

X ANÍBAL EUGÊNIO, VERGESI

TRANSPORTE DE Ca^{2+} POR MITOCONDRIA

CARACTERÍSTICAS DO EFLUXO INDUZIDO PELO ESTADO OXIDADO DOS
NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA MITOCONDRIAIS.

Tese de Livre Docência apresentada
ao Departamento de Bioquímica, Ins^t
tituto de Biologia, Universidade
Estadual de Campinas.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Campinas

1 9 8 2

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório pelas sugestões durante a preparação desta Dissertação.

A todos funcionários do Departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

A Sra Anna Gagliardi, Bibliotecária-Chefe do Instituto de Biologia, pela valiosa colaboração na organização e uniformização das fichas de citações bibliográficas de acordo com as normas da ABNT-PNB-66.

As secretárias Maria Luiza de Souza e Miriam Elizandi da Silva Balthazar pelo trabalho de datilografia.

Ao CNPq e FAPESP pela ajuda financeira durante a execução de parte deste trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ABREVIATURAS

A.B.	-	"bongkrekato"
AcAc	-	Acetoacetato
ADP	-	Adenosina difosfato
ANTI.A	-	Antimicina A
ATP	-	Adenosina trifosfato
BHB	-	β -hidroxibutirato
C.A.T.	-	Carboxiatractilato
DAPP	-	Diadenosina pentaosfato
DIAMIDA	-	Ácido azodicarboxílico bis-dimetilamida
DTNB	-	Ácido 5,5'-ditio bis (2-nitrobenzôico)
DTT	-	Ditiotreitol
EDTA	-	Ácido etileno diamino tetraacético
EGTA	-	Ácido etileno glicol bis (β -aminoetil eter) N,N'-tetra acético
FCCP	-	p-Trifluoro-metoxicarbonil cianeto fenil hidrazina
GSH	-	Glutaciona reduzida
GSSG	-	Glutaciona oxidada
HEPES	-	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetano-sulfônico
ISOC	-	Isocitrato
MIT	-	Mitocondria
NAD	-	Nicotina adenina dinucleotídeo
NADP	-	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato
NTA	-	Ácido nitrilotriacético
OAA	-	Oxaloacetato
R	-	Rheina
SUC	-	Succinato
TMPD	-	5,5,5',5'-tetrametil-parafenileno-diamina
TNB	-	Ácido tio-2-nitrobenzôico
VR	-	Vermelho de rutênio

ÍNDICE

	Pag.
INTRODUÇÃO	1
Possível papel da mitocôndria na regulação da distribuição do Ca^{2+} celular	2
Mecanismo de captação de Ca^{2+} por mitocôndria	5
Sistema transportador de Ca^{2+}	8
Parâmetros cinéticos do transporte de Ca^{2+} por mitocôndria	10
Técnicas usuais de determinação de transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias	10
Fatores que afetam o conteúdo de Ca^{2+} mitocôndrial ...	11
MATERIAIS E MÉTODOS	20
RESULTADOS	22
Características da oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocôndriais por acetoacetato e oxaloacetato ..	22
Oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocôndriais pela combinação acetoacetato-hidroperóxido butírico .	24
Captação de Ca^{2+} por mitocôndria intacta em resposta ao gradiente de H^+ gerado pela reação catalizada pela NAD(P)-transidrogenase.....	26
Correlação entre o estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina e a capacidade de tamponamento de Ca^{2+} externo por mitocôndria	28
Perda de ADP e Mg^{2+} endógenos associados com efluxo de Ca^{2+} induzido por NADP	32
Inibição do efluxo de Ca^{2+} por "Bongkrekato"	34
Inibição do transporte de nucleotídeos de adenina por Sr^{2+}	36
Diminuição do título de grupos -SH ligados a proteínas de membrana mitocôndrial por oxaloacetato	39
Alterações da conformação mitocôndrial induzidas por oxaloacetato e diamida	41
DISCUSSÃO	44
SUMÁRIO	54
SUMMARY	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

INTRODUÇÃO

O transporte ativo de Ca^{2+} por mitocôndria foi descoberto por VASINGTON & MURPHY, 1962 em mitocôndrias isoladas de rins de rato. Estes autores observaram que o Ca^{2+} era acumulado por este tipo de mitocôndria contra gradiente de concentração às expensas de energia respiratória ou hidrólise de ATP (VASINGTON & MURPHY, 1962). Estudos anteriores já indicavam a presença de Ca^{2+} no interior de mitocôndria, porém os resultados não foram interpretados como acumulação contra gradiente de concentração (SLATER & CLELAND, 1953). Outras observações indiretas como estimulação da respiração (SIEKEVITZ & POTTER, 1955; CHANCE, 1955) e ejeção de prótons (SARIS, 1959), quando Ca^{2+} era adicionado a preparações de mitocôndria, indicavam que o íon podia ser acumulado ativamente pela organela.

Sabe-se atualmente que mitocôndrias de quase todos tecidos animais e de alguns fungos, mas não de plantas, acumulam Ca^{2+} do meio externo por processo energeticamente acoplado ao transporte de elétrons na cadeia respiratória ou à hidrólise de ATP a nível da ATPase mitocondrial (LEHNINGER et alii, 1967; LEHNINGER, 1970; BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et alii, 1978a; SARIS & AKERMAN, 1980). Dado à alta velocidade e afinidade, bem como ao fato do transporte ativo de Ca^{2+} em algumas condições experimentais preceder a fosforilação oxidativa na demanda da energia respiratória (ROSSI & LEHNINGER, 1964; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1973; VERCESI et alii, 1978), postula-se que mitocôndria de determinados tecidos, em adição ao seu papel na produção de ATP, desempenha uma importante função na regulação da concentração tanto de Ca^{2+} iônico citoplasmático (CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et alii, 1978a) como na matriz mitocondrial (DENTON et alii, 1980; Mc CORMACK & DENTON, 1980).

Como o Ca^{2+} livre exerce inúmeras funções na regulação da fisiologia celular, o transporte do íon por mitocôndria tem despertado grande interesse no sentido de esclarecer o possível papel dessa organela na distribuição do Ca^{2+} celular. Além disso, o transporte de Ca^{2+} em membrana mitocondrial é uma expressão do processo de conversão de energia, o que torna seu estudo

relevante com respeito à elucidação do mecanismo de fosforilação oxidativa.

A vasta literatura sobre o assunto encerra um alto grau de controvérsia devido à grande variedade de espécies moleculares transportadas simultaneamente em ambas as direções durante a atividade biológica da organela. Sabe-se que mitocôndria desempenha inúmeras outras atividades, possuindo para isso grande número de sistemas enzimáticos. Assim, as proteínas envolvidas no processo de transporte de Ca^{2+} constituem uma pequena fração das proteínas mitocondriais, o que justifica o fato de até hoje não se ter definitivamente isolado e caracterizado o sistema responsável pelo transporte desse íon. Situação oposta é a que ocorre, por exemplo, com o transporte de Ca^{2+} em retículo sarcoplasmático, onde a proteína transportadora constitui cerca de 60 a 80% das proteínas totais da membrana (MEISSNER et alii, 1973; DE MEIS & VIANNA, 1979).

Outro fator de complexidade com respeito ao mecanismo de transporte de Ca^{2+} em mitocôndria é que o Ca^{2+} migra para o interior da mitocôndria em resposta ao potencial eletroquímico de prótons através da membrana ($\Delta\mu\text{H}^+$) gerado pela respiração ou hidrólise de ATP, processo que apesar de extensivamente estudado está longe de ser entendido a nível molecular.

Possível papel da mitocôndria na regulação da distribuição do Ca^{2+} celular.

A concentração de Ca^{2+} livre na célula tem fundamental importância na regulação de uma série de funções celulares, como regulação de vias metabólicas, secreção, motilidade e transporte através de membranas. O controle destas atividades requer uma concentração de Ca^{2+} livre citoplasmático inferior a $1\ \mu\text{M}$ contra uma concentração extracelular da ordem de 2 mM. A importância relativa dos sistemas de transporte de Ca^{2+} situados na membrana celular, na mitocôndria e no retículo endoplasmático, na manutenção deste gradiente de Ca^{2+} entre citoplasma e meio extracelular tem sido motivo de muito estudo e muita divergência.

A entrada de Ca^{2+} na célula não requer energia metabólica uma vez que o íon entra a favor de gradiente de concentração mediado por transportador específico ou por processo ele-

trogênico através de canal de Ca^{2+} . O efluxo de Ca^{2+} ocorre por mecanismo ativo através de ATPase específica ou por processo que troca Ca^{2+} por Na^+ extracelular usando energia derivada do potencial de difusão de Na^+ . O último processo é mais ativo em membrana de células excitáveis (BLAUSTEIN et alii, 1978; SCHATZMANN & BURGIN, 1978).

O transporte de Ca^{2+} em retículo tem sido estudado com grandes detalhes principalmente em microsomas isolados de retículo sarcoplasmático onde Ca^{2+} é transportado por ATPase específica. Para cada ATP hidrolisado dois íons Ca^{2+} são captados num processo dependente de Mg^{2+} e que envolve fosforilação da enzima como produto intermediário de reação (DE MEIS & VIANNA, 1979).

A participação da mitocôndria na regulação da distribuição do Ca^{2+} celular tem sido motivo de amplo debate. Esta organela, em contraste com a membrana celular e retículo, não possui ATPase transportadora de Ca^{2+} . Aceita-se atualmente que o Ca^{2+} difunde através da membrana mitocondrial por processo eletroforético em resposta ao potencial eletroquímico de H^+ mediado por um transportador que liga Ca^{2+} com alta afinidade.

Determinações do potencial de membrana em mitocôndria energizada fornecem valores que variam de -180 a -220 mV. Assumindo-se o valor de -180 mV e considerando-se que a membrana é negativa na face interna, a razão entre o Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial e no citoplasma, fornecido pela equação de NERNST seria igual a 10^6 . Os valores experimentais encontrados são muito inferiores à distribuição termodinâmica esperada (DRAHOTA et alii, 1965; POZZAN et alii, 1977) e sugerem a existência de dois sistemas diferentes para o transporte de Ca^{2+} , um para a captação e outro para a liberação independentemente regulados. Desde que na mitocôndria energizada o potencial eletroquímico de H^+ é sempre negativo internamente, a liberação de Ca^{2+} durante respiração não deve ocorrer por mecanismo eletroforético mas sim eletroneutro. De fato, tem sido demonstrado liberação de um Ca^{2+} em troca por dois Na^+ em mitocôndria de tecidos excitáveis (CARAFOLI et alii, 1974; CROMPTON et alii, 1978b), ou de um Ca^{2+} por dois H^+ em outros tipos de mitocôndria (AKERMAN, 1978b; NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1979). Acredita-se assim que a distribuição de Ca^{2+} entre a matriz e o citoplasma seja cinética e determinada em condições de "steady state" pela razão entre as velocidades de

influxo e efluxo através de duas vias diferentes (POZZAN et alii, 1977; AKERMAN, 1978).

Com respeito ao papel da mitocôndria na regulação do Ca^{2+} livre citoplasmático, estudos com mitocôndrias isoladas indicam que em condições de "steady state" mitocôndria hepática tampona o Ca^{2+} externo a concentrações entre 0,3 a 0,8 μM (NICHOLLS, 1978; BECKER et alii, 1980) enquanto que mitocôndria de miométrio tampona o Ca^{2+} externo a concentrações da ordem de 0,1 μM (BATRA, 1973).

BECKER et alii, 1980 trabalhando com sistema reconstituído contendo mitocôndria e retículo endoplasmático isolados de fígado demonstraram que o retículo tampona o Ca^{2+} externo a uma concentração de 0,2 μM contra 0,5 μM mantido por mitocôndria. Resultados idênticos foram observados quando estes autores compararam a habilidade destes dois sistemas em tamponar o Ca^{2+} citoplasmático em hepatócitos cuja membrana celular havia sido permeabilizada especificamente a íons, por tratamento com baixas concentrações de digitonina. Estes resultados indicaram ainda que apesar da afinidade do retículo por Ca^{2+} ser mais alta que de mitocôndria a capacidade de captação e retenção de Ca^{2+} por mitocôndria é muito maior que a de retículo.

Outros estudos com mitocôndria "in situ" em neurônios gigantes de lula indicaram que nestas células as características do transporte de Ca^{2+} por mitocôndria são similares às observadas em estudos com mitocôndrias isoladas quando as concentrações de Ca^{2+} citoplasmática eram muito superiores às concentrações fisiológicas (BRINLEY et alii, 1977b; BRINLEY et alii, 1978a). Estes estudos demonstraram porém que em concentrações de 50-100 nM, consideradas fisiológicas pelos autores para estas células em condições de repouso, a velocidade de captação de Ca^{2+} por mitocôndria era tão baixa a ponto de sugerir que o papel da organela, em participar na homeostase do Ca^{2+} em condições fisiológicas, era praticamente desprezível. Esta interpretação é questionada por SCOTT et alii, 1980 e NICHOLLS & SCOTT, 1980, baseados nos próprios trabalhos com sinaptosomas intactos e nos trabalhos de LLINAS et alii, 1972 e BRINLEY et alii, 1977a mostrando que durante períodos de atividade elétrica dos neurônios as concentrações de Ca^{2+} sobem e então a captação de Ca^{2+} por mitocôndria assume papel importante na regulação do Ca^{2+} citosólico. Contudo deter-

minações diretas do conteúdo de Ca^{2+} mitocondrial em músculo liso, cardíaco e esquelético, indicaram que mitocôndria não acumula concentrações significantes de Ca^{2+} em células normais mesmo durante atividade elétrica das mesmas (SOMLYO et alii, 1981).

Estudos mais recentes com mitocôndrias cardíacas indicam um importante papel do sistema de transporte de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial na regulação da atividade das enzimas: desidrogenase pirúvica e isocítrica e como consequência na atividade do ciclo de Krebs. Assim, através de flutuações entre as velocidades de influxo e efluxo, este tipo de mitocôndria permite flutuações nas concentrações de Ca^{2+} iônico na matriz mitocondrial entre 0,1 a 10 μM , faixa de concentração em que estas enzimas são sensíveis ao Ca^{2+} (HANSFORD, 1981; DENTON et alii, 1980; Mc CORMACK & DENTON, 1980). Regulação da ATPase mitocondrial e assim da fosforilação oxidativa pelo Ca^{2+} mitocondrial tem sido também aventada (YAMADA et alii, 1981).

Mecanismo de captação de Ca^{2+} por mitocôndria.

Vários trabalhos fornecem evidências que o Ca^{2+} entra na mitocôndria por mecanismo eletroforético em resposta ao gradiente eletroquímico de H^+ gerado por respiração, hidrólise de ATP ou potencial de difusão de K^+ (SCARPA & AZZONE, 1970; SELWYN et alii, 1970; ROTTEMBERG & SCARPA, 1974; HEATON & NICHOLLS, 1976; AKERMAN, 1978b). Este mecanismo de transporte encontra forte apoio na hipótese quimiosmótica da fosforilação oxidativa proposta por MITCHELL, 1961; 1966.

Inicialmente acreditava-se que a energia para captação de Ca^{2+} derivava da hidrólise de um intermediário químico do processo de fosforilação oxidativa que poderia ser utilizado para transporte de Ca^{2+} ou para síntese de ATP. Porém, SCARPA & AZZONE, 1970 mostraram pela primeira vez que Ca^{2+} podia ser acumulado contra gradiente de concentração na ausência de respiração ou hidrólise de ATP. Assim, estes autores conseguiram induzir captação de Ca^{2+} pela mitocôndria em resposta ao potencial de membrana gerado pelo efluxo de K^+ endógeno mitocondrial induzido pelo ionóforo valinomicina (PRESSMAN, 1965). SELWYN et alii, 1970 obtiveram resultados semelhantes induzindo captação de Ca^{2+} por mitocôndria em resposta ao potencial de difusão do ânion SCN^- ,

livremente permeável através da membrana.

De acordo com a hipótese quimiosmótica de fosforilação oxidativa, Ca^{2+} entra na mitocôndria em resposta ao potencial de membrana negativo internamente (MITCHELL, 1961; 1966) . Segundo esta hipótese, respiração ou hidrólise de ATP pela ATPase mitocondrial induz transporte vetorial de H^+ para o exterior da mitocôndria com conseqüente alcalinização da matriz mitocondrial. Este processo gera um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana ($\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$), constituído por um componente químico (ΔpH) e pelo potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) que se relacionam de acordo com a equação:

$$\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+ = 60 \Delta\text{pH} + \Delta\Psi$$

Como existe relação inversa entre velocidade de respiração e potencial de membrana (MITCHELL, 1961; 1966), a entrada de Ca^{2+} na mitocôndria causa um decréscimo no valor de $\Delta\Psi$ com conseqüente estímulo da respiração e ejeção de H^+ para compensar o valor de $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$ às custas de aumento de ΔpH . Assim, a entrada de Ca^{2+} converte o potencial de membrana em gradiente de pH que passa a inibir a respiração e limitar a captação de Ca^{2+} .

Quando, porém, o transporte de Ca^{2+} ocorre na presença de ânions com capacidade de migrar para o interior da mitocôndria na forma protonada e neutralizar o gradiente de pH, grandes quantidades de Ca^{2+} (até 2000 nmoles de Ca^{2+} /mg prot.mitocondrial) podem ser acumuladas (CARAFOLI et alii, 1965). Na ausência de tais ânions "permeantes" ou quando o transporte destes é inibido, não mais de 20 a 30 nmoles Ca^{2+} são captados por mg de proteína mitocondrial (CARAFOLI & CROMPTON, 1978; CROMPTON et alii, 1978a; RAMACHANDRAN & BYGRAVE, 1978).

Os ânions considerados "permeantes" para o transporte de Ca^{2+} ao interior da mitocôndria tais como acetato, propionato, butirato, β -hidroxibutirato são ânions de ácidos fracos, lipofílicos, que passam pela membrana mitocondrial na forma protonada fornecendo H^+ para neutralização da matriz mitocondrial (LEHNINGER, 1974). Grande quantidade de Ca^{2+} pode também ser acumulada na presença de ânion bicarbonato que entra na forma de HCO_3^- (SELWYN & WALKER, 1977) ou como CO_2 (ELDER & LEHNINGER, 1973) dissolvido que é hidratado pela ação de anidrase carbônica mitocondrial resultando no acúmulo de CaCO_3 (ELDER & LEHNINGER, 1973). Outro ânion capaz de acompanhar a entrada de Ca^{2+} é o fos

fato, que através de transportador específico entra na forma de H_3PO_4 (COTY & PEDERSEN, 1975).

Desta maneira a presença de fosfato em concentrações similares às encontradas no citoplasma aumenta a capacidade e velocidade de transporte de Ca^{2+} por mitocôndria. Além do papel do fosfato em tamponar o ΔpH através da membrana durante o transporte de Ca^{2+} , o fosfato é também importante na formação de precipitado de fosfato de Ca^{2+} na forma de grânulos eletro-densos observados na matriz mitocondrial com a ajuda de microscopia eletrônica (BEKER et alii, 1974). ATP e Mg^{2+} parecem estar envolvidos no processo de precipitação e estabilização de fosfato de Ca^{2+} na matriz mitocondrial (LEHNINGER, 1970). De fato, na presença de ATP, Mg^{2+} e fosfato, mitocôndria apresenta capacidade de captar grande quantidade de Ca^{2+} , ("Ca²⁺ -massive loading"), sem perder a habilidade de fosforilação oxidativa (CARAFOLI et alii, 1965).

A determinação da estequiometria entre captação de Ca^{2+} , ejeção de H^+ e transporte de elétrons na cadeia respiratória tem sido extensivamente estudada nos últimos anos. Segundo MOYLE & MITCHELL, 1977 (a,b), o Ca^{2+} é captado na forma $(Ca_2)^{4+} - HPO_4^{2-}$ com apenas uma carga positiva, sendo assim compensado eletricamente pelo efluxo de apenas um H^+ . Como dois Ca^{2+} são captados por par de elétrons passando por sítio de fosforilação, este valor estaria de acordo com a estequiometria de dois H^+ ejetados por sítio de fosforilação encontrado anteriormente por MITCHELL & MOYLE, 1965, 1967. Sabe-se atualmente que a estequiometria $2e^-/2H^+$ era subestimada devido ao retorno de H^+ para o interior da mitocôndria na forma de H_3PO_4 (BRAND et alii, 1976; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1977). Quando esta estequiometria é estudada na presença de N-etilmaleimida que inibe o transporte de fosfato através da membrana, é possível determinar-se que dois H^+ são ejetados por Ca^{2+} captado ou quatro H^+ são ejetados por sítio de fosforilação durante o transporte de $2e^-$ na cadeia respiratória (BRAND et alii, 1976; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1977; VERCESI et alii, 1978; FISKUM et alii, 1979).

Sistema transportador de Ca^{2+} .

O íon Ca^{2+} , ao contrário do que acontece com outros cátions tais como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , por exemplo, é acumulado com alta afinidade e velocidade contra gradiente de concentração por mitocôndria energizada, na ausência de ionóforos ou outros permeabilizantes. Em mitocôndria não energizada o Ca^{2+} pode também penetrar através da membrana a favor de gradiente de concentração desde que na presença de determinados ânions "permeantes" (SELWYN et alii, 1970; LEHNINGER, 1974).

Estes dados indicam que a membrana interna mitocondrial, que é impermeável à maioria de outros cátions, possui uma permeabilidade específica para o Ca^{2+} que seria conferida por um transportador específico.

Algumas características do transporte de Ca^{2+} que indicam a presença de tal sistema transportador são:

a - Especificidade para Ca^{2+} (embora transporte também Sr^{2+} , Mn^{2+} e Ba^{2+} com afinidades decrescentes, respectivamente (LEHNINGER et alii, 1967)).

b - Transporte de Ca^{2+} com alta afinidade; K_m com valor entre 1 e 10 μM (SPENCER & BYGRAVE, 1973; HUTSON, 1977; NOACK & HEINEN, 1977).

c - Cinética com comportamento de saturação e sigmóide, sugerindo cooperatividade a nível da molécula do transportador (SPENCER & BYGRAVE, 1973; HUTSON, 1977; NOACK & HEINEN, 1977).

d - Inibição do transporte por lantanídeos e vermelho de rutênio (MELA, 1969; MOORE, 1971; REED & BYGRAVE, 1974).

e - Identificação de sítios na membrana sensíveis a lantanídeos e vermelho de rutênio que ligam Ca^{2+} com alta afinidade (MELA, 1969; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1969; REED & BYGRAVE, 1974).

f - Estequiometria definida entre acúmulo de Ca^{2+} , ejeção de H^+ e consumo de O_2 (VERCESI et alii, 1978; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1977).

g - Existência de tipos de mitocôndrias que não transportam Ca^{2+} (mitocôndrias de asa de alguns insetos voadores, plantas e leveduras) e não possuem sítios que ligam Ca^{2+} com alta afinidade (CHEN & LEHNINGER, 1973; MOORE & BONNER, 1977).

Apesar destas características do transporte de Ca^{2+} sugerirem a existência de um transportador específico, pouco sucesso tem sido obtido na tentativa de seu isolamento e caracterização. Várias glicoproteínas com alta afinidade por Ca^{2+} tem sido isoladas de membrana mitocondrial (GOMEZ-PUYOU et alii, 1972; KIMURA et alii, 1972; SOTTOCASA et alii, 1972; TASHMUKHAMEDOV et alii, 1972; HAPPEL & KRALL, 1979).

PANFILI et alii, 1980 desenvolveram anticorpo contra a glicoproteína isolada por SOTTOCASA et alii, 1972 e demonstraram que este anticorpo inibe o transporte de Ca^{2+} em mitocôndria o que sugere a participação desta glicoproteína no processo de transporte do íon.

Outra glicoproteína de peso molecular 32.000 que liga Ca^{2+} com alta afinidade ($K_d 2,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$) foi extraída de vários tipos de mitocôndria de vertebrados (HAPPEL & KRALL, 1979). Esta glicoproteína que contém ácido siálico em sua composição, constitui 0,015% das proteínas totais da mitocôndria e liga cerca de 61 nmoles Ca^{2+}/mg , o que corresponde à existência de dois sítios de ligação de Ca^{2+} por molécula. Tal glicoproteína parece constituir parte do sistema de transporte uma vez que, após sua extração, a mitocôndria perde a capacidade de captar Ca^{2+} , recuperando 75-80% da capacidade original quando o sistema é reconstituído pela adição da glicoproteína a uma concentração 8 vezes em excesso em relação à percentagem extraída. Outra característica interessante desta glicoproteína é sua capacidade de induzir captação de Ca^{2+} por mitocôndria de *Drosophila*, que é originalmente destituída de sistema transportador de Ca^{2+} (KRALL & HAPPEL, 1981).

Recentemente, uma proteína hidrofóbica de baixo peso molecular (3.000) que liga Ca^{2+} com alta afinidade ($K_d 5,2 \mu\text{M}$) foi isolada de coração bovino (JENG & SHAMOO, 1980 a,b). Esta proteína, denominada calciforina, transporta Ca^{2+} através de uma fase orgânica em resposta a um gradiente de prótons num processo sensível a vermelho de rutênio e lantanídeos com propriedades consistentes às do sistema responsável pelo transporte eletroforético de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial.

Parâmetros cinéticos do transporte de Ca^{2+} por mitocôndria.

Os valores de K_m , citados na literatura, para transporte de Ca^{2+} em mitocôndria são conflitantes uma vez que variam de 0,4 a aproximadamente 60 μM (BYGRAVE, 1977). A causa desta ampla variação é certamente uma função das diferentes composições de meio de reação, tipos de mitocôndria e métodos utilizados para determinar o movimento de Ca^{2+} . Variação similar é observada para os valores de V_{max} . Neste caso os valores estão entre 300 e 1000 nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína mitocondrial por minuto. Uma observação recente, entretanto, demonstra que quando o transporte de Ca^{2+} é energizado por respiração, o fator limitante é a velocidade de respiração e não a saturação do sistema de transporte (BRAGADIN et alii, 1979). Assim, a velocidade máxima de transporte de Ca^{2+} é de 1000 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ quando energizado pelo potencial de difusão de K^+ induzido por valinomicina, contra 600 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ quando energizado por respiração.

Outra propriedade cinética do transporte de Ca^{2+} é a curva sigmoide obtida no gráfico de velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} em função de concentrações de Ca^{2+} livre (SPENCER & BYGRAVE, 1973; HUTSON, 1977; NOACK & HEINEN, 1977). Coeficientes de Hill próximos de 2 tem sido mais freqüentemente encontrados sugerindo a presença de pelo menos dois sítios de ligação de Ca^{2+} por molécula de transportador. O carácter sigmoide aumenta com a presença de Mg^{2+} , um inibidor do transporte de Ca^{2+} ($K_i = 20 \text{ mM}$) e que está presente no citoplasma em concentrações aproximadas a 1 mM. Na ausência de Mg^{2+} , alguns tipos de mitocôndria apresentam curvas hiperbólicas (CROMPTON et alii, 1976b; AFFOLTER & CARAFOLI, 1981).

Técnicas usuais de determinação de transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias.

Os parâmetros cinéticos de transporte de Ca^{2+} em mitocôndria tem sido determinados por técnicas que variam quanto à especificidade e habilidade em indicar alterações rápidas na concentração de Ca^{2+} , e como mencionado anteriormente explicam em parte a disparidade nos valores destes parâmetros citados na literatura.

Assim, o transporte de Ca^{2+} tem sido determinado indiretamente em função de alterações que ocorrem durante o transporte de Ca^{2+} , tais como velocidade de consumo de O_2 (NOACK & HEINEN, 1977) e ejeção de prótons (VERCESI et alii, 1978), bem como alterações redox de componentes da cadeia respiratória, detectadas por técnicas fluorimétricas ou espectrofotométricas (CHANCE, 1965).

Indicadores metalocrômicos como murexida, arsenazo III e apirazo tem sido amplamente utilizados (CHANCE, 1965; MELA & CHANCE, 1968; SCARPA, 1974; BRINLEY et alii, 1978b). As alterações espectrais induzidas nestes indicadores devido às alterações na concentração de Ca^{2+} iônico no meio de reação podem ser detectadas pelo uso de espectrofotômetro de duplo feixe. Clorotetraciclina tem sido também usada devido à sua propriedade de complexar Ca^{2+} e Mg^{2+} e sofrer alterações fluorimétricas (CASWELL, 1972; SHUSTER & OLSON, 1974). A distinção entre Ca^{2+} e Mg^{2+} pode ser feita usando-se diferentes espectros de fluorescência.

Técnicas isotópicas tem sido utilizadas com a vantagem de permitir determinações de transporte em condições onde as concentrações de Ca^{2+} no meio de reação são mantidas constantes com a ajuda de quelantes de Ca^{2+} como EGTA, NTA ou ATP (SPENCER & BYGRAVE, 1973; REED & BYGRAVE, 1974; HUTSON, 1977).

Atualmente, tem-se utilizado mais amplamente eletrodos específicos de Ca^{2+} que respondem satisfatoriamente a alterações de Ca^{2+} iônico. A característica técnica indesejável destes eletrodos é a resposta não linear a diferentes concentrações de Ca^{2+} .

Fatores que afetam o conteúdo de Ca^{2+} mitocondrial.

a - Potencial protônico ($\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$)

A habilidade da mitocôndria em tamponar a concentração de Ca^{2+} externo parece ser uma consequência de seu sistema de transporte responder ao Ca^{2+} externo de maneira inversa com relação aos componentes (ΔpH e $\Delta\Psi$) do potencial protônico ($\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$) NICHOLLS, 1978 demonstrou que o Ca^{2+} extramitocondrial decresce linearmente com o aumento do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) até valores entre 100 e 130 mV. Nestas condições a concentração extrami-

tocondrial de Ca^{2+} permanece inalterada em torno de 0,8 a 0,3 μM (dependendo do tipo de mitocôndria) mesmo que o potencial atinja valores de 180 mV.

Por outro lado, quando o potencial elétrico é mantido constante, incrementos do t \bar{e} rmo 60 ΔpH para valores acima de 90 induzem efluxo de Ca^{2+} mitocôndrial, com conseq \bar{u} ente aumento da concentração de Ca^{2+} extramitocôndrial. Este efluxo de Ca^{2+} em resposta ao aumento do gradiente de H^+ através da membrana indica efluxo eletroneutro de Ca^{2+} em troca por H^+ externo. (NICHOLLS, 1978).

Uma vez que o Ca^{2+} mitocôndrial, dentro de certos limites, está em equilíbrio com o potencial de membrana (NICHOLLS, 1978), qualquer fator capaz de dissipar o potencial de membrana, induz efluxo de Ca^{2+} mitocôndrial. Assim, quando a captação de Ca^{2+} é energizada por respiração, seu efluxo pode ser induzido por inibidores do transporte de elétrons na cadeia respiratória (rotenona, amital, antimicina A, cianeto, etc.) ou por oligomícina quando a fonte de energia é a hidrólise de ATP. Outro grupo de substâncias com propriedade de descarregar o Ca^{2+} mitocôndrial são os desacopladores de fosforilação oxidativa dado \bar{a} propriedade comum destes em permeabilizar a membrana mitocôndrial a H^+ (CHAPPELL & HAARNOFF, 1967). Vale ainda lembrar a existência de ionóforos de Ca^{2+} entre os quais o mais utilizado é o A_{23187} (REED & LARDY, 1972).

b - Fatores celulares

Entre os fatores celulares que afetam o transporte e a capacidade da mitocôndria em reter o Ca^{2+} captado estão: íons magnésio, íons sódio, prótons, fosfato, nucleotídeos de adenina e o estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina.

Íons magnésio - As interações entre Mg^{2+} e o transporte de Ca^{2+} por mitocôndria tem sido estudadas uma vez que no citoplasma de células intactas, a concentração deste íon é maior que a de Ca^{2+} .

Embora Mg^{2+} não seja normalmente transportado por mitocôndria, exceção feita à mitocôndria cardíaca em condições especiais (BRIERLEY et alii, 1963; CROMPTON et alii, 1976a), ele inibe competitivamente o transporte de Ca^{2+} principalmente em mi

tocondrias cardíacas (SCARPA & AZZI, 1968; HUTSON et alii, 1976). Acredita-se que mesmo não sendo transportado, o Mg^{2+} liga-se passivamente ao transportador de Ca^{2+} inibindo seu transporte.

Com relação ao conteúdo de Mg^{2+} mitocondrial, mitocôndria isolada de uma série de tecidos contém entre 20 e 40 nmoles Mg^{2+} por mg de proteína (THIERS et alii, 1960; KUN et alii, 1969; BOGUCA & WOJTCZAK, 1971; HOSER et alii, 1976). Mais de 90% do Mg^{2+} endógeno está distribuído entre espaço intermembrana e matriz mitocondrial. Cerca de 2 a 3 nmoles Mg^{2+} /mg estão ligados à membrana mitocondrial interna (BINET & VOLFIN, 1975), e parece estar envolvido na manutenção da integridade estrutural da membrana, uma vez que a remoção deste Mg^{2+} induzida pelo ionóforo A_{23187} ou EDTA, induz aumento inespecífico da permeabilidade da membrana (BINET & VOLFIN, 1975; DUSZYŃSKI & WOJTCZAK, 1977).

COELHO & VERCESI, 1980 demonstraram que a capacidade de mitocôndria hepática em captar e reter Ca^{2+} na presença de fosfato é diretamente proporcional à concentração de Mg^{2+} no meio de incubação até concentração de 5,0 mM. Este efeito foi interpretado como secundário ao efeito estabilizante sobre a membrana exercido pelo Mg^{2+} exógeno (SILIPRANDI et alii, 1977 ; COELHO & VERCESI, 1979). Acredita-se que as alterações na estrutura da mitocôndria (transição configuracional, desacoplamento e inchamento mitocondrial) induzidos pela captação de Ca^{2+} na presença de fosfato são secundárias ao aumento da permeabilidade da membrana como consequência do deslocamento de Mg^{2+} ligado à mesma. Como Mg^{2+} e Ca^{2+} competem pelos mesmos sítios de ligação na membrana, é possível que o movimento cíclico de Ca^{2+} induzido por fosfato através da membrana induza liberação do Mg^{2+} estrutural (SILIPRANDI et alii, 1979; COELHO & VERCESI, 1980).

O efeito estabilizante conferido pelo Mg^{2+} ligado à membrana parece resultar da imobilização de fosfolípidos e proteínas através da formação de complexos ternários entre grupos aniônicos destas proteínas e moléculas de fosfolípidos (BINET & VOLFIN, 1975).

Íons sódio - Inúmeras publicações tem demonstrado que Na^+ promove liberação eletroneutra de Ca^{2+} por uma via insensível a vermelho de rutênio em mitocôndria de tecidos excitáveis (CARAFOLI et alii, 1974; CROMPTON et alii, 1976.c; BYGRAVE, 1977; CROMPTON et alii, 1978b; AFFOLTER & CARAFOLI, 1980). A pre-

sença de Na^+ em concentrações superiores a 5 mM induz efluxo de Ca^{2+} mitocondrial por um processo que parece envolver a entrada de dois Na^+ por Ca^{2+} liberado (AFFOLTER & CARAFOLI, 1980).

A ocorrência deste processo em tecidos excitáveis permite especular sobre o possível vínculo entre o influxo de Na^+ durante o fenômeno de despolarização da membrana celular e o aumento de Ca^{2+} citosólico. Várias publicações recentes sobre transporte de Ca^{2+} em sinaptosomas intactos apoiam este tipo de correlação (SCOTT et alii, 1980; AKERMAN & NICHOLLS, 1981 a,b).

Prótons - Existem evidências de que alguns tipos de mitocôndrias possuem um sistema de transporte responsável pelo efluxo de um Ca^{2+} em troca por dois H^+ (NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1979). Acredita-se que o Ca^{2+} que é captado por processo eletroforético pode ter sua distribuição através da membrana em mitocôndria de tecidos não excitáveis, regulada pelo componente ΔpH do potencial protônico ($\Delta\mu\text{H}^+$) num processo que envolve sua liberação eletroneutra (NICHOLLS, 1978). De fato, efluxo de Ca^{2+} de mitocôndria isolada pode ser observado quando se induz acidificação do meio de suspensão (AKERMAN, 1978b; TSOKOS et alii, 1980). Outros experimentos com células intactas de diferentes tecidos demonstraram aumento de Ca^{2+} citoplasmático em resposta à diminuição de pH (BAKER & HONEJAGER, 1978; LEE & ASHLEY, 1978; ROSE & RICK, 1978; FLAGG-NEWTON et alii, 1979).

Fosfato - Como descrito anteriormente, fosfato aumenta a capacidade de captação de Ca^{2+} por mitocôndria dado sua propriedade em acompanhar o fluxo de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria e dissipar o gradiente de pH através da membrana (LEHNINGER, 1974). Outra propriedade do fosfato é estimular o movimento cíclico de Ca^{2+} associado com efluxo de Mg^{2+} , nucleotídeos de adenina e alterações estruturais da mitocôndria (SILIPRANDI et alii, 1977; COELHO & VERCESI, 1979; SILIPRANDI et alii, 1979; COELHO & VERCESI, 1980). Este efeito de fosfato é dependente da composição do meio de reação (COELHO & VERCESI, 1980; ZOCCARATO et alii, 1981).

COELHO & VERCESI, 1980 estudaram o efeito de fosfato sobre efluxo de Ca^{2+} mitocondrial e observaram que as alterações estruturais induzidas por Ca^{2+} na presença de fosfato inorgânico eram minimizadas quando vermelho de rutênio era adicionado durante o efluxo de Ca^{2+} para evitar a recaptação e assim o

movimento cíclico do cátion. Outros trabalhos indicam a existência de uma via de efluxo comum de Ca^{2+} e fosfato através da membrana mitocondrial (RUGOLO et alii, 1981; WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD, 1981).

Nucleotídeos de adenina - ATP e ADP, porém não AMP ou outros nucleotídeos, quando acrescentados ao meio de incubação impedem efluxo de Ca^{2+} e de nucleotídeos de adenina endógenos (ZOCARATO et alii, 1981). Sabe-se também que mitocôndria libera Ca^{2+} espontaneamente quando ADP e ATP endógenos são previamente exauridos em troca por pirofosfato inorgânico (SORDAHL & ASIMAKIS, 1978) ou fosfoenolpiruvato (CHUDAPONGSE & HAUGAARD, 1973; SUL et alii, 1976).

O efeito dos nucleotídeos exógenos parece ser secundário ao seu efeito na manutenção dos nucleotídeos internos, uma vez que após liberação destes, a mitocôndria perde a capacidade em responder à adição de nucleotídeos exógenos (VERCESI¹).

A habilidade dos nucleotídeos de adenina (ADP e ATP) em aumentar o conteúdo de Ca^{2+} mitocondrial parece estar relacionada com a propriedade destes em participar na formação de precipitados de Ca^{2+} na matriz mitocondrial (BEKER et alii, 1974). Outros resultados demonstram também um importante papel de ADP na manutenção da impermeabilidade da membrana mitocondrial (PANOV et alii, 1980; HARRIS et alii, 1979).

Nucleotídeos de piridina - Estudando a estequiometria entre captação de Ca^{2+} , ejeção de H^+ e consumo de O_2 em mitocôndria cardíaca, VERCESI et alii, 1978 observaram que o efluxo de Ca^{2+} era estimulado neste tipo de mitocôndria quando energizada por substratos respiratórios dependentes de NAD. Estes resultados estavam em contraste com observações anteriores de que mitocôndria cardíaca era capaz de reter altas concentrações de Ca^{2+} sem perda das funções quando energizada por succinato na presença de rotenona (VERCESI, 1977).

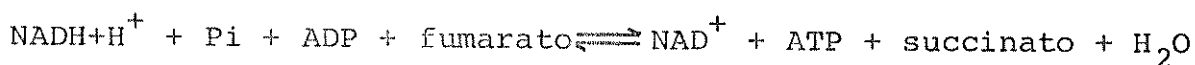
Do ponto de vista energético não há diferença entre as duas condições experimentais (VERCESI et alii, 1978), espera-se, porém, que quando mitocôndria oxida substratos dependentes de NAD(P) estas coenzimas não se encontram tão reduzidas como quando mitocôndria oxida succinato na presença de rotenona que inibe a oxidação de NADH pela cadeia respiratória (COELHO & VERCESI, 1980). É importante também lembrar uma observação ante-

¹ VERCESI, A.E. resultados não publicados

rior indicando que células intactas de tumor de Erlich captavam mais Ca^{2+} do meio de incubação quando energizadas por succinato na presença de rotenona (LANDRY & LEHNINGER, 1976). Baseados nestes resultados LEHNINGER et alii, 1978b testaram o efeito do estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina sobre o transporte de Ca^{2+} em mitocôndria isolada energizada por diferentes substratos: succinato, ascorbato-TMPD ou ATP, sempre na presença de rotenona. Em cada condição experimental a razão $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ era manipulada artificialmente por adições alternadas de oxidantes (oxaloacetato ou acetoacetato) e redutores (β -hidroxibutirato, isocitrato ou glutamato). Assim esses autores demonstraram que o Ca^{2+} acumulado, não importando a fonte de energia, era retido na matriz mitocondrial enquanto os nucleotídeos de piridina eram mantidos reduzidos sendo liberado após oxidação dos mesmos. Ciclos de captação e liberação sucessivas podiam ser assim induzidos por oxidações e reduções alternadas (LEHNINGER et alii, 1978b).

Com base nestes resultados LEHNINGER et alii, 1978 lançaram a hipótese de que algumas enzimas citoplasmáticas envolvidas na produção de substratos respiratórios (fosforilases de glicogênio, lipases, glicerofosfato desidrogenase, etc.) teriam suas atividades reguladas por Ca^{2+} liberado da matriz mitocondrial num mecanismo envolvendo o equilíbrio entre a razão NADH/NAD^+ e o potencial de fosforilação citoplasmático $[\text{ATP}] / [\text{ADP}] [\text{Pi}]$.

A relação entre o potencial de fosforilação citoplasmático que reflete o estado energético da célula e a razão NADH/NAD^+ pode ser uma função do estado de equilíbrio da reação reversível de fosforilação do sítio 1 da cadeia respiratória (LEHNINGER et alii, 1978b):



Assim, quando a razão $[\text{ATP}] / [\text{ADP}] [\text{Pi}]$ diminui no citoplasma, a oxidação do NADH seria favorecida resultando na liberação de Ca^{2+} e estimulação das reações dependentes de Ca^{2+} com produção de substratos respiratórios. Por outro lado, quando a razão $[\text{ATP}] / [\text{ADP}] [\text{Pi}]$ aumenta, a redução do NAD^+ seria favorecida resultando na captação de Ca^{2+} e diminuição da produção de substratos respiratórios.

Tem sido amplamente confirmado que o estado oxidado dos nucleotídeos de piridina mitocondriais está associado com o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial a partir de mitocôndria isolada (DAWSON et alii, 1979; FISKUM & LEHNINGER, 1979; HUNTER & HAWORTH, 1979; LOTSCHER et alii, 1979; PFEIFFER et alii, 1979; SANDRI et alii, 1979; ARSHAD & HOLDSWORTH, 1980; BEATRICE et alii, 1980; COELHO & VERCESI, 1980; DAWSON & FULTON, 1980; LOTSCHER et alii, 1980; PANFILI et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; PRPIC & BYGRAVE, 1980; WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD, 1980; JUNG & BRIERLEY, 1981; HOFSTETTER et alii, 1981; PALMER & PFEIFFER, 1981; WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD, 1981; BARDSLEY & BRAND, 1982), células intactas (KRELL et alii, 1979) e órgão perfundido (SIES et alii, 1981). Apesar disso não está claro qual dos dois nucleotídeos: NAD ou NADP é responsável pela ativação do efluxo de Ca^{2+} . Outro aspecto que tem sido objeto de controvérsia refere-se à natureza do mecanismo. Assim, Ca^{2+} pode ser liberado de mitocôndria como resultado de aumento inespecífico da permeabilidade com queda do potencial de membrana ou por mecanismo eletroneutro sem interferência do potencial de membrana e independente de alterações irreversíveis da membrana mitocondrial. Considera-se que o primeiro processo não ocorre em condições fisiológicas "in situ" enquanto que o segundo apresenta características e propriedades compatíveis ao de um processo de regulação nas condições fisiológicas normais da célula. Conclusões apontando tanto uma como outra possibilidade tem surgido na literatura. Assim, DAWSON et alii, 1979 demonstraram que o efluxo de Ca^{2+} induzido por NAD(P)^+ era sensível aos anestésicos locais nupercaina e tetracaina mesmo após liberação parcial do Ca^{2+} mitocondrial e concluíram que o processo era específico e não resultava de uma ação geral sobre a estabilidade da membrana. FISKUM & LEHNINGER, 1979 estudando liberação de Ca^{2+} por mitocôndria hepática descreveram uma via de liberação de Ca^{2+} em troca por H^+ que seria estimulada pelo estado oxidado do NAD(P) mitocondrial. LOTSCHER et alii, 1979 e LOTSCHER et alii, 1980 propuseram que a distribuição entre Ca^{2+} citoplasmático e mitocondrial pode ser modulada pelo estado de óxido-redução de NAD(P) num processo que envolve a redução de hidroperóxidos pelo sistema glutaciona peroxidase/glutaciona redutase usando NADPH como redutor. Estes autores demonstraram que o processo envolve hidrólise reversível de NAD(P)^+ por uma NADase sensível a ATP . Como

produto desta hidrólise identificaram nicotinamida no sobrenadante e ADP-ribose ligada a uma proteína de membrana que, segundo interpretação dos mesmos, estaria envolvida no mecanismo molecular do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial. SANDRI et alii, 1979 e PANFILI et alii, 1980 demonstraram que a glicoproteína isolada por SOTTOCASA et alii, 1972 possui quatro sítios de ligação para NAD^+ por molécula apresentando cooperatividade positiva. A afinidade desta glicoproteína por Ca^{2+} diminui quando NAD^+ está ligado. Outra observação interessante deste grupo é que a liberação de Ca^{2+} induzida por NAD(P)^+ é inibida pelo anticorpo desenvolvido contra essa glicoproteína, indicando que a mesma estaria envolvida tanto no processo de captação como de liberação de Ca^{2+} .

Entre os trabalhos, que confirmam a correlação entre o estado de óxido-redução de NAD(P) mitocondrial e o efluxo de Ca^{2+} desta organela, merece destaque o trabalho de SIES et alii, 1981 demonstrando estimulação reversível do efluxo de Ca^{2+} celular em fígado perfundido durante oxidação seletiva de NADP citoplasmático e mitocondrial dependente de metabolização de drogas (aminopirina, etilmorfina e hexobarbital) por citocromo p-450 a nível de retículo endoplasmático. Trabalhos de outros laboratórios (HUNTER & HAWORTH, 1979; BEATRICE et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD, 1980; PALMER & PFEIFFER 1981), todavia, ponderam que o estado oxidado dos nucleotídeos de piridina mitocondriais meramente sensibilizam a mitocôndria aos efeitos deletérios do Ca^{2+} , causando desacoplamento e inchamento mitocondrial com queda do potencial de membrana e o consequente efluxo de Ca^{2+} pelo inverso da via de captação. De acordo com esta interpretação tal processo dificilmente poderia representar um mecanismo fisiológico de regulação do Ca^{2+} livre no citoplasma. VERCESI & LEHNINGER, 1982 demonstraram todavia, que apesar da oxidação de NADP predispor a mitocôndria às alterações estruturais induzidas por Ca^{2+} , a liberação do íon induzido por NADP^+ não é necessariamente associada ao inchamento de grande amplitude ou desacoplamento mitocondrial.

Os experimentos descritos nesta Tese indicam que o efluxo de Ca^{2+} induzido por NADP^+ está associado a alterações conformacionais da mitocôndria resultantes da oxidação de grupos -SH da membrana em equilíbrio de óxido-redução com NADP. O envolvimento da enzima transportadora de nucleotídeos de adeni

na bem como dos nucleotídeos de adenina endógenos no mecanismo é discutido. Resultados preliminares deste trabalho foram objeto de três comunicações em congressos (VERCESI, 1979 a-b; VERCESI, 1981).

MATERIAIS E MÉTODOS

Mitocondria era isolada de fígado de ratos pelo método de SCHNEIDER & HOGEBOM, 1950 após jejum de 24 horas. O homogenizado de fígado era preparado em sacarose 250 mM tamponada com Hepes 2,0 mM contendo EGTA 0,5 mM. A fração mitocondrial era lavada três vezes nesta solução sendo que na última vez o EGTA era omitido. A suspensão mitocondrial estoque continha cerca de 100 mg de proteína por ml determinada pelo método de KIES & MURPHY, 1960 e era usada dentro de 5 horas após o término do isolamento. Os ensaios eram feitos em câmaras de vidro termostatizadas ou cubetas de quartzo quando a absorvância ou fluorescência eram determinadas. O consumo de oxigênio era determinado com eletrodo de Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado a oxígrafo Gilson. As variações nas concentrações de Ca^{2+} eram determinadas usando-se eletrodo específico (Calcium Seletrode F2112, Radiometer) cujos sinais eram amplificados através de um acessório de alta impedância (Sargent-Welch Scientific Co.), conectado a um registrador Beckman de 10 polegadas. O eletrodo de Ca^{2+} era calibrado pela adição de solução de Ca^{2+} de concentração conhecida a cada meio de reação como mostrado na Figura 7. O estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina mitocondriais era determinado fluorimetricamente excitando-se a suspensão mitocondrial a 366 nm e medindo-se a emissão em 450 nm usando-se espectrofluorímetro Aminco Bowman. A variação turbidimétrica da suspensão mitocondrial era determinada medindo-se a absorvância em 700 nm usando-se espectrofotômetro de duplo feixe Aminco DW-2. As variações de pH no meio de reação eram determinadas usando-se eletrodo combinado de vidro (Thomas 4090 L15) conectado ao registrador Beckman através de pH-metro Beckman Expandomatic SS-2. Para as determinações de Mg^{2+} , alíquotas de 0,5 ml de suspensão mitocondrial eram colhidas nos tempos indicados na figura e imediatamente centrifugadas em centrífugas Eppendorf 3200. O sedimento mitocondrial era resuspenso e o Mg^{2+} endógeno era determinado em espectrofotômetro de absorção atômica Carl Zeiss, (modelo FMD-3) no sobrenadante ácido após nova centrifugação. O ADP mitocondrial era determinado enzimaticamente como descrito por ASIMAKIS &

APRILLE, 1980. A determinação de grupos -SH de proteínas da membrana mitocondrial era feita como descrito por HATASE et alii, 1977, num processo que envolve a titulação dos grupamentos -SH da membrana com DTNB seguida de precipitação proteica com metanol. Após várias lavagens o sedimento proteico era tratado com DTT que libera o TNB ligado covalentemente aos grupos -SH das proteínas. O TNB liberado era determinado no sobrenadante límpido pela medida de absorbância em 412 nm.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

RESULTADOS

Características da oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais por acetato e oxaloacetato.

Em nossos trabalhos anteriores o estado de óxido-redução de NAD e NADP mitocondrial era alterado por adições alternadas de oxidantes (oxaloacetato ou acetoacetato) e redutor (β -hidroxibutirato). Desde que estes substratos oxidam ou reduzem diretamente NAD, as alterações no estado de óxido-redução de NADP eram dependentes da reação esquematizada abaixo:



Esta reação é catalizada pela enzima transidrogenase de nucleotídeos de piridina (EC 1.6.1.1), designada resumidamente por NAD(P)-transidrogenase. Existem evidências de que esta enzima está localizada na membrana mitocondrial interna e funciona como uma bomba de prótons (RYDSTRON, 1977). Inúmeros trabalhos com partículas sub-mitocondriais ou com o sistema reconstituído em membranas artificiais demonstram que a constante de equilíbrio desta reação é deslocada para a esquerda de um valor unitário para um valor em torno de 500 pela simples energização da vesícula (presença de gradiente de H^+) (RYDSTRON, 1977). Estes resultados explicam as observações anteriores feitas por KLINGENBERG & SLENCZKA, 1959 de que em mitocôndria intacta energizada o NADP era mantido significativamente mais reduzido do que NAD às expensas de NAD(P)-transidrogenase. Esta diferença desaparecia quando a mitocôndria era desenergizada pela adição do protonôforo FCCP.

A figura 1 mostra as características e extensões da oxidação do NAD(P) mitocondrial por acetoacetato ou oxaloacetato em função do estado energético da mitocôndria hepática intacta. Neste experimento o estado de óxido-redução de NAD(P) era determinado pela emissão de fluorescência a 450 nm quando o sistema era excitado a 366 nm (ONTKO et alii, 1975).

A linha sólida mostra a manutenção do estado predominantemente reduzido dos nucleotídeos de piridina em mitocôndria energizada por succinato na ausência de oxidante. A linha tracejada mostra uma rápida oxidação parcial induzida pela adi-

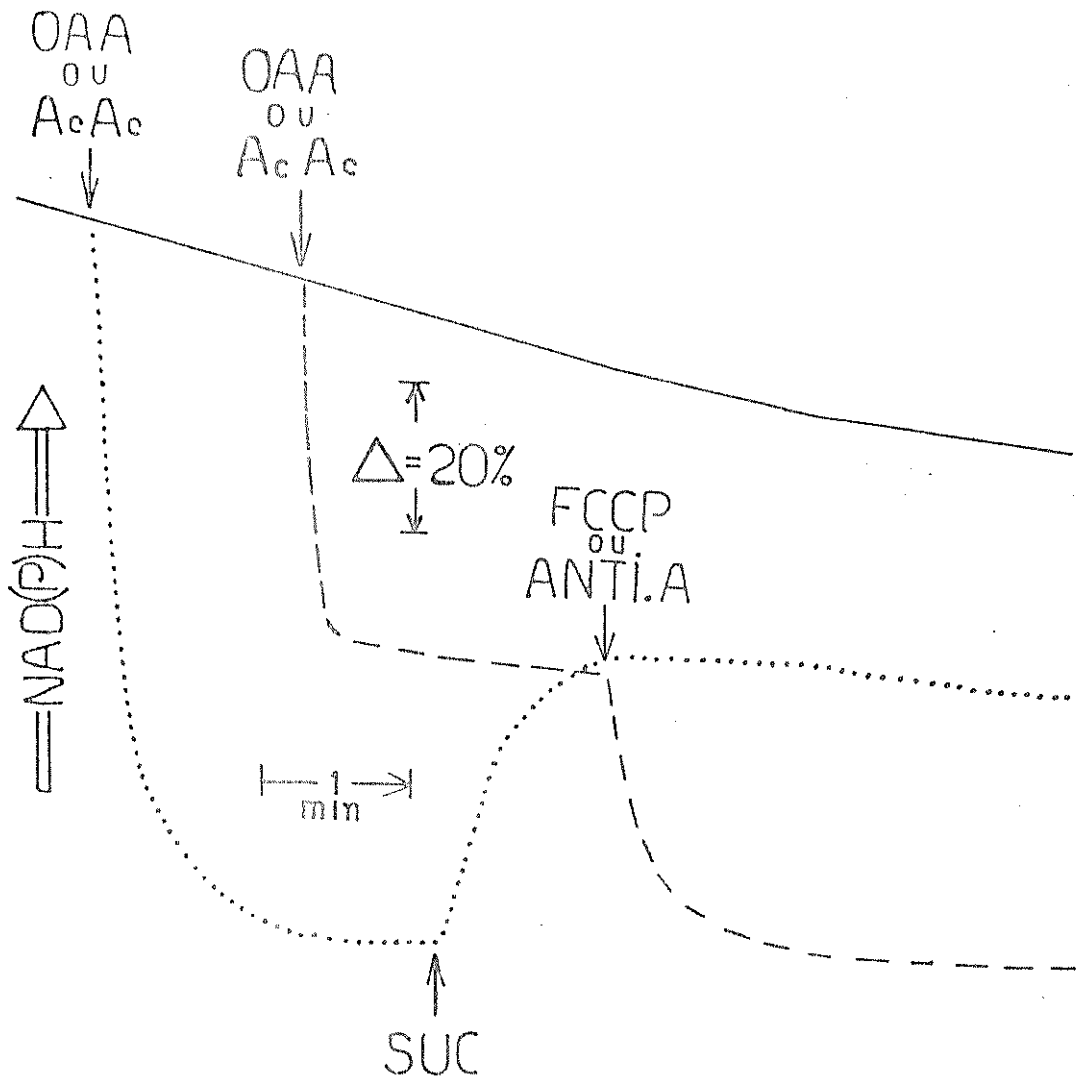


FIGURA 1 - Efeito do estado energético mitocondrial sobre a oxidação dos nucleotídeos de piridina por acetoacetato ou oxaloacetato. Mitocôndria (4,0 mg de proteína) era adicionada ao meio (volume final 2,0 ml, 30°C) contendo: sacarose 125 mM, KCl 60 mM, acetato 20 mM, tampão Hepes 3,0 mM, pH 7,0, EGTA 0,5 mM, ATP 2,0 mM, ADP 1,0 mM, Mg^{2+} 4,0 mM, fosfato 2,0 mM, rotenona 4,0 μM e succinato 1,0 mM. Acetoacetato 0,5 mM ou oxaloacetato 0,5 mM, antimicina A 0,1 nmol/mg ou FCCCP 0,4 μM , quando presentes, eram adicionados nos pontos indicados. Na linha pontilhada, succinato era omitido inicialmente e então adicionado no ponto indicado.

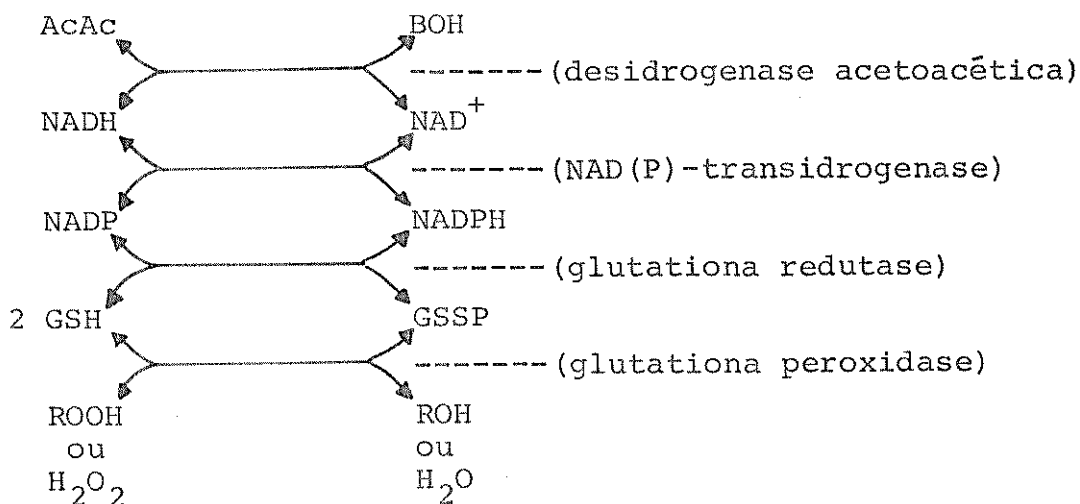
ção de oxaloacetato ou acetoacetato. Um novo decréscimo rápido da fluorescência ocorria após desenergização mitocondrial pela adição de FCCP ou antimicina A, desacoplador e inibidor de respiração, respectivamente. A linha pontilhada mostra a extensão da oxidação induzida pelos oxidantes quando o substrato respiratório era omitido (mitocondria desenergizada). Nestas condições o decréscimo de fluorescência a 450 nm era comparável ao observado na linha tracejada após adição de FCCP ou antimicina A. A posterior energização mitocondrial por succinato promovia retorno da fluorescência aos níveis que precediam a adição de FCCP ou antimicina A.

Estes achados demonstram claramente que a extensão da oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais induzida por acetoacetato ou oxaloacetato é aproximadamente 50% em mitocondria energizada quando comparada com mitocondria não energizada nas mesmas condições.

Oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais pela combinação acetoacetato-hidroperóxido butírico.

Em adição à oxidação pelos substratos acetoacetato e oxaloacetato os nucleotídeos de piridina podem ser oxidados através do sistema glutathiona redutase/glutathiona peroxidase mitocondrial que utilizam poder redutor proveniente de NADPH para reduzir hidroperóxidos formados durante o metabolismo mitocondrial (LOTSCHER et alii, 1979).

O esquema abaixo indica como a combinação entre acetoacetato e hidroperóxidos poderia induzir uma mais completa oxidação dos nucleotídeos de piridina por utilizarem equivalentes de redução provenientes de NADH e NADPH simultaneamente.



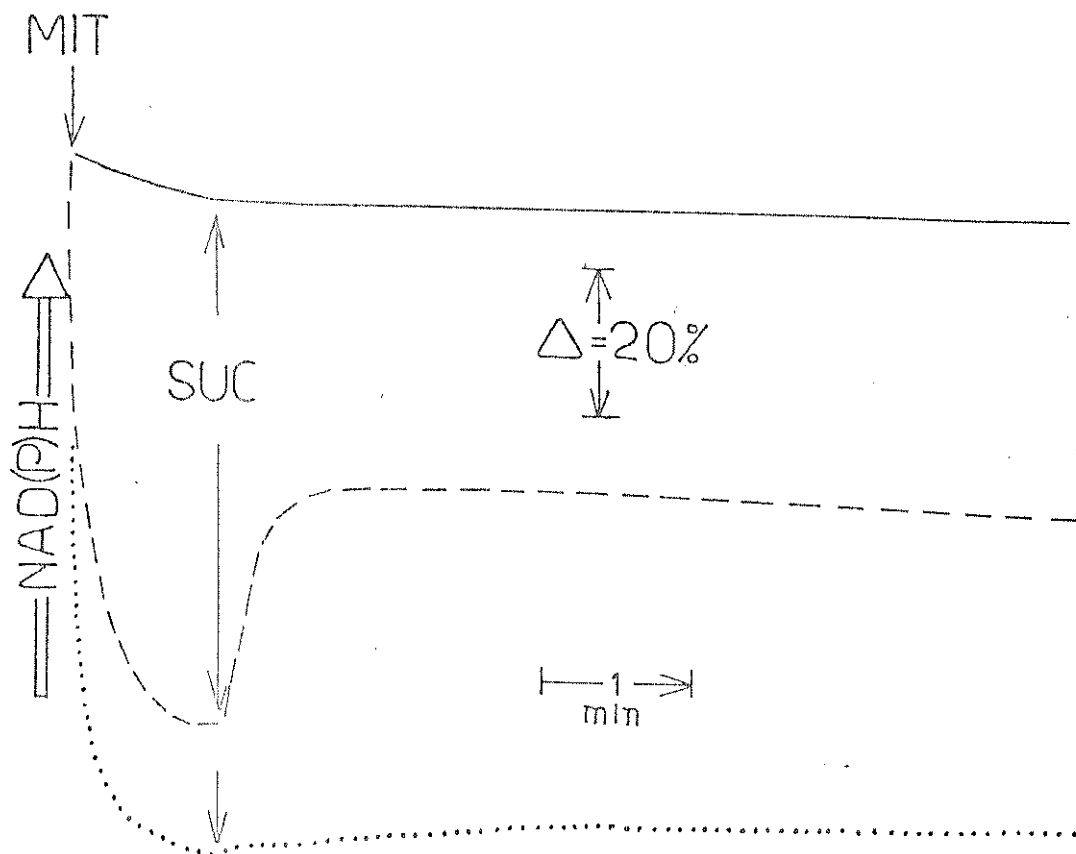


FIGURA 2 - Oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais pela combinação acetoacetato-hidroperóxido butírico. As condições experimentais eram idênticas as da Figura 1 com a diferença que os oxidantes (acetoacetato e/ou hidroperóxido butírico) eram adicionados ao meio antes da inclusão de mitocôndria. Succinato 1,0 mM era adicionado no ponto indicado. A linha sólida indica ausência de oxidantes e presença de β -hidroxibutirato 5,0 mM para uma maior redução de NAD(P). As linhas traçada e pontilhada indicam a presença de acetoacetato 0,5 mM ou acetoacetato 0,5 mM mais hidroperóxido butírico 0,35 mM, respectivamente.

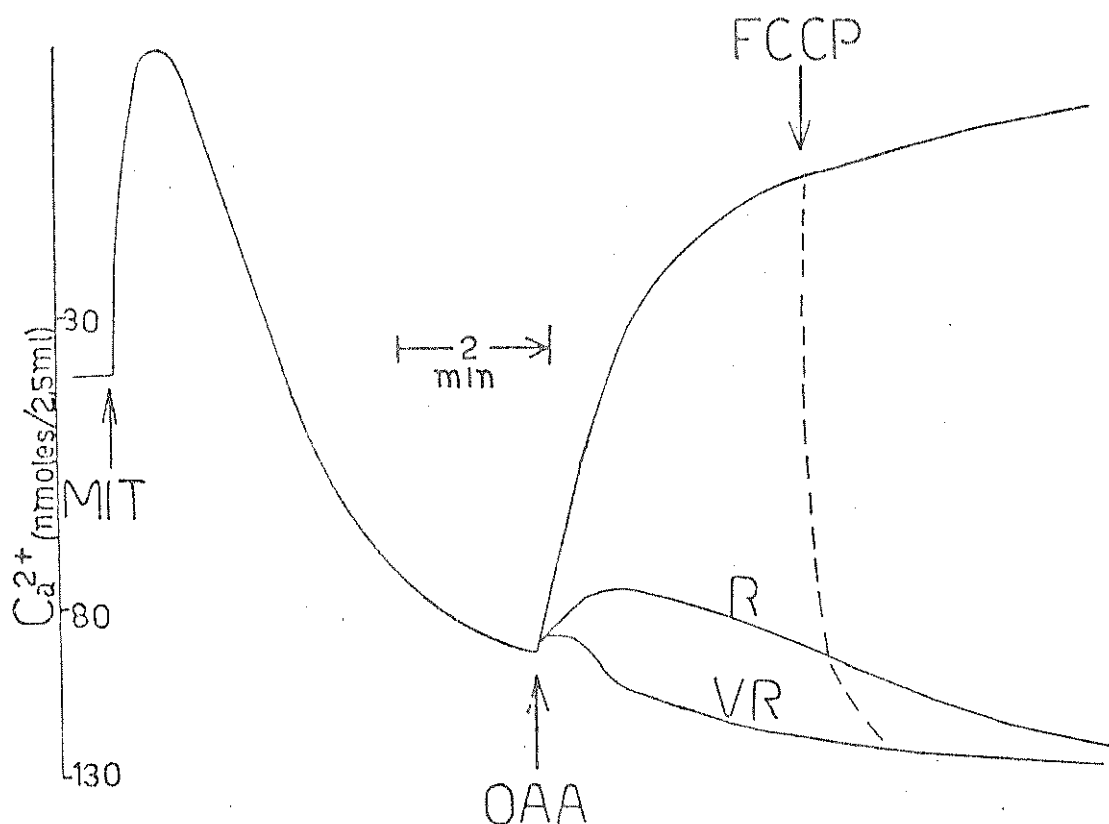


FIGURA 3 - Captação de Ca^{2+} por mitocôndria energizada pela reação catalizada pela enzima NAD(P)-transidrogenase. Mitocôndria hepática (10 mg de proteína) era pré-incubada durante 5 minutos em meio (2,5 ml, 30°C) contendo: sacarose 125 mM; KCl 60 mM; tampão Hepes 5,0 mM; pH 7,0; fosfato 0,5 mM; rotenona 4,0 μM ; antimicina A 0,1 nmol/mg; oligomicina 1,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e isocitrato 1,0 mM. Oxaloacetato 0,25 mM ou FCCP 0,1 μM eram adicionados nos pontos indicados. Rheina 40 μM ou vermelho de rutênio 1,0 μM quando presentes eram adicionados 1 minuto antes da adição de oxaloacetato. A linha tracejada indica liberação de Ca^{2+} induzido por FCCP. A deflexão do eletrodo de Ca^{2+} quando da adição de mitocôndria indica captação do íon num período que precedia a fase de desenergização induzida pelos inibidores metabólicos. O eletrodo indica as concentrações de Ca^{2+} extramitocondriais.

Com o objetivo de interpretar com maior segurança os resultados das figuras 1 e 2 testamos a viabilidade das reações do esquema acima funcionar como um gerador de gradiente de H^+ em nossas condições experimentais.

Assim, mitocôndria era incubada na presença dos inibidores metabólicos: rotenona, antimicina A e oligomicina para uma completa desenergização e liberação de Ca^{2+} endógeno. Isocitrato estava também presente como substrato dependente de NADP. Após liberação da maior parte do Ca^{2+} endógeno, como indicado pelo eletrodo específico, a adição de oxaloacetato induziu recaptção do Ca^{2+} liberado a uma velocidade inicial de aproximadamente 5 nmoles Ca^{2+} por minuto por mg de proteína mitocondrial. A natureza da captação de Ca^{2+} , secundária ao gradiente de prótons gerado pela reação catalizada pela NAD(P)-transidrogenase, foi comprovada por três procedimentos diferentes: i) a adição do protonóforo FCCP induziu liberação do Ca^{2+} acumulado; ii) inibição da captação eletroforética de Ca^{2+} pela presença de vermelho de rutênio e; iii) inibição da captação de Ca^{2+} por rheina, conhecido inibidor da NAD(P)-transidrogenase (MOYLE & MITCHELL, 1973).

Correlação entre o estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina e a capacidade de tamponamento de Ca^{2+} externo por mitocôndria.

a. Mitocôndria energizada por ascorbato-TMPD

No experimento da figura 4 a preparação mitocondrial era incubada na presença de inibidores metabólicos (rotenona, antimicina A e oligomicina) durante 5 minutos para uma completa desenergização e liberação do Ca^{2+} endógeno. Como mostra a parte superior da figura, esta fase de pré-incubação mitocondrial era acompanhada de oxidação espontânea dos nucleotídeos de piridina conforme indicado pela diminuição da fluorescência a 450 nm. Esta oxidação espontânea era completamente revertida pela adição de isocitrato (linha 1) ou incrementada a diferentes níveis pela adição de diferentes concentrações de acetoacetato (linhas 3 a 7). A linha 2 mostra a fluorescência de NAD(P)H na ausência de oxidantes ou redutores exógenos.

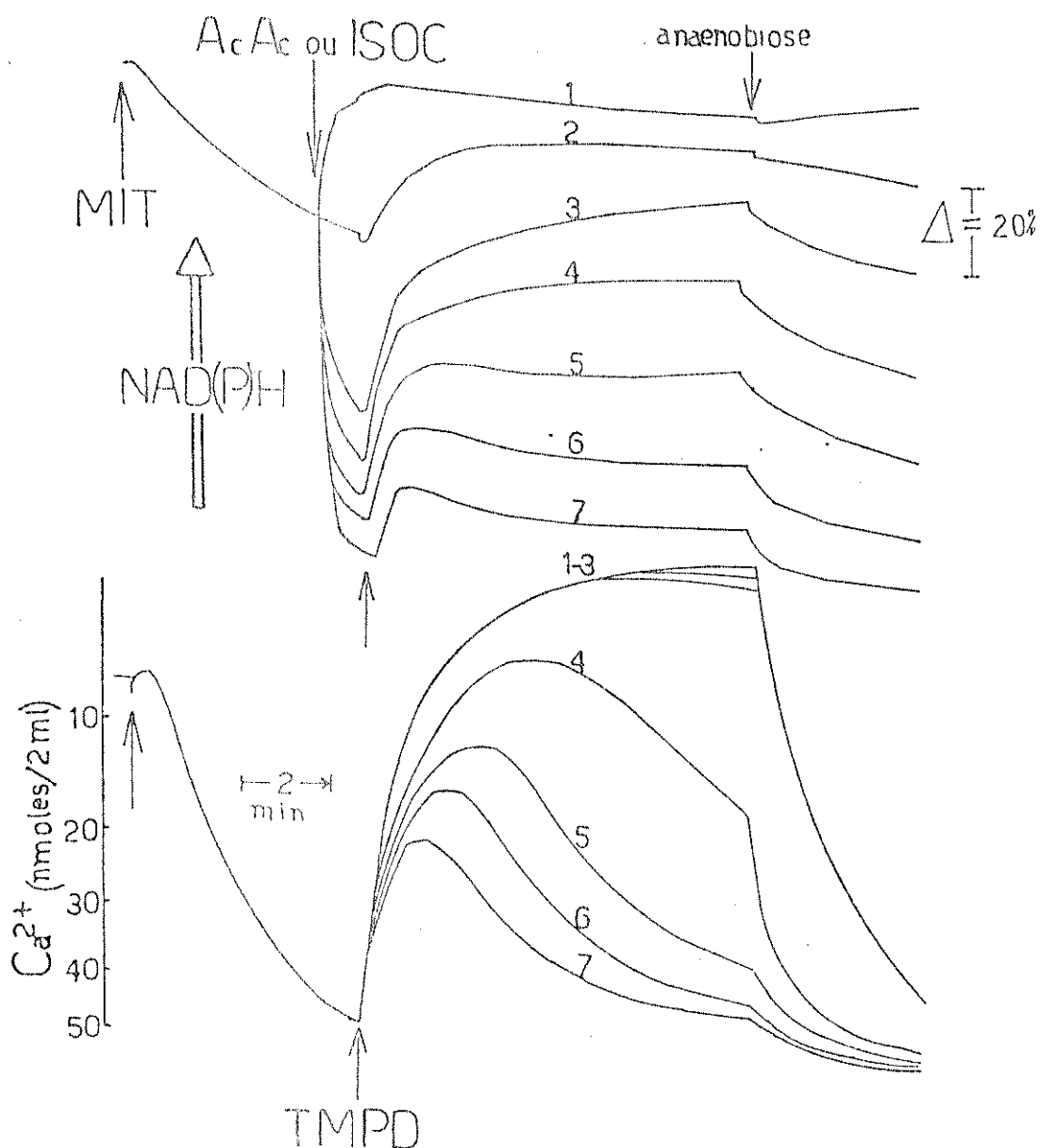


FIGURA 4 - Transporte de Ca^{2+} por mitocôndria sob diferentes "steady states" de óxido-redução de NAD(P). Mitocôndria hepática (4,0 mg de proteína) era pré-incubada durante 5 minutos para uma completa desenergização e liberação do Ca^{2+} endógeno em meio (2,0 ml, 35°C) contendo sacarose 125 mM; KCl 60 mM; acetato 20 mM; tampão HEPES 3,0 mM, pH 7,0; rotenona 4,0 μM ; antimicina A 0,1 nmol/mg; oligomicina 1,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$; ADP 0,1 mM; Mg^{2+} 1,0 mM e ascorbato 1,5 mM. Isocitrato (0,5 mM) ou acetatoacetato (0,06; 0,125; 0,250; 0,50 e 1,0 mM) eram adicionados onde indicado, respectivamente nas linhas 1 e de 3 a 7. A linha 2 representa um experimento na ausência de oxidantes ou redutores exógenos. TMPD (15 μM) era adicionado no ponto indicado.

A posterior energização mitocondrial pela adição de TMPD induzia recaptção de Ca^{2+} e redução parcial dos nucleotídeos de piridina. É possível observar-se, porém, o estabelecimento de diferentes níveis de oxidação destes nucleotídeos em função da presença de isocitrato ou das diferentes concentrações de acetoacetato. Nas condições das linhas de 1 a 3 onde os nucleotídeos de piridina eram mantidos no estado predominantemente reduzido, todo Ca^{2+} presente no meio de incubação era captado e retido pela mitocôndria até que o sistema atingisse anaerobiose. A partir deste momento uma rápida liberação do Ca^{2+} acumulado ocorria como consequência da queda do potencial de membrana. Nas linhas subsequentes (4-7) é possível se observar a correlação entre os estados mais oxidados dos nucleotídeos de piridina e o estímulo do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial. Apesar das velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} serem idênticas em todas as situações elas decresciam progressivamente em relação ao tempo e ao estado mais oxidado dos nucleotídeos de piridina até que as velocidades de liberação sobrepujavam as velocidades de captação e as concentrações de Ca^{2+} externo voltavam a aumentar.

b. Mitocôndria energizada por succinato

Experimentos anteriores indicam que o efluxo de Ca^{2+} estaria relacionado especificamente com o estado oxidado de NADP e não de NAD (PRPIC & BYGRAVE, 1980). Assim, o experimento da figura 5 foi planejado no sentido de se elucidar qual dos nucleotídeos de piridina está diretamente relacionado com o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial.

Neste experimento mitocôndria era adicionada ao meio de reação na ausência de oxidante (linha pontilhada), na presença de acetoacetato (linha tracejada) ou na presença de acetoacetato mais hidroperóxido butírico (linha sólida). Após 5 minutos de pré-incubação, mitocôndria era energizada pela adição de succinato. No experimento controle (linha pontilhada) o NAD(P) mitocondrial era mantido no estado predominantemente reduzido às expensas de substratos endógenos (COELHO & VERCESI, 1980) e todo Ca^{2+} contaminante do meio era captado e retido. A adição de mais Ca^{2+} era seguida de captação do mesmo com volta aos níveis externos anteriores. Na presença de acetoacetato (linha tracejada) ,

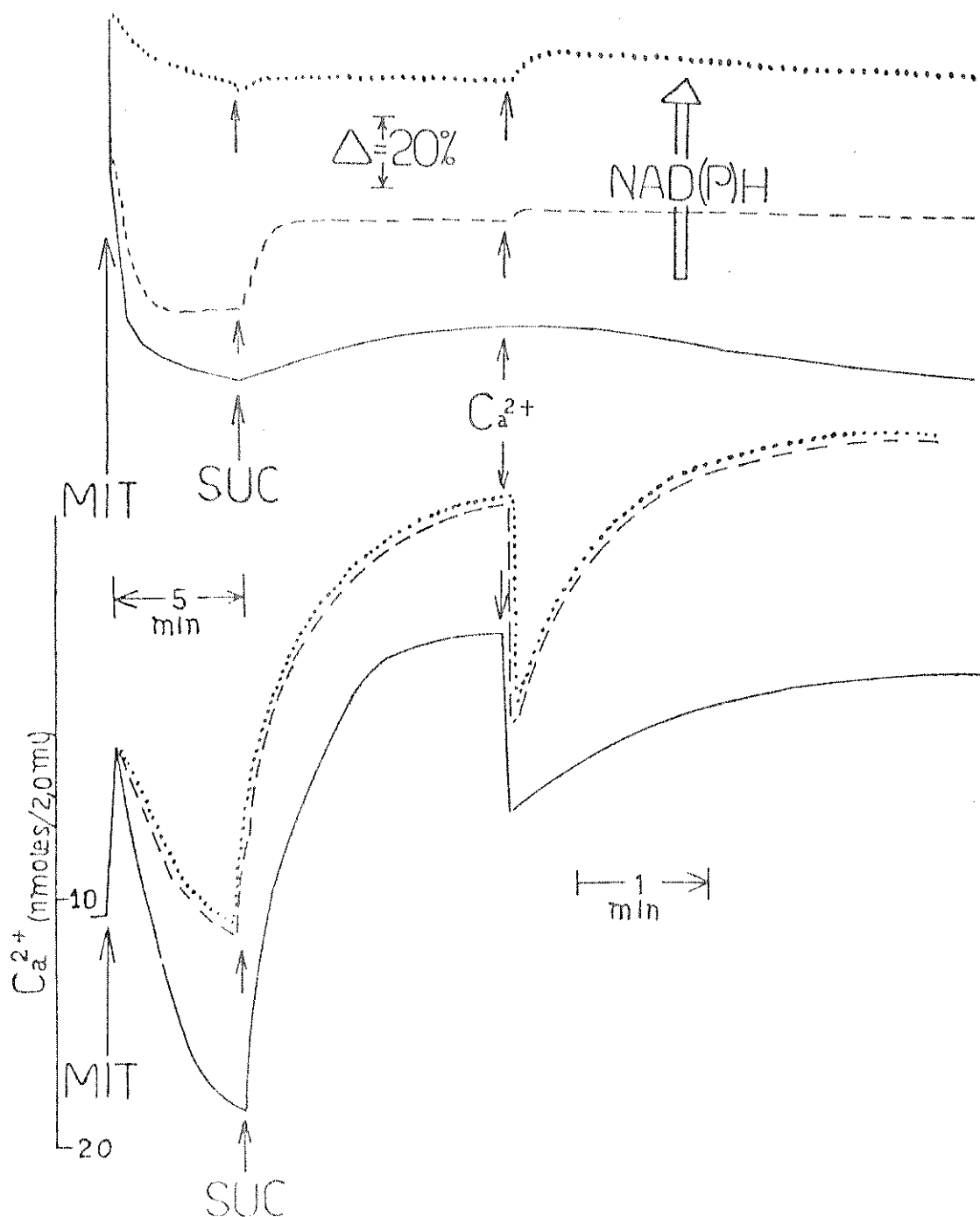


FIGURA 5 - Correlação entre a capacidade de tamponamento de Ca^{2+} por mitocôndria e o estado de óxido-redução de NADP . As condições eram as mesmas da Figura 2 exceto que apenas 2,2 mg de proteína mitocondrial era usada, EGTA era omitido e o movimento de Ca^{2+} era acompanhado. No ponto indicado 40 nmoles de Ca^{2+} eram adicionados. Linha pontilhada - ausência de oxidantes; linha tracejada - presença de acetoacetato e linha sólida - presença de acetoacetato + hidróperóxido butírico.

ocorria uma importante oxidação de NAD(P) que era parcialmente revertida pela adição de succinato como também observado nas figuras 1 e 2. O fluxo de Ca^{2+} observado nestas condições era idêntico ao do experimento controle. Uma liberação mais rápida do Ca^{2+} endógeno era observada quando os nucleotídeos de piridina eram mais completamente oxidados pela combinação de acetoacetato e hidroperóxidos. Nestas condições o estado de oxidação dos referidos nucleotídeos permaneciam praticamente inalterados após a adição de succinato, e a mitocôndria não apresentava capacidade de reduzir a concentração de Ca^{2+} externo aos níveis observados nas condições das linhas pontilhadas e tracejadas. Esta diferença se tornava mais pronunciada após nova adição de Ca^{2+} .

Perda de ADP e Mg^{2+} endógenos associados com efluxo de Ca^{2+} induzido por NADP^+ .

Vários trabalhos indicam que os nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} endógenos estão envolvidos no mecanismo de retenção de Ca^{2+} no interior da matriz mitocondrial (OUT et alii, 1971; SUL et alii, 1976; PENG et alii, 1977; SORDAHL & ASIMAKIS, 1978; AL-SHAIKHALY & BAUM, 1979). Não está claro, porém, se estas substâncias agem por estabilizar o precipitado de fosfato de Ca^{2+} na matriz mitocondrial (BECKER et alii, 1974) ou por afetar o efluxo do cátion ao nível da membrana (HARRIS et alii, 1979). Desde que o efluxo de Ca^{2+} induzido por uma série de fatores esta associado ao efluxo de nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} (AL-SHAIKHALY & BAUM, 1979; ZOCCARATO et alii, 1981) determinamos as concentrações de ADP e Mg^{2+} endógenos em mitocôndria cujo efluxo de Ca^{2+} era estimulado por acetoacetato. No experimento da figura 6, a mitocôndria não energizada contendo 7 nmoles Ca^{2+} por mg era pré-incubada durante 5 minutos antes da adição de TMPD. Durante este período cerca de 4 nmoles Ca^{2+} por mg de proteína era liberado. Nestas condições os conteúdos de ADP e Mg^{2+} endógenos eram mantidos inalterados. Quando a energização mitocondrial era precedida pela adição de isocitrato, que mantinha do NAD(P) mitocondrial completamente reduzido, todo Ca^{2+} previamente liberado mais o Ca^{2+} contaminante era captado e retido na matriz mitocondrial durante o período analisado (linha tracejada). Nestas condições também não houve perda de ADP e Mg^{2+} . Quando a energização mito-

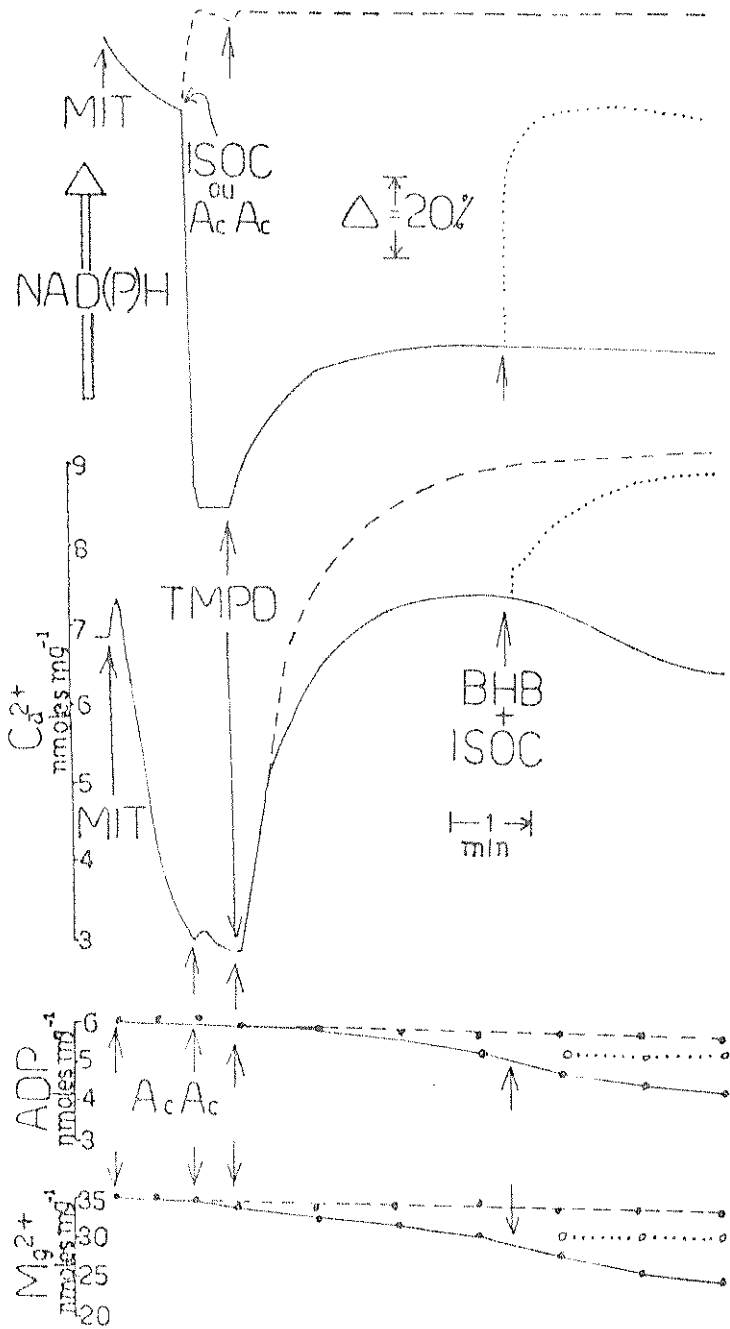


FIGURA 6 - Perda de ADP e Mg^{2+} endógenos associados com o efluxo de Ca^{2+} induzido por $NADP^+$. Mitochondria (3,87 mg de proteína por ml era preincubada durante 4 minutos em estado não energizado em meio contendo sacarose 125 mM; KCl 60 mM; acetato 20 mM; Hepes 3,0 mM, pH 7,0; rotenona 5,0 μM ; antimicina A 0,1 nmol/mg, DAPP 25 μM ; Mg^{2+} 1,1 mM e ascorbato 1,0 mM. Acetoacetato 0,5 mM (linha sólida) ou isocitrato 0,5 mM (linha tracejada) eram adicionados no ponto indicado. Em seguida a mitochondria era energizada por TMPD 10 μM . A linha pontilhada indica alteração nos eventos estudados após adição de isocitrato 0,5 mM e β -hidroxibutirato 3,0 mM quando acetoacetato estava presente no meio de incubação.

condrial era precedida pela adição de acetoacetato e oxidação de NAD(P), a captação do Ca^{2+} externo era incompleta, isto é, a mitocôndria era incapaz de fazer decrescer a concentração de Ca^{2+} externo aos níveis observados na ausência de acetoacetato (linha sólida). Nestas condições uma liberação parcial de ADP e Mg^{2+} era observada. A redução parcial dos nucleotídeos de piridina observada após adição de TMDP está de acordo com o observado nos experimentos anteriores. A posterior redução adicional de NAD(P) após adição de β -hidroxibutirato mais isocitrato induzia recaptação de parte do Ca^{2+} externo e inibição da liberação de ADP e Mg^{2+} .

As concentrações de Ca^{2+} expressas na figura 6 representam o Ca^{2+} mitocondrial total determinado por absorção atômica nas mesmas amostras colhidas para determinação de Mg^{2+} .

Inibição do efluxo de Ca^{2+} por "Bongkrekato".

KLINGENBERG et alii, 1971 observaram que o transportador de nucleotídeos de adenina mitocondrial cataliza também a liberação não compensada de ADP e ATP com velocidade 100 vezes inferior à do transporte compensado (troca ADP-ATP). Estes autores demonstraram ainda que a liberação não compensada destes nucleotídeos é inibida por "bongkrekato" e ligeiramente estimulada por atractilato, ambos inibidores do transporte compensado.

O experimento da figura 7 mostra o efeito destes inibidores do transportador de nucleotídeos de adenina sobre a liberação de Ca^{2+} e oxidação de nucleotídeos de piridina induzidos por acetoacetato.

As linhas sólidas mostram as velocidades de efluxo de Ca^{2+} insensível a vermelho de rutênio na presença e ausência de acetoacetato quando aqueles inibidores eram omitidos. A liberação de Ca^{2+} ocorria a uma velocidade 7 vezes mais rápida na presença de acetoacetato. Esta liberação era completamente inibida por "bongkrekato" (linha tracejada) e praticamente inalterada por carboxiatractilato (linha pontilhada). Não houve alteração significativa da oxidação dos nucleotídeos de piridina por estes inibidores.

Inibição do transporte de nucleotídeos de adenina por Sr^{2+} .

Trabalhos anteriores deste laboratório demonstraram que Sr^{2+} acumulado na matriz mitocondrial, a exemplo do que ocorre com "bongkrekato" era capaz de inibir a liberação de Ca^{2+} induzida por fosfato ou $NADP^+$ (VERCESI, 1979; COELHO & VERCESI, 1980). Estes resultados nos levaram a investigar um possível efeito de Sr^{2+} sobre o transporte de nucleotídeos de adenina como uma possível explicação para seu mecanismo de inibição sobre o efluxo de Ca^{2+} .

O experimento da figura 8 mostra que a adição de Sr^{2+} (200 nmoles/mg) à preparação de mitocôndria energizada por succinato na presença de fosfato (3mM) causava uma estimulação transitória da respiração e acidificação do meio externo. Em consequência da captação de 400 nmoles Sr^{2+} /mg a preparação mitocondrial se mostrava totalmente incapaz de fosforilar o ADP adicionado. Esta inibição era caracterizada pela ausência de estimulação da respiração e alcalinização do meio externo que acompanha o processo de fosforilação oxidativa (MITCHELL, 1966). A subsequente captação de Sr^{2+} adicionado, com as mesmas características observadas anteriormente indicam ausência de inibição do transporte de elétrons ou desacoplamento mitocondrial pelo Sr^{2+} acumulado. Assim, a ausência de fosforilação de ADP poderia ser explicada pela inibição do transporte de nucleotídeos ao interior da mitocôndria ou por inibição direta da ATP-sintetase.

A titulação da fosforilação oxidativa por carboxiatractilato mostrada na figura 9, indicava que o transporte de ADP pelo transportador específico era a etapa limitante da fosforilação oxidativa quando esta era previamente inibida em 50% pelo Sr^{2+} acumulado.

Usando as condições experimentais da figura 8 observamos que 50% de inibição da fosforilação de ADP ocorria quando a mitocôndria acumulava cerca de 100 nmoles Sr^{2+} /mg. A figura 9 mostra o gráfico de velocidade de fosforilação oxidativa, medida indiretamente pela determinação da velocidade da captação de H^+ , em função da concentração de carboxiatractilato no meio. A curva A, mostra as velocidades de fosforilação para cada concentração de carboxiatractilato na ausência de Sr^{2+} e a curva B, quando mitocôndria havia acumulado 100 nmoles Sr^{2+} /mg. Na ausên-

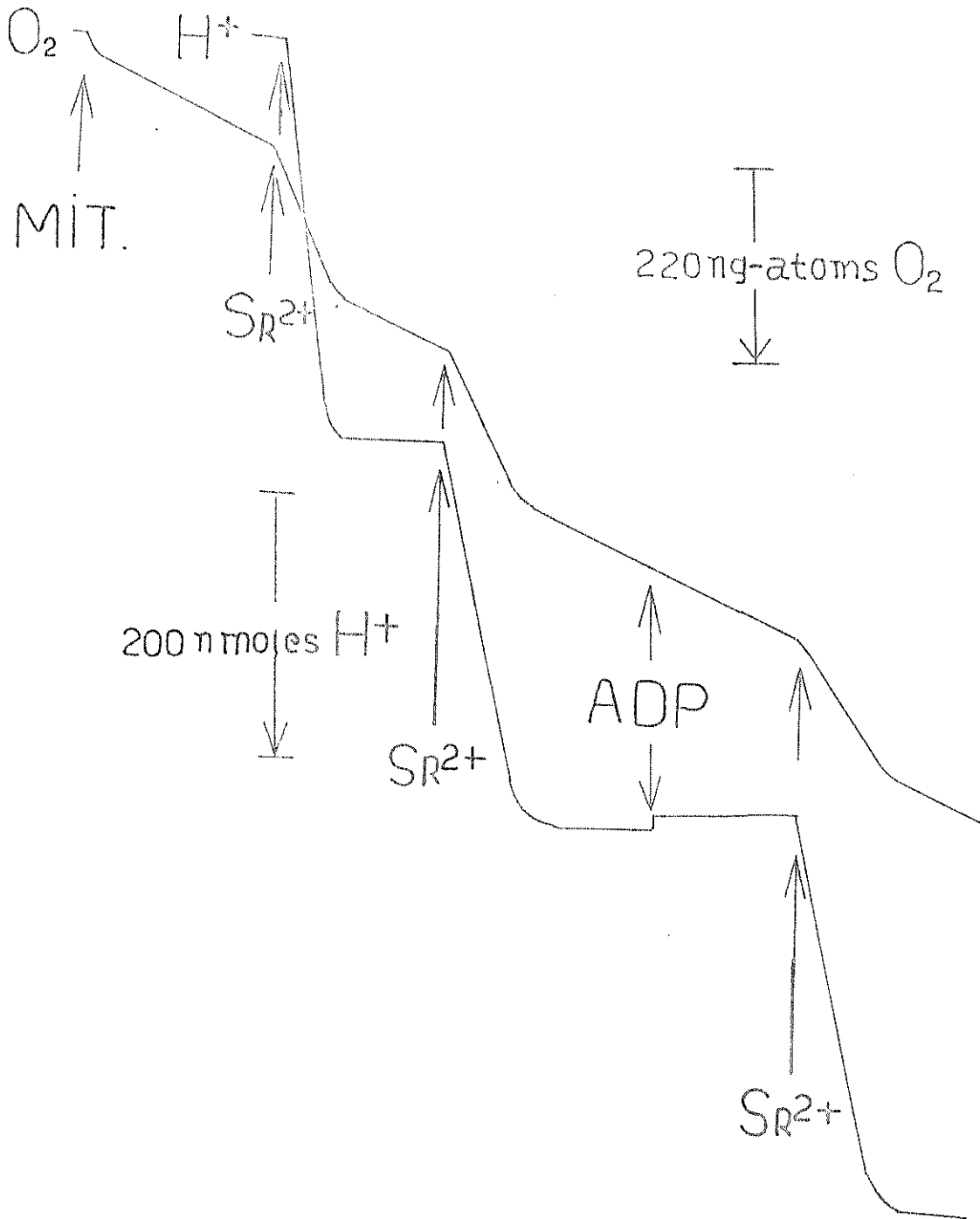


FIGURA 8 - Inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} . Mitocôndria (2,5 mg de proteína) era adicionada em meio (2,5 ml, $30^{\circ}C$) contendo KCl 130 mM; Hepes 3,0 mM, pH 7,1; fosfato 3,0 mM; rotenona 5,0 μM e succinato 1,0 mM . Adições de 200 nmoles de Sr^{2+} e 500 nmoles de ADP eram efetuadas nos pontos indicados. O eletrodo de pH era calibrado pela titulação do meio de reação com HCl padrão após o término do experimento.

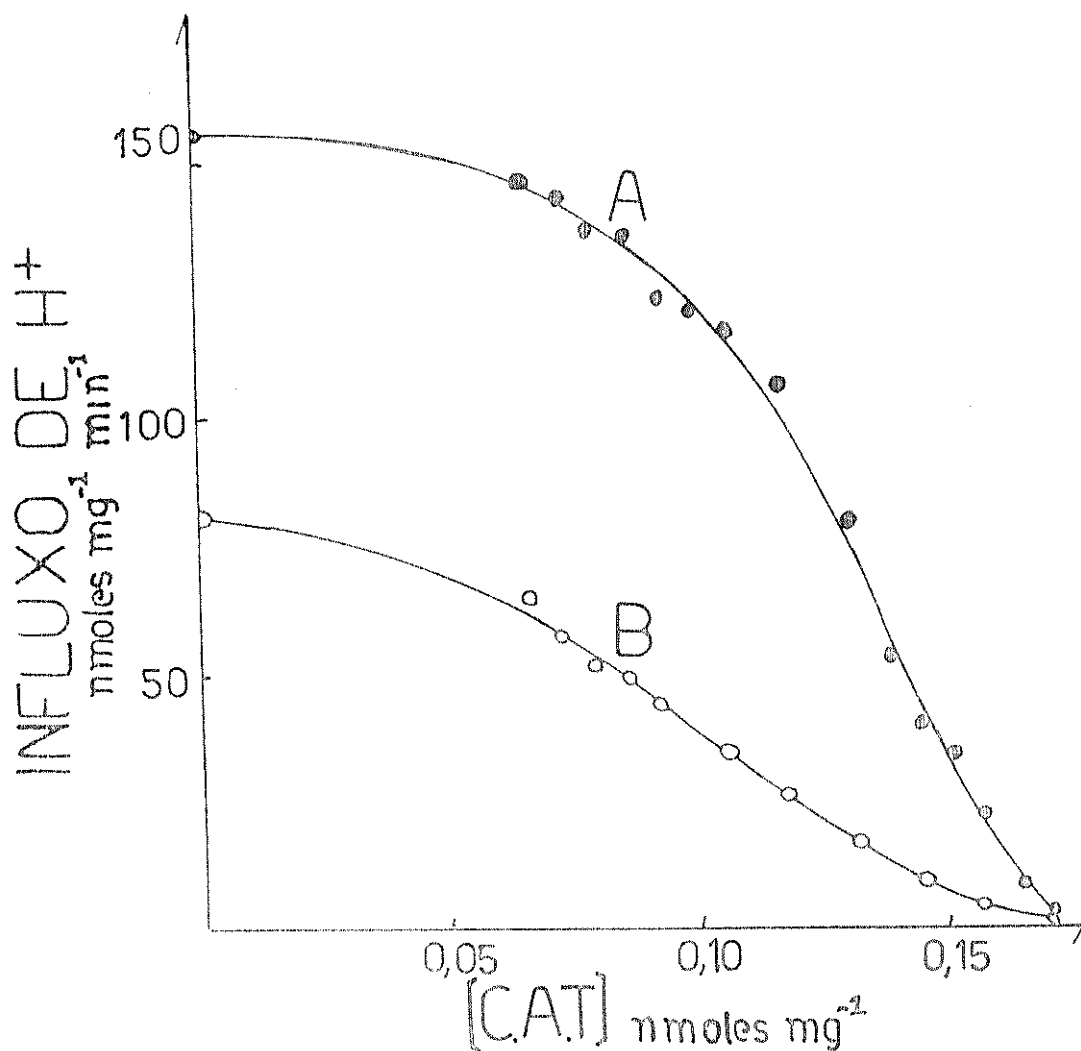


FIGURA 9 - Titulação da fosforilação oxidativa por carboxiatractilato (C.A.T.). As condições experimentais eram idênticas as da figura 8, exceto que diferentes concentrações de carboxiatractilato estavam presentes antes da adição de mitocôndria. A curva B representa as velocidades de fosforilação quando as adições de 500 nmoles de ADP eram precedidas pela captação de 100 nmoles de Sr^{2+} por mg de proteína mitocondrial. Em A o Sr^{2+} era omitido.

cia de carboxiatractilato a velocidade de influxo de H^+ no experimento controle (curva A) era cerca de 160 nmoles H^+ /min/mg contra 80 nmoles H^+ /min/mg depois que mitocôndria havia acumulado 100 nmoles Sr^{2+} /mg (curva B).

A figura 9 mostra ainda que a concentração de carboxiatractilato (0.06 nmol/mg) responsável pela inibição de cerca de 5-10% no transporte de ADP em A era responsável por um incremento similar na inibição induzida por Sr^{2+} em B. O incremento na inibição da fosforilação em B era devido a titulação de uma pequena fração do transportador por carboxiatractilato e indica que o transporte de ADP ao interior da mitocôndria já era a etapa limitante quando a velocidade de fosforilação oxidativa estava inibida por Sr^{2+} . A curva sigmóide observada neste experimento e a concentração de carboxiatractilato necessária para uma inibição de 100% da fosforilação estão de acordo com os valores encontrados na literatura (LEMASTERS & SOWERS, 1979).

Diminuição do título de grupos -SH ligados a proteínas de membrana na mitocôndria por oxaloacetato.

Inúmeros trabalhos tem responsabilizado o estado de óxido-redução de grupos -SH de membrana pela regulação do transporte de íons através das mesmas (MEURY et alii, 1980; JUNG & BRIERLEY, 1981; LEHNINGER et alii, 1981; RUGOLO et alii, 1981). Assim, RUGOLO et alii, 1981 observaram que o efluxo de Ca^{2+} mitocôndria induzido por fosfato era estimulado por diamida e inibido por dithioerythritol, oxidante e redutor de grupos -SH, respectivamente. Um trabalho anterior do mesmo grupo (ZOCARATO et alii, 1981) demonstrou que a liberação de Ca^{2+} mitocôndria induzida por diamida apresenta características semelhantes às observadas nos experimentos deste trabalho (perda de Mg^{2+} e nucleotídeos de adenina internos e inibição por "bongkrekato").

Com base nos resultados mencionados acima julgamos relevante estudar a possível correlação entre o efluxo de Ca^{2+} dependente de $NADP^+$ e o estado redox de grupos -SH de membrana mitocôndria.

A tabela 1 mostra o título de -SH ligado a proteínas de membrana mitocôndria na presença e ausência de oxaloacetato em três condições experimentais diferentes: a) ausência de

T A B E L A I

Efeito de oxaloacetato sobre o título de grupamentos -SH ligados a proteína de membrana mitocondrial. Mitocondria (7,0 mg de proteína) era adicionada em meio (3,0 ml, 30°C) contendo sacarose 250 mM tamponado com Hepes 3,0 mM pH 7,0; rotenona 4,0 µM, antimicina A 0,1 nmol/mg; oligomicina 1,0 µg/mg na presença de oxaloacetato 0,5 mM. Fosfato e Mg^{2+} quando presentes estavam em concentrações igual a 1,0 mM.

C O N D I Ç Õ E S	N MOL -SH MG ⁻¹	
	CONTROLE	O A A
+Pi	54,63 ± 0,67	43,19 ± 1,76
-Pi , -Mg ²⁺	56,85 ± 1,34	43,68 ± 0,67
+Mg ²⁺	61,39 ± 0,67	54,56 ± 1,09

fosfato e Mg^{2+} ; b) presença de fosfato e c) presença de Mg^{2+} . A presença de fosfato, estimulante do efluxo de Ca^{2+} , diminui em cerca de 4% o título de -SH enquanto que Mg^{2+} , inibidor do efluxo de Ca^{2+} , determina aumento de cerca de 9%. Nas três condições estudadas houve diminuição do título de -SH na presença de oxaloacetato. Na ausência de Mg^{2+} a diminuição do título de -SH era da ordem de 20% tanto na presença como na ausência de fosfato, enquanto que na presença de Mg^{2+} o decréscimo era da ordem de 9%.

Alterações da conformação mitocondrial induzidas por oxaloacetato e diamida.

HATASE et alii, 1977 observaram que a diminuição do título de grupos -SH ligados a proteína de membrana está correlacionada com a mudança da conformação mitocondrial para um estado menos condensado. Outros trabalhos relacionam esta alteração conformacional com uma maior permeabilidade da membrana mitocondrial a Ca^{2+} e a outros íons (HUNTER et alii, 1976; HUNTER & HAWORTH, 1979 a,b; HAWORTH & HUNTER, 1979). Estas alterações conformacionais da mitocondria podem ser determinadas em função de mudanças turbidimétricas das misturas de reação (SCHERER & KLINGENBERGER, 1974). A contração mitocondrial aumenta a absorvância enquanto que o aumento de volume mitocondrial decresce a absorvância da suspensão.

As figuras 10 e 11 mostram que suspensões de mitocondria controle desenergizadas não apresentavam alterações de absorvância durante o tempo analisado enquanto que diminuições significativas da absorvância eram induzidas tanto por oxaloacetato como por diamida. No caso de diamida (figura 11) um pequeno aumento transitório de absorvância era observado inicialmente. Em ambos os casos a diminuição de absorvância era inibida por "bongkrekato" e ligeiramente estimulada por carboxiatractilato. ADP exógeno que também inibe a liberação de Ca^{2+} induzida por oxaloacetato e diamida inibia parcialmente a diminuição de absorvância induzida por oxaloacetato e diamida.

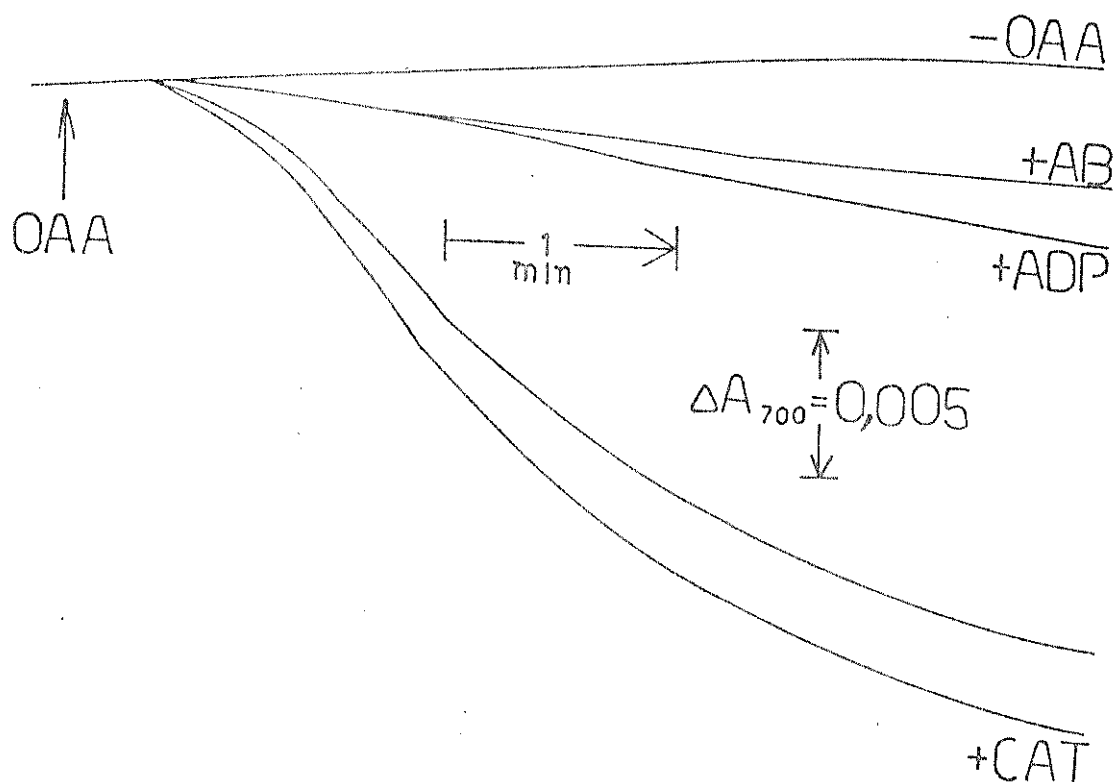


FIGURA 10 - Variação turbidimétrica da suspensão mitocondrial induzida por oxidação de NAD(P). Mitochondria (5,0 mg de proteína) era adicionada em meio (2,5 ml 30°C) contendo sacarose 250 mM; Hepes 3,0 mM, pH 7,1; fosfato 1,0 mM; EGTA 0,4 mM, rotenona 4,0 μ M; antimicina A 0,1 nmol/mg; oligomicina 1,0 μ g/mg na presença ou ausência de oxaloacetato 1,0 mM. As concentrações de "bongkrekato", carboxiatractilato e ADP, quando presentes, eram 10 μ M, 20 μ M e 200 μ M, respectivamente.

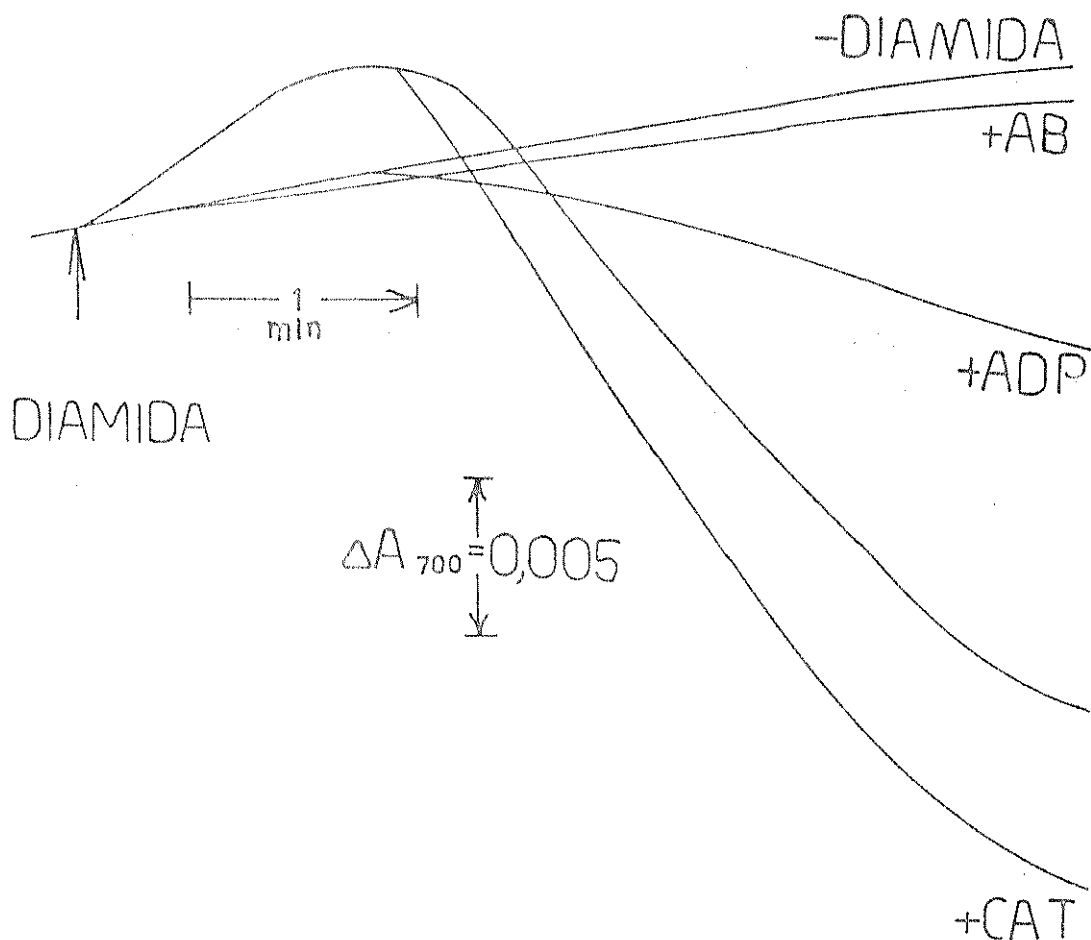


FIGURA 11 - Variação turbidimétrica da suspensão mitocondrial induzida por diamida. As condições experimentais eram idênticas as da figura 10. Diamida 0,3 mM era adicionada para oxidação de grupos -SH.

DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste trabalho bem como em nossos trabalhos anteriores (LEHNINGER et alii, 1978b; COELHO & VERCESI, 1980; VERCESI & LEHNINGER, 1982) demonstram claramente a correlação entre a oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais e a estimulação do efluxo de Ca^{2+} dessa organela. Todavia, alguns aspectos da relação de causa e efeito entre estes dois eventos tem sido discutido na literatura. Por exemplo, segundo a interpretação de BEATRICE et alii, 1980 a liberação de Ca^{2+} induzida por oxaloacetato em mitocôndria energizada por succinato (LEHNINGER et alii, 1978b) seria consequência da inibição da respiração por oxaloacetato ou de um efeito deletério deste diretamente sobre a permeabilidade da membrana de mitocôndria carregada com altas concentrações de Ca^{2+} . O argumento usado para a segunda hipótese era que devido à baixa permeabilidade da membrana mitocondrial intacta a oxaloacetato (HASLAM & KREBS, 1968), este só penetraria na mitocôndria para oxidar os nucleotídeos de piridina após iniciado o efluxo de Ca^{2+} , quando a permeabilidade da membrana já estivesse aumentada. Assim, segundo estes autores, a oxidação dos nucleotídeos de piridina por oxaloacetato exógeno não seria a causa do efluxo de Ca^{2+} mas sim a oxidação de NAD(P) e o efluxo de Ca^{2+} seriam eventos paralelos e a entrada de oxaloacetato na matriz mitocondrial dependeria de um efeito conjunto de oxaloacetato e Ca^{2+} alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial.

Outro ponto de divergência refere-se a qual dos nucleotídeos de piridina estaria diretamente envolvido no mecanismo de liberação de Ca^{2+} mitocondrial (PRPIC & BYGRAVE, 1979; PANFILI et alii, 1979; SANDRI et alii, 1979).

Os resultados da figura 1 mostram que tanto oxaloacetato como acetoacetato oxidam prontamente os nucleotídeos de piridina em condições onde o transporte de Ca^{2+} havia sido abolido pela presença de EGTA. Em mitocôndria energizada a extensão da oxidação era de apenas 50% quando comparada com a oxidação em mitocôndria não energizada. A este respeito, JUNG & BRIERLEY, 1981 determinaram enzimaticamente a oxidação dos nucleotídeos de

piridina por acetoacetato em mitocôndria cardíaca e observaram que apenas NAD era oxidado em mitocôndria energizada por succinato. Após adição de FCCP, no entanto, o NADP era também completamente oxidado. Como em mitocôndria hepática os conteúdos de NAD e NADP são equivalentes (PRPIC & BYGRAVE, 1979), os resultados da figura 1 indicam que a oxidação observada em mitocôndria energizada refere-se apenas a NAD, enquanto que a segunda fase de oxidação após desenergização mitocondrial refere-se a NADP. Esta interpretação apoia-se também no fato da constante de equilíbrio da reação:



que é igual a 1 em mitocôndria não energizada ser deslocada cerca de 500 vezes para a esquerda em mitocôndria energizada (LEE & ERNSTER, 1964). Assim, a enzima NAD(P)-transidrogenase, funcionando como uma bomba de prótons, manteria NADP reduzido em mitocôndria energizada, mesmo quando o NAD estivesse quase totalmente oxidado pela presença de acetoacetato.

A reversão na oxidação de NADP, pela adição de succinato, indica: a) deslocamento da reação catalizada pela NAD(P)-transidrogenase para a esquerda às expensas do gradiente de H^+ gerado pela energização mitocondrial e, b) ausência de desacoplamento mitocondrial induzido por acetoacetato ou oxaloacetato como proposto por BEATRICE et alii, 1980.

A ocorrência da enzima NAD(P)-transidrogenase com as características observadas na figura 1 indicava que para se obter oxidação significativa de NADP em mitocôndria energizada, os oxidantes de NAD não eram suficientes a menos que a atividade desta enzima fosse inibida. Entre os inibidores da enzima estão: rheína, acetil-CoA, palmitil-CoA, 3'-5'-AMP, reagentes de grupos -SH, triiodotironina, Mg^{2+} e Ca^{2+} em altas concentrações (RYDSTROM, 1976). Como estes inibidores apresentam baixa especificidade, não penetram na mitocôndria ou possuem outros efeitos sobre o acoplamento mitocondrial, decidimos utilizar hidroperóxido butírico, oxidante de NADP, em combinação com acetoacetato para garantir uma maior oxidação de NADP em mitocôndria energizada. De fato, o experimento da figura 2 mostra que na presença destes dois oxidantes a energização mitocondrial causava apenas ligeira

redução de NADP. Neste experimento as condições experimentais para se oxidar seletivamente NAD (linha tracejada) ou NAD + NADP (linha pontilhada) foram estabelecidas e assim foi possível estudar qual dos dois nucleotídeos está diretamente envolvido no mecanismo de liberação do Ca^{2+} mitocondrial.

Apesar do grande número de trabalhos demonstrando a natureza da enzima NAD(P)-transidrogenase como uma bomba de prótons, existe muita incerteza sobre este mecanismo uma vez que ambos NAD e NADP apresentam o mesmo potencial de óxido-redução em solução. MOYLE & MITCHELL, 1973 propõem, todavia, a possibilidade de uma diferença de cerca de 250 mV entre os potenciais destes dois nucleotídeos quando estão fortemente ligados à mitocôndria. De qualquer maneira, o experimento da figura 3 mostra que em nossas condições experimentais a reação catalizada pela NAD(P)-transidrogenase quando deslocada no sentido da redução de NAD^+ foi suficiente para energizar a mitocôndria, a exemplo do que ocorre em partículas submitocondriais (DANIELSON & ERNSTER, 1963; LEE & ERNSTER, 1968; RYDSTROM et alii, 1971; MOYLE & MITCHELL, 1973), ou quando a enzima isolada é incorporada a vesículas artificiais (EARLE et alii, 1978). Neste experimento o gradiente prótonico era determinado indiretamente em função de sua capacidade de induzir captação de Ca^{2+} por mitocôndria (MITCHELL, 1966). A liberação do Ca^{2+} acumulado em resposta à adição de FCCP comprova esta interpretação. A baixa velocidade de captação de Ca^{2+} observada neste experimento quando comparada à velocidade de captação de Ca^{2+} em mitocôndria energizada por respiração, por hidrólise de ATP ou pelo potencial de difusão de K^+ , indica o baixo potencial de membrana gerado pela reação e reflete a pequena diferença de potencial de óxido-redução entre NAD e NADP. De fato, resultados não mostrados neste trabalho, usando-se condições experimentais semelhantes às do experimento 3, demonstraram que o gradiente de prótons gerado por esta reação não era suficiente para induzir fosforilação de ADP. Estes resultados contrariam a proposta de MITCHELL & MOYLE, 1973 de que a reação catalizada pela NAD(P)-transidrogenase constituiria um quarto sítio de fosforilação oxidativa, por eles denominado "sítio zero".

A concentração limitante de TMPD usada como substrato respiratório no experimento da figura 5 não era suficiente para gerar um potencial de membrana que deslocasse o equilíbrio

da reação catalizada pela NAD(P)-transidrogenase a ponto de manter NADP totalmente reduzido na presença de acetoacetato (VERCESI & LEHNINGER, 1982). Como a concentração de Ca^{2+} extra-mitochondrial em condições de equilíbrio dinâmico é presumidamente uma função da razão entre as velocidades de influxo e efluxo através de duas vias independentes, acreditamos que a menor capacidade da mitocôndria em baixar os níveis de Ca^{2+} externo nos experimentos das figuras 4 e 5 era o resultado do estímulo na velocidade de efluxo. Esta inferência é baseada no fato das velocidades iniciais de influxo não serem afetadas pelo estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina como pode ser observado na figura 4. Porém, à medida que a concentração de Ca^{2+} aumentava no interior da mitocôndria, a velocidade de acúmulo líquido do íon diminuía progressivamente com o tempo e com a maior extensão de oxidação dos nucleotídeos de piridina, até o momento em que a velocidade de liberação passava a superar a velocidade de captação e as concentrações de Ca^{2+} externo voltavam a aumentar. O equilíbrio dinâmico entre a distribuição de Ca^{2+} interno e externo não era atingido no experimento da figura 4 (linhas 4-7), provavelmente, devido à diminuição progressiva do potencial de membrana dissipado pelo movimento cíclico de Ca^{2+} . A concentração limitante de TMPD utilizada neste experimento não permitia aumento na velocidade de respiração para compensar a queda do potencial elétrico induzido pela recaptação do Ca^{2+} liberado.

Apesar de demonstrar a correlação existente entre a capacidade de tamponamento de Ca^{2+} e o estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina mitocondriais, a figura 4 não indica qual dos nucleotídeos está diretamente envolvido no mecanismo, uma vez que nas condições experimentais utilizadas havia oxidação tanto de NAD como de NADP (VERCESI & LEHNINGER, 1982). A este respeito a figura 5 mostra que nas condições em que havia oxidação seletiva de NAD após energização mitocondrial (linha tracejada), as características do tamponamento de Ca^{2+} externo pela mitocôndria eram idênticas ao experimento controle (linha pontilhada). O envolvimento direto de NADP fica claramente demonstrado pela linha sólida onde o referido nucleotídeo era mantido oxidado mesmo após energização mitocondrial e a concentração de Ca^{2+} externo não baixava aos níveis das linhas pontilhadas e tracejadas. Nestas condições a mitocôndria apresentava habilidade

de manter um equilíbrio dinâmico na distribuição entre o Ca^{2+} mitocondrial e o Ca^{2+} externo. O aumento na diferença das concentrações de Ca^{2+} externo após nova adição do íon, entre as linhas pontilhada e sólida, reflete certamente um aumento na velocidade de efluxo, quando NADP estava oxidado, devido ao aumento na concentração de Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial. Estes resultados corroboram nossas observações anteriores (VERCESI & LEHNINGER, 1982) com mitocôndria não energizada ou energizada por baixas concentrações de TMPD indicando que a oxidação de NADP era necessária para que o efluxo de Ca^{2+} fosse estimulado. Eles estão ainda de acordo com os resultados de PRPIC & BYGRAVE, 1979 e SIES et alii, 1981, que usando diferentes abordagens inferem que o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial e mesmo celular seria estimulado diretamente por NADP^+ . A participação de NAD^+ como proposto por SANDRI et alii, 1979 e PANFILI et alii, 1979 não fica excluída, uma vez que em nossos experimentos o NAD encontrava-se também sempre oxidado nas condições em que o efluxo de Ca^{2+} era estimulado por NADP^+ .

O experimento da figura 6 mostra que o efluxo de Ca^{2+} induzido por NADP^+ , como no caso do efluxo induzido por diamida (ZOCARATO et alii, 1981), está associado com a liberação de nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} endógenos. Segundo a interpretação de NICHOLLS & SCOTT, 1980, a liberação de Ca^{2+} nestas condições seria o resultado de alterações inespecíficas da permeabilidade da membrana com dissipação do potencial elétrico da mesma. De acordo com estes autores a presença de ATP em concentrações semelhantes às encontradas na célula previne tais alterações e o efluxo de Ca^{2+} não ocorre. Esta interpretação é contestada por RUGOLO et alii, 1981 que mediram o potencial de membrana durante o efluxo de Ca^{2+} associado ao efluxo de nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} . Estes autores previniam a recaptação do Ca^{2+} liberado e assim o movimento cíclico do mesmo por vermelho de rutênio. VERCESI & LEHNINGER, 1982 usando abordagem semelhante demonstraram que durante efluxo de Ca^{2+} induzido por NADP^+ na presença de vermelho de rutênio, a mitocôndria mantinha controle respiratório aproximadamente 7, o que indica ausência de alterações irreversíveis da preparação. O experimento foi realizado com mitocôndria suspensa em meio de incubação contendo ADP e Mg^{2+} (estabilizantes da membrana mitocondrial) na presença de baixa concen-

tração de fosfato (0.3mM). De fato, a figura 6 indica que após adição de isocitrato + β - hidroxibutirato havia redução quase completa de NAD(P) mitocondrial com reconstituição da capacidade de tamponamento do Ca^{2+} externo, o que indica que durante o período de tempo de estimulação do efluxo de Ca^{2+} não houve perda significativa de NADP além de demonstrar a reversibilidade da alteração do transporte de Ca^{2+} induzido por NADP^+ .

O fato de não haver perda significativa de nucleotídeos de piridina durante o efluxo de Ca^{2+} indica que a perda de nucleotídeos de adenina, análogos estruturais dos primeiros e que ocorrem na matriz em concentrações similares a eles, seja mediado por transportador. De fato, MEISNER & KLINGENBERG, 1968 observaram que o efluxo não compensado de nucleotídeos de adenina induzido por fosfato na presença de um cátion (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) era mediado pelo transportador específico, porém, que após a liberação de 80% destes nucleotídeos havia perda de especificidade e a mitocôndria passava a perder outros componentes que não possuem transportador específico tal como NAD e NADP, por exemplo. Em seguida KLINGENBERG et alii, 1971 observaram que a liberação não compensada de nucleotídeos de adenina era inibida por "bongkrekato" e não era afetada ou era mesmo ligeiramente estimulada por atracatilato. Estes resultados indicam que o efluxo de Ca^{2+} induzido por NADP^+ de alguma maneira poderia estar acoplado ao efluxo não compensado de ADP e ATP através do transportador específico, uma vez que é também inibido por "bongkrekato" e ligeiramente estimulado por carboxiatractilato. É importante lembrar aqui que tem sido também documentado acúmulo de nucleotídeos de adenina associados a captação de Ca^{2+} ou Mg^{2+} por mecanismo totalmente ignorado (CARAFOLI, et alii, 1965; ASIMAKIS & APRILLE, 1980).

Uma outra propriedade destes inibidores do transportador de nucleotídeos de adenina que poderia explicar seus efeitos sobre a liberação de Ca^{2+} mitocondrial é a de causar alterações conformacionais da organela. "Bongkrekato" que penetra na matriz mitocondrial e liga-se à molécula do transportador na face interna da membrana, causa contração (KLINGENBERG et alii, 1971). Atractilato não penetra através da membrana e se liga à face externa do transportador e ao contrário de "bongkrekato" induz aumento do volume mitocondrial (KLINGENBERG et alii, 1971). Estas variações de pequena amplitude do volume mitocondrial são

independentes de alterações osmóticas da matriz e são induzidas por pequenas alterações estruturais da mitocôndria dependentes de mudanças conformacionais do transportador de nucleotídeos de adenina após ligação com um dos referidos inibidores (KLINGENBERG et alii, 1971; KLINGENBERG & BUCHHOLZ, 1973; SCHERER & KLINGENBERG 1974; BUCHANAN et alii, 1976).

Assim, a liberação de Ca^{2+} induzida por NADP^+ bem como por diamida poderia estar relacionada com o aumento de volume mitocondrial de pequena amplitude observado nas figuras 10 e 11. Estas alterações estruturais da membrana mitocondrial acarretando aumento do volume mitocondrial e associadas à diminuição de nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} ligados à membrana poderiam abrir canais latentes para o efluxo de Ca^{2+} (HARRIS et alii, 1979; JUNG & BRIERLEY, 1981).

Vários trabalhos tem atribuído o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial ao Ca^{2+} , como devido à alteração da conformação mitocondrial para uma configuração menos condensada (HUNTER et alii, 1976; HUNTER & HAWORTH, 1979 a,b; HAWORTH & HUNTER, 1979). De fato, atractilato "per se" tem sido referido como estimulante do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial (ASIMAKIS & SORDAHL, 1977), provavelmente, devido a seu efeito em diminuir o conteúdo de nucleotídeos de adenina ligados a membrana (KLINGENBERG & BUCHHOLZ, 1973) e aumentar o volume mitocondrial. Assim, tanto a estimulação do efluxo de Ca^{2+} por NADP^+ como sua inibição por "bongkrekato" observados na figura 7 seriam explicadas pelos experimentos mostrados na figura 10. A mesma interpretação é válida para o caso de diamida (figura 11).

A titulação da fosforilação oxidativa por carboxi-atractilato na presença de Sr^{2+} (figura 8) indica que a inibição do efluxo de Ca^{2+} por este cátion (VERCESI, 1979) é também secundária a seu efeito sobre o transportador de nucleotídeos de adenina. O Sr^{2+} é captado por mecanismo idêntico ao do Ca^{2+} porém, não é liberado nas mesmas condições que o último (COELHO & VERCESI, 1980). Além disso, as alterações mitocondriais (inchamento e desacoplamento) induzidas pelo acúmulo de altas concentrações de Ca^{2+} na presença de fosfato não ocorrem com Sr^{2+} (COELHO & VERCESI, 1980).

Outra semelhança entre as ações de Sr^{2+} e "bongkrekato" é que o acúmulo de altas concentrações do íon induz con

tração mitocondrial (COELHO & VERCESI, 1980). Assim como no caso de "bonkrekato" resta saber se a inibição da liberação de Ca^{2+} é secundária à retenção dos nucleotídeos de adenina no interior da mitocôndria devido à inibição do transportador específico ou devido à ação destes inibidores sobre a conformação da membrana.

É possível que os dois fatores estejam associados com o efluxo de Ca^{2+} da seguinte maneira: a mudança conformacional induzida por NADP^+ (ou diamida) induziria uma alteração no mecanismo de operação do transportador de nucleotídeos de adenina que passaria a catalizar a liberação não compensada de ADP e Mg^{2+} (ZOCARATO et alii, 1981). Assim, a liberação de Ca^{2+} poderia ser secundária à diminuição dos conteúdos destes ligados a membrana como proposto por HARRIS et alii, 1979 ou a uma diminuição dos mesmos na matriz mitocondrial com desestabilização dos precipitados de Ca^{2+} .

Tanto o aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} como as alterações conformacionais tem sido correlacionados com a variação no título de grupamentos -SH da membrana mitocondrial (HATA SE et alii, 1977; HARRIS et alii, 1979; RUGOLO et alii, 1982). A diminuição no título de -SH observada em nossas condições (tabela 1) está de acordo com aqueles resultados e poderia refletir o equilíbrio redox entre NADP e os referidos grupos -SH de membrana. A semelhança nas características da liberação de Ca^{2+} induzida por diamida (oxidante de -SH) e NADP^+ , indica o envolvimento de grupos -SH no mecanismo de liberação de Ca^{2+} por NADP^+ .

Segundo HARRIS et alii, 1979 a permeabilidade da membrana mitocondrial ao Ca^{2+} seria controlada pela ligação de ADP e Mg^{2+} a mesma. Ainda segundo estes autores a ligação destes à membrana dependeria da manutenção de certos grupos -SH no estado reduzido. A manutenção destes grupos -SH no estado reduzido envolveria energia para a transferência de equivalentes de redução a partir de NADH ao NADP através da enzima NAD(P)-transidrogenase. Uma alta razão -SH/S-S poderia desta maneira ser mantida pela enzima glutationala redutase usando NADPH como redutor. "Bonkrekato" ou atracilato, que aumenta ou diminui, respectivamente, o conteúdo de nucleotídeos de adenina ligados a membrana mitocondrial (KLINGENBERG & BUCHHOLZ, 1973) poderiam ter seus efeitos sobre o transporte de Ca^{2+} explicados por um mecanismo similar ao de grupos -SH. Assim, o estado de óxido-redução de certos grupos

-SH da membrana mitocondrial e o efluxo de Ca^{2+} poderiam ser modulados quimicamente por oxidantes (diamida) ou redutores (dithioerythritol), (RUGOLO et alii, 1982), ou fisiologicamente pelo estado de óxido-redução de NADP.

O estado de óxido-redução de NADP mitocondrial por sua vez poderia ser modulado das seguintes maneiras: a) pelo estado de óxido-redução de NADH; b) pela atividade da enzima NAD(P)-transidrogenase e c) pela velocidade de produção de hidroperóxidos pelo metabolismo mitocondrial (BOVERIS et alii, 1972) que são reduzidos através das enzimas glutathione reductase/glutathione peroxidase usando poder redutor proveniente de NADPH.

Com base nas figuras 1 e 2 é evidente que a atividade da enzima NAD(P)-transidrogenase seria o fator mais importante em mitocondria energizada. Assim, a manutenção de NADP no estado oxidado envolveria a oxidação direta do mesmo ou de NAD, mais a inibição da enzima NAD(P)-transidrogenase. De fato, vários inibidores desta enzima (AMP cíclico, palmitil-CoA, reagentes de grupos SH, metais pesados, etc.) são também conhecidos como indutores de efluxo de Ca^{2+} mitocondrial.

A identidade entre as alterações conformacionais ilustradas pela diminuição na turbidimetria da suspensão mitocondrial induzidas por diamida e oxidação de NAD(P) bem como a sensibilidade de ambos aos agentes que modificam o efluxo de Ca^{2+} de correntes de tais alterações comprovam o envolvimento de grupos -SH no mecanismo de liberação de Ca^{2+} induzido por NADP^+ . A este respeito JUNG & BRIERLEY, 1981 descreveram condições experimentais nas quais as alterações no sistema de transporte de Ca^{2+} induzidas por NADP^+ abrem também canais latentes para K^+ . Segundo estes autores as condições que resultam em oxidação de NADP, por eles descritas, são similares às condições que abrem canais de K^+ por reagentes de grupos -SH em membrana de *Escherichia coli* (MEURY et alii, 1980). Outros reagentes que oxidam NAD(P) ou glutathione ou decrescem os níveis de ATP em células β de ilhotas de pâncreas induzem aumento de permeabilidade a K^+ e Ca^{2+} (HENQUIN, 1980; MALAISSE et alii, 1978). Ainda, segundo JUNG & BRIERLEY, 1981, o mecanismo de captação e liberação de Ca^{2+} por mitocondria tem muitas propriedades comuns ao correspondente sistema de transporte de K^+ nesta organela. Assim, as alterações no sistema de transporte de Ca^{2+} induzidas por NADP^+ poderiam ser tam-

bem responsáveis pela liberação de K^+ descrita por JUNG & BRIERLEY, 1981 e que também acompanha a liberação de Ca^{2+} induzida por diamida (SILIPRANDI et alii, 1978).

O envolvimento de grupamentos tióis no fluxo de Ca^{2+} em outras membranas que não a mitocondrial, como discutido acima indica a existência de similaridade entre transporte de Ca^{2+} através destas membranas e a membrana mitocondrial, pelo menos no que se refere à via responsável pelo efluxo em mitocôndria. Este aspecto é ilustrado de maneira precisa pelo trabalho de SIES et alii, 1981 onde a oxidação de NADP citoplasmático induz liberação reversível de Ca^{2+} de células hepáticas em fígado intacto perfundido. Estes resultados indicam a existência de semelhança não apenas no mecanismo molecular de transporte bem como de regulação do mesmo.

Com base nos resultados discutidos acima propomos a seguinte sequência de eventos para o efluxo de Ca^{2+} induzido por $NADP^+$: a oxidação de NADP reflete em oxidação de determinados grupos tióis da membrana mitocondrial em equilíbrio de óxido-redução com os primeiros através das enzimas glutathione redutase e glutathione peroxidase. A oxidação destes grupamentos -SH de alguma maneira estaria associada à abertura de canais latentes para Ca^{2+} num mecanismo que envolveria a diminuição de nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} ligados à membrana e transição conformacional da mitocôndria.

Os resultados deste trabalho e de nossos trabalhos anteriores indicam que este processo é reversível e independente de queda do potencial elétrico de membrana. Todavia é prematuro afirmar sobre a especificidade para Ca^{2+} e a participação de tal mecanismo na regulação da omeostase de Ca^{2+} celular em condições "in situ".

SUMÁRIO

O efluxo de Ca^{2+} mitocondrial é estimulado pelo estado oxidado de NADP mitocondrial. Em mitocôndria não energizada uma completa oxidação de NAD e NADP pode ser induzida por oxaloacetato ou acetoacetato enquanto que em mitocôndria energizada estes substratos oxidam exclusivamente NAD. Esta diferença deve-se ao efeito do potencial protônico de membrana gerado pela respiração ou hidrólise de ATP sobre a constante de equilíbrio da reação catalizada pela enzima NAD(P)-transidrogenase. No último caso o efluxo de Ca^{2+} não é estimulado pelos referidos oxidantes. O efluxo de Ca^{2+} mitocondrial induzido por NADP^+ é necessariamente associado ao efluxo de Mg^{2+} e nucleotídeos de adenina endógenos mediado pelo transportador específico uma vez que "bongkrekato", inibidor específico deste transportador, inibe tanto o efluxo de nucleotídeos de adenina como de Ca^{2+} . A diminuição no título de grupamentos -SH de membrana mitocondrial que acompanha a oxidação de NADP, bem como a similaridade entre as características do efluxo de Ca^{2+} induzida por NADP^+ e diamida (oxidante de grupos -SH) indicam o envolvimento destes no mecanismo. Ambos, oxidação de NADP e diamida induzem aumento de pequena amplitude no volume mitocondrial que também é sensível a "bongkrekato".

Estes resultados indicam que o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial induzido por NADP^+ está associado a alterações conformacionais da mitocôndria resultantes da oxidação de grupamentos -SH da membrana em equilíbrio de óxido-redução com NADP através do sistema enzimático glutathione reductase/glutathione peroxidase.

SUMMARY

Mitochondrial Ca^{2+} -efflux is stimulated by the oxidized state of mitochondrial NADP. In deenergized mitochondria either oxaloacetate or acetoacetate can induce a full oxidation of both NAD and NADP whereas in energized mitochondria these substrates oxidize NAD only. This difference is due to the effect of the membrane pH gradient generated by respiration or ATP hydrolysis on the energy-linked NAD(P)-transhydrogenase reaction. When mitochondria are energized Ca^{2+} efflux is not stimulated by oxaloacetate or acetoacetate. The mitochondrial Ca^{2+} efflux induced by NADP^+ is associated to the efflux of Mg^{2+} and adenine nucleotides through the adenine nucleotides translocase since the specific inhibition of this enzyme by bongkrekate blocks both adenine nucleotides and Ca^{2+} efflux. The decrease in the titer of membrane bound -SH groups following NADP oxidation as well as the similarity between the characteristics of Ca^{2+} efflux induced by NADP^+ and diamide (-SH oxidant) indicates the participation of thiol groups in this mechanism. Both, NADP oxidation and diamide induce bongkrekate-sensitive low amplitude mitochondrial swelling.

These results indicate that the NADP^+ -induced Ca^{2+} efflux from mitochondria is correlated to mitochondrial configuration transition induced by the oxidation of membrane bound -SH groups in redox equilibrium with mitochondrial NADP through the reactions catalyzed by the enzymes glutathione reductase and glutathione peroxidase.

^
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFOLTER, H. & CARAFOLI, E. The Ca^{2+} - Na^{+} antiporter of heart mitochondria operates ellectroneutrally. Biochem.biophys. Res. Commun., 95:193-6, 1980.
- AFFOLTER, H. & CARAFOLI, E. Hiperbolic kinetics of the electrophoretic carrier of Ca^{2+} uptake in liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 119:199-201, 1981.
- AKERMAN, K. E. O. Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. Biochim. biophys. Acta, 502: 359-66, 1978a.
- AKERMAN, K. E. O. Effect of pH and Ca^{2+} on the retention of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. Archs.Biochem. Biophys., 189: 256-62, 1978b.
- AKERMAN, K. E. O. & NICHOLLS, D. G. Calcium transport by intact synaptosomes. Eur. J. Biochem., 115: 67-73, 1981a.
- AKERMAN, K. E. O. & NICHOLLS, D. G. Ca^{2+} transport by intact synaptosomes: the voltage-dependent Ca^{2+} channel and a re-evaluation of the role of sodium calcium exchange. Eur. J. Biochem., 117: 491-7, 1981b.
- AL-SHAIKHLY, M. H. & BAUM, H. Associated effluxes of calcium and adenine nucleotides from mitochondria: mediation by thyroxine and other agents, and inhibition by bongkrekic acid and adenosine diphosphate. Biochem. Soc.trans., 7: 215-6,1979.
- ARSHAD, J. H. & HOLDSWORTH, E. S. Calcium uptake and release by rat liver mitochondria in the presence of rat liver cytosol or the components of cytosol. J.Membr. biol., 57: 195-205,1980.
- ASIMAKIS, G. K. & SORDAHL, L. A. Effects of atractyloside and palmitoil coenzyme A on calcium transport in cardiac mitochondria. Archs.Biochem. Biophys, 179: 200-10, 1977.
- ASIMAKIS, G. K. & APRILLE, J. R. Net uptake of adenine nucleotides in isolated rat liver mitochondria. Febs lett., 117: 157-60, 1980.

- BAKER, P. F. & HONEJAGER, P. Influence of carbon dioxide on the level of ionised calcium in squid axons. Nature, Lond., 273: 160-1, 1978.
- BARDSLEY, M. E. & BRAND, M. D. Oxaloacetate and acetoacetate-induced calcium efflux from mitochondria occurs by reversal of the uptake pathway. Biochem.J., 202: 197-201, 1982.
- BATRA, S. The role mitochondrial calcium uptake in contraction and relaxation of the human myometrium. Biochim. biophys. Acta, 305: 428-32, 1973.
- BEATRICE, M. C.; PALMER, J. W. & PFEIFFER, D. R. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca^{2+} by mitochondria. J. biol. Chem., 255: 8663-71, 1980.
- BEKER, G. L.; CHEN, C. H.; GREENAWALT, J. W. & LEHNINGER, A. L. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. J. Cell. Biol., 61: 316-26, 1974.
- BECKER, G. L.; FISKUM, G. & LEHNINGER, A. L. Regulation of free Ca^{2+} by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. J. biol. Chem., 255: 9009-12, 1980.
- BINET, A. & VOLFIN, P. Effect of the A_{23187} ionophore on mitochondrial membrane Mg^{2+} and Ca^{2+} . Febs Lett., 49: 400-3, 1975.
- BLAUSTEIN, M. P.; RATZLAFF, R. W. & KENDRICK, N. K. The regulation of intracellular calcium in presynaptic nerve terminals. Ann. N. Y. Acad. Sci., 307: 195-211, 1978.
- BOGUCA, K. & WOJTZAK, L. Intramitochondrial distribution of Mg^{2+} . Biochem. biophys. Res. Commun., 44: 1330-6, 1971.
- BOVERIS, A.; OSHINO, N. & CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem. J., 128: 617-30, 1972.
- BRAGADIN, M.; POZZAN, T. & AZZONE, G. F. Kinetics of Ca^{2+} carrier in rat liver mitochondria. Biochemistry, 18: 5972-8, 1979.
- BRAND, M. D.; REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L. Re-evaluation of the H^+ /site ratio of mitochondrial electron transport with oxygen pulse technique. J. biol. Chem., 251: 5670-9, 1976.

- BRIERLEY, G. P.; MURER, E.; BACHMAN, E. & GREEN, D. F. Studies on ion transport. II The accumulation of inorganic phosphate and Mg^{2+} by heart mitochondria. J. biol. Chem., 238:3482-9, 1963.
- BRINLEY, F. J.; TIFFERT, J. T.; SCARPA, A. & MULLINS, L. J. Intracellular calcium buffering capacity in isolated squid axons. J. gen. Physiol., 70: 355-84, 1977a.
- BRINLEY, F. J.; TIFFERT, J. T.; MULLINS, L. J. & SCARPA, A. Kinetic measurement of Ca^{2+} transport by mitochondria in situ. Febs lett., 82: 197-200, 1977b.
- BRINLEY, F. J.; TIFFERT, T. & SCARPA, A. Kinetics of calcium accumulation by mitochondria, studied in situ, in squid giant axons. Febs lett., 91: 25-9, 1978a.
- BRINLEY, F. J.; TIFFERT, T. & SCARPA, A. Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied "in vitro". J. gen. Physiol., 72: 101-27, 1978b.
- BUCHANAN, B. B.; EIERMANN, W. RICCIO, P.; AQUILA, H. & KLINGENBERG, M. Antibody evidence for different conformational states of ADP, ATP translocator protein isolated from mitochondria. Proc. natn. Acad. sci. U.S.A., 73: 2280-4, 1976.
- BYGRAVE, F. L. Mitochondrial calcium transport. Curr. top. Bioenerg., 6: 259-318, 1977.
- CARAFOLI, E.; ROSSI, C. S. & LEHNINGER, A. L. Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria during active accumulation of Ca^{2+} and phosphate. J. biol. Chem., 240: 2254-61, 1965.
- CARAFOLI, E.; TIOZZO, R.; LUGLI, G.; CROVETTI, F. & KRATZING, C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J.molec.cell.Cardiol., 6: 361-71, 1974.
- CARAFOLI, E. & CROMPTON, M. The regulation of intracellular calcium. Curr. top. Mem. transp., 10: 151-216, 1978.
- CASWELL, A. H. The migration of divalent cations in mitochondria visualized by a fluorescent chelate probe. J.Membr.biol., 7: 345-64, 1972.

- CHANCE, B. Proc. Inter. Congr. Biochem., 3., 1955. Apud SARIS, N. E. & AKERMAN, K. E. O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Curr. top. Bioenerg., 10:103-71, 1980.
- CHANCE, B. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. J. biol. Chem., 240: 2729-48, 1965.
- CHAPPELL, J. B. & HAARNOFF, K. N. The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations. In: SLATER, E. C. et alii, ed. Colloquium on Meeting of the Federation of European Biochemical Societies on the biochemistry of mitochondria, 3., Warsaw, 1966. London, Academic, 1967. p-75-91
- CHEN, C. H. & LEHNINGER, A. L. Ca^{2+} transport activity in mitochondria from some plant tissue. Archs. Biochem. Biophys., 157: 183-96, 1973.
- CHUDAPONGSE, P. & HAUGAARD, N. The effect of phosphoenolpyruvate on calcium transport by mitochondria. Biochim. biophys. Acta, 307: 599-606, 1973.
- COELHO, J. L. C. & VERCESI, A. E. Retention of Ca^{2+} by rat heart mitochondria. I.R.C.S. med. Sci., 7: 407, 1979.
- COELHO, J. L. C. & VERCESI, A. E. Retention of Ca^{2+} by rat liver and rat heart mitochondria: effect of phosphate, Mg^{2+} , and NAD(P) redox state. Archs. Biochem. Biophys., 204:141-7, 1980.
- COTY, W. A. & PEDERSEN, P. L. Phosphate transport in rat liver mitochondria; kinetics, inhibitor sensitivity, energy requirements and labelled components. Mol. cell. Biochem., 9: 109-24, 1975.
- CROMPTON, M.; CAPANO, M. & CARAFOLI, E. Respiration-dependent efflux of Mg^{2+} from heart mitochondria. Biochem. J., 154: 735-42, 1976a.
- CROMPTON, M.; SIGEL, E.; SALZMANN, M. & CARAFOLI, E. A kinetic study of the energy linked influx of Ca^{2+} into heart mitochondria. Eur. J. Biochem., 69: 429-36, 1976b.
- CROMPTON, M.; CAPANO, M. & CARAFOLI, E. The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria; a possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J. Biochem., 69: 453-62, 1976c.

- CROMPTON, M.; HEDIGER, M. & CARAFOLI, E. The effect of inorganic phosphate on calcium influx into rat heart mitochondria. Biochem. biophys. Res. Commun., 80: 540-6, 1978a
- CROMPTON, M.; MOSER, R.; LUDI, H. & CARAFOLI, E. The interrelation between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. Eur. J. Biochem., 82: 25-31, 1978b
- DANIELSON, L. & ERNSTER, L. Demonstration of a mitochondrial energy-dependent pyridine nucleotide transhydrogenase reaction. Biochem. biophys. Res. Commun., 10: 91-6, 1963.
- DAWSON, A. P.; SELWYN, M. J. & FULTON, D. V. Inhibition of Ca^{2+} efflux from mitochondria by nupercaine and tetracaine. Nature, Lond., 277: 484-6, 1979.
- DAWSON, A. P. & FULTON, D. The action of nupercaine on calcium efflux from rat liver mitochondria. Biochem. J., 188: 749-55, 1980.
- DE MEIS, L. & VIANNA, A. L. Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. A. Rev. Biochem., 48: 275-92, 1979.
- DENTON, R. M.; McCORMACK, J. G. & EDGELL, N. J. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism: effects of Na^+ , Mg^{2+} and ruthenium red on the Ca^{2+} stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. Biochem. J., 190: 107-17, 1980.
- DRAHOTA, Z.; CARAFOLI, E.; ROSSI, C. S.; GAMBLE, R. L. & LEHNINGER, A. L. The steady state maintenance of accumulated Ca^{2+} in rat liver mitochondria. J. biol. Chem., 240: 2712-20, 1965.
- DUSZYNSKI, J. & WOJTCZAK, L. Effect of Mg^{2+} depletion of mitochondria on their permeability to K^+ ; the mechanism by which ionophore A_{23187} increases K^+ permeability. Biochem. biophys. Res. Commun., 74: 417-24, 1977.
- EARLE, S. R.; ANDERSON, W. M. & FISHER, R. R. Evidence that reconstituted bovine heart mitochondrial transhydrogenase functions as a proton pump. Febs lett., 91: 21-4, 1978.
- ELDER, J. A. & LEHNINGER, A. L. Respiration dependent transport of carbon dioxide into rat liver mitochondria. Biochemistry, 12: 976-82, 1973.

- FISKUM, G. & LEHNINGER, A. L. Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ antiport. J. Biol. Chem., 254: 6236-9, 1979.
- FISKUM, G.; REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L. The electric charge stoichiometry of respiration dependent Ca^{2+} uptake by mitochondria. J. Biol. Chem., 254: 6288-95, 1979.
- FLAGG-NEWTON, J. & LOLWENSTEIN, W. R. Experimental depression of junctional membranes permeability in mammals cell culture. A study with tracer molecules in the 300 to 800 dalton range. J. Membr. Biol., 50: 65-100, 1979.
- GOMEZ-PUYOU, A.; GOMEZ-PUYOU, T.; BECKER, G. & LEHNINGER, A. L. An isoluble Ca^{2+} binding factor from rat liver mitochondria. Biochem. biophys. Res. Commun., 77: 1203-9, 1972
- HANSFORD, R. G. Effect of micromolar concentrations of free Ca^{2+} ions on pyruvate dehydrogenase interconversion in intact rat heart mitochondria. Biochem. J., 194: 721-732, 1981.
- HAPPEL, R. D. & KRALL, A. R. Partial reconstitution of calcium binding glycoprotein in rat liver mitochondria. Biochem. Soc. Trans., 7: 1311-2, 1979.
- HARRIS, E. J.; AL-SHAIKHALY, M. & BAUM, H. Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol-specific reagents and by thyroxine. The relationship to adenosine disphosphate retention and to mitochondrial permeability. Biochem. J., 182: 455-64, 1979.
- HASLAM, J. M. & KREBS, H. A. The permeability of mitochondria to oxaloacetate and malate. Biochem. J., 107: 659-67, 1968.
- HATASE, O.; TSUTSUI, K. & ODA, T. Mitochondrial sulfhydryl groups A possible endogenous probe of conformational changes in the mitochondrial membrane. J. Biochem., 82: 359-63, 1977.
- HAWORTH, R. A. & HUNTER, D. R. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. Archs. Biochem. Biophys., 195: 460-7, 1979.
- HEATON, G. M. & NICHOLLS, D. G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium eletrochemical gradient. Biochem. J., 156: 635-46, 1976.

- HENQUIN, J. C. Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells. Biochem. J., 186: 541-50, 1980.
- HOFSTETTER, W.; MUHLEBACH, T.; LOTSCHER, H. R.; WINTERHALTER, K. H. & RICHTER, C. ATP prevents both hydroperoxide-induced pyridine nucleotide oxidation and release of calcium in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 117: 361-367, 1981.
- HOSER, N.; DARGEL, R.; DAWCZYNSKI, H. & WINNEFELD, K. Respiration-dependent stimulation inorganic phosphate of Mg^{2+} release from rat liver mitochondria. Febs lett., 72: 193-6, 1976.
- HUNTER, D. R. & HAWORTH, R. A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. Archs. Biochem. Biophys., 195: 453-9, 1979a.
- HUNTER, D. R. & HAWORTH, R. A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca^{2+} release. Archs. Biochem. Biophys., 195: 468-77, 1979b.
- HUTSON, S. M.; PFEIFFER, D. R. & LARDY, H. A. Effect of cations and anions on the steady state kinetics of energy dependent Ca^{2+} transport in rat liver mitochondria. J. biol. Chem., 251: 5251-8, 1976.
- HUTSON, S. M. Steady state kinetics of energy dependent Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria. J. biol. Chem., 252: 4539-45, 1977.
- JENG, A. Y. & SHAMOO, A. E. Isolation of a Ca^{2+} carrier from heart inner mitochondrial membrane. J. biol. Chem., 255: 6897-903, 1980.
- JENG, A. Y. & SHAMOO, A. E. The electrophoretic properties of a Ca^{2+} carrier isolated from calf heart inner mitochondrial membrane. J. biol. Chem., 255: 6904-12, 1980
- JUNG, D. W. & BRIERLEY, G. P. On the relationship between the uncoupler induced efflux of K^+ from heart mitochondria and the oxidation reduction state of pyridine nucleotides. J. biol. Chem., 256: 10490-6, 1981.
- KIES, M. W. & MURPHY, J. B. Spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. Biochim. biophys. Acta, 45: 382-84, 1960.

- KIMURA, T.; CHU, J. W.; MUKAI, R.; ISHIZUKA, I. & YAMAKAWA, T. Some properties of a glycoprotein isolated from adrenal cortex mitochondria. Biochem. biophys. Res. Commun., 46: 1678-83, 1972.
- KLINGENBERG, M. & SLENCZKA, W. Pyridinnucleotide in liber-mitochondria. Eine analyse ihrer redox-beziehungen. Biochem. Z., 331: 486-517, 1959.
- KLINGENBERG, M.; GREBE, K. & SCHERER, B. Oposite effects of bongkreik acid and atractyloside on the adenine nucleotides induced mitochondrial volume changes and on the efflux of adenine nucleotides. Febs lett., 16: 253-6, 1971.
- KLINGENBERG, M. & BUCHHOLZ, M. On the mechanism of bongkrekate effect on the mitochondrial adenine-nucleotide carrier as studied through the binding of ADP. Eur. J. Biochem., 38: 346-58, 1973.
- KRALL, A. & HAPPEL, R. D. Reconstitution of high rates of calcium uptake in rat liver mitochondria. Fedn.Proc.Am.Socs.exp.Biol., 40: 1781, 1981.
- KRELL, H.; BAUR, H. & PFAFF, E. Transient ^{45}Ca uptake and release in solated rat liver cells during recovery from deenergized states. Eur. J. Biochem., 101: 349-64, 1979.
- KUN, E.; KEARNEY, E. B.; WIEDMANN, I. & LEE, N. M. Regulation of mitochondrial metabolism by specific cellular substances. II. The nature of stimulation of mitochondrial glutamate metabolism by a cytoplasmic component. Biochemistry, 8: 4443-50, 1969
- LANDRY, Y. & LEHNINGER, A. L. Transport of calcium ions by Ehrlich ascites tumor cells. Biochem.J., 158: 427-38, 1976.
- LEE, C. P. & ERNSTER, L. Equilibrium studies of the energy-dependent and non-energy-dependent nucleotide transhydrogenase reactions. Biochim. biophys. Acta, 81: 187-90, 1964.
- LEE, T. J. & ASHLEY, C. C. Increase in free Ca^{2+} in muscle after exposure to CO_2 . Nature, Lond., 275: 236-8, 1978.
- LEHNINGER, A. L.; CARAFOLI, E. & ROSSI, C. E. Energy-linked ion movements in mitochondrial systems. Adv. Enzymol, 29: 259-320, 1967.

- LEHNINGER, A. L. Mitochondria and calcium ion transport: the fifth jubilee lecture. Biochem. J., 119: 129-38, 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., 71:1520-4, 1974
- LEHNINGER, A. L.; REYNAFARJE, B.; VERCESI, A. & TEW, W. P. Transport and accumulation of calcium in mitochondria. Ann. N. Y. Acad. Sci., 307: 160-76, 1978a.
- LEHNINGER, A. L.; VERCESI, A. E. & BABABUNMI, E. A. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation reduction state of pyridine nucleotides. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 75: 1690-4. 1978b.
- LEHNINGER, A. L.; FISKUM, G.; VERCESI, A. E. & TEW, W. Ca^{2+} transport by mitochondria: A survey. In: BRONNER, F. & PETERLIK, M., ed. Calcium and phosphate transport across biomembranes. New York, Academic, 1981. p.37-78.
- LEMASTERS, J. J. & SOWERS, A. E. Phosphate dependence and atractyloside inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation. J. biol. Chem., 254: 1248-54, 1979.
- LLINAS, R.; BLINKS, J. R. & NICHOLSON, C. Calcium transient in presynaptic of squid giant synapse; detection with aequorin. Science, 176: 1127-9, 1972.
- LOTSCHER, H. R.; WINTERHALTER, K. H.; CARAFOLI, E. & RICHTER, C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 76: 4340-4, 1979.
- LOTSCHER, H. R.; WINTERHALTER, K. H.; CARAFOLI, E. & RICHTER, C. Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mitochondria. J. biol. Chem., 255: 9325-30, 1980.
- MCCORMACK, J. G. & DENTON, R. M. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism; properties of the Ca^{2+} -sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat. Biochem. J., 190: 95-105, 1980.

- MALAISSÉ, W. J.; HUTTON, J. C.; KAWAZU, S. & SENER, A. The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. Metabolic effects of menadione in isolated islets. Eur. J. Biochem., 87: 121-30, 1978.
- MEISNER, H. & KLINGENBERG, M. Efflux of adenine nucleotides from rat liver mitochondria. J. biol. Chem., 243:3631-9, 1968.
- MEISNER, G. CONNER, G. E. & FLEISCHER, D. Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca^{2+} pump and Ca^{2+} binding proteins. Biochim. Biophys. Acta, 298: 246-69, 1973.
- MELA, L. & CHANCE, B. Spectrophotometric measurements of the kinetics of Ca^{2+} and Mn^{2+} accumulation in mitochondria. Biochemistry, 7:4059-63, 1968.
- MELA, L. Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria; effects of lanthanides and local anesthetic drugs. Biochemistry, 8: 2481-6, 1969.
- MEURY, J.; LEBAIL, S. & KEPES, A. Opening of potassium channels in Escherichia coli membranes by thiol reagents and recovery of potassium tightness. Eur. J. Biochem., 113: 33-8, 1980.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, Lond., 191: 144-8, 1961.
- MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev., 41: 445-502, 1966.
- MITCHELL, P. & MOYLE, J. Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphate systems of rat liver mitochondria. Nature, Lond., 208:147-51, 1965.
- MITCHELL, P. & MOYLE, J. Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. Biochem. J., 105: 1147-62, 1967.
- MOORE, A. L. & BONNER Jr., W. D. The effect of calcium on the respiratory responses of mung bean mitochondria. Biochim. biophys. Acta, 460: 455-66, 1977.
- MOORE, C. L. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. Biochem. biophys. Res. Commun., 42:298-305, 1971.

- MOYLE, J. & MITCHELL, P. The proton-translocating nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) transhydrogenase of rat liver mitochondria. Biochem.J., 132: 571-85, 1973.
- MOYLE, J. & MITCHELL, P. Electric charge stoichiometry of calcium translocation in rat liver mitochondria. Febs lett., 73: 131-6, 1977a.
- MOYLE, J. & MITCHELL, P. The lanthanide sensitive calcium phosphate porter of rat liver mitochondria. Febs lett., 77: 136-40, 1977b.
- NICHOLLS, D. G. The regulation of extra mitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. Biochem. J., 176: 463-74, 1978.
- NICHOLLS, D. G. & BRAND, M. D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. Biochem.J., 188:113-8, 1980.
- NICHOLLS, D. G. & SCOTT, I. D. The regulation of brain mitochondrial-ion transport. Biochem. J., 186:833-9, 1980.
- NOACK, E. A. & HEINEN, E. M. A kinetic study of calcium transport by heart mitochondria. Eur. J. Biochem., 79: 245-50, 1977.
- ONTKO, J. A.; OTTO, D. A.; OSHINO, N. & CHANCE, B. Calcium-mediated alterations in the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides in isolated liver cells. Febs lett., 53: 297-301, 1975.
- OUT, T. A.; KEMP Jr., A. & SOUVERIJN, J. H. M. The effect of bongkreikic acid on the Ca^{2+} -stimulated oxidation in rat liver mitochondria and its relation to the efflux of intramitochondrial adenine nucleotides. Biochim. biophys. Acta, 245:299-304, 1972.
- PALMER, J. W. & PFEIFFER, D. R. The control of Ca^{2+} release from mitochondria. J. biol. Chem., 256: 6742-50, 1981.
- PANFILI, E.; SANDRI, G.; SOTTOCASA, G. L.; LUNAZZI, G.; LIUT, G. & GRAZIOTI, G. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by antibodies directed to the Ca^{2+} binding glycoprotein. Nature, Lond., 264: 185-6, 1976.

- PANFILI, E.; SOTTOCASA, G. L.; SANDRI, G. & LIUT, G. The Ca^{2+} -binding glycoprotein as the site of metabolic regulation of mitochondrial Ca^{2+} movements. Eur. J. Biochem., 105: 205-10, 1980.
- PANOV, A.; FILIPOVA, S. & LYAKHOVICH, V. Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability to H^+ and K^+ ions. Archs. Biochem. Biophys., 199: 420-6, 1980.
- PENG, C. F.; STRAUB, K. D.; KANE, J. J.; MURPHY, M. L. & WADKINS, C. L. Effects of adenine nucleotide translocase inhibitions on dinitrophenol-induced Ca^{2+} efflux from pig heart mitochondria. Biochim. biophys. Acta, 462: 403-13, 1977.
- PFEIFFER, D. R.; SCHMID, P. C.; BEATRICE, M. C. & SCHMID, H. H. O. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca^{2+} plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. J. biol. Chem. 254: 11485-94, 1979.
- POZZAN, T.; BRAGADIN, M. & AZZONE, G. F. Desequilibrium between steady-state Ca^{2+} accumulation ratio and membrane potential in mitochondria; Pathway and role of Ca^{2+} efflux. Biochemistry, 16: 5618-25, 1977.
- PRESSMAN, B. C. Induced active transport of ion in mitochondria. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 53: 1076-83, 1965.
- PRPIC, V. & BYGRAVE, F. L. On the inter-relationship between glucagon action, the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides, and calcium retention by rat liver mitochondria. J. biol. Chem., 255: 6193-9, 1980.
- RAMACHANDRAN, C. & BYGRAVE, F. L. Calcium ion cycling in rat liver mitochondria. Biochem. J., 174: 613-20. 1978.
- REED, K. C. & BYGRAVE, F. L. Inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. Biochem. J., 140: 143-53, 1974.
- REED, P. W. & LARDY, H. A. A_{23187} : a divalent cation ionophore. J. biol. Chem., 247: 6970-7, 1972.

- REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L. High affinity and low affinity binding of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. J. biol. Chem., 244: 584-93, 1969.
- REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L. Ca^{2+} transport by mitochondria from L1210 mouse ascites tumor cells. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 70: 1744-8, 1973.
- REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L. Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. Biochem. biophys. Res. Commun. 77: 1273-9, 1977.
- ROSE, B. & RICK, R. Intracellular pH, intracellular free calcium and junctional cell-cell coupling. J. Membr. biol., 44: 377-415, 1978.
- ROSSI, C. S. & LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of calcium and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J. biol. Chem., 239: 3971-80, 1964.
- ROTTEMBERG, H. & SCARPA, A. Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. Biochemistry, 13: 4811-7, 1974.
- RUGOLO, M.; SILIPRANDI, D.; SILIPRANDI, N. & TONINELLO, P. Parallel efflux of Ca^{2+} and P_i in energized rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 114: 195-9, 1981.
- RYDSTROM, J.; TEIXEIRA da CRUZ, A. & ERNSTER, L. Steady-state kinetics of mitochondrial nicotinamide transhydrogenase. II. The energy-linked reaction. Eur. J. Biochem., 23: 212-9, 1971.
- RYDSTROM, J. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Biochim. biophys. Acta, 463: 155-84, 1977.
- SANDRI, G.; SOTTOCASA, G.; PANFILI, E. & 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: 214-20, 1979.
- SARIS, N. E. L. Suom. Kimistise uran. Tied., 68, Apud SARIS, N. E. & AKERMAN, K. E. O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Curr. top. Bioenerg., 10: 103-71, 1980.
- SARIS, N. E. & AKERMAN, K. E. O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Curr. top. Bioenerg., 10: 103-71, 1980.

- SCARPA, A. Indicators of free magnesium in biological systems. Biochemistry, 13: 2789-94, 1974.
- SCARPA, A. & AZZI, A. Cation binding to submitochondrial particles. Biochim. biophys. Acta, 150: 473-81, 1968.
- SCARPA, A. & AZZONE, G. The mechanism of ion translocation in mitochondria. Eur. J. Biochem., 12: 328-35, 1970.
- SCHATZMANN, H. J. & BÜRGIN, H. Calcium in human red blood cells. Ann. N. Y. Acad. Sci., 307: 125-46, 1978.
- SCHERER, B. & KLINGENBERG, M. Demonstration of the relationship between the adenine nucleotide carrier and the structural changes of mitochondria as induced by adenosine 5'-diphosphate. Biochemistry, 13: 161-170, 1974.
- SCHNEIDER, W. C. & HOGEBOOM, G. H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. J. biol. Chem., 183: 123-8, 1950.
- SCOTT, I. D.; AKERMAN, K. E. O. & NICHOLLS, D. G. Calcium-ion transport by intact synaptosomes. Intrasyntosomal compartmentation and the role of the mitochondrial membrane potential. Biochem. J., 192: 873-80, 1980.
- SELWYN, M. J.; DAWSON, A. P. & DUNNETT, S. J. Calcium transport in mitochondria. Febs. Lett., 10: 1-5, 1970.
- SELWYN, M. J. & WALKER, H. A. Permeability of the mitochondrial membrane to bicarbonate ions. Biochem. J., 166: 137-9, 1977.
- SHUSTER, S. M. & OLSON, M. S. Studies of the energy-dependent uptake of divalent metal ions by beef heart mitochondria. J. biol. Chem., 249: 7151-8, 1974.
- SIEKEVITZ, P. & POTTER, V. R. Biochemical structure of mitochondria I. Intramitochondrial components and oxidative phosphorylation. J. biol. Chem., 215: 221-35, 1955.
- SIES, H.; GRAF, P. & ESTRELA, J. M. Hepatic calcium efflux during cytochrome P.450-dependent drug oxidations at the endoplasmic reticulum in intact liver. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.:biol., 78: 3358-62, 1981.

- SILIPRANDI, D.; TONINELLO, A.; ZOCCARATO, F. & SILIPRANDI, N.
A possible mechanism for respiration dependent efflux of Mg ions from liver mitochondria. Biochem. biophys. Res. Commun., 78: 23-7, 1977.
- SILIPRANDI, D.; TONINELLO, A.; ZOCCARATO, F.; RUGOLO, M. & SILIPRANDI, N. Efflux of Mg^{2+} and K^+ from liver mitochondria induced by inorganic phosphate and by diamide. J.bioenerg. Biomembr., 10: 1-11, 1978.
- SILIPRANDI, N.; RUGOLO, M.; SILIPRANDI, D.; TONINELLO, A. & ZOCCARATO, F. Induction of Mg^{2+} efflux and Ca^{2+} cycling in rat liver mitochondria by inorganic phosphate and oxidizing agents. In: LEE, C. P.; SCHATZ, G. & ERNSTER, L., eds. Membrane bioenergetics, Massachusetts, Addison-Wesley, 1979. p.533-45.
- SLATER, E. C. & CLELAND, K. W. The effects of Ca^{2+} on the respiration and phosphorylative activities of heart muscle sarcosomes. Biochem. J., 55: 566-72, 1953.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V.; SHUMAN, H.; SCARPA, A.; ENDO, M. & INESI, G. Mitochondria do not accumulate significant Ca^{2+} concentrations in normal cells. In: BRONNER, F. & PETERLIK, M. ed. Calcium and phosphate transport across biomembranes. New York, Academic, 1981. p.87-93.
- SORDAHL, L. A. & ASIMAKIS, G. K. Calcium retention and release in heart. In: AZZONE, G. F. et alii, eds. The proton and calcium pumps. Amsterdam, Elsevier, 1978. p.203-214.
- SOTTOCASA, G.; SANDRI, G.; PANFILI, E.; BERNARD, B.; GAZZOTTI, P.; VASINGTON, F. D. & CARAFOLI, E. Isolation of a soluble Ca^{2+} binding glycoprotein from ox liver mitochondria. Biochem. biophys. Res. Commun., 47: 808-13, 1972.
- SPENCER, T. & BYGRAVE, F. L. The role of mitochondria in modifying the cellular ionic environment; studies of the kinetic accumulation of calcium by rat liver mitochondria. Bioenergetics, 4: 347-62, 1973.
- SUL, H. S.; SHRAGO, E. & SHUG, A. L. Relationship of phosphoenolpyruvate transport, acyl coenzyme A inhibition of adenine nucleotide translocase and Ca^{2+} efflux in Guinea Pig heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 172: 230-7, 1976.

- TASHMUKHAMEDOV, B. A.; GAGELGANS, A. I.; MAMATKULOV, K. & MAKHMODOVA, E. M. Inhibition of Ca^{2+} transport in mitochondria by selective blockade of membrane mucopolysaccharides by hexamine cobaltichloride. Febs lett., 28: 239-42, 1972.
- THIERS, R. E.; REYNOLDS, E. S. & VILLE, B. L. The effect of carbon tetrachloride poisoning on subcellular metal distribution in rat liver. J. biol. Chem., 235: 2130-3, 1960.
- TSOKOS, J.; CORNWELL, T. F. & VLASUK, G. Ca^{2+} efflux from liver mitochondria induced by a decrease in extramitochondrial pH. Febs lett., 119: 297-300, 1980.
- VASINGTON, F. D. & MURPHY, J. V. Active binding of calcium by mitochondria. Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 20: 146, 1961.
- VASINGTON, F. D. & MURPHY, J. V. Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. biol. Chem., 237: 2670-6, 1962.
- VERCESI, A. E. Ca^{2+} transport in rat heart mitochondria. Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 36: 826, 1977.
- VERCESI, A. E.; REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of H^+ ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. biol. Chem., 253: 6379-85, 1978.
- VERCESI, A. E. Release of endogenous Ca^{2+} from mitochondria by the oxidation of pyridine nucleotides. In: International Congress of Biochemistry, Toronto, Ca, 1979a p.453 abstracts.
- VERCESI, A. E. Estimulação do efluxo de Ca^{2+} endógeno em mitocôndria hepática não energizada tratada por vermelho de rutênio. In: Sociedad Argentina de Biofísica, 8, Buenos Aires, 1979b.
- VERCESI, A. E. Sequence of events in Ca^{2+} efflux induced by the oxidized steady state of mitochondrial NAD(P). Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 40: 1781, 1981.
- VERCESI, A. E. & LEHNINGER, A. L. Uncoupling is not obligatory for NADP^+ -induced Ca^{2+} efflux from mitochondria. Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 41: 1434, 1982.

- YAMADA, E. W.; HUZEL, N. J. & DICKISON, J. C. Reversal by uncouplers of oxidative phosphorylation and by Ca^{2+} of the inhibition of mitochondrial ATPase activity by the ATPase inhibitor protein of rat skeletal muscle. J. biol. Chem., 256: 10203-7, 1981.
- WOLKOWICZ, P. E. & McMILLIN-WOOD, J. Dissociation between mitochondrial calcium ion release and pyridine nucleotide oxidation. J. biol. Chem., 255: 10348-53, 1980.
- WOLKOWICZ, P. E. & McMILLIN-WOOD, J. Glutamate-supported calcium movements in rat liver mitochondria: effects of anions and pH. Archs. Biochem. Biophys., 209: 408-22, 1981.
- ZOCCARATO, F.; RUGOLO, M.; SILIPRANDI, D. & SILIPRANDI, N. Correlated effluxes of adenine nucleotides, Mg^{2+} and Ca^{2+} induced in rat liver mitochondria by external Ca^{2+} and phosphate. Eur. J. Biochem., 114: 195-9, 1981.