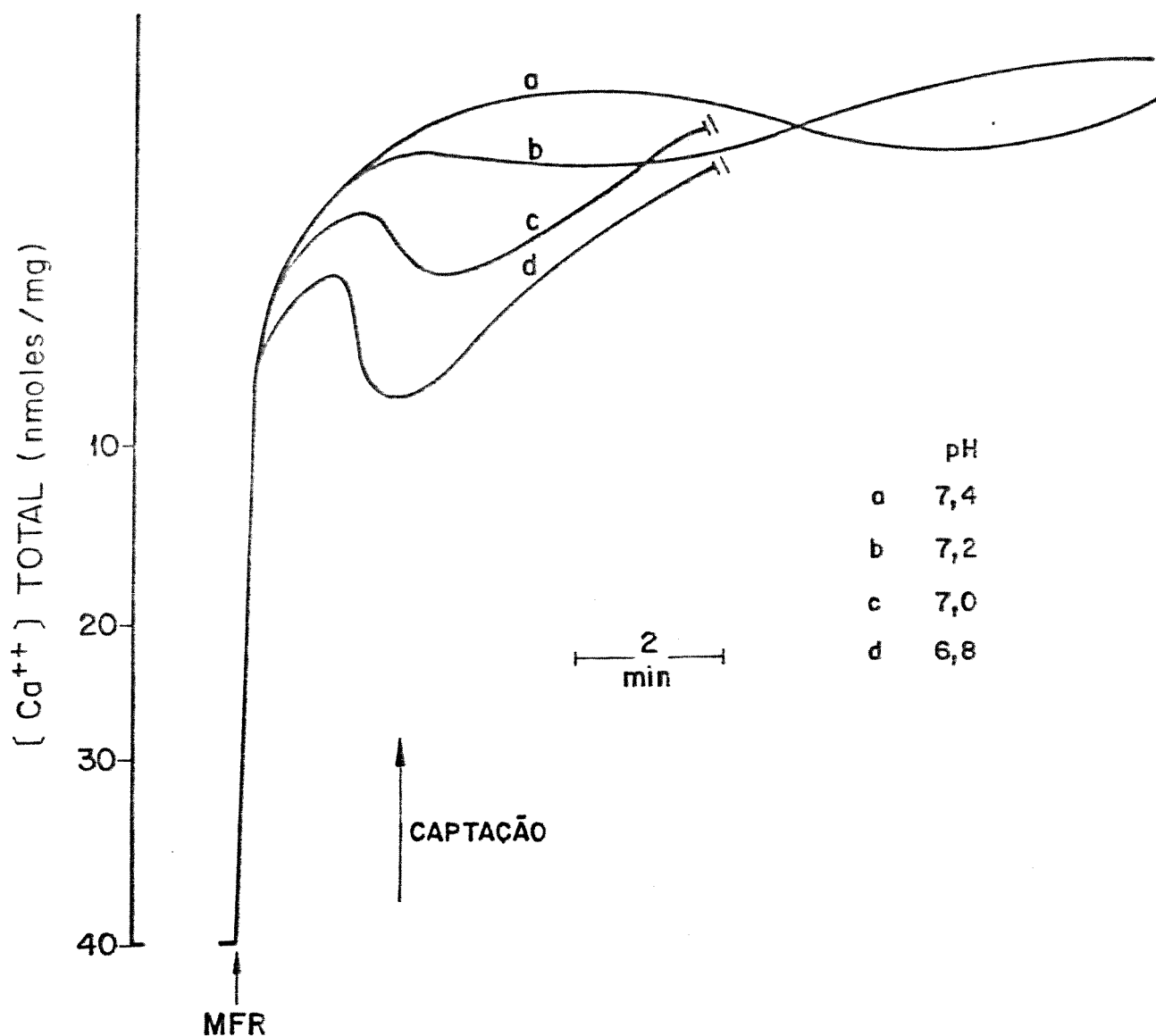


Figura 4. Efeito de t-butil hidroperóxido sobre o transporte de Ca^{2+} em diferentes valores de pH. Mitocôndrias de fígado (1,0mg de proteína) foram incubadas em 1,0ml de meio básico de reação (Materiais e Métodos) contendo ATP 3,0mM, Mg^{2+} 4,0mM e acetato de potássio 10mM, na presença de 40nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína e t-butil hidroperóxido 75 μ M.

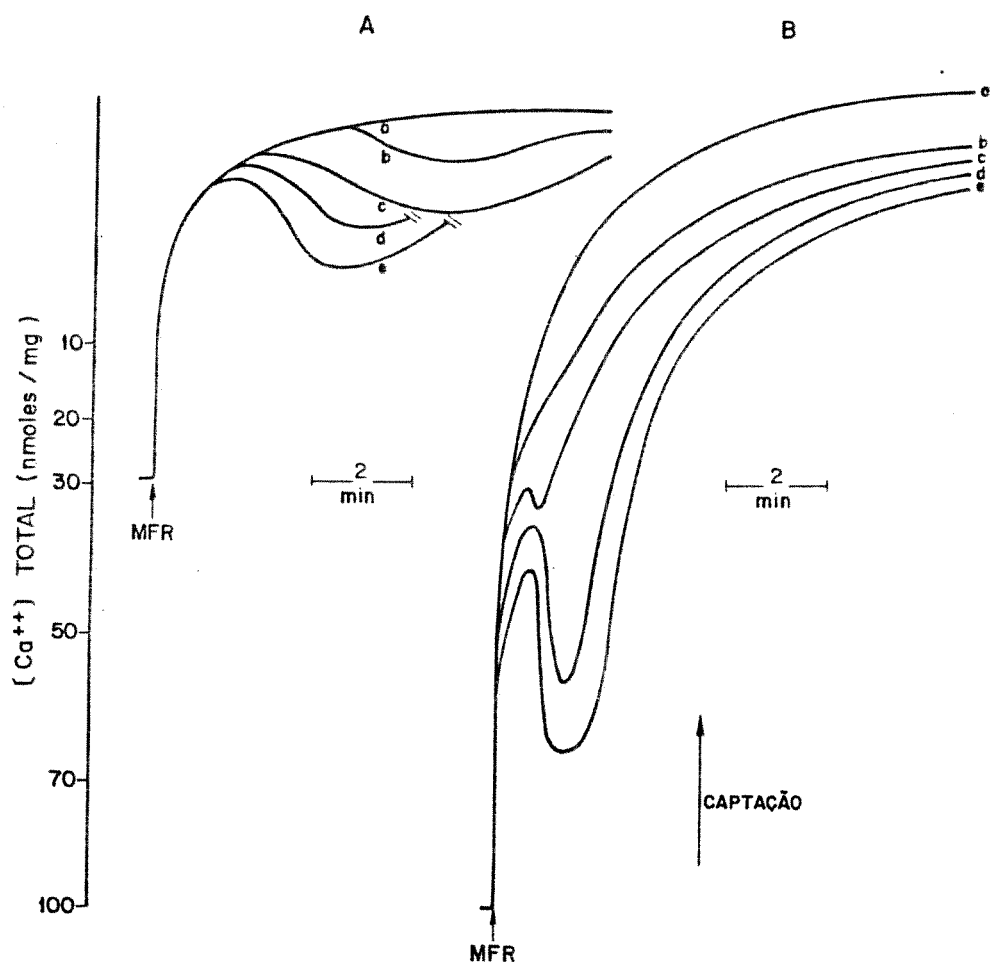


Figura 5. Efeito de t-butil hidroperóxido sobre o transporte de Ca^{2+} na presença de diferentes concentrações de acetato de potássio. Mitocôndrias hepáticas (1,0mg de proteína) foram incubadas em 1,0ml de meio semelhante ao descrito na figura 4, na presença de 30 (A) ou 100 nmoles (B) de Ca^{2+} /mg de proteína. As concentrações de acetato de potássio usadas foram: (a) 0; (b) 3,0mM; (c) 10mM; (d) 15mM e (e) 20mM.

estudada. A figura 5 (A e B) mostra que, nas duas concentrações de Ca^{2+} estudadas, o efluxo também foi mais pronunciado à medida em que a concentração de acetato de potássio aumentou na faixa de 0-20mM.

CORRELAÇÃO ENTRE POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA E EFLUXO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR t-BUTIL HIDROPERÓXIDO

Os experimentos das figuras 6 e 7 mostram as variações no fluxo de Ca^{2+} e no potencial elétrico de membrana de mitocôndrias hepáticas incubadas na presença ou ausência de 50 μM de t-butil hidroperóxido, quando a captação de Ca^{2+} foi energizada somente pela hidrólise de ATP (Figura 6), ou pela hidrólise de ATP e oxidação de succinato (Figura 7). Pode ser observado que na ausência de succinato, a hidrólise de ATP estava associada à produção de um potencial elétrico de membrana em torno de 150mV (Figura 6, painel inferior) enquanto na presença de succinato, o potencial gerado foi de aproximadamente 200mV (Figura 7, painel inferior). Nestas condições, as mitocôndrias captavam o Ca^{2+} presente no meio de reação (30nmoles/mg de proteína mitocondrial) até que a concentração extramitocondrial atingisse uma condição de fluxo constante em valores aproximados de 1,0 e 0,5 μM (Figuras 6 e 7,

Figura 6. Correlação entre fluxo de Ca^{2+} e potencial elétrico de membrana em mitocôndrias energizadas pela hidrólise de ATP. Mitocôndrias hepáticas (1,0mg de proteína) foram incubadas em 1,0ml de meio de reação semelhante ao descrito na figura 4, contendo rot 4,0 μM e 30nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, na presença (linha tracejada) ou ausência (linha cheia) de t-butil hidroperóxido 50 μM .

Figura 7. Correlação entre fluxo de Ca^{2+} e potencial elétrico de membrana em mitocôndrias energizadas pela hidrólise de ATP e oxidação de succinato. Mitocôndrias (1,0mg de proteína) foram incubadas em meio semelhante ao descrito na figura 6, acrescido de Suc 2,0mM, na presença (linha tracejada) ou ausência (linha cheia) de t-butil hidroperóxido 50 μM .

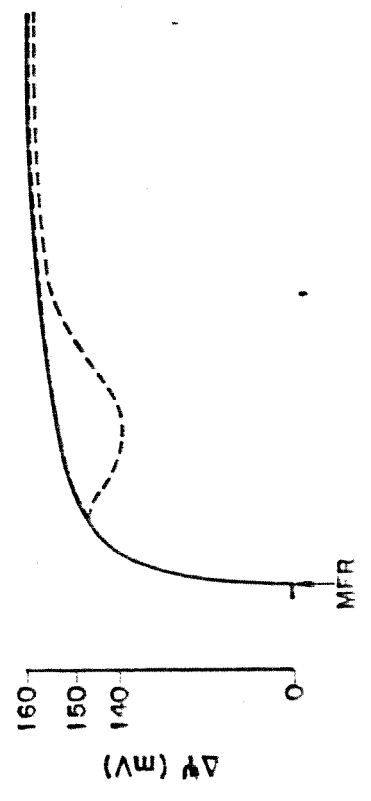
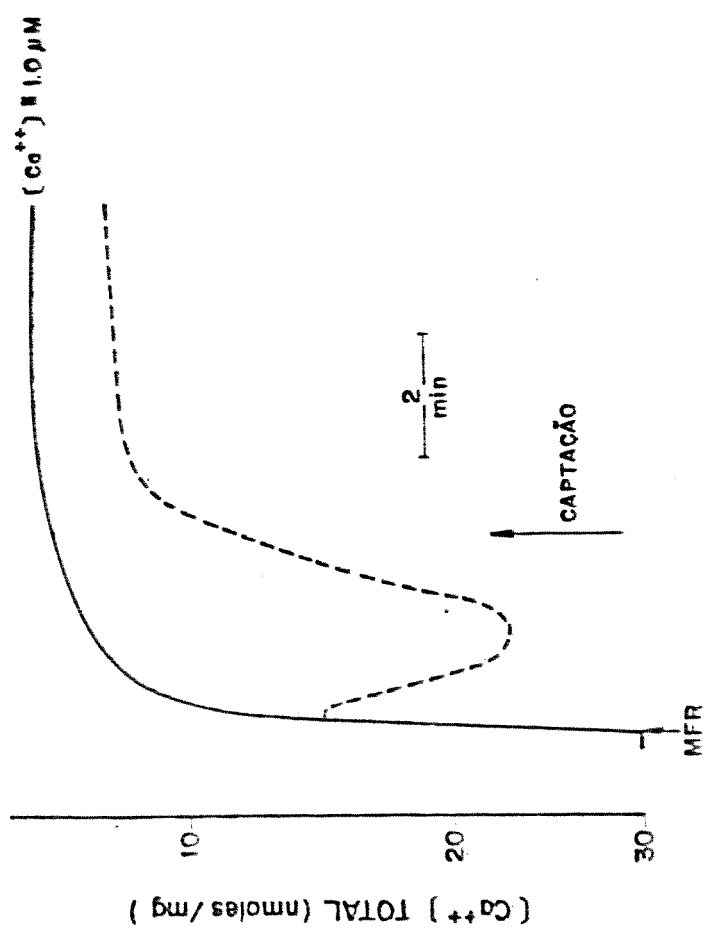
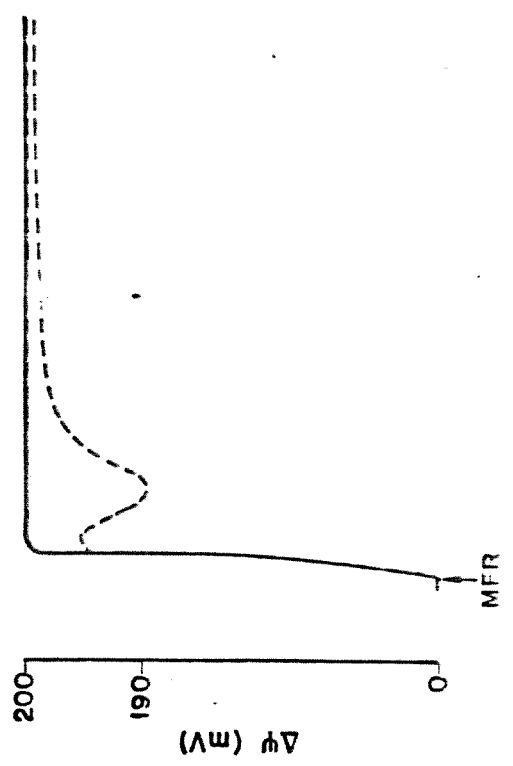
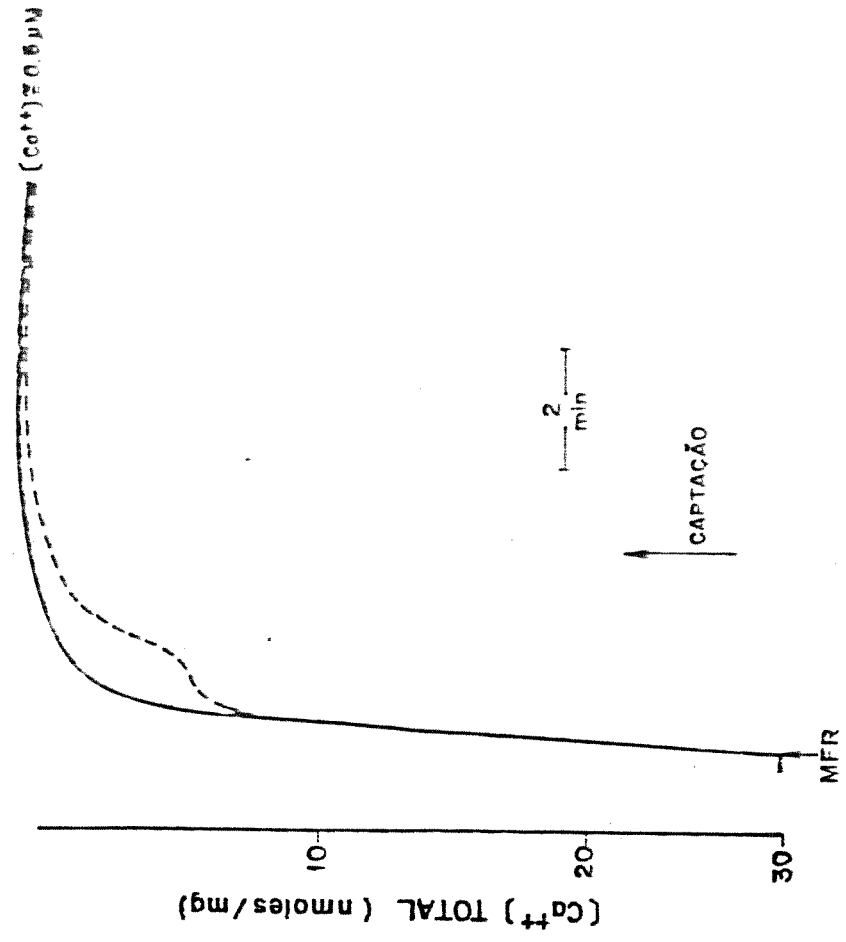


Figura 7

Figura 6

paineis superiores), respectivamente. Nas condições experimentais da figura 6 ($\Delta\Psi=150\text{mV}$), a presença de hidroperóxido causou um acentuado efluxo de Ca^{2+} , paralelo a uma queda de aproximadamente 10mV no potencial de membrana, enquanto nas condições da figura 7 ($\Delta\Psi=200\text{mV}$), uma queda equivalente de $\Delta\Psi$ estava associada a uma alteração pouco significativa no fluxo de Ca^{2+} .

CORRELAÇÃO ENTRE O ESTADO ENERGÉTICO DAS MITOCONDRIAS E A OXIDAÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA ENDÓGENOS INDUZIDA POR t-BUTIL HIDROPERÓXIDO

Como mencionado na introdução deste trabalho, o t-butil hidroperóxido é reduzido na matriz mitocondrial pelo sistema enzimático glutathione peroxidase/glutathione reductase, utilizando equivalentes de redução do NADPH provenientes do NADH através da reação dependente de energia (na forma de $\Delta\mu\text{H}^+$), catalisada pela NADP-transidrogenase (LOTSCHER et alii, 1979). A figura 8 (traçado b) mostra que a oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais, ilustrada pelo decréscimo da fluorescência em 450nm, causada pela adição de 50 μM de t-butil hidroperóxido, é totalmente revertida após um

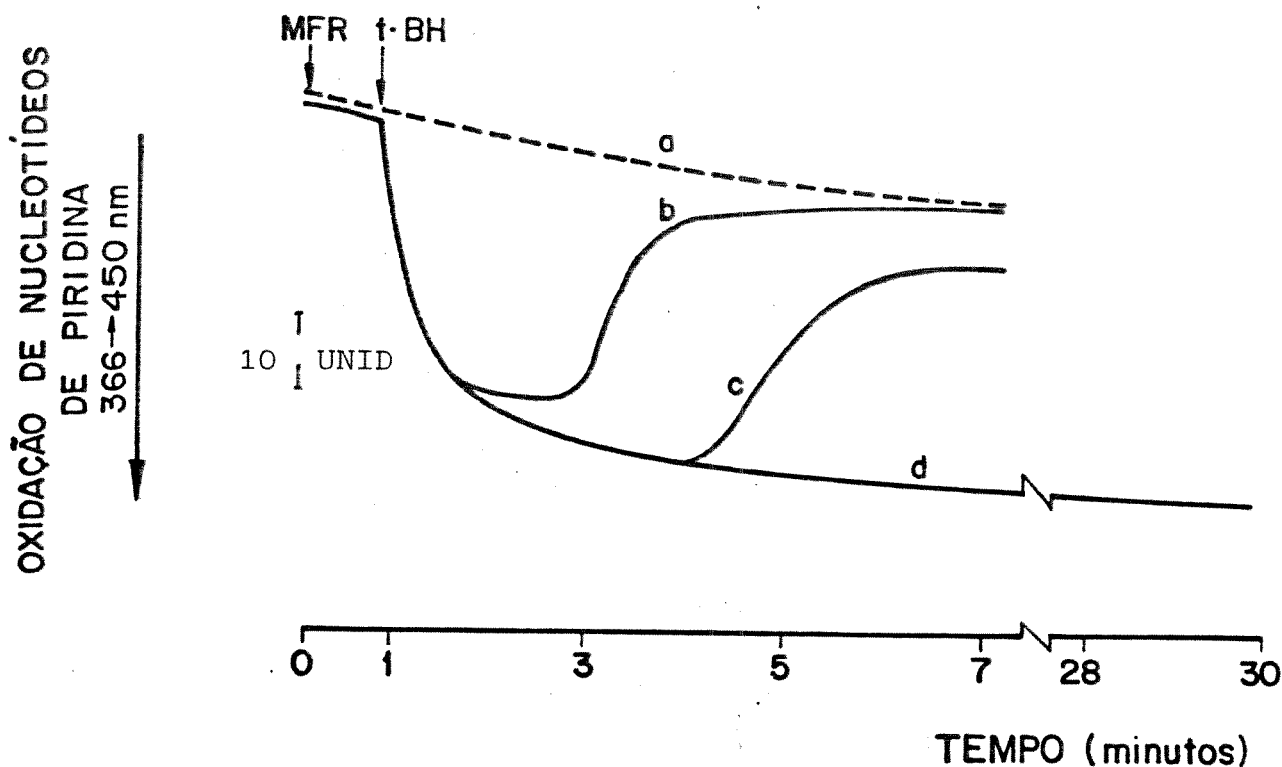


Figura 8. Correlação entre o estado energético das mitocôndrias e a oxidação dos nucleotídeos de piridina endógenos induzida por t-butil hidroperóxido. Mitocôndrias hepáticas (1,0mg de proteína) foram incubadas em 1,0ml de meio básico de reação contendo Mg^{2+} 4,0mM e Ac^{-} 10mM na ausência (controle, traçado a) ou presença de t-BH 50 μ M mais: (b) suc 2,0mM + rot 4,0 μ M e ATP 3,0 mM, (c) ATP 3,0mM e rot 4,0 μ M e (d) igual a c mais FCCP 0,5 μ M e Oligo 1,0 μ g/mg.

período de tempo de aproximadamente 2 minutos, quando as mitocôndrias foram energizadas por ATP e succinato ($\Delta\Psi=200\text{mV}$). Na ausência de succinato ($\Delta\Psi=150\text{mV}$, traçado c), este período de tempo é significativamente maior (aproximadamente 4 minutos). Quando as mitocôndrias foram totalmente desenergizadas pela presença de rotenona, oligomicina e FCCP (traçado d), não ocorreu re-redução dos nucleotídeos de piridina mesmo após um período de observação de 30 minutos. É possível ainda observar que, além da redução de todo hidroperóxido adicionado ter ocorrido num período de tempo bastante curto na presença de succinato, a extensão da oxidação dos nucleotídeos de piridina também foi cerca de 25% menor nestas condições. Estes resultados presumivelmente explicam o menor efeito do hidroperóxido sobre o fluxo de Ca^{2+} no experimento da figura 7 quando comparado com o da figura 6.

MITOCÔNDRIAS DESENERGIZADAS SÃO MAIS SENSÍVEIS AOS EFEITOS DELETÉRIOS DE Ca^{2+} NA PRESENÇA DE t-BUTIL HIDROPERÓXIDO

Os experimentos das figuras 9 e 10 mostram as variações no fluxo de Ca^{2+} (painel superior) e inchamento mitocondrial (painel inferior) causados pela presença de

t-butil hidroperóxido em mitocôndrias hepáticas energizadas pela oxidação do succinato. No experimento da figura 9 as mitocôndrias foram adicionadas ao meio de reação já contendo succinato, enquanto no experimento da figura 10 as mitocôndrias foram pré-incubadas durante 5 minutos com 60 nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína, antes da adição do substrato respiratório. As demais condições para os dois experimentos foram idênticas. O traçado a da figura 9 (linha cheia) mostra que o Ca^{2+} adicionado ao meio de reação foi captado até que a concentração extramitocondrial atingiu uma condição de fluxo constante a um valor aproximado de $0,75\mu\text{M}$, e que não ocorreu inchamento mitocondrial na ausência de t-butil hidroperóxido. O traçado b (linha tracejada) mostra que houve um efluxo transiente de Ca^{2+} e um lento inchamento mitocondrial quando os nucleotídeos de piridina foram oxidados pela adição de t-butil hidroperóxido. A adição de antimicina A, que desenergiza imediatamente as mitocôndrias, (traçado c, linha pontilhada) causou a imediata liberação do cátion e aumentou significativamente a velocidade do inchamento observado no traçado b. Nos experimentos da figura 10, o traçado a (linha cheia) mostra que na ausência do oxidante, a adição de succinato fez com que as mitocôndrias captassem o Ca^{2+} extramitocondrial até uma condição de fluxo constante aproximadamente igual a da figura 9 e também não causou inchamento mitocon-

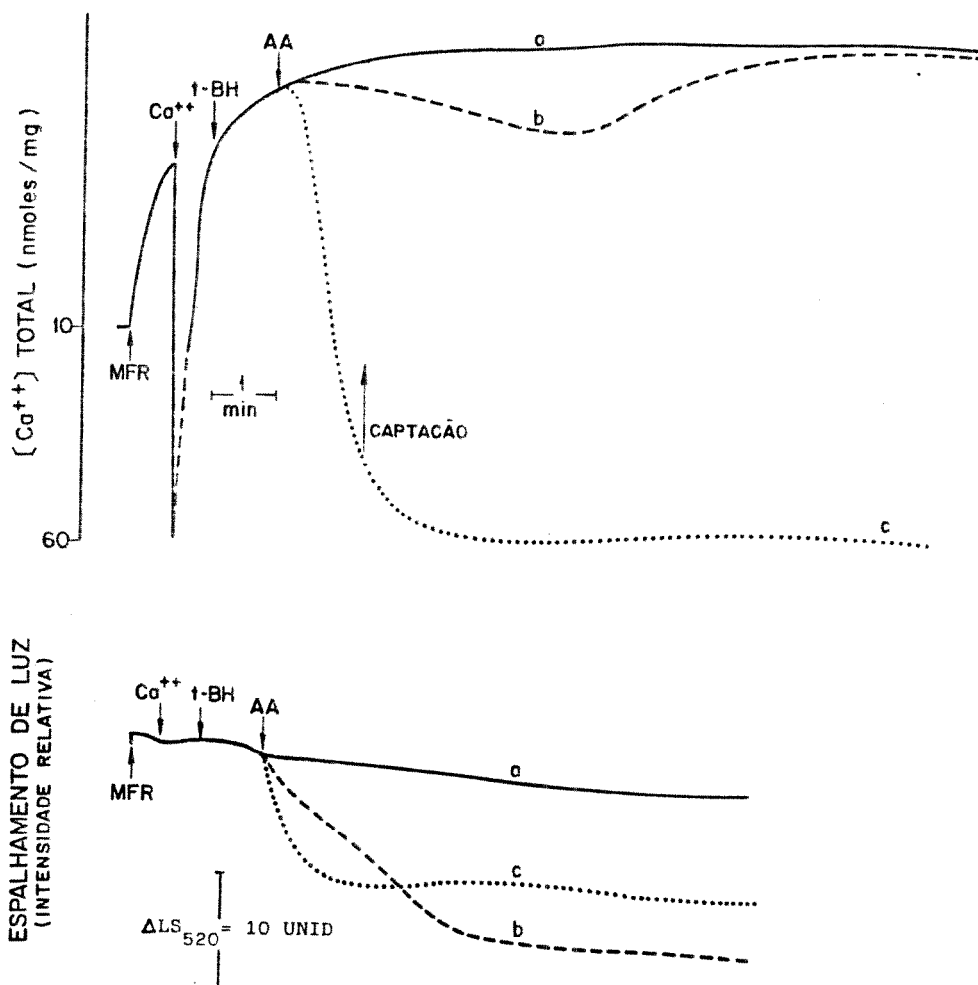


Figura 9. Correlação entre fluxo de Ca^{2+} e inchamento mitocondrial em mitocôndrias hepáticas energizadas pela oxidação de succinato. Mitocôndrias hepáticas (1,0mg de proteína) foram incubadas em 1,0ml de meio básico de reação contendo suc 2,0mM, rot 4,0 μ M oligo 1,0 μ g/mg, Pi 0,2mM, Mg^{2+} 1,0mM e 60nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína. Os experimentos foram realizados: (a) na ausência de t-BH e AA (linha cheia) ; (b) na presença de t-BH 20 μ M e ausência de AA (linha tracejada) e (c) na presença de t-BH 20 μ M e AA 1,0 μ M (linha pontilhada).

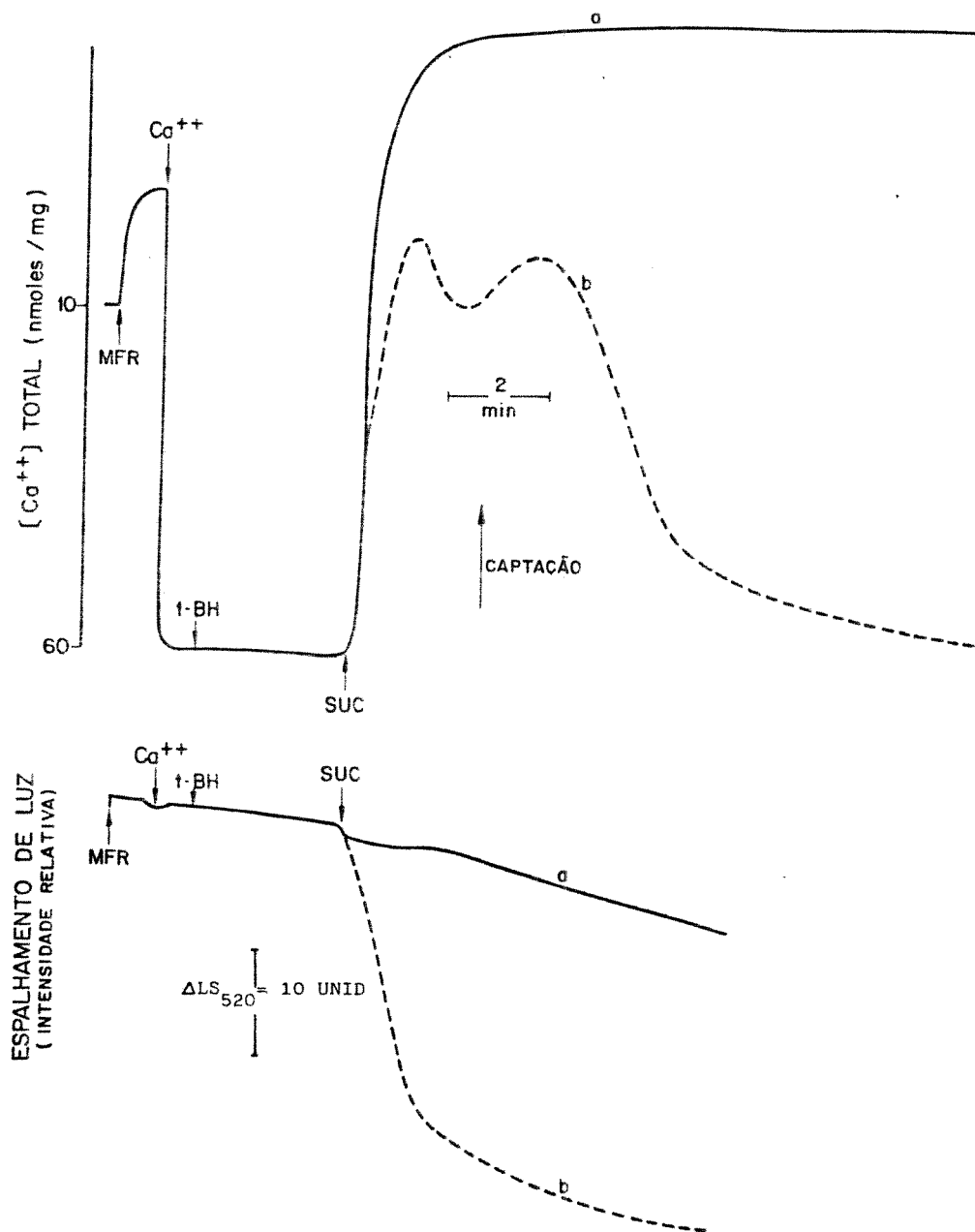


Figura 10. Efeito da pré-incubação com Ca^{2+} de mitocôndrias desenergizadas sobre o fluxo de Ca^2 e inchamento mitocondrial. Mitocôndrias hepáticas (1,0mg de proteína) foram pré-incubadas durante 5 minutos em 1,0ml de meio básico de reação contendo rot 4,0 μM , oligo 1,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$, Pi 0,2mM, Mg^2 1,0mM e 60nmoles de Ca^{2+}/mg de proteína. Suc 2,0mM foi adicionado onde indicado, após o período de pré incubação. Os experimentos foram realizados: (a) na ausência de t-BH (linha cheia) e (b) na presença de t-BH 20 μM (linha tracejada).

drial de grande amplitude. No entanto, o traçado b (linha tracejada) mostra a ocorrência de efluxo líquido de Ca^{2+} e de um rápido e extenso inchamento mitocondrial na presença de t-butil hidroperóxido, indicando que a pré-incubação de mitocôndrias desenergizadas com concentrações altas de Ca^{2+} externo causou uma grande diferença na resposta ao efluxo do íon e inchamento mitocondrial induzido pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina.

EFEITO DE N-ETILMALEIMIDA SOBRE O EFLUXO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR t-BUTIL HIDROPERÓXIDO

Vários trabalhos (JEWELL et alii, 1982; BEATRICE et alii, 1984; VERCESI, 1984b) indicam que a oxidação de alguns grupos -SH críticos de proteínas da membrana mitocondrial, secundária à oxidação de NAD(P)H ou GSH está mais diretamente ligada à liberação de Ca^{2+} causada por hidroperóxido. No experimento mostrado na figura 11, testamos esta hipótese utilizando N-etilmaleimida para proteger tais grupos -SH contra esta possível oxidação. Pode ser observado que a presença de N-etilmaleimida (20 μM) preveniu o efluxo de Ca^{2+} induzido pelo t-butil hidroperóxido (traçado a). Além disso, este

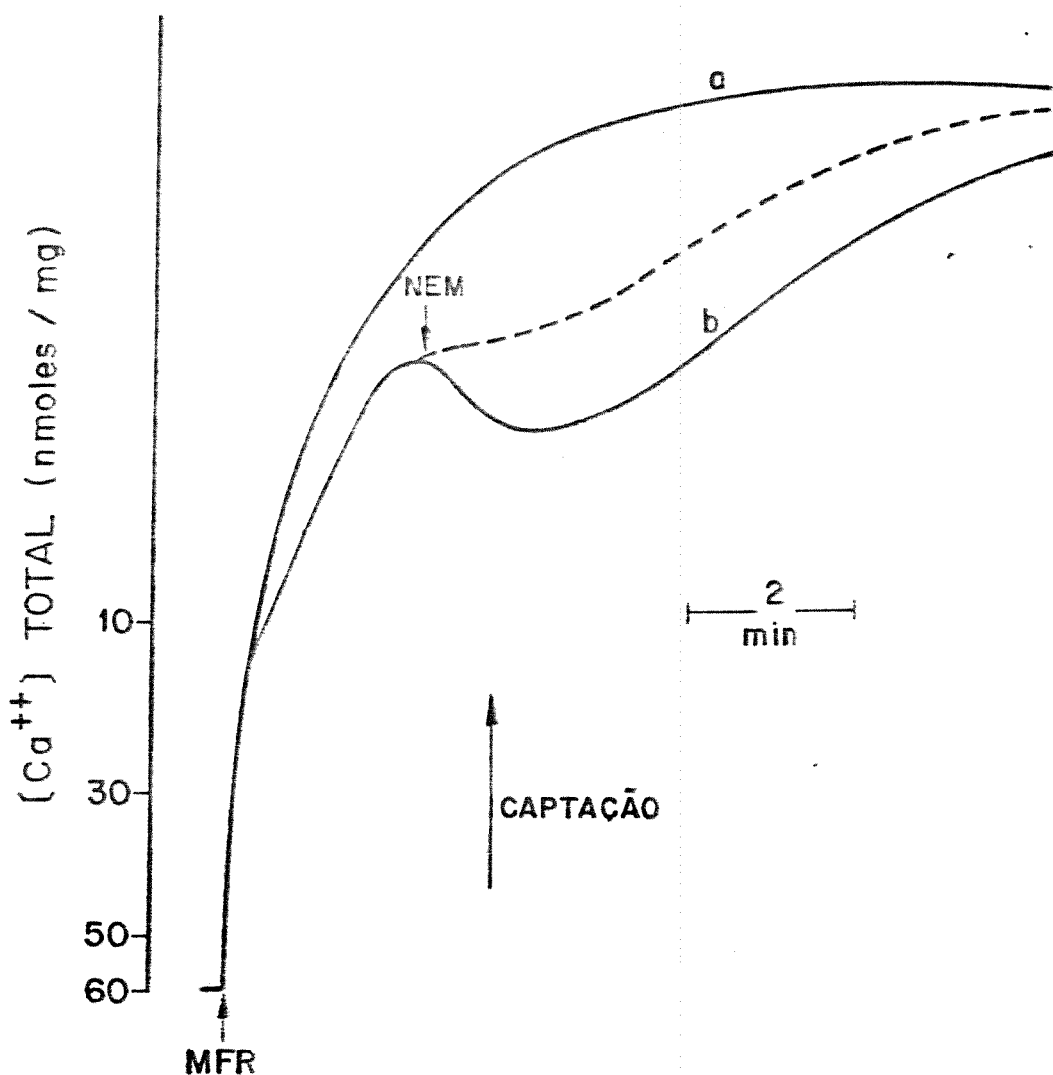


Figura 11. Efeito de N-etilmaleimida sobre o efluxo de Ca^{2+} induzido por t-butil hidroperóxido. Mitocôndrias hepáticas (1,0mg de proteína) foram incubadas em 1,0 ml de meio básico de reação, semelhante ao descrito na figura 4, com 60nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína mais: (a) t-BH 70µM e NEM 20µM, (b) t-BH 70µM. NEM (20µM) foi adicionado onde indicado (linha tracejada).

efluxo induzido pelo hidróperóxido (traçado b) foi revertido pela presença deste reagente tiólico (linha tracejada).

REVERSAO POR DITIOTREITOL DO EFLUXO DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL INDUZIDO POR DIAMIDA E t-BUTIL HIDROPERÓXIDO

A figura 12 mostra experimentos nos quais o efluxo de Ca^{2+} de mitocôndrias hepáticas foi induzido pela presença de t-butil hidróperóxido (A) ou diamida (B). A diamida, além de ser um oxidante de grupos -SH vicinais de cadeias polipeptídicas de membrana (KURANTSI-MILLS & LESSIN,1981), também oxida o NAD(P)H mitocondrial (RIZZUTO et alii,1987). Em ambos os casos, a recaptação de Ca^{2+} ocorreu imediatamente após a adição de ditiotreitól que, presumivelmente regenera grupos sulfidrila de proteínas da membrana. Quando usamos uma concentração de t-butil hidróperóxido que causou somente uma oxidação transitória dos nucleotídeos de piridina (BERNARDES et alii,1986), o aumento na concentração de Ca^{2+} extra mitocondrial também foi transitório (Figura 12A, linha tracejada).

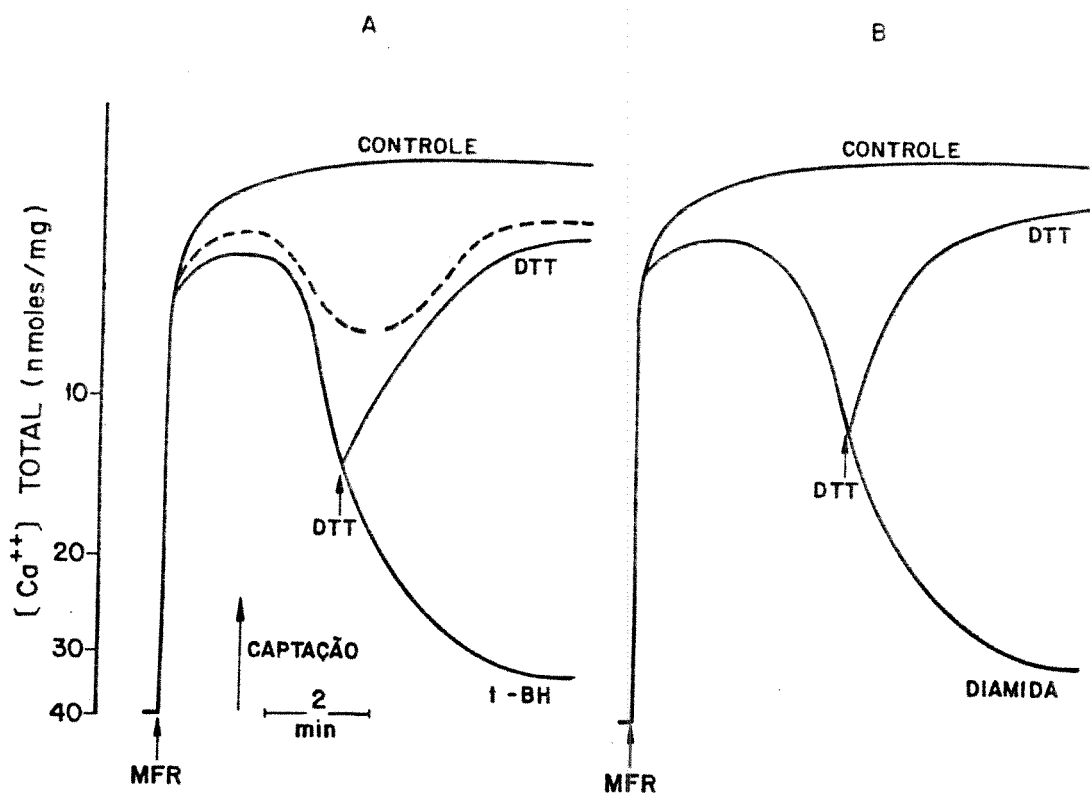


Figura 12. Efeitos de t-butil hidroperóxido, diamida e ditio treitol sobre o fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias hepáticas. Mitocôndrias (1,0mg de proteína) foram incubadas em 1,0ml de meio básico de reação contendo ATP 200 μM , Mg^{2+} 0,5mM e 40nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína. (A) Os experimentos foram realizados na ausência (controle) ou presença de t-BH 25 μM (linha tracejada) ou 50 μM (linha cheia). (B) Os experimentos foram realizados na ausência (controle) ou presença de diamida 0,3mM. DTT (0,5mM) foi adicionado onde indicado em A e B.

FLUXO DE Ca^{2+} E INCHAMENTO MITOCONDRIAL EM MITOCÔNDRIAS DE
CÉREBRO DE RATOS: EFEITO DE FOSFATO, DIAMIDA E ATP E Mg^{2+}

A figura 13 mostra que na presença de baixas concentrações de fosfato no meio de reação (0,2mM), mitocôndrias de cérebro captam e retém o Ca^{2+} presente no meio, mantendo a concentração extramitocondrial a valores próximos de 0,75 μM (traçado a). Entretanto, a presença de fosfato 3,0mM (traçado b) ou diamida 0,3mM (traçado c) induziram efluxo do Ca^{2+} acumulado mesmo antes de todo o Ca^{2+} do meio ter sido captado. Por outro lado, os experimentos da figura 14 mostram que quando ATP e Mg^{2+} estão presentes no meio de incubação, estas mitocôndrias podem captar e reter cerca de 60nmol de Ca^{2+} por mg de proteína, mesmo na presença de fosfato 3,0mM ou diamida 0,3mM. A adição posterior de Ca^{2+} foi seguida pela captação e retenção deste cátion. Em concordância com os experimentos sobre fluxo de Ca^{2+} (Figuras 13 e 14), o experimento da figura 15 mostra que adições de Ca^{2+} em mitocôndrias desenergizadas, incubadas na presença de fosfato (traçado b) ou fosfato mais diamida (traçado c) induzem um inchamento mitocondrial muito rápido que é quase que completamente inibido pela presença de ATP e Mg^{2+} (traçado d).

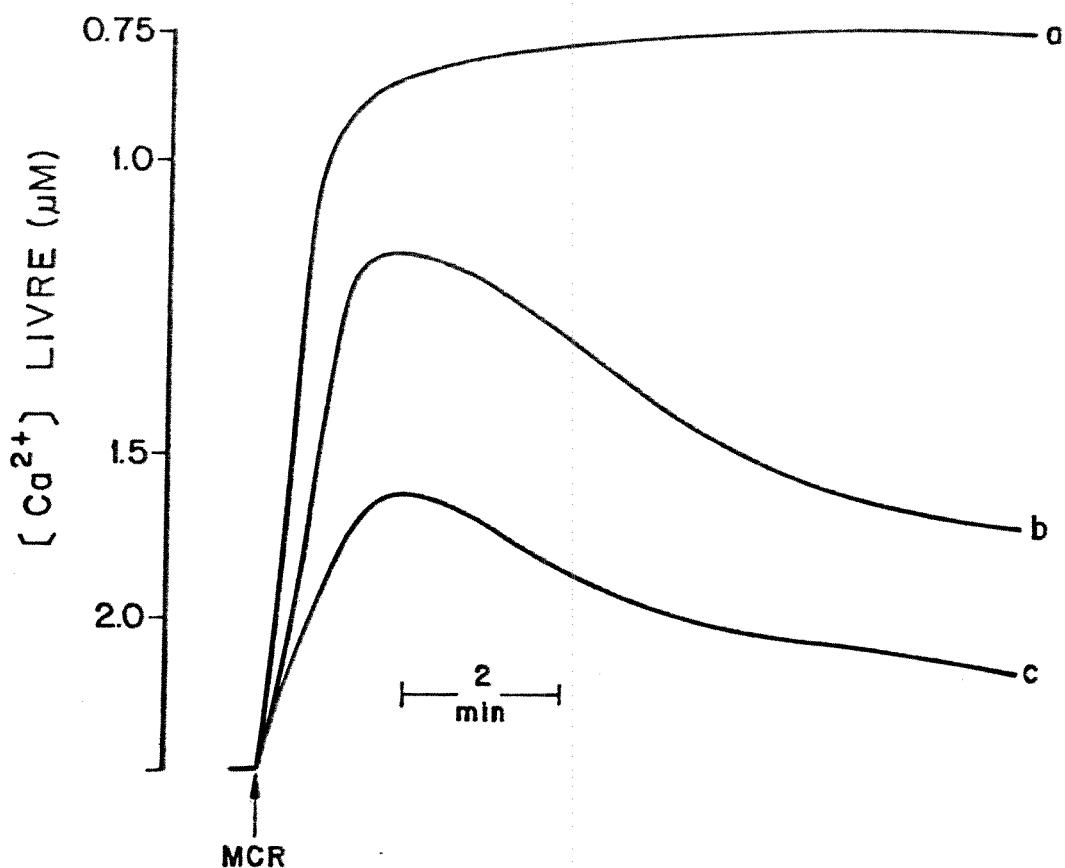


Figura 13. Efeito de fosfato e diamida sobre o fluxo de Ca^{2+} em mitocôndria de cérebro de rato. Mitocôndrias (1,0mg de proteína) foram in cubadas em 1,0ml de meio básico de reação (Materiais e Métodos) contendo suc 2,0mM, rot 4,0mM, Mg^{2+} 1,0mM e 10nmoles de Ca^{2+} / mg de proteína, mais: (a) Pi 0,2mM, (b) Pi 3,0mM e (c) diamida 0,3mM.

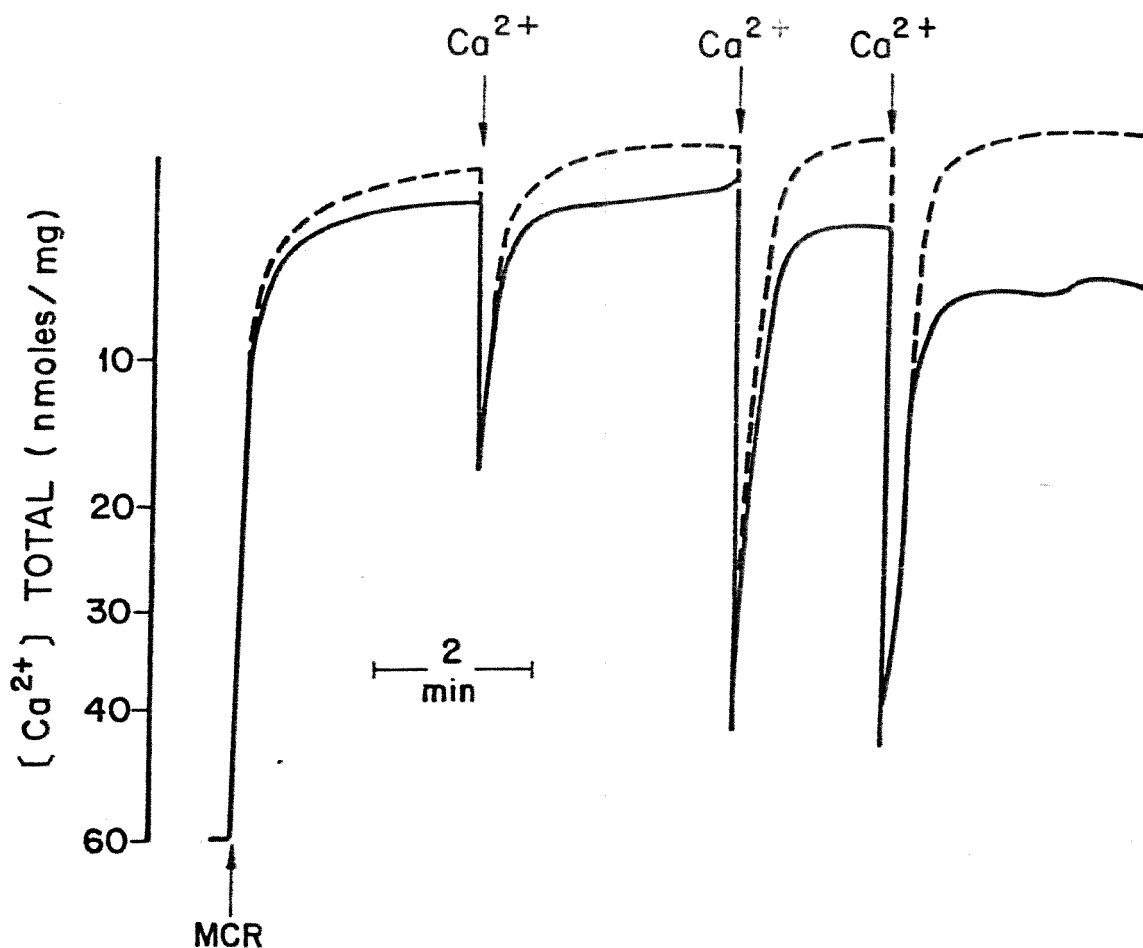


Figura 14. Retenção de Ca^{2+} por mitocôndrias de cérebro na presença de ATP e Mg^{2+} . Mitocôndrias de cérebro (1,0mg de proteína) foram incubadas em 1,0ml de meio básico de reação contendo suc 2,0mM, rot 4,0 μ M, ATP 3,0mM e Mg 4,0mM mais: Pi 3,0mM (linha tracejada) ou Pi 3,0mM e diam 0,45mM (linha cheia). Adições sequenciais de 50, 100 e 100 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína foram feitas onde indicado.

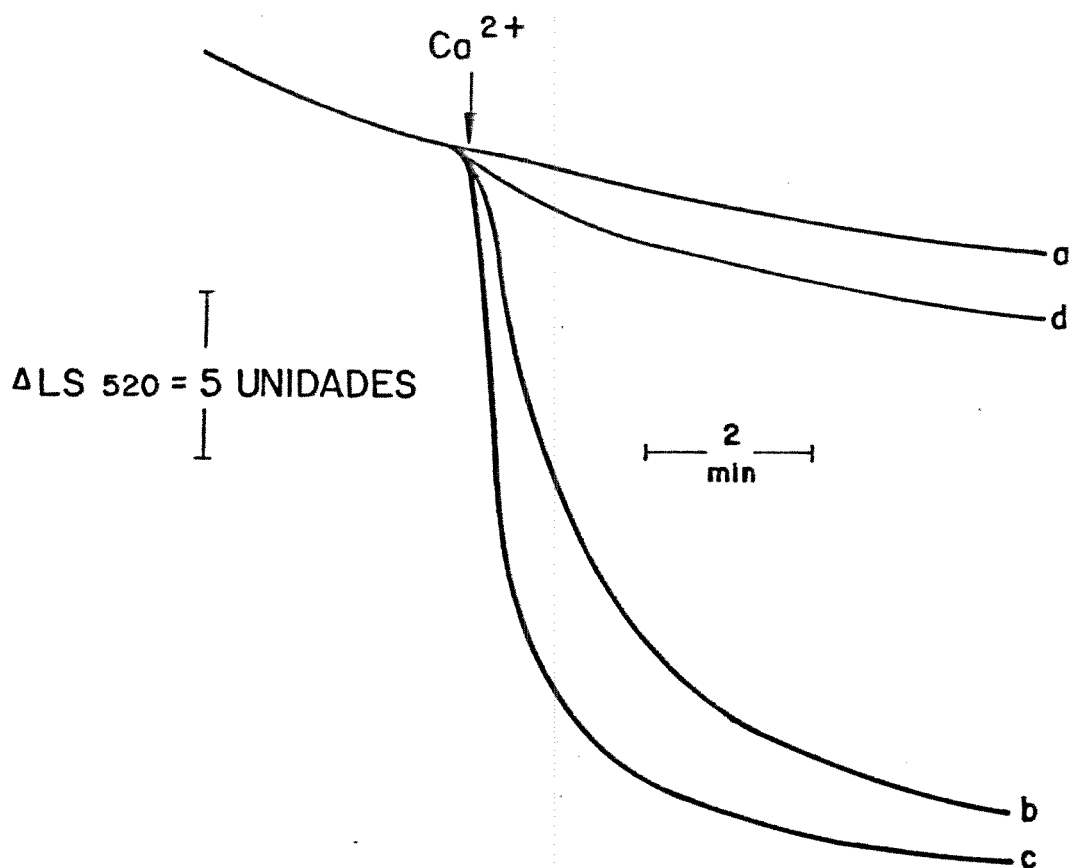


Figura 15. Inchamento mitocondrial em mitocôndrias de cérebro desenergizadas, induzido por fosfato ou diamida na presença de Ca^{2+} . Mitocôndrias (0,25mg de proteína) foram incubadas em 1,0ml de meio básico de reação contendo oligo 1,0 μ g/mg, AA 0,2mM, mais: (a) EGTA 0,5mM, (b) pi 3,0mM, (c) Pi 3,0mM + Diamida 0,3mM e (d) igual c mais ATP 3,0mM e Mg^{2+} 4,0mM. $CaCl_2$ (500 μ M) foi adicionado on de indicado.

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM MITOCÔNDRIAS PRÉ-
INCUBADAS NA PRESENÇA DE Ca^{2+} E DIAMIDA

De acordo com a hipótese do grupo de Pfeiffer, o efeito de oxidantes de nucleotídeos de piridina sobre o aumento da permeabilidade não específica na membrana mitocondrial interna é devido à perturbação no ciclo de deacilação-reacilação de fosfolipídeos da membrana, resultando deste processo, acúmulo de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (RILEY & PFEIFFER, 1985, 1986). Segundo estes autores, a atividade da fosfolipase A_2 , ativada por Ca^{2+} , em mitocôndrias de cérebro é cerca de 20% daquela observada para mitocôndrias hepáticas (FISKUM et alii, 1985). Os experimentos da figura 16 (A e B) mostram os resultados da cromatografia de camada delgada, do extrato mitocondrial de fígado e de cérebro, nas condições de inchamento passivo em meio de sacarose e KCl, após 60 (Figura 16A) e 120 minutos (Figura 16B) de incubação. O aparecimento de ácidos graxos livres em mitocôndrias de fígado após 60 e 120 minutos de incubação (Figura 16 AeB, traçado a) na mesma altura da amostra tratada com o padrão (Figura 16 AeB, traçado b) comprovam os resultados obtidos por FISKUM et alii (1985), uma vez que nas mesmas condições experimentais, não foram detectados ácidos graxos

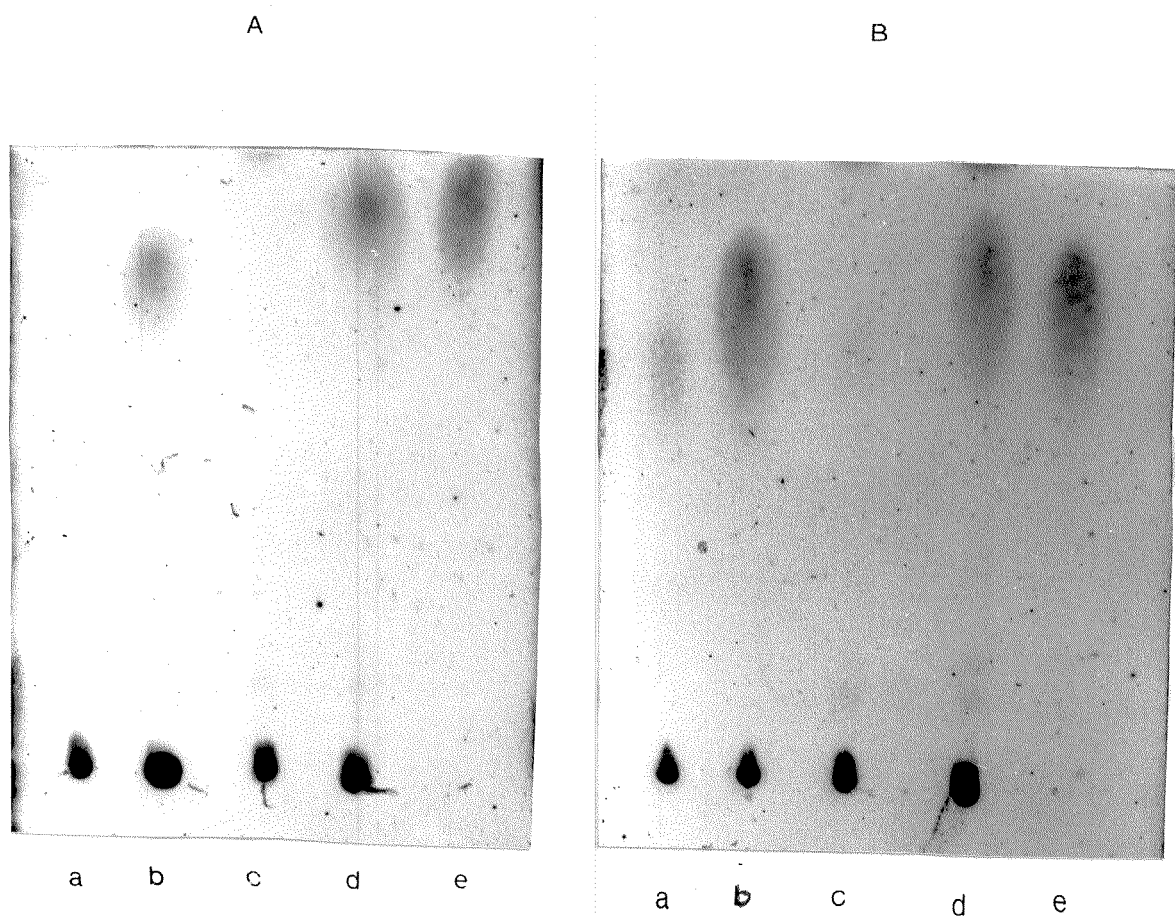


Figura 16. Determinação de ácidos graxos livres em camada fina de sílica gel de suspensões mitocondriais de fígado e de cérebro de rato. 3,0mg/ml de proteína mitocondrial foram incubadas em meio básico de reação de sacarose a 30°C em presença de fosfato 3,0mM. Após 10, 60 e 120 minutos de incubação na presença de Ca^{2+} 250 μM e diamida 0,6mM, as suspensões mitocondriais foram tratadas para análise do conteúdo de ácidos graxos livres totais conforme o item 11 de Materiais e Métodos. (A) Fotografia da cromatografia de mitocôndrias de fígado e de cérebro tratadas após 60 minutos de incubação e (B) após 120 minutos de incubação. a) mitocôndria de fígado tratada, b) mitocôndria de fígado tratada + padrão, c) mitocôndria de cérebro tratada, d) mitocôndria de cérebro tratada + padrão e e) padrão de ácido oleico 0,006 pmoles.

livres em mitocôndrias de cérebro (Figura 16 AeB, traçado c). Na presença do padrão (Figura 16 AeB, traçado d) detectou-se quantidade semelhante de ácidos graxos ao do padrão feito com mitocôndrias de fígado.

EFLUXO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR DIAMIDA EM MITOPLASTOS HEPÁTICOS

Desde sua observação inicial por VERCESI (1978), o efluxo de Ca^{2+} induzido pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina mitocondriais foi sempre estudado em mitocôndrias intactas, extraídas de diversos tecidos. No experimento da figura 17 estudamos a ocorrência deste processo em mitoplastos hepáticos com o objetivo de eliminar a participação de elementos da membrana externa e do espaço intermembrana neste mecanismo. Pode ser observado que estes mitoplastos apresentam a propriedade de captar e reter cerca de 20nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína, na ausência de diamida (controle). Na presença deste oxidante observou-se efluxo de todo o Ca^{2+} acumulado (diamida). Como no caso de mitocôndrias intactas (Figura 12B), este efluxo foi completamente revertido pela adição de ditiotreitól (linha tracejada).

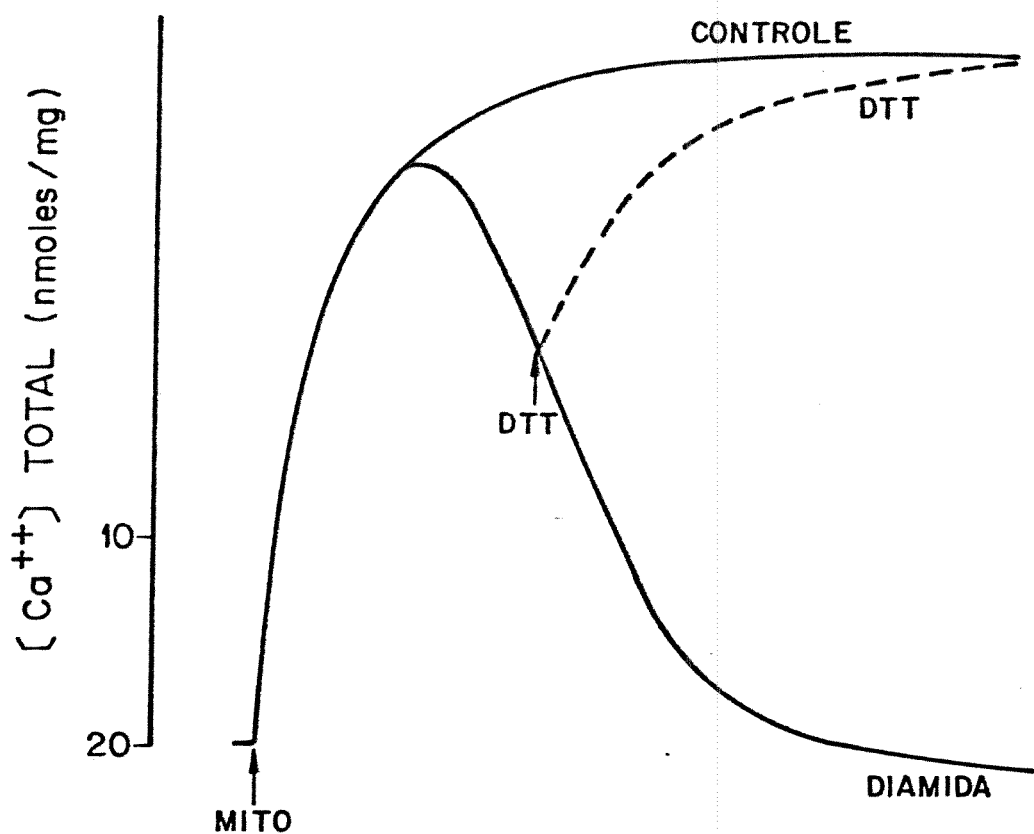


Figura 16. Efeitos de diamida e ditionotreitól sobre o fluxo de Ca^{2+} em mitoplastos hepáticos. Mitoplastos (1,0mg de proteína) foram incubados em 1,0ml de meio básico de reação usado para mitocôndrias hepáticas contendo suc2,0mM rot 4,0 μ M, Mg^{2+} 1,0mM e 20nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína. Os experimentos foram realizados na ausência (controle) ou presença de diamida 0,3mM. DTT (0,5mM) foi adicionado onde indicado.

DISCUSSÃO

A liberação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias pode ocorrer basicamente por três mecanismos distintos (BERNARDI et alii, 1984): pelo reverso da via de entrada eletroforética, através de uma depressão no potencial transmembrana, através da via de efluxo eletroneutra ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$), quando o potencial elétrico de membrana é mantido em valores próximos a 180mV ou através de aumento inespecífico da permeabilidade da membrana mitocondrial. Na prática, entretanto, esta separação se torna um pouco mais complexa, pois o movimento cíclico de Ca^{2+} , resultante do fluxo em sentidos opostos através de caminhos distintos para captação e liberação do íon, também leva à perda de energia e dissipação em $\Delta\psi$, mesmo quando o efluxo ocorre pela via eletroneutra. Já é conhecido, há algum tempo, que mitocôndrias isoladas sofrem grandes alterações estruturais e funcionais quando carregadas com altas concentrações de Ca^{2+} na presença de agentes geralmente referidos como liberadores de Ca^{2+} , tais como fosfato (WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD, 1980; BEATRICE et alii, 1980), fosfoenolpiruvato (CHUDAPONGSE & HAUNGAARD, 1973; PENG et alii, 1974; ROSS et alii, 1978), atractilato (ASIMAKIS & SORDHAL, 1977; NICHOLLS & SCOTT, 1980), resíduos acilCoA de cadeia longa (SUL

et alii,1976; WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD,1979) ou oxidantes de nucleotídeos de piridina como acetoacetato, oxaloacetato e hidroperóxidos orgânicos (LEHNINGER et alii,1978b; FISKUM & LEHNINGER,1979; LOTSCHER et alii,1979). Durante vários anos discutiu-se em qual das categorias de efluxo de Ca^{2+} , acima mencionadas, estava situada esta, causada por estes oxidantes. Os dados mais recentes (RILEY & PFEIFFER,1985; 1986; BERNARDES et alii,1986; AL-NASSER & CROMPTON,1986; RIZZUTO et alii,1987) comprovam que este efluxo está associado a um aumento inespecífico da permeabilidade e decréscimo do potencial de membrana. Entretanto, estes danos mitocondriais são prevenidos quando as organelas são incubadas em meios de reação contendo MgATP (NICHOLLS & BRAND,1980; ÅKERMAN & NICHOLLS, 1983). Segundo alguns autores, o efeito de ATP ocorreria através da inibição de uma NADase envolvida no mecanismo de permeabilização da membrana (HOFSTETTER et alii,1981). De acordo com outra interpretação, o ATP seria um cofator necessário nas reações de reacilação dos ácidos graxos livres liberados de fosfolipídeos da membrana em resposta a estes agentes liberadores (PFEIFFER et alii,1979; RILEY & PFEIFFER, 1986).

Embora nosso laboratório e outros tenham estabelecido condições experimentais nas quais o efluxo induzido pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina é completamen

te reversível (BERNARDES et alii,1986; AL-NASSER & CROMPTON, 1986; RIZZUTO et alii,1987), sempre foram observadas variações quantitativas ao se comparar os resultados de um mesmo ou de diferentes laboratórios. Vários trabalhos têm indicado que estas variações parecem depender de uma série de fatores, dentre eles: grau de acoplamento mitocondrial, idade da preparação, concentração de Ca^{2+} , tipo de ânion permeante empregado, pH do meio de reação, etc (WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD,1980; VERCESI,1984a; 1985; FREI et alii,1985a; RIZZUTO et alii,1987). De fato, os experimentos das figuras 4 e 5 demonstram que tanto o pH quanto a concentração de acetato tiveram um efeito significativo sobre o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial na presença de t-butil hidroperóxido. Assim, é necessário muito cuidado ao se analisar os resultados, algumas vezes discordantes, obtidos pelos vários grupos que estudam este mecanismo. No entanto, apesar destas diferenças, foi possível observar neste trabalho que a liberação de Ca^{2+} induzida pelo t-butil hidroperóxido foi sempre reversível. Estes resultados estão de acordo com dados anteriores deste e de outros laboratórios, indicando que a abertura de poros inespecíficos na membrana mitocondrial podem sofrer um completo reselamento (BERNARDES et alii,1986; AL-NASSER & CROMPTON, 1986; CROMPTON et alii,1987).

A influência de $\Delta\psi$ neste mecanismo de liberação

de Ca^{2+} estimulado pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina tem sido considerado um fator relevante. Segundo VERCESI (1987), a amplitude do potencial de membrana é importante na determinação do efeito de acetoacetato sobre a retenção ou efluxo de Ca^{2+} pelas mitocôndrias. Nas condições experimentais do autor, o menor efluxo de Ca^{2+} obtido em potencial de membrana mais alto foi correlacionado com um menor grau de oxidação do NADPH mitocondrial, causado pelo deslocamento da reação abaixo para a esquerda, em função do maior potencial de membrana:



Os resultados das figuras 6,7 e 8 comprovam esta correlação entre efluxo de Ca^{2+} e amplitude do potencial elétrico de membrana, embora em condições experimentais completamente diferentes daquelas utilizadas por VERCESI (1987). Nos experimentos das figuras 9 e 10 correlacionamos o efluxo de Ca^{2+} aos danos mitocondriais associados, através da clássica técnica do inchamento mitocondrial, onde a penetração do suporte osmótico utilizado (sacarose e KCl) reflete aumento não específico na permeabilidade da membrana. Nestes experimentos, a energização das mitocôndrias levou à formação de potenciais de membrana de diferentes amplitudes. Os resultados obtidos indicam que os danos mitocondriais, refletidos pela velocidade e extensão do inchamento mitocondrial foram

inversamente proporcionais à amplitude do potencial de membrana. Os dados da figura 9 indicam ainda que a extensão do inchamento mitocondrial não foi maior após a adição de antimicina A, provavelmente porque a queda provocada em $\Delta\Psi$ levou a uma rápida liberação do Ca^{2+} acumulado. Além disso, os resultados da figura 10 demonstram que a pré-incubação da mitocôndria desenergizada (baixo $\Delta\Psi$) com Ca^{2+} e t-butil hidroperóxido potencializou os efeitos deletérios destes agentes. Embora durante este período de pré-incubação as mitocôndrias estivessem desenergizadas, o influxo de Ca^{2+} ocorre em resposta a diferença de atividade do íon entre o meio e a matriz. Esta interpretação é apoiada por resultados de VERCESI et alii (1988), indicando que o vermelho de rutênio, que impede a entrada do Ca^{2+} na mitocôndria, inibe este efeito da pré-incubação de Ca^{2+} com as mitocôndrias desenergizadas, demonstrando que o mesmo é mediado pela ligação do íon a sítios intramitocondriais.

Como descrito na introdução deste trabalho, existem duas hipóteses principais para explicar o mecanismo molecular envolvido no efluxo de Ca^{2+} induzido por NAD(P)^+ . A do grupo de Lötscher e Richter, envolvendo oxidação e hidrólise dos nucleotídeos de piridina endógenos, que seria catalisada por uma NADase da membrana mitocondrial interna (LOTSCHER et alii, 1979; 1980; RICHTER et alii, 1983; SATRUSTEGUI & RICHTER,

1984; GRAF et alii, 1985; FREI et alii, 1985b; 1986) e a do grupo de Pfeiffer, implicando a perturbação do equilíbrio de deacilação e reacilação de fosfolipídeos da membrana (PALMER & PFEIFFER, 1981; RILEY & PFEIFFER, 1985; 1986). Entretanto, os resultados das figuras 11 e 12 favorecem a hipótese alternativa que propõe que a oxidação de grupamentos -SH, de proteíínas da membrana, em equilíbrio de óxido-redução com os nucleotídeos de piridina seriam, em última análise, o evento mais direto ligado ao aumento na permeabilidade da membrana (VERCESI, 1984b). Embora N-etilmaleimida em altas concentrações (acima de 80 μ M) seja conhecido por alterar vários aspectos do metabolismo de cátions bivalentes e causar liberação de Ca^{2+} em mitocôndrias (PFEIFFER et alii, 1979), a concentração do reagente utilizada nos experimentos da figura 11 (20 μ M) não tem efeito "per se" na oxidação dos nucleotídeos de piridina nem no inchamento mitocondrial (VALMIR L. FERRAZ, resultados não publicados). Nestas condições, a presença de N-etilmaleimida certamente protegeu os grupamentos -SH da oxidação causada pelo t-butil hidroperóxido e assim, o efluxo de Ca^{2+} foi prevenido ou revertido. De maneira análoga, o efluxo de Ca^{2+} induzido tanto por t-butil hidroperóxido quanto por diamida foi rapidamente revertido pela ação do ditiotreitol, um redutor de grupamentos -SH de membrana. Este mecanismo proposto é também apoiado pelos experimentos mostranu

do que a diamida causa hemólise devido a formação de dissulfetos mistos em membranas de eritrócitos (KOSOWER et alii, 1982). Além disso, BELLOMO et alii (1987), trabalhando com hepatócitos isolados expostos a baixas concentrações de menadiona, verificaram que, concomitantemente com a oxidação de GSH foram formados dissulfetos mistos entre glutathione e grupamentos -SH de proteínas. Observaram também que, a adição de ditioneitol removeu eficientemente todos os dissulfetos mistos formados durante o metabolismo da menadiona. Ainda, os trabalhos de LÊ QUOC & LÊ QUOC (1985) e os de HARRIS et alii (1979), forneceram, respectivamente, evidências do envolvimento de grupamentos -SH no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial e de que o NAD(P)H mantém a glutathione no estado reduzido. Atualmente, estão em curso em nosso laboratório, experimentos no sentido de examinar se de fato o efluxo transiente de Ca^{2+} induzido pela oxidação transitória dos nucleotídeos de piridina é paralelo a transições sulfeto-dissulfeto em proteínas da membrana.

Na nossa opinião, as principais características do efluxo de Ca^{2+} induzido por NAD(P)^+ que favorecem a hipótese da transição sulfeto-dissulfeto sobre a hipótese da deacilação-reacilação são: 1) a acil CoA sintetase, dependente de ATP, presente na matriz mitocondrial tem um turnover muito baixo, da ordem de 3,0 nmoles/min/mg de proteína (RILEY &

PFEIFFER,1986). Esta velocidade parece não ser compatível com a rápida transição da liberação para a recaptação do Ca^{2+} que ocorre após a adição de ditiotreitol (Figura 12 AeB);

ii) apesar dos resultados obtidos por cromatografia de camada delgada (Figura 16 AeB), que comprovam que a atividade da fosfolipase A_2 nas mitocôndrias de cérebro é mais baixa em relação àquela observada em mitocôndrias hepáticas (FISKUM et alii,1985), elas são muito mais sensíveis aos efeitos deletérios do Ca^{2+} na presença de fosfato ou oxidantes de NADPH (Figura 13) que mitocôndrias de fígado. Estes dados sugerem que a fosfolipase A_2 pode não ser o único fator envolvido na permeabilização da membrana que ocorre nestas condições;

iii) de acordo com os trabalhos de BROEKEMEIER et alii(1985), a hidrólise de fosfolipídeos da membrana, estimulada por Ca^{2+} e agentes liberadores deste íon, está diretamente ligada ao aumento da permeabilidade para sacarose. Neste caso então, a reacilação dos fosfolipídeos seria necessária para a restauração da impermeabilidade à sacarose. No entanto, AL-NASSER & CROMPTON (1986), investigando a permeabilização de mitocôndrias de fígado de rato induzida por Ca^{2+} e hidroperóxidos, demonstraram que esta organela pode se reselar sob condições nas quais os cofatores essenciais para a reacilação(ATP,CoA) foram liberados do espaço da matriz e estão disponíveis somente em concentrações extremamente baixas. Estes autores su

gerem que o aumento de permeabilidade da membrana pode refletir a presença de um poro seletivo ativado por Ca^{2+} , que abre quando o Ca^{2+} da matriz excede o limite normal e fecha com a remoção do íon (AL-NASSER & CROMPTON, 1986; CROMPTON et alii, 1987), em concordância com resultados anteriores deste laboratório (BERNARDES et alii, 1986; VALLE et alii, 1986; VERCESI, 1987). Na verdade, estes mecanismos propostos por Pfeiffer e Vercesi, se realmente ocorrem, não são mutuamente excludentes e podem acontecer simultaneamente, uma vez que ambos reivindicam a formação de dissulfetos mistos nas enzimas responsáveis pela reacilação dos fosfolipídeos ou em proteínas da membrana, respectivamente. A elucidação final requererá a identificação de uma proteína cujos grupamentos -SH sofram transições redox associadas com estas alterações na permeabilidade da membrana.

A figura 14 demonstra a grande capacidade de mitocôndrias de cérebro em reter Ca^{2+} acumulado na presença de ATP e Mg^{2+} , conhecidos estabilizadores de membrana (SILIPRANDI et alii, 1977; COELHO & VERCESI, 1979; 1980). Estes dados estão em concordância com resultados de outros autores (ROSENTHAL et alii, 1987) e indicam fortemente que os efeitos do Ca^{2+} observados nos experimentos de fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias energizadas (Figuras 13 e 14) e os experimentos de inchamento mitocondrial realizados com mitocôndrias desenergi-

zadas (Figura 15) expressam um mesmo fenômeno, pois nos dois casos as mitocôndrias são igualmente protegidas por MgATP.

MORENO et alii (1984), estudando a redução de nitrofuranos por mitocôndrias de fígado de rato, que em concentrações micromolares também induzem liberação de Ca^{2+} em mitocôndrias (BEATRICE et alii, 1984), observaram que a atividade nitroredutase, dependente de NAD(P)H, era muito mais alta nas preparações de membrana externa obtidas após o subfracionamento da mitocôndria, do que em mitocôndrias intactas ou mitoplastos. Os experimentos da figura 17 foram realizados com mitoplastos (mitocôndrias destituídas da membrana externa), para se verificar o possível envolvimento de enzimas da membrana externa e/ou do espaço intermembrana no mecanismo de efluxo de Ca^{2+} induzido por diamida. A semelhança destes resultados com aqueles obtidos com mitocôndrias intactas (Figura 12B) sugerem que as enzimas responsáveis pelas alterações na permeabilidade da membrana, causada pela adição dos oxidantes empregados e Ca^{2+} , estão localizadas principalmente na membrana interna e/ou no espaço da matriz mitocondrial.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o carregamento mínimo de Ca^{2+} no qual este efluxo pode ser observado varia entre as diferentes preparações e diferentes condições experimentais, mas sempre requerem concentrações de Ca^{2+} mais altas do que aquelas que supostamente

ocorrem na matriz sob condições "in situ" (HANSFORD & CASTRO, 1982). Isto indica que é muito improvável que este mecanismo esteja envolvido na regulação da distribuição de Ca^{2+} entre a matriz e o espaço extramitocondrial sob condições fisiológicas. Na nossa opinião, estes resultados são relevantes com respeito ao mecanismo de morte celular associada ao aumento de Ca^{2+} citosólico, que ocorre em algumas condições patológicas, como anóxia, por exemplo. Sabe-se que períodos prolongados de anóxia celular causam aumento do Ca^{2+} citosólico associado a diminuição de: potencial elétrico de membrana mitocondrial, concentração de nucleotídeos de adenina (ATP) e glutatona reduzida (FARBER, 1987; MANDEL et alii, 1987). Neste trabalho, estas condições são simuladas pelos experimentos onde se mostra que os danos mitocondriais causados por alto Ca^{2+} são mais fortemente potencializados pelos oxidantes de nucleotídeos de piridina, que levam a uma redução de GSH, se for omitido ATP no meio de reação e em condições de baixo $\Delta\Psi$. Assim, estas alterações mitocondriais aqui estudadas devem ser um evento importante no mecanismo de desenvolvimento de lesão celular irreversível causada pela isquemia e algumas toxinas que causam alterações semelhantes a estas.

RESUMO

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que as alterações no fluxo de Ca^{2+} , causadas por oxidantes de nucleotídeos de piridina na presença deste íon, secundárias ao aumento de permeabilidade da membrana mitocondrial interna, são influenciadas por vários fatores, tais como: concentração de acetato, pH do meio de reação, mudanças no potencial de membrana e reagentes tiólicos. Observamos que este efluxo transiente de Ca^{2+} que acompanha a oxidação transitória dos nucleotídeos de piridina por t-butil hidroperóxido ou diamida é potencializado pelo aumento da concentração de acetato na faixa de 0 a 20 mM ou pelo decréscimo do pH do meio, de 7,4 para 6,8. Os diferentes potenciais de membrana foram obtidos pela energização das mitocôndrias com succinato na presença de ATP ou pela hidrólise de ATP apenas. Além disso, a suspensão mitocondrial foi pré-incubada na presença de Ca^{2+} antes da energização, isto é, na ausência de alto potencial de membrana ou o potencial de membrana foi colapsado pela adição de antimicina A após o acúmulo do cátion. Todos estes procedimentos mostraram que as mitocôndrias são mais sensíveis aos efeitos deletérios do Ca^{2+} na presença destes agentes oxidantes em potenciais de membrana mais baixos. Observou-se também que mitocôndrias de cérebro, cuja atividade da enzima fosfolipase A_2 dependente de Ca^{2+} é menor do que em mitocôndrias hepáticas, são mais sensíveis aos efeitos do Ca^{2+} na presença destes agentes, sugerindo que esta enzima não deve exercer um papel central neste mecanismo. Por outro lado, os efeitos inibitórios de NEM e DTT, ambos reagentes tiólicos, observados em nossos experimentos, corroboram resultados anteriores de nosso laboratório indicando que a liberação transiente de Ca^{2+} (aumento transiente na permeabilidade da membrana) induzido pela oxidação transiente dos nucleotídeos de piridina ocorre em paralelo à transições sulfo-to-dissulfeto na membrana mitocondrial.

SUMMARY

The results reported in this work indicate that the alterations in Ca^{2+} fluxes secondary to the alterations in the inner mitochondrial membrane permeability caused by pyridine nucleotides oxidants plus Ca^{2+} are influenced by several factors such as: acetate concentration, medium pH, changes in membrane potential and thiol reagents. It was observed that the extension of the reversible Ca^{2+} efflux-influx cycle that accompanies the transient oxidation of pyridine nucleotides by diamide or t-butyl hydroperoxide is augmented by increasing the acetate concentration from 0 to 20mM or by decreasing the medium pH from 7.4 to 6.8. The different membrane potentials were obtained by energizing mitochondria with succinate in the presence of ATP or by ATP alone. Moreover, the mitochondria were preincubated in the presence of Ca^{2+} prior to energization, that is, in the absence of an appreciable membrane potential or the membrane potential was collapsed by the addition of Antimycin A after the cation had been accumulated. All these procedures have shown that mitochondria are more sensitive to the deleterious effects of Ca^{2+} plus an oxidant of pyridine nucleotides at lower membrane potentials. In addition it was shown that rat brain mitochondria, whose activity of the Ca^{2+} -stimulated phospholipase A_2 is much lower than in liver mitochondria, are more sensitive to the effects of Ca^{2+} plus these oxidants indicating that this enzyme may not play a major role in this mechanism. On the other hand, the inhibitory effects of NEM and DTT, both thiol reagents, observed in our experiments strongly supports previous data from this laboratory indicating that the transient Ca^{2+} release (transient increase in membrane permeability) induced by transient oxidation of pyridine nucleotides is paralleled by membrane sulfhydryl - disulfide transitions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-KHALIL, S., ABOU-KHALIL, W.H. and YUNIS, A.A. Inhibition by Ca^{2+} of oxydative phosphorylation in myeloid tumor mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 209:460-464, 1981.
- AL-NASSER, I. and CROMPTON, M. The reversible Ca^{2+} -induced permeabilization of rat liver mitochondria. Biochem. J., 239: 19-29, 1986.
- ÅKERMAN, K.E.O. Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. Biochim. Biophys. Acta., 502:359-366, 1978.
- ÅKERMAN, K.E.O. and NICHOLLS, D.G. Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. Rev. Physiol. Biochem Pharmacol., 95:149-201, 1983
- ARSHAD, J.H. and HOLDSWORTH, E.S. Stimulation of calcium efflux from rat liver mitochondria by adenosine 3'5' cyclic monophosphate. J. Membr. Biol., 57:207-212, 1980
- ASIMAKIS, G.K. and SORDAHL, L.A. Effects of atractylate and palmitoyl-CoA on calcium transport in cardiac mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 179:200-210, 1977.
- BARDSLEY, M.E. and BRAND, M.D. Oxaloacetate and acetoacetate - induced calcium efflux from mitochondria occurs by reversal of the uptake pathway. Biochem. J., 202:197-201, 1982.
- BARRIT, G.J. Calcium transport across cell membranes: progress toward molecular mechanism. Trends Biochem. Sci., 6:322, 1981.
- BAUMHUTER, S. and RICHTER, C. The hydroperoxide-induced relea-

se of mitochondrial calcium occurs via a distinct pathway and leaves mitochondria intact., FEBS lett., 148(2): 271-275,1982.

BEATRICE,M.C., PALMER,J.W. and PFEIFFER,D.R. The relation ship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential and the retention of Ca^{2+} by mitochondria. J. Biol. Chem., 255(18): 8663-8671,1980.

BEATRICE,M.C., STIERS,D.L. and PFEIFFER,D.R. Increased permeability of mitochondria during Ca^{2+} release induced by t-butyl hidroperoxide or oxaloacetate. J.Biol. Chem., 257(12): 7161-7171,1982.

BEATRICE,M.C., STIERS,D.L. and PFEIFFER,D.R. The role of glutathione in the retention of Ca^{2+} by liver mitochondria. J.Biol.Chem., 259(2):1279-1287,1984.

BECKER,G.L. Steady state regulation of extramitochondrial Ca^{2+} by rat liver mitochondria. Biochim.Biophys.Acta: 591: 234-239,1980.

BECKER,G.L., FISKUM,G. and LEHNINGER,A.L. Regulation of free Ca^{2+} by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. J. Biol.Chem., 255:9009-9012,1980.

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

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

- BELLOMO,G., NICOTERA,P. and 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. and ORRENIUS,S. Increase in cytosolic Ca^{2+} concentration during t-butyl hydroperoxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca^{2+} stores. FEBS lett., 168(1): 38-42,1984c.
- BELLOMO,G., MIRABELLI,F., DIMONTE,D., RICHELMI,P., THOR, H., ORRENIUS,C and ORRENIUS,S. Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress A study with isolated hepatocytes and menadione (2-methyl 1,4-naphthoquinone). Biochem. Pharmac., 36(8): 1313-1320, 1987.
- BERNARDES,C.F., PEREIRA DA SILVA,L. and VERCESI,A.E. t-butyl hydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and ATP. Biochim. Biophys.Acta., 850:41-48,1986.
- BERNARDI,P., PARADISI,V., POZZAN,T. and AZZONE,G.F. Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: inhibition by ruthenium red. Biochemistry, 23: 1645-1651,1984.
- BRAND,M.D. Electroneutral efflux of Ca^{2+} from liver mitochondria. Biochem.J., 225:413-419,1985.
- BRAND,M.D., REYNAFARJE,B. and LEHNINGER,A.L. Re-evaluation of the H^{+} /site ratio of mitochondrial electron transport with oxygen pulse technique. J.Biol.Chem., 251:5670-5696, 1976.

- BROEKEMEIER, K.M., SCHMID, P.C., SCHIMID, H.H.O. and PFEIFFER, D.R. Effects of phospholipase A₂ inhibitors on ruthenium red-induced Ca² release from mitochondria. J.Biol. Chem., 260:105-113, 1985.
- 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.Cambridge Philos.Soc., 53:43-79, 1978.
- CARAFOLI, E. Active accumulation of Sr² by rat liver mitochondria. Biochim.Biophys.Acta., 97:107-117, 1965.
- CARAFOLI, E. The calcium cycle of mitochondria. FEBS.lett., 104:1-5, 1979.
- CARAFOLI, E. Mitochondrial Pathology: An overview. Annals.New York Acad. Sci., 468:1-18, 1986.
- CARAFOLI, E., TIOZZO, R., Lugli, G., CROVETTI, F. and KRATZING, C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J.Mol.Cell.Cardiol., 6:361-371, 1974.
- CARAFOLI, E. and CROMPTON, M. The regulation of intracellular calcium. Curr.Top.Membr.Transp., 10:151-216, 1978.
- CARNIERI, E.G.S., MARTINS, I.S. and VERCESI, A.E. Ca² transport by plant mitochondria: Aspects linked to the mechanism and biological role. Brasilian J.Med.Biol.Res., (in press) 1987.
- CHANCE, B. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. J.Biol.Chem., 240:2729-2748, 1965.
- CHANCE, B. and Williams, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv.Enzymol., 17:65-134, 1956.

- CHAREST,R., BLACKMORE,P.F., BERTHON,B. and EXTON,J.H. Changes in free cytosolic Ca^2 in hepatocytes following α -1-adrenergic stimulation. J.Biol.Chem., 258:8769-8773,1983.
- CHARLTON,R.R. and WENNER,C.E. Calcium-ion transport by intact-tumour cells. Biochem.J., 170:537-544,1978.
- CHUDAPONGSE,P. and HAUGAARD,N. The effect of phosphoenolpyruvate on calcium transport by mitochondria. Biochim. Biophys.Acta., 307:599-603,1973.
- COCKRELL,R.S. Ruthenium red-insensitive Ca^2 uptake and release by mitochondria. Arch.Biochem.Biophys., 243(1): 70-79, 1985.
- COELHO,J.L.C. and VERCESI,A.E. Retention of Ca^2 by heart mitochondria. I.R.C.S. Med. Sci., 7:407,1979.
- COELHO,J.L.C. and VERCESI,A.E. Retention of Ca^2 by rat liver and rat heart mitochondria: effect of phosphate, Mg^2 and NAD(P)^+ redox state. Arch.Biochem.Biophys., 204(1):141-147 1980.
- COTY,W.A. and PEDERSEN,P.L. Phosphate transport in rat liver mitochondria; kinetics, inhibitor sensitivity, energy requirements and labelled components. Mol.Cell.Biochem., 9: 109-124,1975.
- CROMPTON,M., CAPANO,M. and CARAFOLI,E. The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria; a possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J.Biochem., 69:453-462,1976.
- CROMPTON,M., COSTI,A. and HAYAT,L. Evidence for the presence of a reversible Ca^2 -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. Biochem.J., 245:915-918,1987.

- DAWSON, A.P., SELWYN, M.J. and FULTON, D.V. Inhibition of Ca^{2+} efflux from mitochondria by nupercaine and tetracaine. Nature., 277:484-486, 1979.
- DAY, D.A. and WISKICH, J.T. Transport processes of isolated plant mitochondria. Physiol.Vég., 22:241-261, 1984.
- DeLUCA, H.F. and ENGSTROM, G.W. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 47: 1744-1750, 1961.
- DE MEIS, L. and VIANNA, A.L. Energy interconversion by the Ca^{2+} dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Ann. Rev. Biochem., 48:275-292, 1979.
- DENTON, R.M., RANDLE, P.J. and MARTINS, B.R. Stimulation by Ca^{2+} of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. Biochem. J., 128:161-163, 1972.
- DENTON, R.M., RICHARDS, D.A. and CHING, J.G. Calcium ions and the regulation of NAD^{+} -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. Biochem.J., 176:899-906, 1978.
- DENTON, R.M. and 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. and McCORMACK, J.G. Ca^{2+} transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. Am.J.Physiol., 249(12): E543-E554, 1985.
- DOUCE, R. In: Mitochondria in higher plants: structure, function and biogenesis. Orlando, Fl, Academic, 1985. p.327.
- DRAHOTA, Z., GAZZOTTI, P. and CARAFOLI, E. A comparison of the effects of different cations on a number of mitochondrial reactions linked to ion translocation. Arch.Biochem. Bio-

phys., 130:267-273, 1969

- ELDER, J.A. and LEHNINGER, A.L. Respiration dependent transport of carbon dioxide into rat liver mitochondria. Biochemistry., 12:976-982, 1973.
- FAGIAN, M.M., PEREIRA DA SILVA, L. and VERCESI, A.E. Inhibition of oxidative phosphorylation by Ca^2 or Sr^2 : a competition with Mg^2 for the formation of adenine nucleotide complexes. Biochim.Biophys.Acta., 852:262-268, 1986
- FARBER, J.L. Calcium and ischemic cell injury. Seventh International Washington Spring Symposium, Washington, DC. May, 19-22, Abstract 15, 1987.
- FISKUM, G. and COCKRELL, R.S. Ruthenium red sensitive and insensitive calcium transport in rat liver and ehrlich ascites tumor cell mitochondria. FEBS lett., 92:125-128, 1978.
- FISKUM, G. and LEHNINGER, A.L. Regulated release of Ca^2 from respiring mitochondria by $\text{Ca}^2/2\text{H}^+$ antiport. J.Biol.Chem., 254(14):6236-6239, 1979.
- FISKUM, G. and LEHNINGER, A.L. In: Cheung, W.Y., ed. Calcium and cell functions. New York, Academic, 1981. v.2, p.38-80.
- FISKUM, G. PFEIFFER, D.R., BROEKEMEIER, K.M. and BARDODY, B. Calcium buffering characteristics and phospholipase activities of rat brain mitochondria. Biophys.J., 47:413a, 1985.
- FREI, B., WINTERHALTER, K.H. and RICHTER, C. Quantitative and mechanistic aspects of the hydroperoxide-induced release of Ca^2 from rat liver mitochondria. Eur.J.Biochem., 149:633-639, 1985a.
- FREI, B., WINTERHALTER, K.H. and 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. and RICHTER, C. Menadione (2-methyl

- 1,4-naphtoquinone)dependent enzymatic redox cycling and calcium release by mitochondria. Biochemistry, 25: 4438-4443, 1986.
- GOCHMAN, N. and GIVELBER, H. Automated, simultaneous microdetermination of calcium and magnesium by atomic absorption. Cl. Chem., 16: 229-234, 1970.
- GRAF, M., FREI, B., WINTERHALTER, K.H. and RICHTER, C. Divicine induces calcium release from rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 129(1): 18-25, 1985.
- GUNTER, T.E., CHACE, H.H., PUSKIN, J.S. and GUNTER, K.K. Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. Biochemistry, 22: 6341-6351, 1983.
- HANSFORD, R.G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 102: 1-72, 1985.
- HANSFORD, R.G. and 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. Biomemb., 14: 361-376, 1982.
- HANSON, J.B. and DAY, D.A. Plant mitochondria. In: Tolbert., ed. The Biochemistry of Plants. New York, Academic, 1980. v.1, p.315-357.
- HARRIS, E.J., AL-SHAikhLY, M. and BAUM, H. Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol-specific reagents and by tyroxine. Biochem. J., 182: 455-464, 1979.
- HEATON, G.M. and NICHOLLS, D.G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. Biochem.

- 1,4-naphtoquinone)dependent enzymatic redox cycling and calcium release by mitochondria. Biochemistry, 25: 4438-4443, 1986.
- GOCHMAN, N. and GIVELBER, H. Automated, simultaneous microdetermination of calcium and magnesium by atomic absorption. Cli.Chem., 16:229-234, 1970.
- GRAF, M., FREI, B., WINTERHALTER, K.H. and RICHTER, C. Divicine induces calcium release from rat liver mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Comm., 129(1):18-25, 1985.
- GUNTER, T.E., CHACE, H.H., PUSKIN, J.S. and GUNTER, K.K. Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. Biochemistry, 22:6341-6351, 1983.
- HANSFORD, R.G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. Rev.Physiol. Biochem.Pharmacol., 102:1-72, 1985.
- HANSFORD, R.G. and 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.Biomemb., 14: 361-376, 1982.
- HANSON, J.B. and DAY, D.A. Plant mitochondria. In: Tolbert., ed. The Biochemistry of Plants. New York, Academic, 1980.v.1, p.315-357.
- HARRIS, E.J., AL-SHAIKHALY, M. and BAUM, H. Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol-specific reagents and by tyroxine. Biochem.J., 182:455-464, 1979.
- HEATON, G.M. and NICHOLLS, D.G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. Biochem.

J., 156:1635-1646,1976.

HOLMES,R.P. The influence of membrane lipids on the permeability of membrane to Ca^2 . In:Benga,G.,ed. Structure and Properties of Cell Membranes. Boca Raton,FL.,CRC,1985.v.2 p.53-76.

HOFSTETTER,W., MUHLEBACH,T., LOTSCHER,H.R., WINTERHALTER,K.H. and RICHTER,C. ATP prevents both hydroperoxides induced hydrolysis of pyridine nucleotide and release of calcium in rat liver mitochondria. Eur.J.Biochem., 117:361,1981.

HUNTER,D.R. and HAWORTH,R.A. The Ca^2 -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca^2 release. Arch. Biochem.Biophys., 195:468-477,1979.

JEWELL.S.A., BELLOMO,G., THOR,H. and ORRENIUS,S. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. Science.,217:1257-1259,1982.

JOHNSTON,J.D. and BRAND,M.D. Stimulation of the respiration rate of rat liver mitochondria by sub-micromolar concentrations of extramitochondrial Ca^2 . Biochem.J.,245: 217-222,1987.

JONES,D.P.,THOR,H.,SMITH,M.T.,JEWELL.S.A. and ORRENIUS,S. Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca^2 sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. J.Biol.Chem.,258(10):6390-6393,1983.

JOSEPH,S.K., COLL,K.E., COOPER,R.H., MARKS,J.S. and WILLIAMSON,J.R. Mechanisms underlying calcium homeostasis in isolated hepatocytes. J.Biol.Chem., 258:731-741,1983.

KAMO,N., MURATSUGU,M., HONGO,H. and KOBATAKE,J. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensi-

- tive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. J.Memb.Biol., 49:105-121,1979.
- KIES,M.W. and MURPHY,J.B. Spectrophotometric determination of protein in dilute solutions. Biochim.Biophys. Acta.,45: 382-384,1960.
- KOSOWER,N.S., ZIPSER,Y. and FALTIN,Z. Membrane thiol-dissulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: Relationship to cellular glutathione.Biochim.Biophys.Acta., 692(2):345-352,1982.
- KRELL,H., BAUR,H. and PFAFF,E. Transient Ca^{2+} uptake and release in isolated rat liver cells during recovery from deenergized states. Eur.J.Biochem., 101:349-364,1979.
- KURANTSIN-MILLS,J. and LESSIN,L.S. Aggregation of intramembrane particles in erythrocyte membranes treated with diamide. Biochim.Biophys.Acta., 641:129-137,1981.
- LANDRY,Y. and LEHNINGER,A.L. Transport of calcium ions by ehrlich,tumours cells. Biochem.J., 158:427-438,1976.
- LÊ-QUOC,K. and LÊ-QUOC,D. Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. J. Biol. Chem., 260(13):7422-7428,1985.
- LEHNINGER,A.L. Mitochondria and calcium ion transport: The fifth jubilee lecture. Biochem.J., 119:129-138,1970.
- LEHNINGER,A.L. Role of phosphate and other proton- donating anions in respiration coupled transport of calcium by mitochondria. Proc.Natn.Acad.Sci.U.S.A., 71:1520-1524,1974.
- LEHNINGER,A.L., CARAFOLI,E. and ROSSI,C.S. Energy linked ion movememts in mitochondrial systems. Adv.Enzymol., 29:259-320,1967.

- LEHNINGER, A.L., REYNAFARJE, B., VERCESI, A.E. and TEW, W. Transport and accumulation of calcium in mitochondria. Ann. N. Y. Acad. Sci., 307:160-176, 1978a.
- LEHNINGER, A.L., VERCESI, A.E. and BABABUNMI, E.A. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75(4):1690-1694, 1978b
- LOTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E. and RICHTER, C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76(9):4340-4344, 1979.
- LOTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E. and RICHTER, C. Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 255(19):9325-9330, 1980.
- MADEIRA, V.M.C. A rapid and ultrasensitive method to measure Ca^{2+} movements across biological membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 64:870-876, 1975.
- MALMSTRÖM, K. and CARAFOLI, E. The interaction of Ca^{2+} with mitochondria from human myometrium. Arch. Biochem. Biophys., 182:657-666, 1977.
- MANDEL, L.J., JACOBS, W.R., SCHNELLMANN, R., LEFURGERY, A. and SGAMBATI. Mechanism of anoxic injury to transport and metabolism of proximal renal tubules. Seventh International Washington Spring Symposium, Washington, D.C. May, 19-22, Abstract 16, 1987.
- MARTINS, I.S. and VERCESI, A.E. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plat mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 129:943-948, 1985.

- MARTINS, I.S., CARNIERI, E.G.S. and VERCESI, A.E. Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 850:49-56, 1986
- MASINI, A., BOTTI, B., CECCARELLI, D., MUSCATELLO, V. and VANNINI, V. Induction of calcium efflux from isolated rat-liver mitochondria by 1,2-dibromoethane. Biochim. Biophys. Acta., 852(1): 19-24, 1986.
- MCCORMACK, J.G. and DENTON, R.M. The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. Biochem. J., 533: 544, 1979.
- MCCORMACK, J.G. and DENTON, R.M. Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria. Trends. Biochem. Sci., 11:258-262, 1986.
- MELA, L. Inhibition and activation of calcium effects of lanthanides and local anesthetic drugs. Biochemistry., 8: 2481-2486, 1969.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, Lond., 191:144-148, 1961.
- MITCHELL, P. and MOYLE, M. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 7:471-484, 1969.
- MOORE, C.L. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42: 298-305, 1971.
- MOORE, G.A., JEWELL, S.A., BELLOMO, G. and ORRENIUS, S. On the relationship between Ca^{2+} efflux and membrane damage during t-butyl hydroperoxide metabolism by liver mitochondria. FEBS lett., 153(2):289-292, 1983.

- MOORE, A.L. and ÅKERMAN, K.E.O. Calcium and plant organelles. Plant.Cell.Envirn., 7:423-429, 1984.
- MOORE, G.A., O'BRIEN, P.J. and ORRENIUS, S. Menadione induced mitochondrial Ca^2 fluxes. (manuscript), 1986.
- MORENO, S.N.J., MASON, R.P. and DOCAMPO, R. Reduction of nifurtimox and nitrofurantoin to free radical metabolites by rat liver mitochondria. J.Biol.Chem., 259(10):6298-6305, 1984.
- MORENO-SÁNCHEZ, R. Inhibition of oxidative phosphorylation by a Ca^2 induced diminution of the adenine nucleotide translocation. Biochim.Biophys.Acta., 724:278-285, 1983.
- MOSER, B., WINTERHALTER, K.H. and RICHTER, C. Purification and properties of a mitochondrial NAD glycohydrolase. Arch. Biochem.Biophys., 224(1):358-364, 1983.
- MURPHY, E., COLL, K., RICH, T.L. and WILLIAMSON, J.R. Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. J.Biol.Chem., 255:6600-6608, 1980.
- NEDERGAARD, J. Na^+ - dependent regulation of extramitochondrial Ca^2 by rat liver mitochondria. Eur.J.Biochem., 144:159-168, 1984.
- NICHOLLS, D.G. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton electrochemical gradient across the inner membrane of rat liver mitochondria as determined by ion distribution. Eur.J.Biochem., 50:305-315, 1974.
- NICHOLLS, D.G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. Biochem. J., 176:464-474, 1978.
- NICHOLLS, D.G. and SCOTT, I.D. The regulation of brain mitochondrial calcium transport, the role of ATP in the discrimination between kinetic and membrane potential dependent calcium efflux mechanism. Biochem.J., 186:833-839, 1980.

- NICHOLLS,D.G. and BRAND,M.D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. Biochem.J., 188: 113-118,1980.
- NICHOLLS,D.G. and ÅKERMAN,K. Mitochondrial calcium transport Biochim.Biophys.Acta., 683:57-88,1982.
- ORRENIUS,S. JEWELL,S.A., BELLOMO,G., THOR,H., JONES,D.P. and 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, toxicological and clinical aspects. Raven Press, New York, p.2261-2271,1983.
- ORRENIUS,S. On the role of calcium in toxic cell injury. Seventh International Washington Spring Symposium, Washington, D.C. May,19-22, Abstract 12,1987.
- OSHINO,N. and CHANCE,B. Properties of glutathione release during reduction of organic hydroperoxide, 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.
- PALMER,J.W. and PFEIFFER,D.R. The control of Ca^{2+} release from heart mitochondria. J.Biol.Chem.,256(13):6742-6750,1981.
- PANFILI,E., SOTTOCASA,G.L., SANDRI,G. and LIVI,G. The Ca^{2+} - binding glycoprotein as the site of metabolic regulation of mitochondrial Ca^{2+} movements. Eur.J.Biochem.,105: 205-210,1980.
- PEDERSEN,P.L., GREENAWALT,J.W., REYNAFARJE,B., HULLIHEN,J., DECKER,G.L., SOPER,J.W. and BUSTAMANTE,E. Preparation and characterization of mitochondria and liver derived tissue. In: Methods in cell biology. Acad.Press.Inc.New York,1978 v.20,p.413.

- PENG,C.F., PRICE,D.W., BHUVANESWARAN,C. and WADKINS,C.L. Factor which influence phosphoenolpyruvate-induced calcium efflux from rat liver mitochondria. Biochem.Biophys. Res. Commun., 56:134-141,1974.
- PFEIFFER,D.R., SCHMID,P.C., BEATRICE,M.C. and SCHMID,H.H.O. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca^{2+} plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function.J. Biol.Chem., 254(22): 11485-11494,1979.
- PORTZEHL,H., CALDWELL,P.C. and RUEGG,J.G. The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab Maia squinado on the internal concentration of free calcium ions. Biochim.Biophys.Acta., 79:581-591,1964.
- POZZAN,T., BRAGADIN,M. and AZZONE,G.F. Disequilibrium between steady state Ca^{2+} accumulation ratio and membrane potential in mitochondria: Pathway and role of Ca^{2+} efflux. Biochemistry., 16:5618-5625,1977.
- PRPIC,V. and 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):6193-6199,1980.
- PUSKIN,J.S., GUNTER,T.E., GUNTER,K.K. and RUSSEL,P.R. Evidence for more than one calcium transport mechanism in mitochondria. Biochemistry. 15:3834-3842,1976.
- RAPUANO,B.E. and MADDALIAH,V.T. Effects of hypophysectomy and administration of growth and thyroid hormones on the hydroperoxide-induced calcium release process and glutathione levels in rat liver mitochondria. Arch.Biochem.Biophys., 260(1):359-376,1988.
- RASMUSSEN,H. Calcium and cAMP as synarchic messengers. John Wiley New York,1981.

- REED, K.C. and BYGRAVE, F.L. The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanids and ruthenium red. Biochem. J., 140:143-155, 1974.
- REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A.L. Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 77:1273-1279, 1977.
- RICHTER, C., WINTERHALTER, K.H., BAUMHUTER, S., LOTSCHER, H.R. and MOSER, B. ADP-ribosylation in inner membrane of rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:3188-3192, 1983.
- RICHTER, C. and FREI, B. Ca^{2+} movements induced by hydroperoxides. In: Sies, H., ed. Oxidative Stress. Academic Press Inc (London) LTD, 1985. p.221-239.
- RILEY, W.W. and PFEIFFER, D.R. Relationships between Ca^{2+} release, Ca^{2+} cycling and Ca^{2+} mediated permeability changes in mitochondria. J. Biol. Chem., 260(23):12416-12425, 1985.
- RILEY, W.W. and PFEIFFER, D.R. The effect of Ca^{2+} and acyl Coenzyme A:lysophospholipid acyltransferase inhibitors on permeability properties of the liver mitochondrial inner membrane. J. Biol. Chem., 261(30):14018-14024, 1986.
- RIZZUTO, R., PITTON, G. and AZZONE, G.F. Effect of Ca^{2+} , peroxides, SH reagents, phosphate and aging on the permeability of mitochondrial membrane. Eur. J. Biochem., 162:239 - 249, 1987.
- ROMAN, I., CLARK, A., and SWANSON, P.D. The interaction of calcium transport and ADP phosphorylation in brain mitochondria. Membr. Biochem., 4:1-9, 1981.
- ROSENTHAL, R.E., HAMUD, F., FISKUM, G., VARGUESE, P.J. and SHARPE, S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoplagine., 1987 (in press).

- ROSS, I., CROMPTON, M. and CARAFOLI, E. The effect of phosphoenolpyruvate on the retention of calcium by liver mitochondria. FEBS lett., 94:418-421, 1978.
- ROTH, Z. and DIKSTEIN, S. Inhibition of ruthenium red insensitive mitochondrial Ca^{2+} release and its pyridine nucleotide specificity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105(3): 991-996, 1982.
- ROTTENBERG, H. The measurements of transmembrane electrochemical protons gradients. Bioenergetics., 7:61-74, 1975.
- ROTTENBERG, H. and SCARPA, A. Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. Biochemistry., 13:4811-4817, 1974.
- RYDSTROM, J. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenases. Biochim. Biophys. Acta., 463:155-184, 1977.
- SANDRI, G., SOTTOCASA, G., PANFILI, E. and LIUT, G. The ability of the mitochondrial Ca^{2+} -binding glycoprotein to restore Ca^{2+} transport in glycoprotein-depleted rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 558:214-220, 1979.
- SARIS, N-E.L. The calcium pump in mitochondria. Comments. Phys. Math. Soc. Sci. Finn(suppl)., 28:1-59, 1963.
- SARIS, N-E.L. Non-respiring rat liver mitochondria do not have a $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ antiporter. Acta Chemica Scand. B41., 79-82, 1987.
- SARIS, N-E.L. and ÅKERMAN, K.E.O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Curr. Top. Bioenerg., 10:103-171, 1980.
- SATRUSTEGUI, J. and RICHTER, C. The role of hydroperoxides as calcium release agents in rat brain mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 233(2):736-740, 1984.
- SCARPA, A. and AZZONE, G.F. The mechanism of ion translocation in mitochondria.-Coupling of K^{+} efflux with Ca^{2+} uptake. Eur. J. Biochem., 12:328-335, 1970.

- SCHNEIDER, W.C. and HOGEBLOOM, 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.
- SCOTT, I.D. and NICHOLLS, D.G. The estimation of the electrical potential across the inner membrane of mitochondria within intact synaptosomes. Biochem. Soc. Trans., 7: 969-970, 1979.
- SCOTT, I.D. and NICHOLLS, D.G. Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. Biochem. J., 186: 21-33, 1980.
- SCOTT, I.D., ÅKERMAN, K.E.D. and NICHOLLS, D.G. Calcium ion transport by intact synaptosomes. Intrasyntosomal compartmentation and the role of the mitochondrial membrane potential. Biochem. J., 192: 873-880, 1980.
- SELWIN, M.J., DAWSON, A.P. and DUNNETT, S.J. Calcium transport in mitochondria. FEBS Lett., 10: 1-5, 1970.
- SELWIN, M.J. and WALKER, H.A. Permeability of the mitochondrial membrane to bicarbonate ions. Biochem. J., 166: 137-139, 1977.
- SIES, H. Hydroperoxide and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. In: Sies, H., ed. Oxidative Stress. Academic Press Inc (London) LTD., 1985. p. 73-88.
- SIES, H. and MOSS, K.M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. Eur. J. Biochem., 84: 377-383, 1978.
- SIES, H., GRAF, P. and ESTRELA, J.M. Hepatic calcium efflux during cytochrome P-450-dependent drug oxidations at the endoplasmic reticulum in intact liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78(6): 3358-3362, 1981.

- SILIPRANDI,D., TONINELLO,A.,ZOCARATO,F. and SILIPRANDI,N. A possible mechanism for respiration-dependent efflux of Mg^{2+} ions from liver mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Commun.,78(1):23-27,1977.
- SILIPRANDI,D.,SILIPRANDI,N. and 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.,130:173-175,1983.
- SOMLYO,A.P.,SOMLYO,A.V.,SHUMAN,H.,SCARPA,A.,ENDO,M. and INESI,G. Mitochondria do not accumulate significant Ca^{2+} concentrations in normal cells. In: Bronner,F. and Peterlick,M.(eds). Calcium and phosphate transport across biomembranes. Academic,New York,p.87-93,1981.
- SORDAHL,L.A. Effects of magnesium,ruthenium red and antibiotic ionophore A-23187 on initial rates of calcium uptake and release by heart mitochondria. Arch.Biochem.Biophys.,167:104-115,1974.
- SOTTOCASA,G.,SANDRI,G.,PANFILI,E.,BERNARD,B.,GAZZOTTI,P.,VASSINGTON,F.D. and CARAFOLI,E. Isolation of a soluble Ca^{2+} binding glycoprotein from liver mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Comm.,47:808-813,1972.
- SUL,H.S.,SHAAGO,E. and SHUG,A.L. Relationship of phosphoenolpyruvate transport acylCoA, inhibition of adenine nucleotide translocase and calcium efflux in guinea-pig heart mitochondria. Arch.Biochem.Biophys.,172:230-237,1976.
- TEDESCHI,H. The transport of cations in mitochondria.Biochim.Biophys.Acta.,639:157-196,1981.
- TSIEN,R.Y. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. Nature.,290:527,1981.

- THOR, H., SMITH, M. T., HARTZELL, P., BELLOMO, G., JEWELL, S. A. and ORRENIUS, S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. J. Biol. Chem., 257: 12419-12425, 1982.
- TSOKOS, J., CORNWELL, T. F. and VLASUK, G. Ca^{2+} efflux from liver mitochondria induced by a decrease in extramitochondrial pH. FEBS Lett., 119: 297-300, 1980.
- VAINIO, H., MELA, L. and CHANCE, B. Energy dependent bivalent cation transport in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 12: 387-391, 1970.
- VALLE, V. G. R., PEREIRA DA SILVA, L. and VERCESI, A. E. Undesirable feature of safranin as a probe for mitochondrial membrane potential. Biochem. Biophys. Res. Commun., 135(1): 189-195, 1986.
- VALLIÉRES, J., SCARPA, A. and SOMLYO, H. P. Subcellular fractions of smooth muscle. Arch. Biochem. Biophys., 170: 659-669, 1975.
- VASINGTON, F. D. and MURPHY, J. V. Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem., 237: 2670-2676, 1962.
- VASINGTON, F. D., GAZZOTTI, P., TIOZZO, R. and CARAFOLI, E. The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 256(1) : 43-54, 1972.
- VERCESI, A. E. Dissociation of NAD(P)^{+} stimulated mitochondrial Ca^{2+} 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^{2+} efflux from mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 119: 305-318, 1984b.

- VERCESI, A.E. Mitochondrial Ca^{2+} transport. Characteristics of NAD(P)^{+} -induced Ca^{2+} efflux. Arq. Biol. Tecnol., 27:477, 1984c.
- VERCESI, A.E. Stimulation of mitochondrial Ca^{2+} efflux by NADP^{+} with maintenance of respiratory control. An. Acad. Brasil. Ciên., 57(3):369-375, 1985.
- VERCESI, A.E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 252(1):171-178, 1987.
- VERCESI, A.E., REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A.L. Stoichiometric of H^{+} ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem., 253: 6379-6385, 1978.
- VERCESI, A.E. and LEHNINGER, A.L. Uncoupling is not obligatory for NADP^{+} -induced Ca^{2+} efflux from mitochondria. Fed. Proc. 41(4):1434, 1982.
- VERCESI, A.E., FERRAZ, V.L., MACEDO, D.V. and FISKUM, G. Ca^{2+} -dependent NAD(P)^{+} -induced alterations of mitochondrial membrane permeability. Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press)., 1988.
- VILLALOBO, A. and LEHNINGER, A.L. Inhibition of oxidative phosphorylation in ascites tumor mitochondria and cells by intramitochondrial Ca^{2+} . J. Biol. Chem., 255:2457-2464, 1980.
- WILLIAMSON, J.R. and CORKEY, B.E. Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorimetric enzyme methods. Low Enstein, J.M. (Ed.), Methods in Enzymology, XII. Acad. Press., New York and London, p.434-513, 1969.

- WISKICH, J.T. Mitochondrial metabolite transport. Ann. Rev. Plant. Physiol., 28:45-69, 1977.
- WOLKOWICZ, P.F. and McMILLIN-WOOD, J. Effect of malonyl-CoA on calcium uptake and pyridine nucleotide redox in rat liver mitochondria. FEBS lett., 101:63-66, 1979.
- WOLKOWICZ, P.E. and McMILLIN-WOOD, J. Dissociation between mitochondrial calcium ion release and pyridine nucleotide oxidation. J. Biol. Chem., 255(21):10348-10353, 1980.