

FABIANE FORTES

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Fabiane Fortes** Campinas, 28 de fevereiro de 2003.

Prof(a). Dr(a). Aníbal Eugenio Vercesi
Orientador(a) 

**TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE DE MEMBRANA
EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE BATATA**

200402745

CAMPINAS

2003

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

FABIANE FORTES

***TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE DE MEMBRANA
EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE BATATA***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. ANÍBAL EUGÊNIO VERCESI

CAMPINAS

2003

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/10 N1 cmma
F 376T
V EX
TOMBO BC 56976
PROC. 16-8-117/04
C ☐ D ☒
PREÇO
DATA
Nº CPD

CH00192892-7

bio id 311574

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Fortes, Fabiane

Transição de permeabilidade de membrana em mitocôndrias isoladas de batata

/ Fabiane Fortes. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador: Aníbal Eugênio Vercesi

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mitocôndria. 2. Cálcio. 3. Estresse Oxidativo. 4. Transição de Permeabilidade.

I. Aníbal Eugênio Vercesi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética do Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Professor Anibal Eugênio Vercesi, na vigência de auxílios concedidos pela FAPESP, PRONEX, CNPq e FAEP/UNICAMP.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi

Membros:

1. Anibal Eugênio Vercesi

2. Eva Gunilla Skare Carnieri

3. Ione Salgado

4. Celene Fernandes Bernardes

5. Claudia Barbosa Ladeira Campos

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/fevereiro/2003.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais...minha força...

Agradeço ao Professor Anibal E. Vercesi, por todos valiosos ensinamentos, pela dedicação, paciência e orientação.

Ao Professor Roger F. Castilho pela inestimável ajuda durante os muitos momentos difíceis.

À Professora Eva G. S. Carnieri, ex-orientadora e eterna amiga que, em momentos certos me deu força e incentivo para realizar o que deveria ser realizado.

À Márcia Fagian, pela ajuda nos momentos burocráticos. Aos colegas de laboratório: Adriana, Anna Maria, Chico, Cláudia, Denise, Evelise, Félix, Felipe, Giovana, Jesus, Leda, Luciane, Michely, Natália, Ricardo e Solange pela amizade, ajuda e incentivo constantes. Ao Endrigo, com saudades.

Às técnicas, Edilene e Elisângela pela fundamental ajuda durante o preparo de mitocôndrias e tudo mais que foi utilizado durante a realização deste trabalho.

À minha família de Campinas: "Dona Lourdes", Vó Basília, Beto, Ana Rita e Matheus. Ao meu grande amigo, "Seu Newton"...um exemplo de pessoa.

Aos meus familiares e amigos que me acompanharam nas dificuldades e conquistas pertinentes à realização deste trabalho; em especial aos meus pais, Maria Rosa e Carlos, pelo carinho, "paciência" e amor. Ao meu irmão Luiz Roberto pelo incentivo, amizade e momentos de descontração. Esta vitória é de vocês!

Ao Pituchão, pelas bagunças e muitos momentos de alegria.

A FAPESP, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro e tudo o que ele trouxe.

Ao milagre da existência chamado Deus.

	PÁG.
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1. Mitocôndrias vegetais.....	35
1.2. Homeostase intracelular de cálcio.....	36
1.3. Transporte de cálcio por mitocôndrias de mamíferos.....	38
1.4. Transporte de cálcio por mitocôndrias vegetais.....	42
1.5. Transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPM).....	44
1.5.1. Mitocôndrias de mamíferos.....	44
1.5.2. Mitocôndrias vegetais.....	46
1.6. Produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio.....	47
1.6.1. Mitocôndrias de mamíferos.....	47
1.6.2. Mitocôndrias vegetais.....	50
1.7. Transição de permeabilidade da membrana mitocondrial induzida em condições de estresse oxidativo.....	51
1.8. Possíveis ações do cálcio no processo de permeabilização da membrana mitocondrial interna.....	54
2. OBJETIVOS.....	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1. Isolamento de mitocôndrias de tubérculo de batata e de batata doce.....	63
3.2. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	64

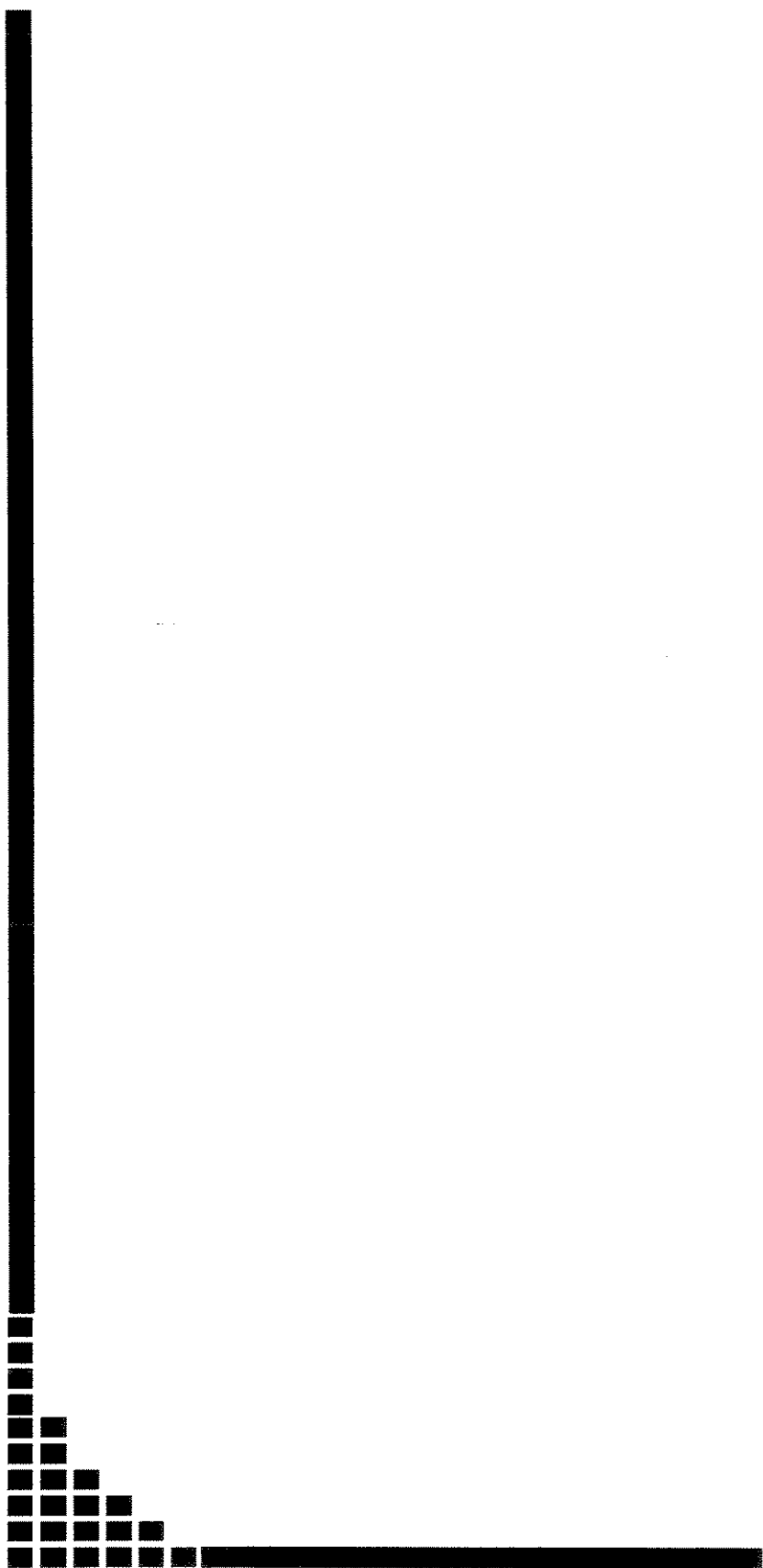
3.3. Dosagem de proteína.....	64
3.4. Determinação do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) de membrana mitocondrial.....	64
3.5. Medida do inchamento mitocondrial.....	65
3.6. Transporte de cálcio por mitocôndrias.....	65
3.7. Medida da atividade da peptidilprolil- <i>cis-trans</i> isomerase.....	66
3.8. Procedimento de incubação.....	66
4. RESULTADOS.....	67
5. DISCUSSÃO.....	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
7. ANEXOS.....	119

$\Delta\Psi$	Potencial elétrico transmembrana
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração de cálcio intracelular
AOX	Oxidase alternativa
ADP	Adenosina 5' difosfato
Anti A	Antimicina A
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BSA	Albumina de soro bovina
Cat	Catalase
CAT	Carboxiatractilosídeo
Cyp-D	Ciclofilina D
Diamida	Ácido azodicarboxílico bis [dimetilamida]
DTT	Ditiotreitol
DTE	Ditioeritritol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol-bis (β -amino éter) N, N, N', N'-tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	Carbonil cianida <i>p</i> -triflourometoxifenilhidrazona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	[N-(2-hidroxietil) piperazina N'-(2-ácido etanosulfônico)]
kDa	Kilodalton
MITO	Mitocôndria
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
$O_2^{\bullet -}$	Radical superóxido
$HO^{\bullet -}$	Ânion hidroxila
$HO^{\bullet}$	Radical hidroxil
Pi	Fosfato inorgânico
PUMP	Proteína desacopladora mitocondrial de plantas
UCP	Proteína desacopladora
$\Delta\mu_{H^+}$	Gradiente eletroquímico de prótons transmembrana
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
CsA	Ciclosporina A
PTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
S	Safranina
-SH	Grupo sulfidril
Suc	Succinato
TH	Transidrogenase
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
CGDH	Desidrogenase cetoglutarica
ICDH	Desidrogenase isocitrica
PDH	Desidrogenase piruvica

	PÁG.
Figura 1: Esquema sumarizando os mecanismos de transporte de Ca^{2+} localizados nas membranas plasmáticas, nuclear, mitocondrial e do retículo endo(sarco)plasmático em uma célula de mamífero.....	39
Figura 2: Produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e principais defesas antioxidantes.....	49
Figura 3: Efeito da diamida sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+}	75
Figura 4: Captação de Ca^{2+} e potencial de membrana em mitocôndrias de tubérculo de batata e fígado de rato.....	76
Figura 5: Efeito do vermelho de rutênio e ionomicina sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida.....	77
Figura 6: Efeitos de antioxidantes e inibidores do poro de transição de permeabilidade sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida.....	78
Figura 7: Efeito do pH sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida.....	79
Figura 8: Inibição da atividade da enzima peptidilprolil <i>cis-trans</i> isomerase pela ciclosporina A em mitocôndrias de fígado de rato (A), tubérculo de batata (B) e batata doce (C).....	80
Figura 9: Inchamento mitocondrial induzido por reagentes tiólicos: efeito do Ca^{2+}	81

Figura 10:	Efeito da dibucaína e do BSA sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} (A), Ca^{2+} e diamida (B) e mersalil (C).....	82
Figura 11:	Captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de tubérculo de batata e mitocôndrias de batata doce.....	83
Figura 12:	Efeito da diamida, inibidores do poro de transição de permeabilidade e vermelho de rutênio sob o acúmulo de Ca^{2+} em mitocôndrias de batata doce.....	84
Figura 13:	Efeito da CsA e catalase sobre o inchamento induzido por Ca^{2+} na ausência e presença de diamida em mitocôndrias de batata doce.....	85
Figura 14:	Efeito do bongkrekatol e da CsA sobre o inchamento mitocondrial de tubérculo de batata, batata doce e fígado de rato induzido por Ca^{2+} e diamida.....	86
Figura 15:	Efeito da CsA sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+}	87



RESUMO

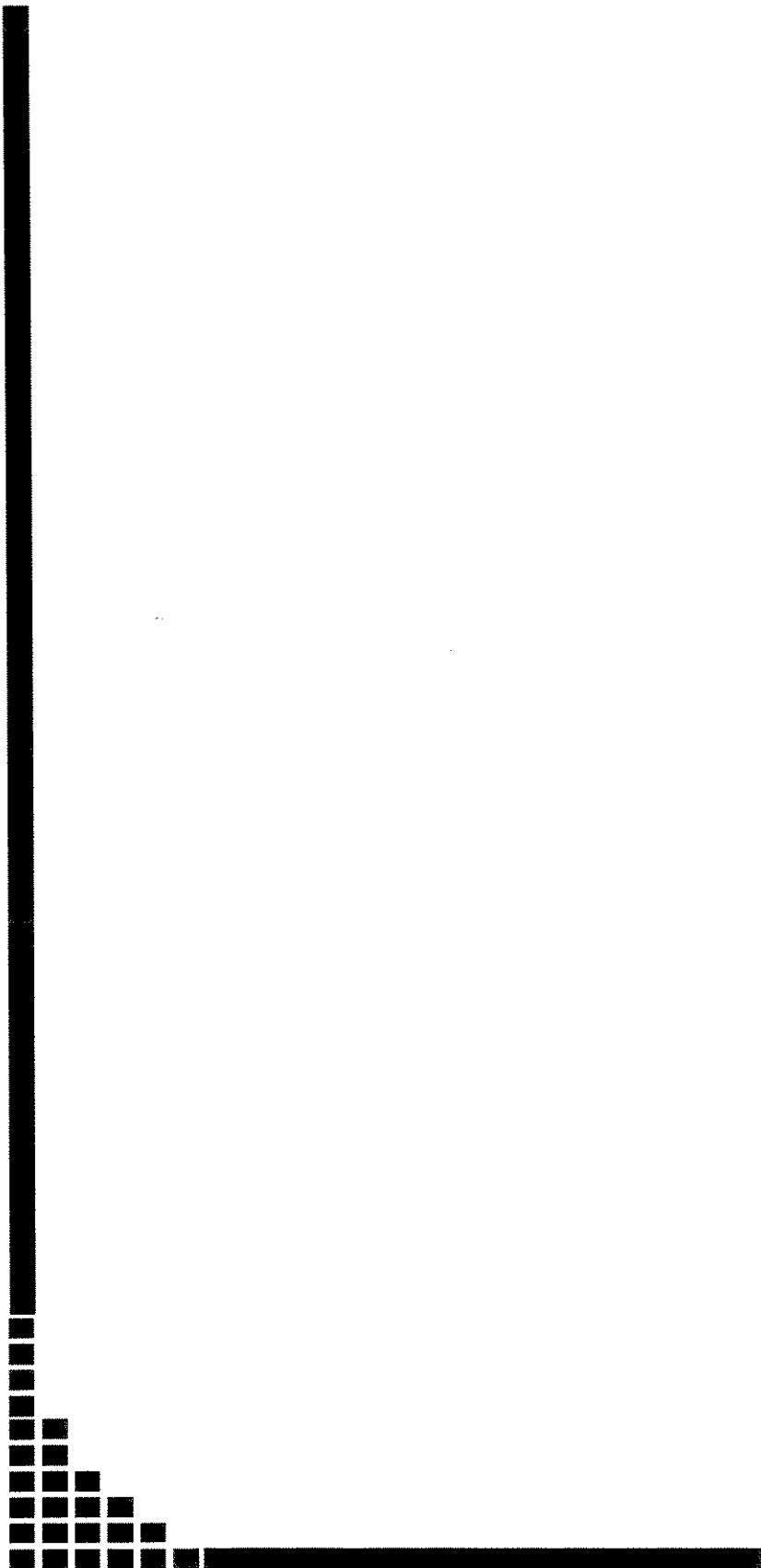
O dano oxidativo induzido por Ca^{2+} e agentes prooxidantes em mitocôndrias é mediado pelo ataque de espécies reativas de oxigênio geradas pela própria mitocôndria. Estas espécies reativas de oxigênio atacam os grupos tióis de proteínas de membrana promovendo oxidação e ligações cruzadas que conduzem à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM em mamíferos caracteriza-se por uma permeabilização não específica e dependente de Ca^{2+} que ocorre na membrana mitocondrial interna e é inibida por concentrações submicromolares de ciclosporina A (CsA).

No presente estudo foi evidenciado que apesar de mitocôndrias isoladas de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*) não apresentarem captação e acúmulo significativo de Ca^{2+} , sofrem permeabilização da membrana interna quando tratadas com Ca^{2+} ($> 0,2 \text{ mM}$). Esta permeabilização foi potencializada pela adição de diamida, um oxidante de grupos tiólicos que estabelece uma condição de estresse oxidativo devido à oxidação de nucleotídeos de piridina. Esta permeabilização foi inibida pela acidificação do pH do meio de reação, Mg^{2+} e pelos antioxidantes catalase e ditiotreitol, mas não foi prevenida por inibidores clássicos da TPM de mamíferos como: ADP, bongkrekato e CsA. A ausência de inibição da permeabilização mitocondrial de batata pela CsA contrasta com seu efeito inibitório sobre a atividade da enzima peptidilprolil *cis-trans* isomerase, que está relacionada com a proteína ciclofilina, um sítio de ligação para CsA. O mersalil, um reagente tiólico monofuncional induz um extenso inchamento insensível à CsA, mesmo na presença de baixas concentrações de Ca^{2+} ($> 0,01 \text{ mM}$).

Com o objetivo de realizar um estudo comparativo utilizando mitocôndrias vegetais capazes de captar e acumular Ca^{2+} presente no meio extramitocondrial, foram utilizadas mitocôndrias isoladas de batata doce (*Ipomoea batatas*), as quais são capazes de captar Ca^{2+} por um mecanismo eletroforético sensível ao vermelho de rutênio, o que caracteriza a presença de um sistema ativo de captação de Ca^{2+} . O acúmulo de altas concentrações de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de batata doce conduziu a uma permeabilização de membrana mitocondrial interna, demonstrada por inchamento da organela e por um lento efluxo de Ca^{2+} . Esta permeabilização induzida por Ca^{2+} também foi estimulada por diamida e inibida parcialmente por catalase. Assim como ocorreu com *Solanum tuberosum*, o bongkrekato não apresentou efeito inibitório sobre a permeabilização mitocondrial induzida

por Ca^{2+} , bem como a CsA não foi capaz de inibir o inchamento mitocondrial e o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de batata doce. Também na batata doce a atividade da enzima peptidilprolil *cis-trans* isomerase de mitocôndrias foi inibida por CsA.

Considerando os resultados aqui apresentados, podemos concluir que foi identificada e caracterizada uma condição de transição de permeabilidade de membrana induzida por Ca^{2+} e espécies reativas de oxigênio, insensível à CsA, em mitocôndrias isoladas de batata e de batata doce. É possível sugerir ainda que a possível existência de um sistema ativo de transporte de Ca^{2+} nestes vegetais não está relacionada com a insensibilidade da transição de permeabilidade destas mitocôndrias vegetais a CsA.



ABSTRACT

Oxidative damage of mammalian mitochondria induced by Ca^{2+} and prooxidants is mediated by the attack of mitochondria-generated reactive oxygen species on membrane proteins thiols, promoting oxidation and cross-linkage that leads to the opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPT). In mammalian mitochondria, MPT is defined as a Ca^{2+} -dependent, nonspecific permeabilization of the mitochondrial inner membrane, inhibited by submicromolar concentrations of cyclosporin A (CsA).

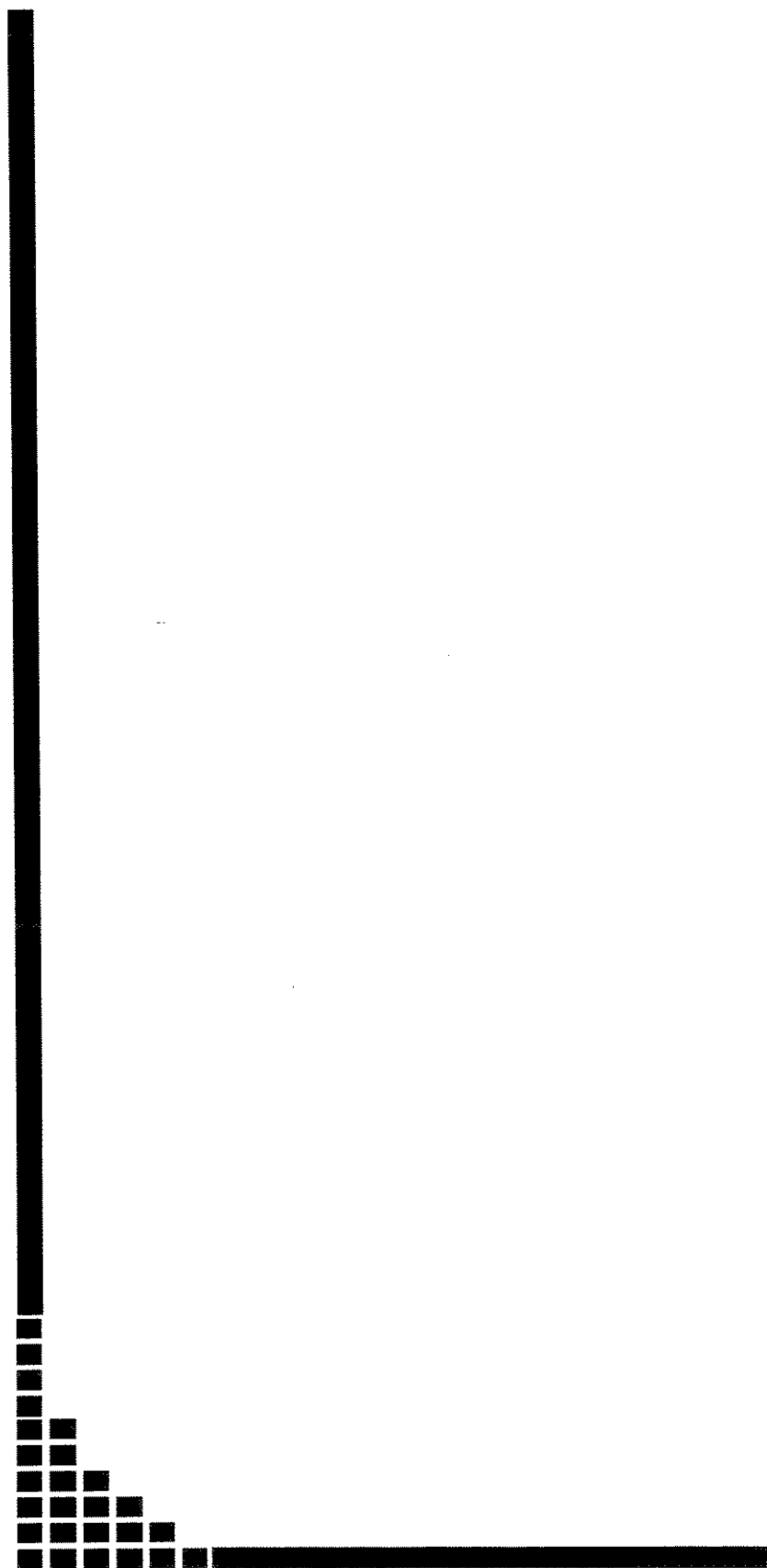
In this study, we presented evidence that deenergized potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria, which do not possess a Ca^{2+} uniport, undergo inner membrane permeabilization when treated with Ca^{2+} ($> 0.2 \text{ mM}$), as indicated by mitochondrial swelling. Similar to rat liver mitochondria, this permeabilization was enhanced by diamide, a thiol oxidant that creates a condition of oxidative stress by oxidizing pyridine nucleotides. This was inhibited by the acidic pH, Mg^{2+} , and by the antioxidants catalase and dithiothreitol. Potato mitochondrial membrane permeabilization was not inhibited by ADP, bongkrekate and CsA, well known inhibitors of the mammalian mitochondrial permeability transition. The lack of inhibition of potato mitochondrial permeabilization by cyclosporin A is in contrast to the inhibition of the peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity, that is related to the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. Interestingly, the monofunctional thiol reagent mersalyl induces an extensive cyclosporin A-insensitive potato mitochondrial swelling, even in the presence of lower Ca^{2+} concentrations (>0.01).

In order to compare a plant mitochondria able to take up and retain the Ca^{2+} present in the extramitochondrial medium of *Solanum tuberosum*, which is unable to take up Ca^{2+} , we used mitochondria isolated from sweet potato (*Ipomoea batatas*). These mitochondria are able to take up the Ca^{2+} by an electrophoretical mechanism sensitive to ruthenium red which characterizes an active system of Ca^{2+} uptake.

The retaining of high amount of Ca^{2+} by mitochondria isolated from sweet potato leads to an inner mitochondrial permeabilization demonstrated by organelle swelling and by a slow Ca^{2+} efflux. The permeabilization of the sweet potato mitochondrial membrane induced by Ca^{2+} was also stimulated by diamide and partially inhibited by catalase. The ATP/ADP translocase inhibitor, bongkrekate, did not show inhibitory effect on the mitochondrial

permeabilization induced by Ca^{2+} on sweet potato mitochondria. Cyclosporin A was also unable to inhibit the mitochondrial swelling and Ca^{2+} efflux on sweet potato mitochondria.

In conclusion we have identified and characterized a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore induced by Ca^{2+} and by reactive oxygen species in isolated potato tuber and sweet potato mitochondria. It is possible to suggest that the absence or the presence of an active system of Ca^{2+} uptake in these plants are not related to the cyclosporin A-insensitivity of these mitochondria.



1. INTRODUÇÃO

1.1. MITOCÔNDRIAS VEGETAIS

A função fundamental das mitocôndrias de qualquer ser vivo é fornecer ATP como principal fonte de energia para a célula. Em vegetais, este ATP pode ser produzido de duas maneiras: através da fotofosforilação nos cloroplastos ou da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. O nível de contribuição de cada organela na produção de ATP depende do tecido vegetal e de fatores ambientais como a quantidade de luz (AFFOURTIT *et al.*, 2001).

A cadeia respiratória de mitocôndrias de plantas difere em vários aspectos dos mamíferos: ela apresenta quatro NAD(P)H desidrogenases adicionais; duas localizadas na parte externa da membrana mitocondrial interna, e duas NAD(P)H desidrogenases internas localizadas na membrana mitocondrial interna, que não transportam prótons e não são inibidas por inibidores clássicos do complexo I (rotenona, por exemplo) (MOLLER, 1997; MOLLER & RASMUSSEN, 1998; MOLLER 2001). Mitocôndrias de plantas superiores possuem ainda outra via não fosforilativa dissipadora de energia - a oxidase alternativa (AOX), que se ramifica no nível da ubiquinona e na qual o fluxo de elétrons não está acoplado a uma construção do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_{H^+}$) e a fosforilação de ADP (DAY & WISKICH, 1995). Esta "respiração alternativa" insensível a cianeto e antimicina A, foi descrita pela primeira vez em 1929 por Genevois em brotos de ervilha (DAY & WISKICH, 1995). Este tipo de respiração encontra-se ausente em mitocôndrias isoladas de batatas (DIZENGREMEL & LANCE, 1976; LATIES, 1982), mas pode ser induzida artificialmente através de tratamento com etileno (RYCHTER *et al.*, 1979) e do envelhecimento dos tubérculos de batata (DIZENGREMEL & LANCE, 1976). A oxidase alternativa apresenta função termogênica nos vegetais *Arum maculatum* e *Sauromatum guttatum* (BONNER *et al.*, 1986; ELTHON & McINTOSH, 1987) semelhante à proteína desacopladora presente em mitocôndrias de tecido adiposo marrom de mamíferos hibernantes (CANNON & NEDERGAARD, 1985).

Recentemente, uma proteína similar em vários aspectos à proteína desacopladora de mamíferos (UCP) foi descoberta em mitocôndrias de tubérculos de batata (VERCESI *et al.*, 1995). Estudos de nosso grupo demonstraram que a proteína desacopladora

de plantas aumenta a condutividade da membrana à prótons, tanto em mitocôndrias intactas quanto em sistemas reconstituídos, através de um mecanismo dependente de ácidos graxos livres (JEZEK *et al*, 1996; JEZEK *et al*, 1997).

Além de desempenhar um papel fundamental na produção de energia, as mitocôndrias desempenham um importante papel nos processos anabólicos de células vegetais. As plantas são autotróficas e precisam assimilar nitrogênio para síntese de aminoácidos. Os esqueletos carbônicos necessários para este processo derivam-se de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) (HOEFNAGEL *et al.*, 1998).

1.2. HOMEOSTASE INTRACELULAR DE CÁLCIO

O íon cálcio exerce papel essencial no controle de uma série de funções celulares (GUNTER *et al.*, 1994; BERRIDGE, 1997). Em células vegetais está diretamente envolvido no crescimento e desenvolvimento das plantas, regulando atividades como equilíbrio iônico, expressão gênica, secreção, contração, mitose e ativação de enzimas (BUSH, 1995). Para exercer estas funções é necessário que sua distribuição nos compartimentos extra e intracelulares seja regulada por mecanismos de alta precisão e que possam ocorrer rápidas flutuações na concentração do íon, o que se dá graças a processos de transporte mediado através das membranas.

A concentração de Ca^{2+} livre no citosol (10^{-7} M) é mantida cerca de 10.000 vezes abaixo da concentração extracelular (10^{-3} M). Este alto gradiente eletroquímico de Ca^{2+} entre os compartimentos intra e extracelulares é essencial para a sua função como carreador de sinais bioquímicos. Desta forma, pequenos aumentos na permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} geram um rápido fluxo do íon para o interior das células (CARAFOLI, 1987; BERRIDGE, 1997).

A distribuição do Ca^{2+} intracelular é controlada por processos de transporte do íon através da membrana plasmática e das membranas de organelas subcelulares, como o retículo endo(sarco)plasmático, núcleo e mitocôndrias de mamíferos (Figura 1) (CARAFOLI, 1987; GUNTER *et al.*, 1994).

A membrana plasmática possui mecanismos de entrada de Ca^{2+} na célula mediados por canais dependentes de voltagem ou regulados por segundo mensageiros (BERRIDGE, 1987). O efluxo ativo do íon é promovido por uma Ca^{2+} -ATPase, que hidrolisa um ATP por Ca^{2+} translocado (CLARK & CARAFOLI, 1983; CARAFOLI, 1989, 1994), ou por um sistema de trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que troca um Ca^{2+} interno por três Na^+ externos, utilizando a energia do potencial do gradiente eletroquímico de Na^+ (REEVES & HALE, 1984). Este último é particularmente ativo em células de tecidos excitáveis (CARAFOLI, 1989) e, dependendo do gradiente de Na^+ , pode atuar no influxo de Ca^{2+} celular (REEVES & CHEON, 1989).

O retículo endo(sarco)plasmático é considerado o principal reservatório de Ca^{2+} intracelular. O influxo de Ca^{2+} é catalisado por uma Ca^{2+} -ATPase, que transloca dois íons Ca^{2+} para cada ATP hidrolisado (DE MEIS & VIANNA, 1979). O efluxo de Ca^{2+} se dá através de um canal estimulado por inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) (BERRIDGE, 1987; CARAFOLI, 1987), que funciona como um segundo mensageiro para liberar Ca^{2+} do retículo endo(sarco)plasmático (BERRIDGE, 1989) e por cafeína em retículo sarcoplasmático (SORRENTINO & VOLPE, 1993).

Vercesi e colaboradores (1994) identificaram em *Trypanosoma brucei* um compartimento ácido sensível à nigericina, denominado de acidocalcisoma e que também está envolvido na homeostase de Ca^{2+} . A captação de Ca^{2+} pelo acidocalcisoma ocorre através de uma reação catalisada por uma Ca^{2+} -ATPase vacuolar em troca de H^+ . O efluxo de Ca^{2+} ocorre em troca de H^+ e é favorecida por trocas de Na^+/H^+ (VERCESI *et al.*, 1994B).

Tem sido demonstrado que modificações funcionais em alguns destes translocadores de Ca^{2+} podem causar alterações na manutenção da homeostase intracelular de Ca^{2+} , levando a morte celular (FARBER, 1981; JEWELL *et al.*, 1982; ORRENIUS *et al.*, 1989). Por exemplo, um distúrbio na homeostase intracelular do Ca^{2+} pode desencadear uma condição de estresse no retículo endoplasmático e mitocôndria que, se prolongado, pode conduzir à morte celular (MATTSON *et al.*, 2000; DUCHEN, 2000; BOWSER *et al.*, 2001; WEIR, 2001).

1.3. TRANSPORTE DE CÁLCIO POR MITOCÔNDRIAS DE MAMÍFEROS

O transporte de Ca^{2+} mitocondrial foi descrito no início da década de 1960, simultaneamente por De Luca & Engstrom (1961) e Vasington & Murphy (1962). Sabe-se agora que mitocôndrias de quase todos os tecidos animais vertebrados e invertebrados (CARAFOLI & CROMPTON, 1978; McCORMACK & DENTON 1980; NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982; HANSFORD, 1985; McCORMACK & DENTON, 1986; GUNTER & PFEIFFER, 1990; GUNTER & GUNTER, 1994, 2001; GUNTER *et al.*, 1998; POZZAN & RIZZUTO, 2000; GUNTER *et al.*, 2000; VANDECASTEELE *et al.*, 2001), de alguns fungos (VOTYAKOVA *et al.*, 1990, 1993; BRADSHAW *et al.*, 2001; MILANI *et al.*, 2001), de alguns tecidos vegetais (MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS *et al.*, 1986; CARNIERI *et al.*, 1987; VERCESI *et al.*, 1989; RUGOLO *et al.*, 1990) e de protozoários (DOCAMPO & VERCESI, 1989, A, B, 1994; VERCESI *et al.*, 1991A, 1991B, 1993A, B; DOCAMPO *et al.*, 1993; URIBE *et al.*, 1994; MORENO *et al.*, 1994; MORENO *et al.*, 1996; YURKOV *et al.*, 1997; THOMSON *et al.*, 1999; UYEMURA *et al.*, 2000) captam Ca^{2+} do meio externo por um processo dependente do $\Delta\Psi$. Esse transporte é mediado por um complexo sistema que compreende dois mecanismos: de influxo e de efluxo, este último ocorrendo por duas vias distintas, o efluxo Na^+ -dependente (CROMPTON *et al.*, 1976) e o efluxo Na^+ -independente (ROTTEMBERG & SCARPA, 1974; PUSKIN *et al.*, 1976; BYGRAVE, 1977; ÅKERMAN & NICHOLLS, 1983; GUNTER & PFEIFFER, 1990) (Figura 1).

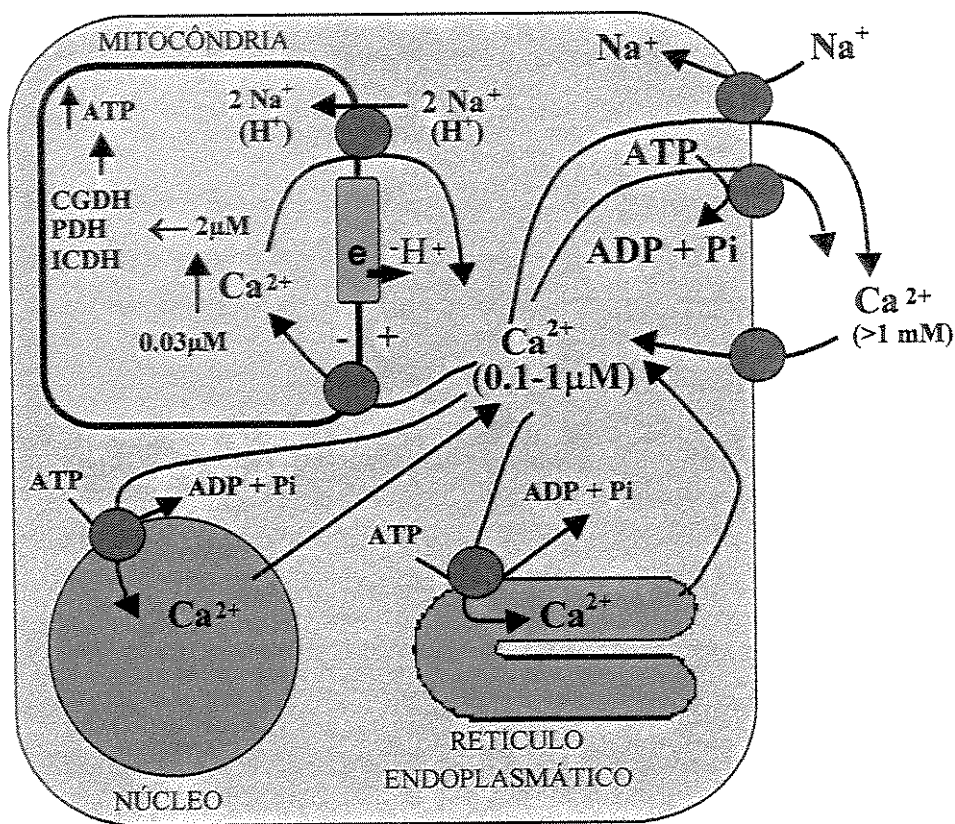


Figura 1 - Esquema sumarizando os mecanismos de transporte de Ca^{2+} localizados nas membranas plasmática, nuclear, mitocondrial e do retículo endo(sarco)plasmático em uma célula de mamífero.

O influxo de Ca^{2+} para a matrix mitocondrial ocorre por um processo eletroforético, em resposta ao potencial elétrico de membrana, negativo internamente, gerado pela atividade da cadeia respiratória ou hidrólise de ATP pela ATPase mitocondrial (GUNTER & PFEIFFER, 1990). O translocador de Ca^{2+} na membrana mitocondrial interna é sensível a vermelho de rutênio e lantanídeos (GUNTER *et al.*, 1994) e tem afinidade relativamente baixa pelo Ca^{2+} , com K_m entre 10 e 30 μM , dependendo da origem da mitocôndria e da composição do meio de reação (SARIS & ÅKERMANN, 1980; NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982; VERCESI, 1984A). Este transportador também liga e transporta outros cátions bivalentes com a seguinte afinidade: $\text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ (GUNTER

et al., 1994). Estes são similares ao Ca^{2+} e agem como inibidores competitivos. O vermelho de rutênio é um potente inibidor não competitivo da via de influxo com um K_i de cerca de 30 nM (REED & BYGRAVE, 1974A, B; GUNTER *et al.*, 1994).

Dois mecanismos de efluxo têm sido identificados em mitocôndrias de vertebrados, o processo Na^+ -dependente, que é principalmente ativo em tecidos excitáveis, e troca um íon Ca^{2+} interno por dois íons Na^+ externos (BRAND, 1985B; LI *et al.*, 1992) e o processo Na^+ -independente, que ocorre em mitocôndrias de uma maneira geral e opera por uma via que troca um íon Ca^{2+} por dois H^+ externos (ÅKERMAN, 1978; NICHOLLS, 1978; BRAND, 1985A). Estes translocadores apresentam velocidades máximas de efluxo de aproximadamente 1 e 5 nmoles/mg de proteína/min, respectivamente (VINAGRADOV & SCARPA, 1973; ANTONIO *et al.*, 1991). Algumas características da via Na^+ -independente indicam que a mesma não se comporta como uma via eletroneutra de troca 1 $\text{Ca}^{2+}/2 \text{H}^+$ (GUNTER *et al.*, 1983; GUNTER & PFEIFFER, 1990): 1) grande variação na estequiometria $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ quando medidas em meios com diferentes pH; 2) falta de estímulo com aumento no gradiente de pH; 3) ausência da troca Ca^{2+} - Ca^{2+} . O K_m aparente para o efluxo de Ca^{2+} é da ordem de 5 a 10 μM tanto para a via Na^+ -dependente quanto para a via Na^+ -independente (COLL *et al.*, 1982). Apesar das baixas concentrações destes transportadores na membrana mitocondrial eles já foram isolados e reconstituídos em lipossomas. Os dados cinéticos obtidos com estes translocadores reconstituídos estão de acordo com os valores encontrados em mitocôndrias intactas (GARLID, 1994).

O efluxo de Ca^{2+} mitocondrial pode também ocorrer pelo reverso da via de entrada eletroforética. Isto pode ser observado quando a concentração de Ca^{2+} externo é diminuída com o uso de quelantes como EGTA ou EDTA, pela redução do potencial elétrico de membrana causada por desacopladores como dinitrofenol e FCCP, ou por inibidores da respiração como rotenona, antimicina A e cianeto (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). Este efluxo também pode ser induzido pelo uso de oligomicina, quando o transporte de Ca^{2+} usa energia de hidrólise de ATP (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982).

A distribuição do íon Ca^{2+} entre o espaço intra e extramitocondrial em condições de equilíbrio é cineticamente regulada pelo movimento cíclico contínuo do mesmo através das vias de influxo e efluxo (NICHOLLS, 1978; NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982). Este movimento cíclico ocorre a velocidades muito baixas, em condições fisiológicas, devido ao alto K_m para influxo e baixa velocidade para o efluxo e mantém o Ca^{2+} livre extramitocondrial na faixa de 0,1 a 1,0 μM (NICHOLLS, 1978; COLL *et al.*, 1982). A habilidade da mitocôndria, particularmente na presença de Mg^{2+} e ATP, em tamponar o cálcio externo na faixa de concentração que se acreditava bastante próxima à encontrada no citosol *in vivo*, levou muitos investigadores a propor uma função importante a essa organela, na regulação da concentração de cálcio livre citosólico (NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1979; ÅKERMANN & NICHOLLS, 1983). Entretanto, alguns estudos mostram que o cálcio mitocondrial total de células normais *in vivo* é de aproximadamente 0,2 - 4,0 nmoles/mg de proteína mitocondrial, o que corresponde a concentrações entre 0,1 - 2,0 μM de Ca^{2+} livre na matriz (HANSFORD & CASTRO, 1982; SOMLYO *et al.*, 1985). Estes dados são incompatíveis com as características cinéticas dos translocadores que estariam envolvidos na regulação mitocondrial do Ca^{2+} citosólico e indicam que nas condições de repouso o translocador de influxo mitocondrial de Ca^{2+} é totalmente inoperante (HANSFORD, 1985; CARAFOLI, 1987; McCORMACK *et al.*, 1990). Outros estudos com mitocôndrias *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+} citoplasmáticas eram muito superiores às concentrações fisiológicas (BRINLEY *et al.*, 1977; BRINLEY *et al.*, 1978). Estes estudos demonstraram 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+} , era praticamente desprezível.

É amplamente aceito que a principal função do sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial seja regular a concentração de Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial em faixas de concentrações compatíveis com o estímulo da atividade de algumas enzimas regulatórias do ciclo de Krebs (HANSFORD 1985; CARAFOLI, 1987; McCORMACK *et al.*, 1990; GUNTER & GUNTER, 1994). Quando a concentração de Ca^{2+} citosólica aumenta em

resposta a algum estímulo externo, como por exemplo, sob a ação de hormônios que ativam processos que demandam energia (secreção, contração e outros), este sistema de captação de Ca^{2+} se torna operante. Assim a concentração de Ca^{2+} intramitocondrial também aumenta, na faixa de 0,03 a 2,0 μM , com o objetivo de estimular três desidrogenases (pirúvica, α -cetoglútica e isocítrica) que catalizam reações regulatórias do ciclo de Krebs. Isto resulta em estímulo da produção de ATP para suprir a demanda energética do processo celular estimulado pelo hormônio (HANSFORD, 1985; McCORMACK & DENTON, 1986). O $K_{0,5}$ encontrado para a ativação dessas desidrogenases pelo Ca^{2+} está na faixa de 0,2 a 1,0 μM dependendo da origem das mitocôndrias e das condições empregadas (para revisão ver HANSFORD, 1991). O mecanismo de ativação pelo Ca^{2+} é alostérico para a NAD-isocitrato desidrogenase (DENTON *et al.*, 1978) e α -cetoglutarato desidrogenase (McCORMACK & DENTON, 1986). O mecanismo de ativação para a piruvato desidrogenase é indireto e mediado pela ativação da fosfatase que remove grupos fosforil de resíduos de serina da forma inativa da enzima (TEAGUE *et al.*, 1982). Devido a esse efeito do Ca^{2+} , o mecanismo de controle respiratório pelo ADP, proposto por Chance & Williams em 1956, foi ampliado em termos da disponibilidade de ADP e Ca^{2+} (HANSFORD, 1985; McCORMACK & DENTON, 1986).

1.4. TRANSPORTE DE CÁLCIO POR MITOCÔNDRIAS VEGETAIS

O Ca^{2+} desempenha um papel chave no crescimento e desenvolvimento das plantas (BUSH, 1995). Uma deficiência de Ca^{2+} pode resultar na inibição do crescimento e no desenvolvimento de desordens fisiológicas (BANGERTH, 1979). Tem sido identificado um grande número de processos celulares que dependem de alterações nos níveis de Ca^{2+} citosólico para sua ativação (JOHANNES *et al.*, 1991). Este fato tem levado os pesquisadores de plantas a adotar a teoria que o Ca^{2+} atua como mensageiro intracelular, fornecendo informações sobre a natureza de estímulos particulares ou influência do estresse sobre as proteínas alvo que guiam a resposta celular.

Várias medidas estimam que a concentração intracelular do Ca^{2+} nas células vegetais em repouso varie entre 30 e 200 nM (BUSH, 1995). Mudanças rápidas na concentração do Ca^{2+} citosólico, a partir destes níveis basais, ocorrem em resposta a estímulos endógenos como hormônios de plantas e estímulos exógenos como a luz, sol, aquecimento e toque.

A habilidade das células manterem uma baixa concentração citosólica de Ca^{2+} ou responderem a estímulos através de mudanças no Ca^{2+} citosólico, ocorre devido às atividades combinadas de muitas proteínas que catalisam o transporte de Ca^{2+} através das membranas celulares. O efluxo de Ca^{2+} do citoplasma para o meio extracelular ou para dentro de organelas intracelulares requer energia e é catalisado por um conjunto de proteínas de membrana que utilizam ATP ou uma força próton motriz para dirigir o movimento do Ca^{2+} (BUSH, 1995).

Características do transporte de Ca^{2+} por algumas mitocôndrias vegetais, indicam que o mesmo deve ter um papel significativo na homeostase do Ca^{2+} no nível celular (CARNIERI *et al.*, 1987). O Ca^{2+} regula funções como: balanço iônico, motilidade, expressão gênica, metabolismo de carboidratos, mitose e secreção (BUSH, 1995). Cloroplastos e mitocôndrias contêm níveis milimolares de cálcio total, o qual está complexado em sua maioria, com fosfato ou lipídios de membrana. A elevação do nível de Ca^{2+} em plastídios e mitocôndrias é atribuído à manutenção do potencial de membrana, que se eleva como resultado da fotossíntese ou respiração (BUSH, 1995).

Estudos tem mostrado que o transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias de plantas varia em muitos aspectos entre diferentes espécies vegetais (CHEN & LEHNINGER, 1973; DIETER & MARMÉ, 1980; DAY & WISHICH, 1984) e idades dentro da mesma espécie (DIETER & MARMÉ, 1980).

O desenvolvimento de uma técnica para a obtenção de mitocôndrias intactas e funcionais (MARTINS & VERCESI, 1985) e posterior estudo do transporte mitocondrial de Ca^{2+} , levou à conclusão que o acúmulo do íon por algumas espécies vegetais era acompanhado pela extrusão de H^+ , aumento da velocidade respiratória, decréscimo do potencial de membrana (inibido por vermelho de rutênio e Mg^{2+}) e também que a captação

de Ca^{2+} ocorre de forma semelhante em mitocôndrias energizadas por substratos respiratórios diferentes ou por hidrólise de ATP (MARTINS *et al.*, 1986; CARNIERI *et al.*, 1987).

Mostrou-se que mitocôndrias isoladas de coleóptiles de milho (*Zea mays*), hipocótilos de soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e café (*Coffea arabica*) são ativas no acúmulo de Ca^{2+} acoplado à respiração (HANSON *et al.*, 1964; CHEN & LEHNINGER, 1973; MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS *et al.*, 1986; CARNIERI *et al.*, 1987). No entanto, mitocôndrias de folhas brancas de repolho (*Brassica oleraceae*), tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*) e raízes de beterraba (*Beta vulgaris*), não são capazes de acumular Ca^{2+} , apesar da capacidade de formar um alto potencial elétrico de membrana, indicando que não possuem um uniporter eletroforético funcional de Ca^{2+} (MARTINS & VERCESI, 1985; SILVA *et al.*, 1992). Tubérculos de batata são um exemplo de tecido dormente. Eles funcionam como um tecido de reserva de amido durante o verão e na primavera o amido é mobilizado para formar uma nova planta. Estudos demonstraram que a fosforilação oxidativa em mitocôndrias de batata é bastante acoplada e não existe relação obrigatória entre estado de acoplamento e atividade específica das enzimas.

1.5. TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL (TPM)

1.5.1. Mitocôndrias de Mamíferos

A TPM é caracterizada por uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que gradativamente se torna permeável a prótons, outros íons, suporte osmótico e até mesmo pequenas proteínas (ZORATTI & SZABÒ, 1995, VERCESI *et al.*, 1997). Estudos recentes demonstraram que sob certas condições patológicas, o Ca^{2+} da matriz mitocondrial pode alcançar uma concentração capaz de iniciar o processo de TPM em mitocôndrias de mamíferos (HALESTRAP *et al.*, 1997; LEMASTERS, 1998; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; CROMPTON, 1999). Esta permeabilização,

dependente da presença de Ca^{2+} no espaço intramitocondrial, é inibida por concentrações submicromolares do imunossupressor ciclosporina A (CROMPTON *et al.*, 1988, BROEKEMEIER *et al.*, 1989; GUNTER & PFEIFFER, 1990). O nome "transição de permeabilidade" é utilizado devido à observação de que a permeabilização mitocondrial nesta situação pode ser parcialmente revertida pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou redutores ditiólicos, logo após o início do processo de permeabilização (HUNTER *et al.*, 1976; HUNTER & HAWORTH, 1979, VALLE *et al.*, 1993, CASTILHO *et al.*, 1996).

Estudos evidenciaram vários agentes potencializadores da transição de permeabilidade induzida por Ca^{2+} , como: fosfato inorgânico (Pi) (ROSSI & LEHNINGER, 1964), oxidantes de nucleotídeos de piridina (LEHNINGER *et al.*, 1978, VERCESI, 1984, 1984A, 1984B, BERNARDES *et al.*, 1986), protonóforos (BERNARDI, 1992) e reagentes ditiólicos (LENATOWICS *et al.*, 1991, BERNARDES *et al.*, 1994) denominados como "agentes liberadores de Ca^{2+} " ou "indutores" (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Foram identificados também agentes que protegem a mitocôndria contra os efeitos deletérios do Ca^{2+} , como ADP, ATP, Mg^{2+} , anestésicos locais e redutores de grupos dissulfeto. Pesquisadores sugeriram que a permeabilização da membrana mitocondrial por Ca^{2+} poderia ser estimulada pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina e revertida pela redução desta coenzima (LEHNINGER *et al.*, 1978; VERCESI *et al.*, 1978). Esta descoberta estimulou muitos grupos a realizar trabalhos referentes a este tema, utilizando mitocôndrias isoladas (GUNTER & PFEIFFER, 1990) células isoladas (BELLOMO *et al.*, 1982) e até órgãos perfundidos (SIES, 1986). Estes estudos estabeleceram uma importante relação entre o poder redutor mitocondrial e a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (RICHTER & FREI, 1988). Trabalhos recentes sugerem que a TPM seja uma condição regulada por Ca^{2+} através da abertura de um canal protéico sensível a ciclosporina A (o poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial - PTP) (GUNTER *et al.*, 1994; ZORATTI & SZABÒ, 1995; CROMPTON *et al.*, 1988; BROEKEMEIER *et al.*, 1989; CROMPTON *et al.*, 1999) que permite um equilíbrio de solutos com peso molecular de até 1500 Da (HUNTER *et al.*, 1976). A conformação fechada deste poro é favorecida pelo alto potencial elétrico transmembrana (BERNARDI, 1992) e acidificação da matriz (BERNARDI *et al.*, 1992). Tem sido proposto que o PTP possa operar em condições patológicas, tais como isquemia/reperfusão (NAZARETH *et al.*, 1991;

PASTORINO *et al.*, 1993) ou mesmo em condições fisiológicas (BRUSTOVETSKY *et al.*, 1993; BERNARDI *et al.*, 1994). Algumas revisões sobre a regulação (GUNTER *et al.*, 1994; ZORATTI & SZABÒ, 1995; BERNARDI *et al.*, 1994) e características eletrofisiológicas (ZORATTI & SZABÒ, 1995) do PTP foram publicadas. Os estudos desenvolvidos em nosso laboratório vem dando ênfase sobretudo à participação de espécies reativas de oxigênio e oxidação de grupos tióis protéicos na TPM (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001).

Apesar da existência de muitos estudos, o papel da TPM ainda permanece desconhecido. É proposto que a TPM participe de funções mitocondriais fisiológicas (BRUSTOVETSKY *et al.*, 1993; BERNARDI *et al.*, 1994; BERNARDI & PETRONILLI, 1996) tais como eliminar o excesso de Ca^{2+} da matriz, permitir o transporte de proteínas ou até mesmo participar de mecanismos de geração de calor. Por outro lado, as características inespecíficas da TPM, levando ao inchamento coloido-osmótico da matriz mitocondrial (GUNTER & PFEIFFER, 1990) e finalmente, perda de proteínas da matriz (IGBAVBÓA *et al.*, 1989), são incompatíveis com a manutenção da integridade mitocondrial. Nesse contexto, várias evidências indicam que a TPM possa estar relacionada com o dano e morte celular em situações de estresse oxidativo, como na isquemia/reperfusão (NAZARETH *et al.*, 1991; PASTORINO *et al.*, 1993; GRIFFITHS & HALESTRAP, 1995).

1.5.2. Mitocôndrias Vegetais

Estudos muito recentes tem tentado caracterizar a existência de um poro de transição de permeabilidade em mitocôndrias vegetais (FORTES *et al.*, 2001; ARPAGAUSS *et al.*, 2002; CURTIS & WOLPERT, 2002; TIWARI *et al.*, 2002).

Jones (2000), discutiu em seu trabalho o papel de mitocôndrias e poro de transição de permeabilidade como possíveis sensores de estresse e desencadeadores de morte celular programada em células animais e vegetais. Vianello *et al.* (1995) utilizando mitocôndrias de hastes de ervilhas observaram que a fase *lag*, que precede o colapso do $\Delta\Psi$ induzido por FCCP, foi aumentada na presença de CsA. No entanto, estas mitocôndrias não

apresentaram inchamento, o que foi sugerido como uma característica intrínseca e específica destas organelas.

Arpagaus *et al* (2002) utilizando mitocôndrias isoladas de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*), observaram que em presença de CsA e ditieritritol (DTE) o inchamento de mitocôndrias de batata induzido por altas concentrações de Ca^{2+} , poderia ser completamente inibido, caracterizando a presença de um PTP sensível à CsA. No entanto, sabe-se que somente o DTE, um redutor de grupos $-\text{SH}$, é capaz de prevenir este inchamento nestas mitocôndrias. Este resultado, bem como as condições experimentais utilizadas pelos autores, contrastam com nosso trabalho e será discutido posteriormente com mais detalhes (Figura 15).

Existem muitas controvérsias no sentido de esclarecer a presença ou não de um PTP em mitocôndrias vegetais e também, se este poro é sensível (ARPAGAUS *et al.*, 2002; TIWARI *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2002) ou não à CsA (FORTES *et al.*, 2001; CURTIS & WOLPERT, 2002). São necessários mais estudos, utilizando diferentes mitocôndrias vegetais para o estabelecimento das condições de funcionamento e existência deste PTP.

1.6. PRODUÇÃO MITOCONDRIAL DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

1.6.1. Mitocôndrias de Mamíferos

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por mitocôndrias é um evento fisiológico e contínuo em condições aeróbicas (Figura 2). Aproximadamente 2% do total de oxigênio (O_2) consumido resulta na geração de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) na NADH-coenzima Q e coenzima QH_2 -citocromo c desidrogenases (complexos I e III) (BOVERIS *et al.*, 1972; CADENAS *et al.*, 1977; TURRENS, 1997; MOLLER, 2001), devido à redução monoeletrônica do O_2 . Apesar da reatividade moderada do $\text{O}_2^{\bullet -}$ em solução aquosa, ele pode gerar uma espécie reativa de oxigênio altamente citotóxica, o radical hidroxil ($\text{HO}^{\bullet}$), através da clivagem homolítica e redutora do H_2O_2 , um produto da dismutação do $\text{O}_2^{\bullet -}$ (DUNFORD, 1987). É provável que a maior parte do $\text{HO}^{\bullet}$ gerado *in vivo* seja resultado

da Reação de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-$) (BOVERIS & CHANCE, 1973; SUTTON & WINTERBOURN, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante (Figura 2), representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), NAD(P)-transhidrogenase (TH), e outros componentes tais como glutathione (GSH), NADPH, vitaminas E e C (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; VERCESI & HOFFMANN, 1993). Em condições fisiológicas, os sistemas oxidantes e antioxidantes da organela estão em equilíbrio, mas em condições nas quais um excesso de espécies reativas de O_2 (EROs) é produzido e/ou o sistema antioxidante de defesa está depletado, um estado de estresse oxidativo é gerado. Nestas condições muitas alterações oxidativas de componentes da membrana mitocondrial podem ocorrer, tais como peroxidação lipídica e oxidação de tióis protéicos, levando à permeabilização e disfunção mitocondriais e também oxidação do DNA mitocondrial (VERCESI & HOFFMANN, 1993).

Nosso grupo demonstrou que a TPM causada por Ca^{2+} , ou Ca^{2+} na presença de diferentes agentes indutores, ocorre devido a um aumento na produção mitocondrial de ROS e é caracterizada pela oxidação de grupos tióis de proteínas de membrana (KOWALTOWSKY & VERCESI, 1999).

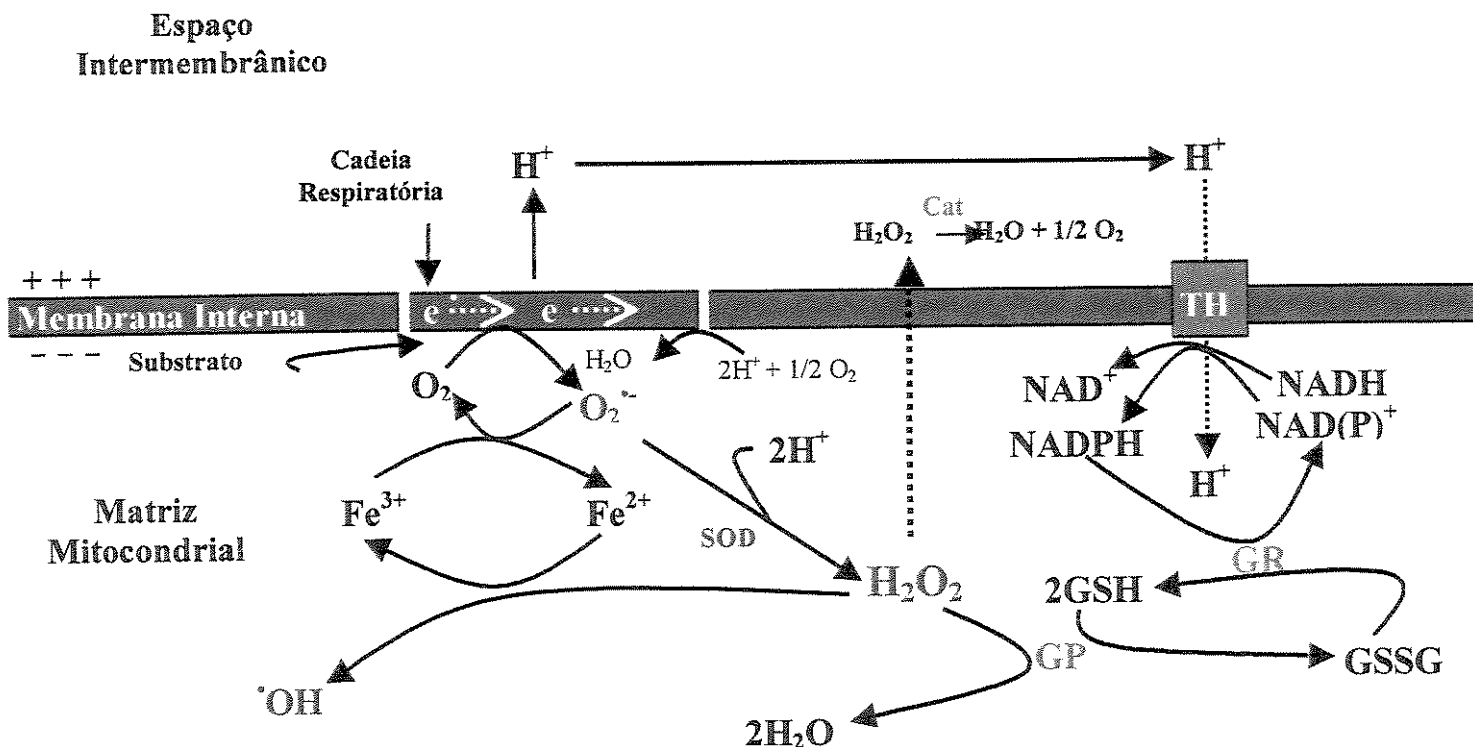


Figura 2 - Produção Mitocondrial de Espécies Reativas de Oxigênio e Principais Defesas Antioxidantes.

Em 1980, Cadenas & Boveris demonstraram que a produção mitocondrial de $O_2^{\bullet -}$ / H_2O_2 era aumentada por ionóforos e altas concentrações de Ca^{2+} . Partículas submitocondriais de coração de boi são fontes efetivas de $O_2^{\bullet -}$ / H_2O_2 . Foi mostrado por Grijalba e colaboradores (1999) que a ligação de Ca^{2+} à partículas submitocondriais, provavelmente a cardiolipina (único lipídeo aniônico presente na mitocôndria), causa alterações (empacotamento) na organização dos lipídios e separação de fase, condições que comprometem a conformação e a funcionalidade de proteínas e enzimas da membrana. Nestas condições, a produção de radicais livres pode ser aumentada, de acordo com o aumento de H_2O_2 por mitocôndrias na presença de Ca^{2+} (CASTILHO *et al.*, 1995A; GRIJALBA *et al.*, 1999).

1.6.2. Mitocôndrias Vegetais

Estima-se que aproximadamente 1% do O_2 total consumido pelos tecidos vegetais se converta em EROs (PUNTARULO *et al.*, 1988). Como em mamíferos, mitocôndrias de células vegetais não fotossintetizantes são as maiores, senão a maior fonte de produção de EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). No entanto a importância relativa de mitocôndrias e cloroplastos na produção de EROs sob a luz ainda não é conhecida (MOLLER, 2001).

Em repouso, as concentrações celulares de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em células de mamíferos são de aproximadamente 10^{-12} - 10^{-11} M e 10^{-9} – 10^{-7} M respectivamente (CHANCE *et al.*, 1979). Até o momento, o único valor estimado para tecidos de plantas sob condições normais é de 5 de H_2O_2 em eixos embriônicos de feijão, aumentando para 50 quando a atividade da catalase é inibida (PUNTARULO *et al.*, 1988). No entanto, estes valores apresentam ordens de magnitude muito superiores aos valores propostos para os mamíferos, necessitando ainda de confirmação.

Em mitocôndrias de plantas, o modo de ação das EROs ainda não está clara porque: i) Poucos estudos tem sido realizados; ii) Os valores de EROs sintetizados por tecidos vegetais variam numa razão de cerca de 100 vezes;iii)A maioria dos estudo não tem obtido êxito ao considerar as possíveis contribuições das NAD(P)H desidrogenases não bombeadoras de prótons.

Apesar destes problemas, algumas considerações podem ser feitas sobre a produção de EROs por mitocôndrias isoladas de plantas: 1) Mitocôndrias vegetais produzem quantidades iguais ou superiores de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 do que mitocôndrias de mamíferos; 2) A produção de Eros diminui quando a AOX está ativada(PURVIS *et al.*, 1995; BRAIDOT *et al.*,1999); 3) Quantidades substanciais de formação de $O_2^{\bullet-}$ podem ser detectadas em mitocôndrias intactas de vários vegetais (ervilhas, hipocótilos de feijão e tubérculo de batata) durante a oxidação do substrato respiratório (PURVIS *et al.*, 1995; PURVIS 1997); 4) Em alguns casos, a produção de EROs é completamente inibida por KCN, indicando que o complexo III é a única fonte de produção de EROs antes da adição de KCN (PURVIS *et al.*, 1995; PUNTARULO *et al.*, 1988). Em outros casos, ocorre uma

alta produção de EROs na presença de KCN, indicando que o complexo I e/ou as outras desidrogenases são o maiores sítios de produção de EROs (RICH & BONNER, 1978; PURVIS, 1997).

Desta forma, pode-se afirmar que mitocôndrias vegetais respirando ativamente, produzem EROs em altas quantidades e que os seus principais sítios de produção são os complexos respiratórios I e III. No entanto, para se entender o metabolismo da produção de EROs por mitocôndrias vegetais ainda são necessários muitos estudos nesta área (MOLLER, 2001).

1.7. TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INDUZIDA POR Ca^{2+} EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO

O conteúdo protéico das membranas mitocondriais varia entre 60 e 65%, e pode chegar a 75% na membrana mitocondrial interna (LEHNINGER, 1964; NICHOLLS & FERGUSON, 1982). Devido ao alto conteúdo protéico da membrana mitocondrial interna, é esperado que estas proteínas sejam um dos principais alvos das EROs geradas pela mitocôndria. As proteínas da membrana mitocondrial sofrem extensa oxidação em condições de estresse oxidativo mitocondrial induzido por Ca^{2+} (FAGIAN *et al.*, 1990, VALLE *et al.*, 1993, TAKAYAMA *et al.*, 1994; CASTILHO *et al.*, 1995A KOWALTOWSKI *et al.* 1996, 1996A; CASTILHO *et al.* 1996).

As EROs são capazes de oxidar resíduos de cisteína e metionina protéicos, levando à formação de ligações cruzadas S-S e sulfóxido de metionina, respectivamente. Como a oxidação de resíduos de metionina tem pouco efeito sobre a estrutura e função protéica, provavelmente a disfunção mitocondrial ocorra devido à oxidação de proteínas da membrana mitocondrial levando à oxidação de resíduos de cisteína e formação de ligações cruzadas S-S (FAGIAN *et al.*, 1990; CASTILHO *et al.*, 1996; BERLETT & STADMAN, 1997).

O efluxo de Ca^{2+} de mitocôndrias isoladas é estimulado pela presença de nucleotídeos de piridina ou pela oxidação destes nucleotídeos pela cadeia respiratória na ausência do inibidor rotenona (LEHNINGER *et al.*, 1978; VERCESI *et al.*, 1978; COELHO & VERCESI, 1980). Estas condições experimentais podem induzir a uma

situação de estresse oxidativo *in vitro*, por exaustão de GSH e NADPH mitocondriais, substratos das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e glutathione reductase, favorecendo o acúmulo de H_2O_2 (BEATRICE *et al.*, 1984; VERCESI, 1993). Estudos utilizando estes e outros prooxidantes, como diamida e *t*-butil hidroperóxido, demonstraram que este efluxo de Ca^{2+} ocorria devido a TPM (BERNARDES *et al.*, 1986; VALLE *et al.*, 1993; CASTILHO *et al.*, 1995B). Posteriormente, outros estudos comprovaram que as alterações oxidativas das proteínas da membrana mitocondrial interna que ocorrem somente na presença de Ca^{2+} , levam à TPM (ZORATTI & SZABÒ, 1995; VERCESI *et al.*, 1997).

A TPM induzida por Ca^{2+} pode ser estimulada por um grande número de compostos conhecidos como indutores (ZORATTI & SZABÒ, 1995). A maioria destes indutores são compostos capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial promovido pelo Ca^{2+} (CASTILHO *et al.*, 1995A; KOWALTOWSKI *et al.*, 1996, 1996A; VERCESI *et al.*, 1997; CASTILHO *et al.*, 1998). A primeira evidência de que a TPM era causada por EROs geradas pela mitocôndria foi apresentada quando Lehninger e colaboradores demonstraram que o estado oxidado de nucleotídeos de piridina estimulava o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial (LEHNINGER *et al.*, 1978; VERCESI, 1984, 1984A, 1984B). Este efluxo foi posteriormente atribuído a uma permeabilização mitocondrial não específica (NICHOLLS & BRAND, 1980). Os oxidantes de nucleotídeos de piridina promovem o acúmulo de H_2O_2 em mitocôndrias porque o sistema glutathione peroxidase/glutathione reductase mitocondrial é reduzido por nucleotídeos de piridina (MEISTER & ANDERSON, 1983; CHANCE *et al.*, 1979).

A similaridade entre as alterações na membrana mitocondrial causadas por sistemas geradores de espécies reativas de oxigênio e outros indutores da TPM, sugere que a permeabilização da membrana mitocondrial induzida por Ca^{2+} seja uma situação relacionada com o estresse oxidativo mitocondrial. Esta proposta é apoiada pelo fato de que um grande acúmulo de Ca^{2+} por mitocôndrias é capaz de aumentar a produção mitocondrial de EROs (CADENAS & BOVERIS, 1980; CASTILHO *et al.*, 1995A; HERMES-LIMA, 1995; GRIJALBA *et al.*, 1999).

A participação de EROs geradas pela mitocôndria no mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial por Ca^{2+} foi comprovada através de experimentos mostrando que a catalase exógena previne a queda do potencial de membrana e o inchamento mitocondrial causado por Ca^{2+} ou por Ca^{2+} em presença de *t*-butil hidroperóxido (VALLE *et al.*, 1993; CASTILHO *et al.*, 1995A) e por experimentos mostrando que não ocorre permeabilização mitocondrial na ausência de oxigênio molecular ou na presença de *o*-fenantrolina (CASTILHO *et al.*, 1995B), um quelante de Fe^{2+} . O Fe^{2+} é necessário para a produção do radical $\text{HO}^{\bullet}$ via reação de Fenton (SUTTON & WINTERBOURN, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Outros estudos como: a dependência de Ca^{2+} no aumento da geração mitocondrial de EROs precedendo a TPM induzida por Ca^{2+} (KOWALTOWSKI *et al.*, 1995), Ca^{2+} e P_i (KOWALTOWSKI *et al.*, 1996, 1996A) e Ca^{2+} e protonóforos (KOWALTOWSKI *et al.*, 1996), contribuíram ainda mais para a hipótese de que a TPM induzida por Ca^{2+} seja dependente de EROs.

A realização destes estudos se tornou possível, em grande parte, devido ao desenvolvimento de um protocolo para o estudo de TPM em mitocôndrias desenergizadas e tratadas com um inibidor de cadeia respiratória (VERCESI *et al.*, 1988), uma condição experimental que apresenta a vantagem de eliminar a participação de respiração, potencial de membrana e captação eletroforética de Ca^{2+} no processo estudado (VERCESI & HOFFMANN, 1993). Nesta situação, o influxo de Ca^{2+} na mitocôndria pode ser promovido por um gradiente de concentração do cátion.

Na ausência de EROs, pode-se promover TPM através do uso de reagentes ditiólicos, como o ácido 4,4'-diisotiocianatostilbene-2,2'-dissulfônico (DIDS – BERNARDES *et al.*, 1994; CASTILHO *et al.*, 1995A) e óxido de fenilarsina (LENARTOWICS *et al.*, 1991; KOWALTOWSKI *et al.*, 1997; KOWALTOWSKI & CASTILHO, 1997). A semelhança entre a TPM promovida por EROs e por reagentes ditiólicos nos levou a propor que as EROs mitocondriais induzem a TPM por oxidar e promover a ligação cruzada entre grupamentos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial. Esta hipótese foi confirmada pela diminuição da concentração de tióis protéicos e pelo aparecimento de agregados protéicos de alto peso molecular em mitocôndrias que sofreram TPM (FAGIAN *et al.*, 1990; CASTILHO *et al.*, 1995A; CASTILHO *et al.*, 1996; KOWALTOWSKI *et al.*, 1997,).

Embora a oxidação de grupamentos tiólicos na TPM seja um processo extenso (KOWALTOWSKI *et al.*, 1997), é provável que a permeabilização da membrana mitocondrial seja promovida pela oxidação de um grupo específico de proteínas, o que explicaria o caráter parcialmente reversível e regulado da TPM (LEHNINGER *et al.*, 1978; VALLE *et al.*, 1993; ZORATTI & SZABÒ, 1995; CASTILHO *et al.*, 1996). O translocador de ADP/ATP é a proteína mais abundante da membrana mitocondrial interna em mitocôndrias de mamíferos e possui quatro resíduos de cisteína (KLINGENBERG, 1989) e certamente está envolvido no processo de TPM. Ligantes do translocador de ADP/ATP que o mantêm na sua configuração *c*, como ADP e bongkreonato, inibem e até reverterem a TPM, enquanto ligantes que mantêm o translocador em sua conformação *m*, como o carboxiatractilósido, promovem TPM (HUNTER & HAWORTH, 1979; VERCESI, 1984 B; CASTILHO *et al.*, 1996). O ADP também é capaz de inibir parcialmente a TPM, de modo sensível a oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial (CASTILHO *et al.*, 1996). Por outro lado, Novgorodov e colaboradores (1994) demonstraram que o translocador de ADP/ATP participa indiretamente da formação do poro de TPM. Estes resultados sugerem que alterações na configuração do translocador de ADP/ATP podem mudar o posicionamento de grupamentos tiólicos de proteínas de membrana, promovendo ou inibindo sua oxidação, e, conseqüentemente, a ocorrência de TPM (VERCESI *et al.*, 1997).

1.8. POSSÍVEIS AÇÕES DO CÁLCIO NO PROCESSO DE PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

A presença do Ca^{2+} na matriz mitocondrial é necessária para induzir a transição de permeabilidade (ZORATTI & SZABÒ, 1995) em mitocôndrias de mamíferos. Isto é comprovado pela inibição da permeabilização mitocondrial pelo vermelho de rutênio, que bloqueia a via de influxo de Ca^{2+} (REED & BYGRAVE, 1974A). De acordo com dados da literatura, o Ca^{2+} pode agir em quatro etapas na indução da TPM: i) estimulando a produção de $\text{O}_2^{\bullet}/\text{H}_2\text{O}_2$ pela cadeia respiratória (CADENAS & BOVERIS, 1980; CASTILHO *et al.*, 1995A), ii) estimulando a reação de Fenton através da mobilização de Fe^{2+} da matriz

mitocondrial (CASTILHO *et al.*, 1995B); iii) expondo grupos tióis de proteínas da membrana, permitindo a TPM na presença de reagentes tióis hidrofílicos (KOWALTOWSKI *et al.*, 1996 B); iv) regulando diretamente a abertura do PTP por se ligar a proteínas específicas da membrana mitocondrial (GUNTER & PFEIFFER, 1990; GUNTER *et al.*, 1994; ZORATTI & SZABÒ, 1995; BERNARDI *et al.*, 1994; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). A inibição competitiva por dibucaína, um anestésico local que compete com o Ca^{2+} por sítios de ligação na membrana (VERCESI *et al.*, 1988; BERNARDI *et al.*, 1993), também sugere que a ligação de Ca^{2+} a lipídeos (cardiolipinas) de membrana seja importante para a indução da TPM.



2. OBJETIVOS

Além do seu papel econômico, as plantas constituem um modelo de pesquisa interessante por serem organismos autotróficos, fotossintetizantes e que se encontram naturalmente expostos às mais variadas condições de estresse, como variações de temperatura, solos, ataque de patógenos e suprimento de água. 7

Existem muitos estudos referentes à TPM e seus mecanismos de ação em mitocôndrias de células animais, porém muito pouco é conhecido em relação às mitocôndrias vegetais. Com o objetivo de expandir nossos conhecimentos sobre transição de permeabilidade em mitocôndrias vegetais utilizamos mitocôndrias de batata (*Solanum tuberosum*) e de batata doce (*Ipomoea batatas*) por apresentarem diferenças referentes à capacidade de captar e acumular o Ca^{2+} . Assim, estas mitocôndrias são um modelo adequado para esclarecer a relação entre a presença de um sistema transportador de Ca^{2+} e a ocorrência da transição de permeabilidade mitocondrial.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULO DE BATATA E DE BATATA DOCE

Mitocôndrias de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum* variedade Bintje) e de batata doce (*Impomoea batatas*) foram isoladas de acordo com o procedimento descrito por Beavis & Vercesi (1992). Aproximadamente 1 kg de batatas foram descascadas e cortadas em pequenos pedaços e em seguida trituradas em centrífuga doméstica usando um litro do meio de extração contendo: sacarose 250 mM, HEPES-K⁺ 10 mM pH 8,0, EGTA 2 mM, cisteína 3 mM e BSA 1 mg/ml. A solução resultante foi filtrada, o pH ajustado para 7.6 e em seguida centrifugada durante 15 minutos a 1000 g. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos e o precipitado resultante contendo as mitocôndrias foi ressuspenso em aproximadamente 40 ml de solução contendo sacarose 250 mM, HEPES-K⁺ 2 mM pH 7,1 e EGTA 0,1 mM e foi centrifugado duas vezes a 250 g por 10 minutos. Os precipitados de amido foram descartados após cada centrifugação. As mitocôndrias foram então coletadas por centrifugação a 6000 g por 15 minutos. O precipitado final foi ressuspenso em cerca de 1 ml de sacarose 250 mM obtendo-se uma suspensão de proteínas com concentração aproximada de 20 a 30 mg de proteína por ml. Para purificação de mitocôndrias de tubérculo de batata, porções do precipitado final foram adicionados à superfície de gradientes compostos por: sacarose 250 mM, HEPES-K⁺ 10 mM pH 7,2, EGTA 0,3 mM e Percoll 21%. A mistura foi centrifugada a 39.000 g por 30 minutos. Duas bandas foram recuperadas a partir do gradiente: uma banda densa correspondente a cerca de dois terços que está na parte inferior do tubo equivalente às mitocôndrias purificadas e na banda de cima foram isolados os contaminantes. As mitocôndrias purificadas foram removidas com uma pipeta Pasteur e foram diluídas em 30 ml de meio contendo: sacarose 250 mM, Hepes-K⁺ 2 mM pH 7,1 e EGTA 0,1 mM e centrifugado durante 15 minutos a 19.000 g para remoção do Percoll. O precipitado foi ressuspenso em cerca de 1 ml de sacarose 250 mM obtendo-se uma suspensão de proteínas com concentração aproximada de 15 a 20 mg/ml.

3.2. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

Mitocôndrias foram isoladas de fígados de ratos Wistar mantidos em jejum por aproximadamente 16 horas durante a noite, utilizando o método convencional de centrifugação diferencial, como descrito por Schneider & Hogeboom (1950). O fígado, retirado após a morte do animal por concisão cerebral, foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2.500 g por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 10.000 g sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em sacarose 250 mM, HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,3 mM, e novamente centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução sendo que isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 100 mg de proteína por ml.

3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (GORNALL *et al*, 1949), modificado pela adição de colato 1% (KAPLAN & PEDERSEN, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

3.4. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO ($\Delta\Psi$) DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

O potencial de membrana mitocondrial foi monitorado através da medida das alterações de fluorescência da safranina O (5 μ M) utilizando o espectrofotômetro Hitachi modelo F-4010 (Hitachi Ltd, Tóquio, Japão) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 e 586 nm respectivamente (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976).

A calibração foi feita pela titulação do potencial de membrana com a captação de concentrações conhecidas de potássio (K^+) pela mitocôndria na presença de valinomicina, em meio de reação isento de potássio e contendo sacarose 200 mM, HEPES 20 mM pH 7,2, $MgCl_2$ 1,0 mM, rotenona 4,0 μM , EGTA 0,3 mM, succinato 5,0 mM, valinomicina 0,06 $\mu g/ml$. Foram realizadas adições sucessivas de KCl, seguidas de uma adição de nigericina 0,15 $\mu g/ml$. Os valores de potencial de membrana foram calculados utilizando a equação de Nernst, considerando-se a concentração intramitocondrial inicial de K^+ igual a 120 mM.

3.5. MEDIDA DE INCHAMENTO MITOCONDRIAL

O inchamento mitocondrial foi estimado a partir da queda de absorbância (A) da suspensão mitocondrial a 520 nm medida em espectrofotômetro Hitachi U-3000 (BEAVIS *et al*, 1985; GARLID & BEAVIS, 1985). Esta técnica gera uma variável “ β ” de dispersão de luz, a qual normaliza a absorbância recíproca, pela concentração de proteína mitocondrial, “P” (miligramas/ml), de acordo com a fórmula:

$$\beta = \frac{P}{P_s} (A^{-1} - a)$$

Onde “a” corresponde a uma constante do aparelho e “ P_s ” (igual a 1 mg/ml) é uma constante introduzida para fazer o redimensionamento de “ β ”.

3.6. TRANSPORTE DE CÁLCIO POR MITOCÔNDRIAS

O movimento de Ca^{2+} através das mitocôndrias foi verificado determinando-se as variações de absorbância do complexo Ca^{2+} -arsenazo III nos comprimentos de onda 665-685 nm (SCARPA, 1979). O aparelho utilizado foi um espectrofotômetro SLM Aminco DW2000 com capacidade de determinar as diferenças de absorbância em dois comprimentos de onda em uma mesma cubeta. O corante arsenazo III apresenta espectros

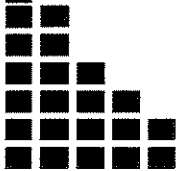
de absorção diferentes na forma livre ou ligada ao Ca^{2+} . A variação na diferença de absorbância nos comprimentos de onda 665-685 nm está associada a variações na concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação. As calibrações foram feitas determinando-se as variações de absorbância em função de adições de concentrações conhecidas de EGTA, estipuladas considerando-se a concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação.

3.7. MEDIDA DA ATIVIDADE DA PEPTIDILPROLIL-*CIS-TRANS* ISOMERASE

A atividade da peptidilprolil *cis-trans* isomerase foi determinada pelo procedimento descrito por Fischer *et al.* (1989). Este ensaio foi baseado na isomerização *cis-trans* do peptídeo *N*-succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil 4-nitroanilide. A quimotripsina hidrolisa o peptídeo somente quando a ligação Ala-Pro estiver na conformação *trans*, esta reação é acompanhada pelo aumento da absorbância a 390 nm. Mitocôndrias (0,25 mg/ml) foram incubadas durante 2 min à temperatura ambiente em meio de reação contendo tampão Hepes- K^+ 40 mM (pH 8.0) e Triton X-100 0.05%, seguido pela pré-incubação de 30 segundos com quimotripsina 20 μM . As medidas de absorbância a 390 nm foram iniciadas 2 segundos após a adição de *N*-succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil 4-nitroanilide usando um espectrofotômetro DW 2000 Aminco SLM.

3.8. PROCEDIMENTO DE INCUBAÇÃO

Os experimentos foram realizados a 30°C em meio de reação descrito nas legendas das figuras. Os resultados mostrados são representativos de séries de no mínimo três experimentos, utilizando diferentes preparações mitocondriais.



4. RESULTADOS

O inchamento mitocondrial constitui-se em uma das manifestações do fenômeno de TPM. O mecanismo deste inchamento possui natureza colóide-osmótica e ocorre devido ao fato das moléculas pequenas atingirem equilíbrio de concentração através de alterações de permeabilidade da membrana mitocondrial interna, enquanto as proteínas ficam retidas na matriz, gerando um maior desequilíbrio osmótico. As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio, e, qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a consequente diminuição da luz espalhada. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias são ideais à aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre desdobramento de suas pregas anterior ao seu rompimento.

Nos experimentos de inchamento mitocondrial foram utilizadas condições experimentais que excluíssem qualquer interferência do potencial de membrana gerado pela cadeia respiratória bem como o movimento de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna. Para tanto foram utilizadas mitocôndrias desenergizadas e desacopladas por antimicina A e FCCP. A diamida foi escolhida como agente indutor da TPM por tratar-se de um composto oxidante de grupos -SH clássico em mitocôndrias animais com efeitos bem conhecidos nessas organelas (KOSOWER *et al.*, 1969; SILIPRANDI *et al.*, 1974, 1975; BEATRICE *et al.*, 1980; FAGIAN *et al.*, 1990; PETRONILLI *et al.*, 1994). Este indutor é responsável por um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna de fígado de rato, quando o Ca^{2+} apresenta-se ligado a sítios internos desta membrana (GUNTER & PFEIFFER, 1990) e está relacionada no grupo de substâncias conhecidas como agentes liberadores de Ca^{2+} ou indutores de TPM (ZORATTI & SZABÒ, 1995).

Os resultados da Figura 3 mostram que a queda de absorbância da suspensão mitocondrial de tubérculos de batata expressa por ' β ' que corresponde a um variável de dispersão de luz, foi induzida por concentrações crescentes de Ca^{2+} (200-800 μM) ocorre

de modo proporcional à concentração de Ca^{2+} (*linhas b-e*). A *linha pontilhada* mostra que na presença de 300 μM de diamida, a fase *lag* que precede o inchamento induzido por 600 μM de Ca^{2+} foi reduzida comparada àquela em que o Ca^{2+} foi adicionado sozinho (*linha d*).

O sistema uniporter de transporte de Ca^{2+} , tal como descrito para células animais, aparentemente não opera em mitocôndrias de tubérculos de batata (MARTINS *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 1992). A Figura 4A confirma a ausência de um sistema de captação de Ca^{2+} dependente de $\Delta\Psi$ operante nestas mitocôndrias (*linha a*) (Ca^{2+} livre = 20 μM). Sob as mesmas condições, mitocôndrias de fígado de rato (*linha b*) acumulam e retêm o Ca^{2+} presente no meio de reação até o momento da adição do protonóforo FCCP. A Figura 4B mostra que mitocôndrias isoladas de fígado de rato (*linha b*) e de tubérculo de batata (*linha a*) respirando em presença do substrato succinato, foram capazes de construir um potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e mantê-lo por 10 minutos. A adição de ADP causou uma queda reversível na fluorescência da safranina (*linhas a e b*) observada no momento da fosforilação do ADP. Após a adição de 20 μM de Ca^{2+} não foi observada nenhuma alteração no $\Delta\Psi$ de mitocôndrias de tubérculo de batata, confirmando a ausência de um sistema de transporte de Ca^{2+} dependente do $\Delta\Psi$ nestas mitocôndrias (*linha a*). Mitocôndrias de fígado de rato (*linha b*) apresentaram uma queda do $\Delta\Psi$ mitocondrial em resposta à adição de Ca^{2+} .

Os resultados apresentados na Figura 5A indicam que o vermelho de rutênio (2 μM), um inibidor do uniporte de Ca^{2+} mitocondrial, e a ionomicina (5 μM), um ionóforo com alta seletividade pelo Ca^{2+} (*linhas c e d*, respectivamente), não alteraram significativamente os padrões do inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} 600 μM e diamida 300 μM (*linha b*) em mitocôndrias isoladas de batata. Por outro lado, a adição de vermelho de rutênio (*linha c*) inibiu parcialmente, enquanto a ionomicina (*linha d*) estimulou o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida em mitocôndrias de fígado de rato (Painel B).

A Figura 6 demonstra os efeitos de diferentes inibidores da transição de permeabilidade mitocondrial sobre o inchamento promovido por diamida na presença de Ca^{2+} . A CsA é um inibidor altamente específico da transição de permeabilidade em mitocôndrias de mamíferos. Este composto é igualmente eficiente quando diferentes tipos de agentes indutores são empregados e parece agir por sua ligação a sítios mitocondriais com uma constante de afinidade de 10^{-9} M. A CsA tem sido utilizada na investigação do mecanismo e do significado fisiológico da TPM (GUNTER & PFEIFFER, 1990). Com a finalidade de verificar se o comportamento de mitocôndrias vegetais frente a CsA seria similar àquele descrito para mitocôndrias animais, foram realizados experimentos de inchamento mitocondrial na presença deste composto. Foi observado que a ciclosporina A (Painel B, *linha c*) e o ADP (B, *linha e*), inibidores clássicos do poro de transição de permeabilidade em mamíferos (GUNTER & PFEIFFER, 1990), não apresentaram efeito inibitório no inchamento em mitocôndrias de tubérculo de batata. Por outro lado, foi observado que o ditioneitol (Painel A, *linha c*), um redutor de grupos dissulfeto e a catalase (Painel A, *linha d*), uma enzima que catalisa a decomposição de H_2O_2 , inibiram completamente o inchamento mitocondrial de tubérculos de batata (Figura 6A, *linha b*). Desde os primeiros estudos sobre transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna, realizados por HUNTER & HAWORTH (1976; 1979), ficou constatado que a ausência de protetores endógenos, como os nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} , favoreciam o fenômeno. Além disso, o Mg^{2+} compete com o Ca^{2+} pelos sítios de ligação na membrana mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998) e nestes experimentos inibiu parcialmente o inchamento de mitocôndrias de batata (Figura 6B, *linha d*). Mitocôndrias de batata não purificadas apresentam-se contaminadas com peroxissomas intactos e restos de amiloplastos. Para descartar a hipótese de interferência destes compostos nos resultados obtidos, foram realizados experimentos com mitocôndrias de batata purificadas (Figura 4C). Observou-se que o ditioneitol (Figura 6C, *linha c*) e catalase (*linha d*) inibiram completamente o inchamento induzido por diamida e Ca^{2+} em mitocôndrias de batata purificadas (Figura 6C, *linha b*). A CsA (*linha e*) não apresentou efeito inibitório no inchamento mitocondrial. Estes resultados demonstram que mitocôndrias purificadas apresentam o mesmo comportamento que mitocôndrias de batata não purificadas quanto ao inchamento promovido por Ca^{2+} e diamida.

A Figura 7 mostra os efeitos do pH do meio de reação (pH 6,6 - 7,6) sobre o inchamento mitocondrial induzido por diamida e Ca^{2+} . Observou-se que ao aumentar o pH do meio de reação, houve uma redução progressiva da fase *lag*, que precede o inchamento mitocondrial (pH 6,6 - 7,6, Figura 7 *linhas a-f*, respectivamente). Estes resultados sugerem que a acidificação do meio de reação inibe o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida da mesma maneira que ocorre com mitocôndrias isoladas de fígado de rato (HALESTRAP, 1991; BERNARDI *et al*, 1992).

Em mitocôndrias de mamíferos associa-se a inibição do poro de transição de permeabilidade pela ciclosporina A, com sua ligação à ciclofilina, inibindo a atividade da enzima peptidilprolil *cis-trans* isomerase (HALESTRAP *et al*, 1997; CROMPTON, 1999). Uma vez que não foi observado efeito da ciclosporina A em mitocôndrias de batata, foi investigada a presença de atividade da enzima peptidilprolil *cis-trans* isomerase e sua inibição por ciclosporina A, o que revelaria se mitocôndrias de batata possuem ciclofilina. A Figura 8 mostra típicas mudanças de absorbância após 2 segundos de início do ensaio com a enzima peptidilprolil *cis-trans* isomerase, utilizando o peptídeo teste N-succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanyl 4-nitroanilide. A isomerização ocorreu na ausência da proteína mitocondrial (Figura 8, *linhas c*), mas foi estimulada quando mitocôndrias de fígado de rato (Figura 8A), de batata (Figura 8B) ou de batata doce (Figura 8C) estavam presentes (*linhas a*). A CsA inibiu a atividade da enzima isomerase (Figura 8, *linhas b*) em todos os tipos de mitocôndrias. Estes resultados indicam uma dissociação entre a propriedade da ciclosporina A em inibir a atividade da enzima peptidilprolil *cis-trans* isomerase e em inibir a transição de permeabilidade de membrana de mitocôndrias de batata.

Com o objetivo de investigar a participação de grupos tióis de proteínas na permeabilização mitocondrial de batata induzida por Ca^{2+} , foram testados os efeitos de reagentes tiol monofuncionais e reagentes tiólicos que promovem ligações cruzadas sobre o inchamento de mitocôndrias de batata (Figura 9). Quando os experimentos foram conduzidos na presença de EGTA ($[\text{Ca}^{2+}]$ livre < 0,01 μM) (Figura 9A), o mersalil, mas não o óxido de fenilarsina, DIDS ou *N*-etilmaleimida, induziu um lento inchamento mitocondrial. O inchamento induzido pelo mersalil foi fortemente estimulado por 10 μM de

Ca^{2+} (*linha a*), mas não por óxido de fenilarsina, DIDS ou *N*-etilmaleimida. Na presença de altas concentrações de Ca^{2+} (600 μM ; Figura 9C) todos os reagentes tiol estimularam o inchamento mitocondrial de batatas.

A Figura 10 mostra o inchamento de mitocôndrias de tubérculo de batata induzido por Ca^{2+} 600 μM (Painel A, *linha a*), Ca^{2+} 600 μM e diamida 300 μM (Painel B, *linha a*) e mersalil 50 μM (Painel C, *linha a*). Observou-se inibição parcial do inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} ou Ca^{2+} mais diamida pela dibucaína (200 μM) um anestésico local que desloca de uma forma competitiva íons Ca^{2+} ligados a fosfolípidos de membranas (LOW *et al.*, 1979). A ausência de inibição por dibucaína do inchamento mitocondrial induzido por mersalil (Figura 10C, *linha b*) pode ser explicada pela não dependência de Ca^{2+} desta permeabilização mitocondrial. A presença de BSA, um quelante de ácidos graxos livres, inibiu quase completamente o inchamento mitocondrial em todas as situações estudadas (Figura 10, *linhas c*).

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que mitocôndrias de tubérculo de batata (Figura 11, *linha a*) não são capazes de captar Ca^{2+} e que mitocôndrias de batata doce (Figura 11, *linha b*) são capazes de captar e acumular o Ca^{2+} presente no meio de reação. A adição do protonóforo FCCP resultou na liberação de Ca^{2+} para o meio extramitocondrial.

Um dos métodos utilizados para monitorar a transição de permeabilidade de mitocôndrias isoladas é o efluxo mitocondrial de Ca^{2+} . A Figura 12 (Painel A) mostra que mitocôndrias de batata doce captam e acumulam o Ca^{2+} presente no meio de reação. Após aproximadamente 20 minutos, o Ca^{2+} começa a ser liberado. Quando as concentrações de Ca^{2+} são aumentadas (60, 100, 200 e 300 μM , *linhas a, b, c e d* respectivamente) as mitocôndrias perdem progressivamente sua capacidade de retenção de Ca^{2+} . Após a adição do ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina, o Ca^{2+} mitocondrial foi completamente liberado. Os efeitos de diferentes inibidores de transição de permeabilidade foram testados em relação a liberação de Ca^{2+} (60 μM) induzida pela diamida (200 μM) (Painel B, *linhas a-d*). Foi observado que a ciclosporina A (*linha a*) não apresentou efeito inibidor na liberação de Ca^{2+} mitocondrial. Por outro lado, a catalase (*linha b*), inibiu parcialmente a liberação de

Ca^{2+} . Com o objetivo de assegurar que o Ca^{2+} estava sendo captado pelas mitocôndrias, utilizou-se o inibidor de uniporte de Ca^{2+} , vermelho de rutênio (*linha d*), o qual preveniu completamente a captação de Ca^{2+} .

Os resultados apresentados na Figura 13 mostram que o inchamento de mitocôndrias de batata doce energizadas com succinato foi induzido por 120 μM de Ca^{2+} (Painel A, *linhas a-c*). No Painel B, os experimentos foram conduzidos em presença de 60 μM de Ca^{2+} e 200 μM de diamida (*linhas a-c*). Foi observado que 2 μM de catalase inibiu o inchamento mitocondrial (*linhas b*). A CsA não apresentou efeito inibitório sobre o inchamento mitocondrial (*linhas c*). As *linhas d* representam experimentos controle na presença de 1 mM de EGTA.

Com o objetivo de investigar a participação do translocador de ATP/ADP no fenômeno de TPM (VERCESI, 1984; KOWALTOWSKI *et al.*, 2001), foi utilizado o bongkretrato (BKA), um inibidor deste translocador. A Figura 14 mostra que o inchamento de mitocôndrias de fígado de rato induzido por Ca^{2+} e diamida (Painel A, *linha a*) foi completamente inibido pelo BKA e por CsA (*linhas b e c*, respectivamente). Por outro lado, o BKA (*linhas b*) e a CsA (*linhas c*) não foram capazes de prevenir o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida em organelas isoladas de batata (Painel B) e batata doce (Painel C).

Em contraste com os nossos resultados, Arpagaus e colaboradores (2002) observaram que o inchamento de mitocôndrias de tubérculo de batata induzido por altas concentrações de Ca^{2+} (5 mM) pôde ser inibido parcialmente por CsA. Estes autores também verificaram que a presença de ditioeritritol (DTE) potencializa o efeito inibitório da CsA. Na Figura 15 utilizamos condições experimentais similares às utilizadas por Arpagaus e colaboradores (2001). O inchamento mitocondrial induzido por 600 μM e 2,5 mM de Ca^{2+} (*linhas a e c*, respectivamente) não foi inibido pela CsA (2 μM) (*linhas b e d*, respectivamente). A *linha e* representa um experimento controle em presença de EGTA.

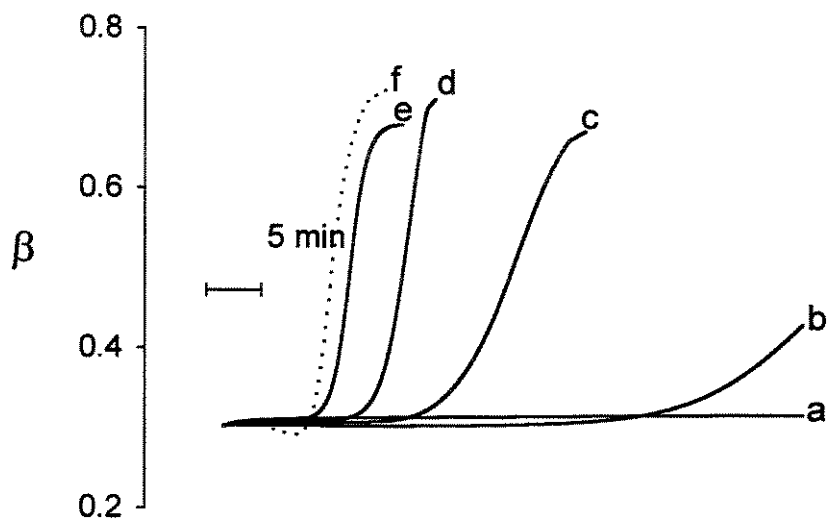
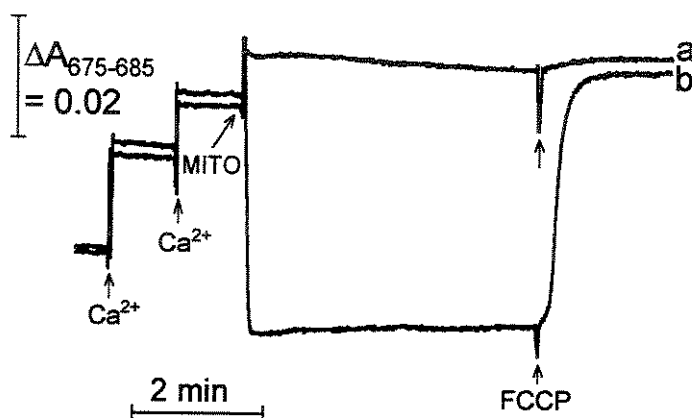


Figura 3. Efeito da diamida sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} : Mitocôndrias de tubérculo de batata (0,2 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 300 mM, Hepes-KOH 10 mM, pH 7,2, FCCP 0,5 μM , e AA 1 μM , suplementado com Ca^{2+} 200 μM (linha b), Ca^{2+} 400 μM (linha c), Ca^{2+} 600 μM (linha d), Ca^{2+} 800 μM (linha e) e Ca^{2+} 600 μM em presença de diamida 300 μM (linha pontilhada). A linha a representa um experimento controle sem adições de Ca^{2+} e diamida.



B

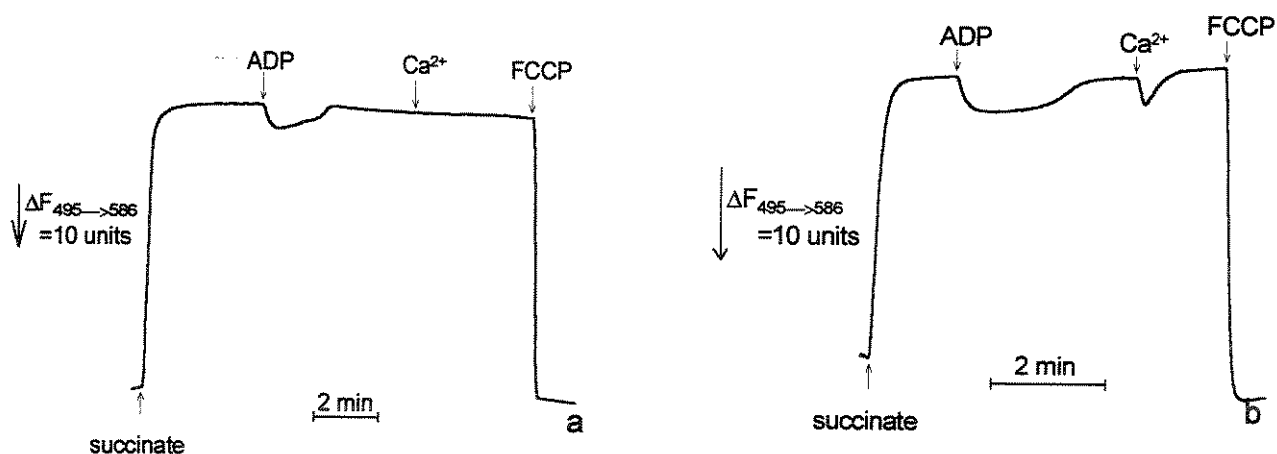


Figura 4. Captação de Ca^{2+} e potencial de membrana em mitocôndrias de tubérculo de batata e de fígado de rato. Mitocôndrias de tubérculo de batata (linhas a) e de fígado de rato (linhas b) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 250 mM, Hepes-KOH 10 mM, pH 7,2, fosfato 1 mM, BSA 0,1 mg/ml, succinato 2 mM e rotenona 5 μ M, suplementado com arsenazo III 20 μ M (A) ou safranina O 5 μ M (B). Em (A) as setas indicam, duas adições consecutivas de Ca^{2+} 10 μ M, mitocôndria (MITO) 1 mg/ml e FCCCP 1 μ M. Em (B), ADP 100 μ M, Ca^{2+} 20 μ M e FCCCP 1 μ M foram adicionados onde indicado.

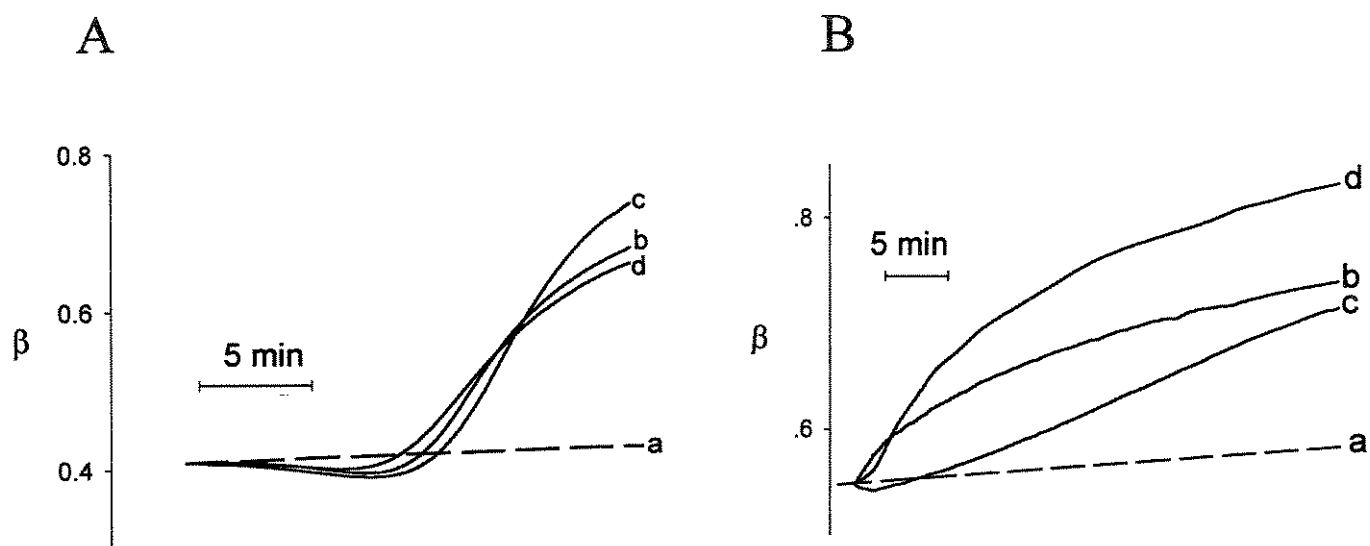


Figura 5. Efeito do vermelho de rutênio e ionomicina sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida. Mitocôndrias de tubérculo de batata (A) e de fígado de rato (B) (0,2 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na Figura 3, em meio de reação suplementado com diamida 300 μM e Ca^{2+} 600 μM (linhas b-d). Vermelho de rutênio 2 μM e ionomicina 5 μM foram adicionados nos experimentos representados pelas linhas c e d respectivamente. As linhas pontilhadas (a) representam experimentos controle na ausência de Ca^{2+} e diamida.

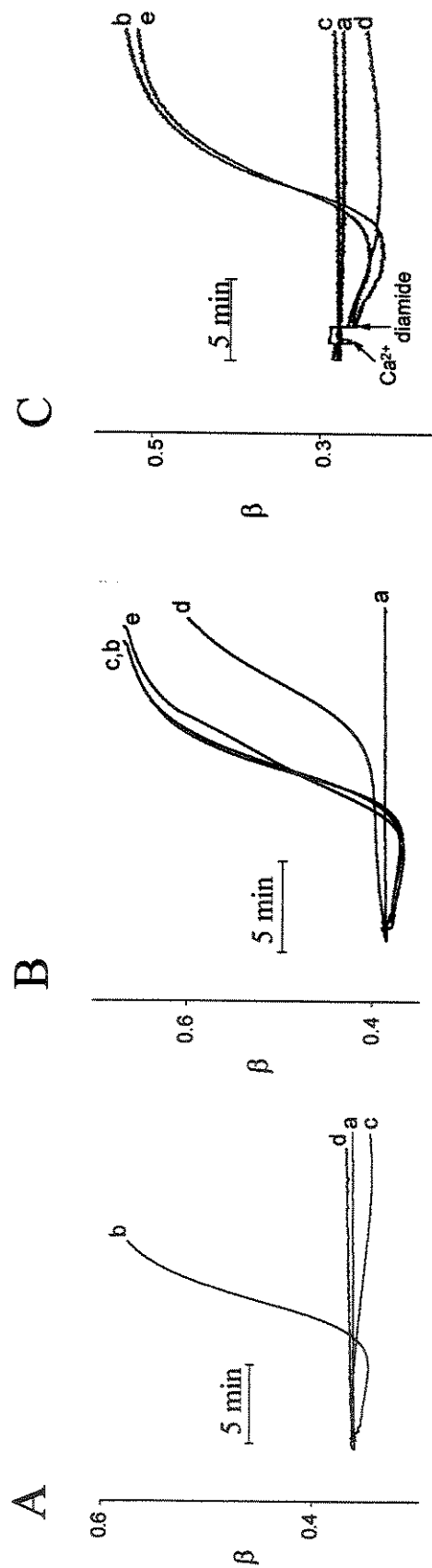


Figura 6. Efeitos de antioxidantes e inibidores do poro de transição de permeabilidade sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida. Mitocôndrias de tubérculo de batata (0,2 mg/ml; mitocôndrias não purificadas (A e B) e purificadas (C) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na Figura 3, em presença de diamida 300 μM e Ca^{2+} 600 μM (A-C, linhas b-e). Em (A) os experimentos foram conduzidos em meio de reação contendo DTT 2 mM (linha c) e catalase 5 μM (linha d). Em (B), CsA 1 μM (linha c), Mg^{2+} 5 mM (linha d) ou ADP 200 μM (linha e). Em (C), o experimento foi conduzido em presença de DTT 2 mM (linha c), catalase 5 μM (linha d) ou CsA 1 μM (linha e). As linhas a representam experimentos controle.

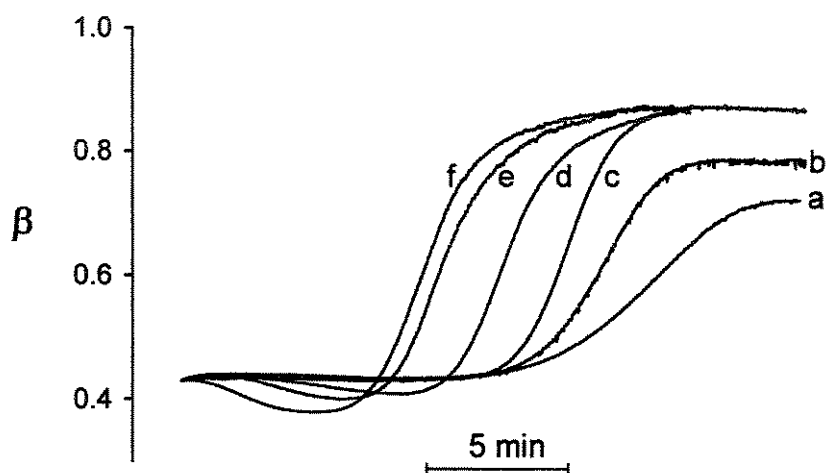


Figura 7. Efeito do pH sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e diamida. Mitocôndrias de tubérculo de batata (0,2 mg/ml) foram incubadas em meio de reação tamponado com MOPS/Tris 10 mM, em presença de diamida 300 μM e Ca^{2+} 600 μM , sob diferentes condições de pH (6,6 (linha a), 6,8 (linha b), 7,0 (linha c), 7,2 (linha d), 7,4 (linha e), 7,6 (linha f)).

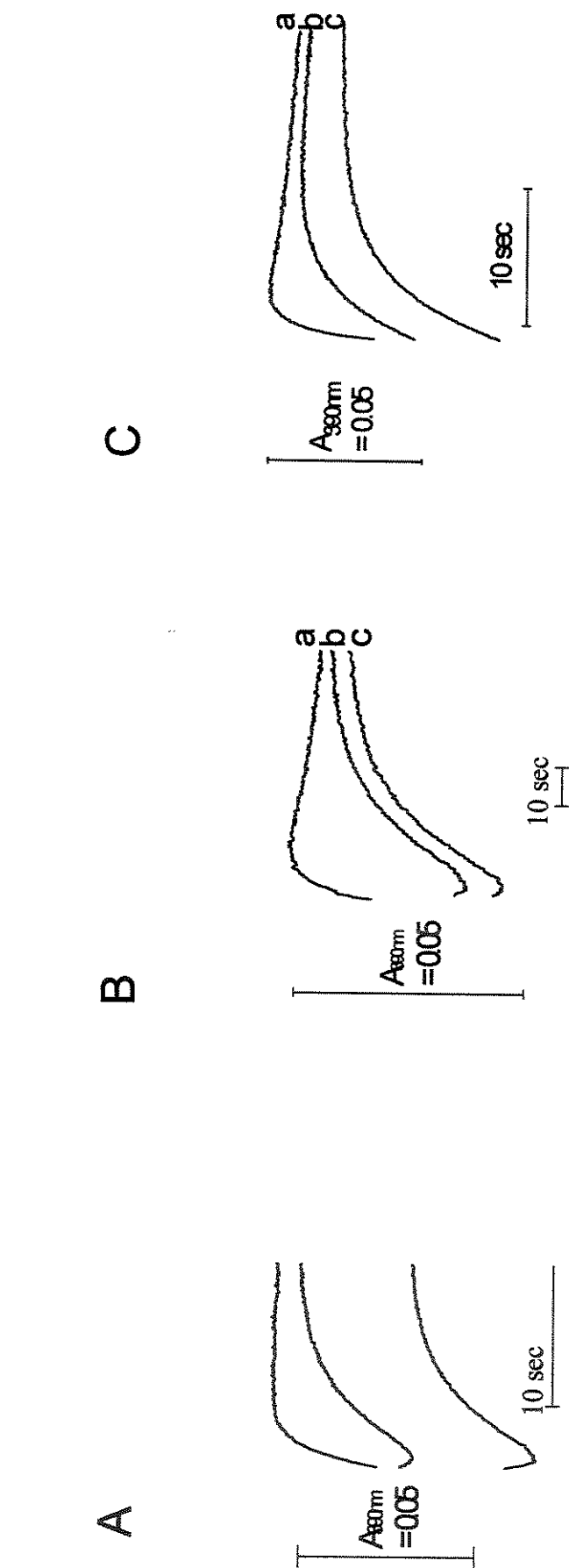


Figura 8. Inibição da atividade da enzima peptidilprolil *cis-trans* isomerase pela ciclosporina A em mitocôndrias de fígado de rato (A), tubérculo de batata (B) e batata doce (C). Mitocôndrias foram incubadas em tampão de ensaio contendo Hepes-KOH 40 mM, pH 8,0 e Triton X-100 0,05%, seguido da pré-incubação de 30 segundos com quimotripsina 20 μ M. As medidas de absorbância foram iniciadas 2 segundos após a adição de N-succinil-alanil-prolil-fenilalenil 4-nitroanilide 60 μ M ao tampão de ensaio contendo 0,25 mg/ml de mitocôndria (linhas a) em presença de ciclosporina A 2 μ M (linhas b) ou na ausência de adições (linhas c).

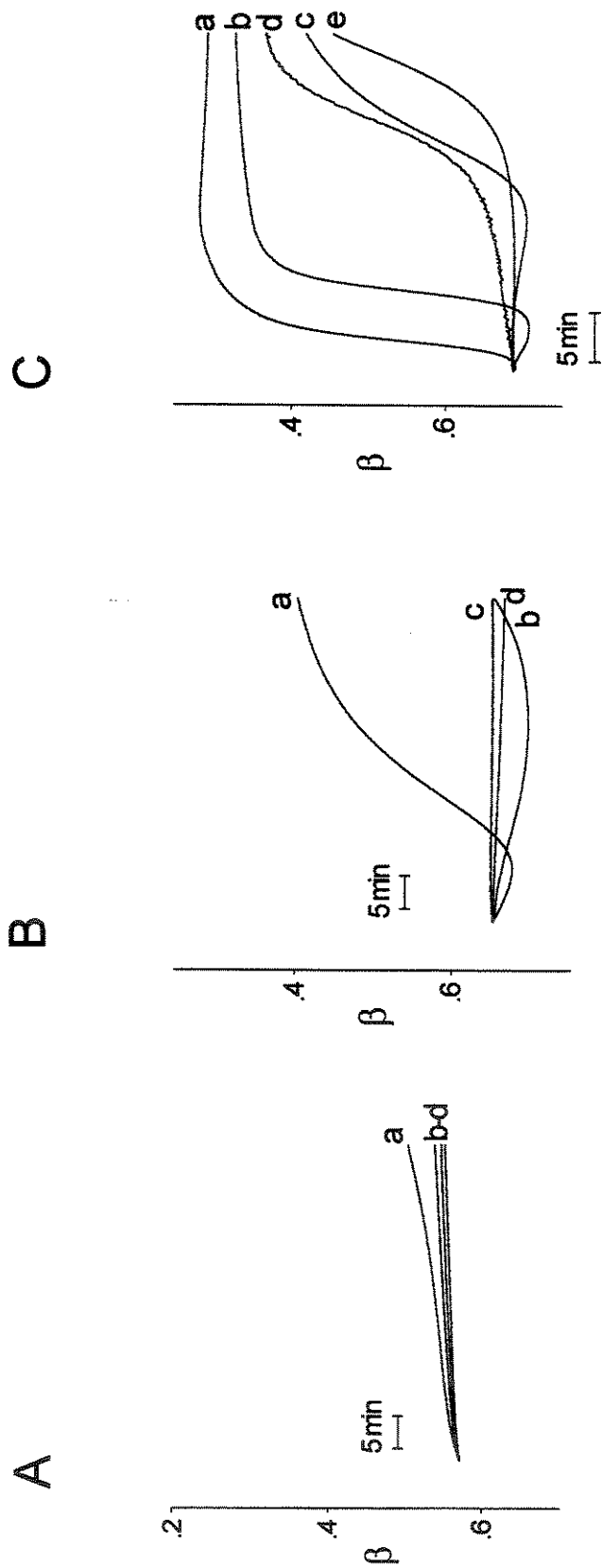


Figura 9. Inchamento mitocondrial induzido por reagentes tiólicos: efeito do Ca^{2+} . Mitocôndrias de tubérculo de batata (0,2 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na Figura 3, em meio de reação contendo EGTA 1 mM (A), Ca^{2+} 10 μM (B) ou Ca^{2+} 600 μM (C). Os experimentos foram conduzidos em presença de 50 μM dos reagentes tióis: mersalil (linhas a), óxido fenilarsine (linhas b), DIDS (linhas c) ou N-etilmaleimida (linhas d). Em (C), a linha e representa um experimento controle em presença de Ca^{2+} 600 μM na ausência de reagentes tióis.

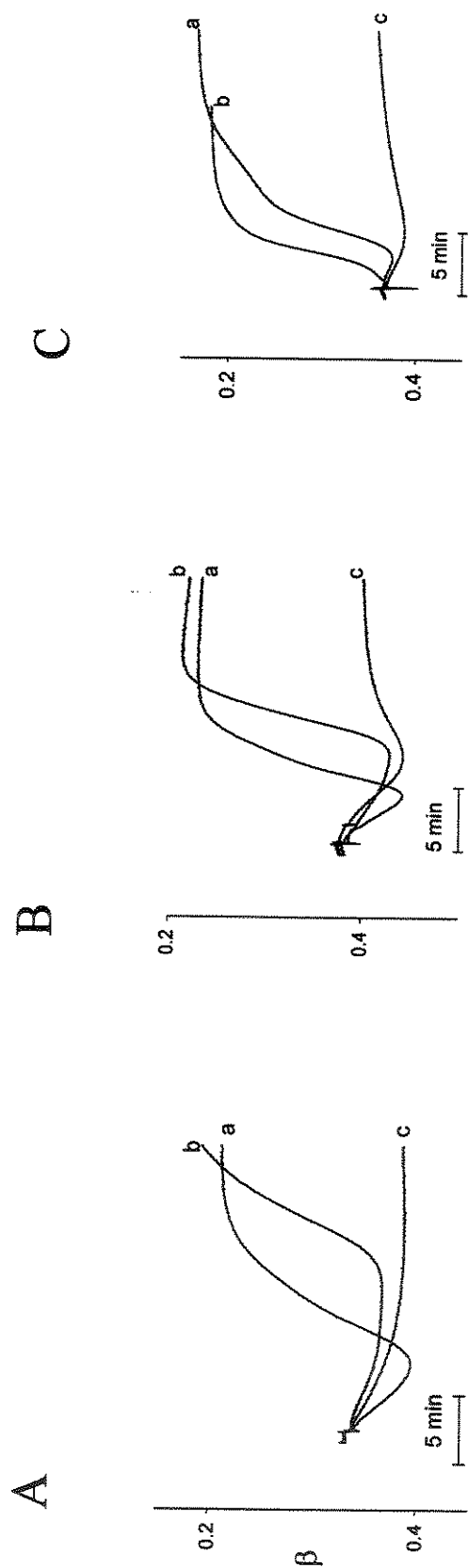


Figura 10: Efeito da dibucaína e do BSA sobre o inchamento mitocondrial indizado por Ca^{2+} (A), Ca^{2+} e diamida (B) e mersalil (C). Mitocôndrias de tubérculo de batata (0,2 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na figura 3, em meio de reação contendo Ca^{2+} 600 μM (A), Ca^{2+} 600 μM e diamida 300 μM (B) e mersalil 50 μM (C) (linhas a). Dibucaína 200 μM eBSA 0,1 mg/ml foram adicionados nos traçados correspondentes as linhas b e c respectivamente.

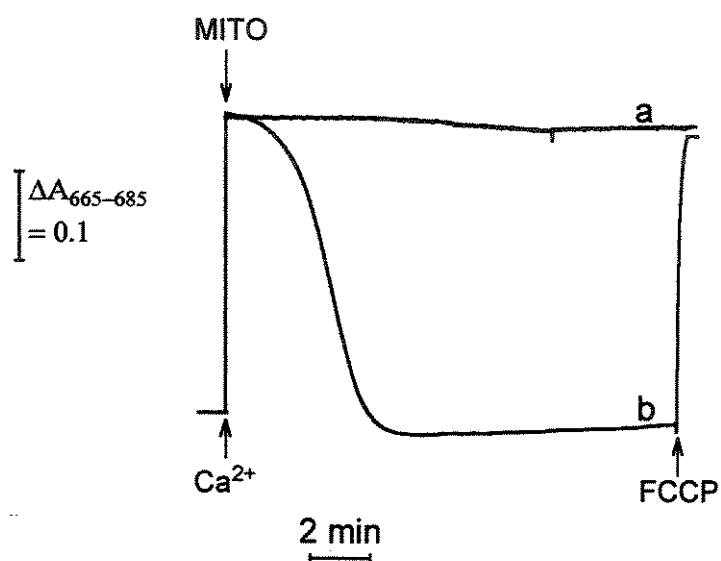


Figura 11. Captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de tubérculo de batata e mitocôndrias de batata doce. Mitocôndrias de tubérculo de batata (linha a) e mitocôndrias de batata doce (linha b) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 250 mM, Hepes-KOH 1 mM pH 7,2, Pi 1 mM, succinato 2 mM e rotenona 5 μM , suplementado com Arsenazo III 20 μM e Ca^{2+} 60 μM . Mitocôndria (0,2 mg/ml (MITO) e FCCP 2 μM foram adicionados onde indicado.

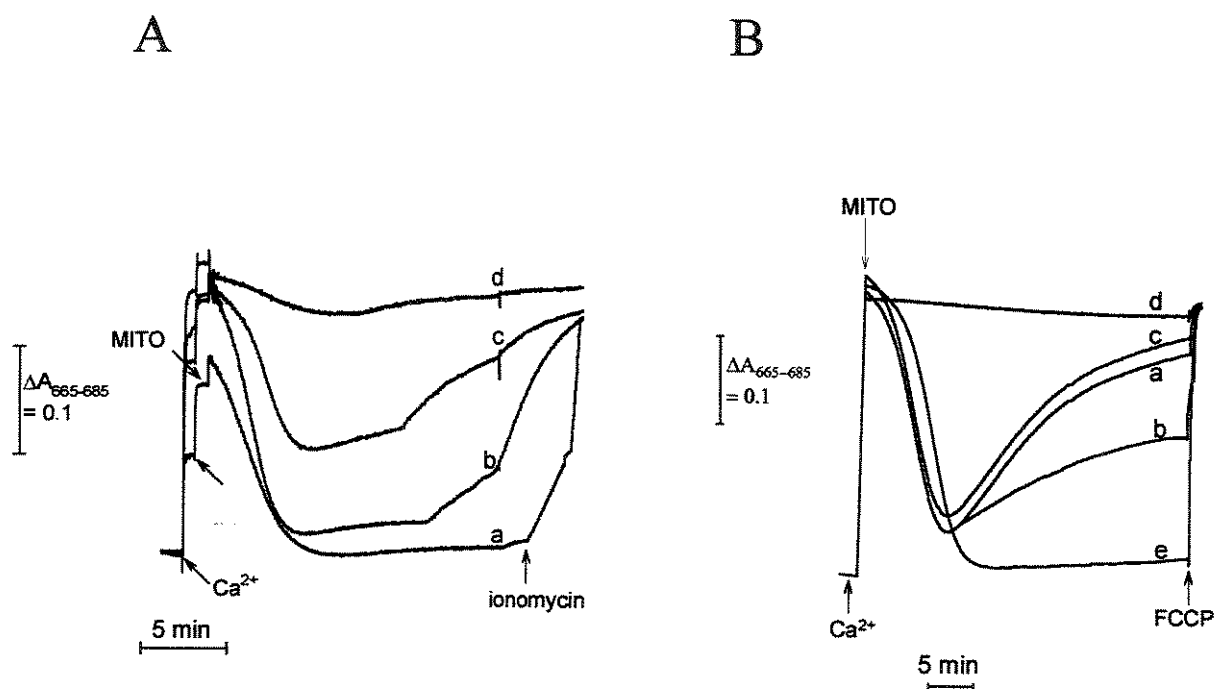


Figura 12. Efeito da diamida, inibidores do poro de transição de permeabilidade e vermelho de rutênio sob o acúmulo de Ca^{2+} em mitocôndrias de batata doce. Mitocôndrias de batata doce (0,2 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na Figura 4. Em (A) foram adicionadas diferentes concentrações de Ca^{2+} (60, 100, 200 e 300 μM , linhas *a*, *b*, *c* e *d* respectivamente). Em (B) os experimentos foram conduzidos em meio de reação contendo Ca^{2+} 60 μM , em presença de 200 μM de diamida (linhas *a-d*). CsA 0,5 μM , catalase 2 μM e vermelho de rutênio 2 μM estavam presentes nos experimentos representados pelas linhas *a*, *b* e *d* respectivamente. A linha *e* representa um experimento controle contendo Ca^{2+} 60 μM na ausência de diamida.

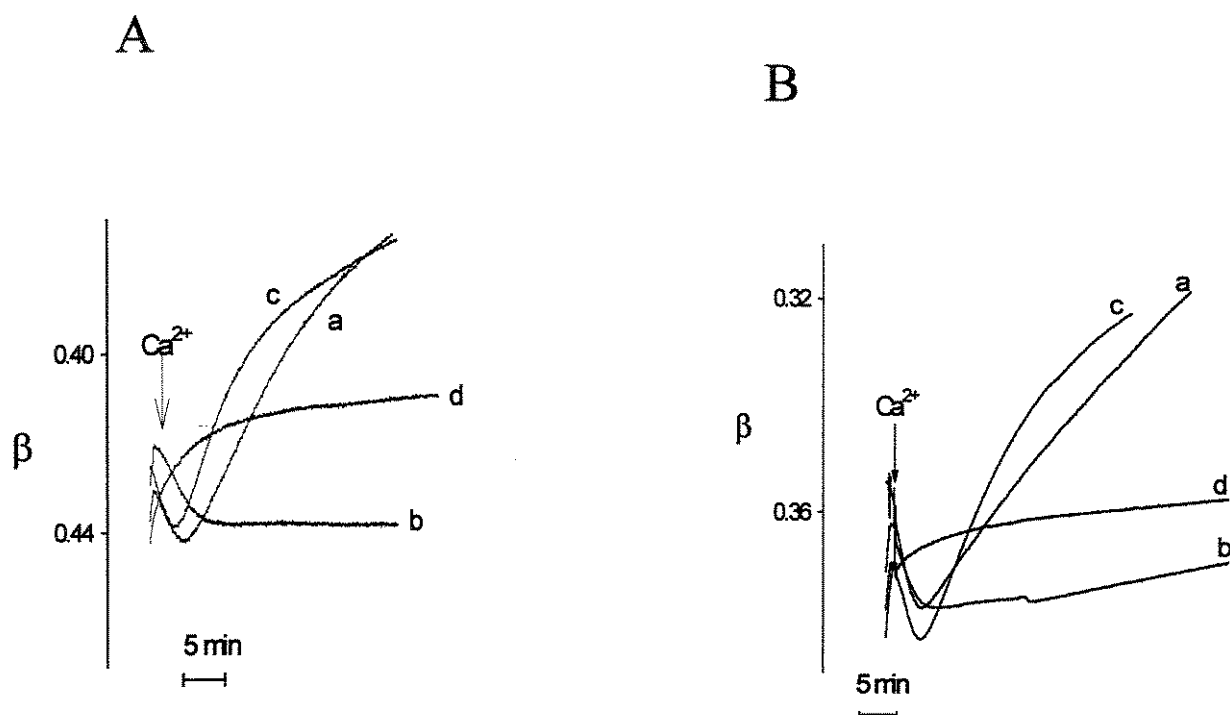


Figura 13. Efeito da CsA e catalase sobre o inchamento induzido por Ca^{2+} na ausência e presença de diamida em mitocôndrias de batata doce. Mitocôndrias de batata doce (0,2 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na Figura 4. Em (A) foi adicionado Ca^{2+} 120 μM (linhas *a-c*). Em (B), os experimentos foram conduzidos em presença de Ca^{2+} 60 μM e diamida 200 μM (linhas *a-c*). Catalase 2 μM e CsA 0,5 μM foram adicionadas nos experimentos representados pelas linhas *b* e *c* respectivamente. As linhas *d* representam experimentos controle em presença de EGTA 1 mM.

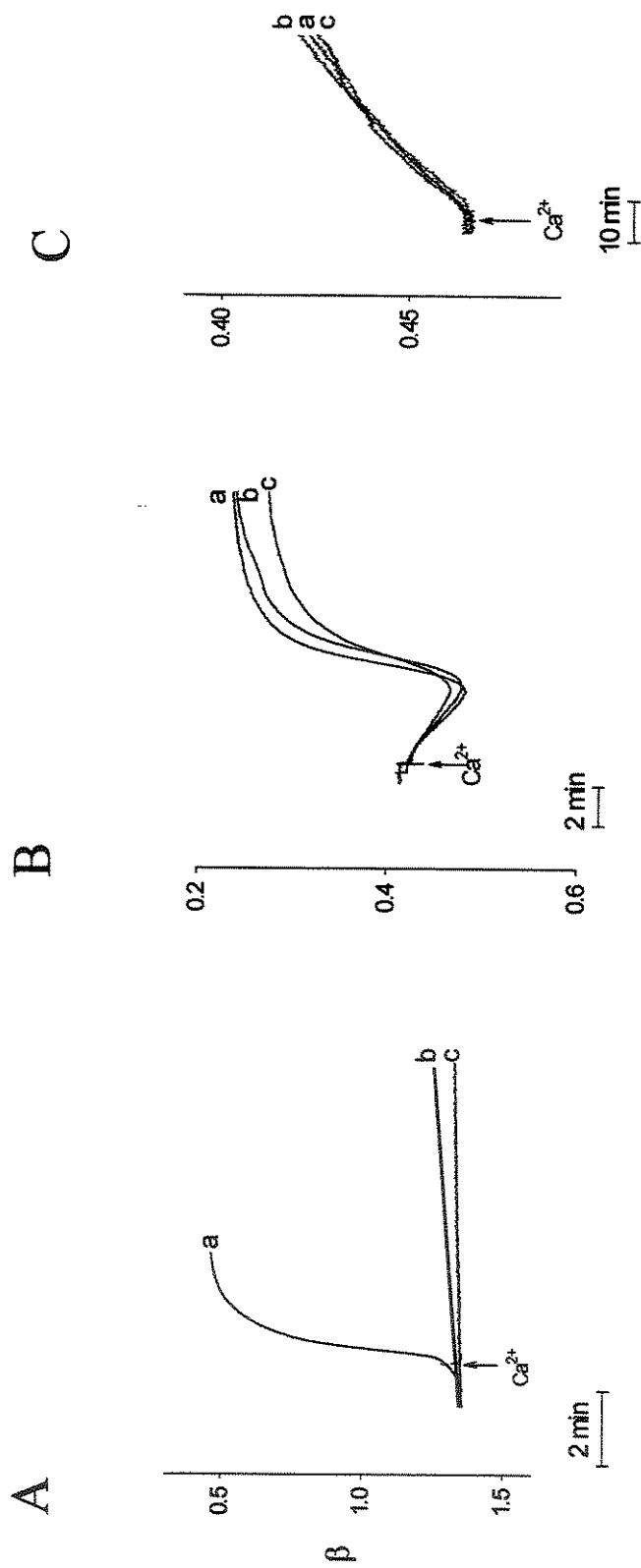


Figura 14. Efeito do bongkrekato e da CsA sobre o inchamento mitocondrial de tubérculo de batata, batata doce e fígado de rato induzido por Ca^{2+} e diamida. Mitocôndrias (0.2 mg/ml) de fígado de rato (A), tubérculo de batata (B) e batata doce (C) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na Figura 3, em meio de reação contendo diamida 100 μM e Ca^{2+} 10 μM (A), diamida 300 μM e Ca^{2+} 600 μM (B), e diamida 200 μM e Ca^{2+} 60 μM (C) (linhas a-c). Bongkrekato (5 μM) e CsA 0.5 μM estavam presentes nos experimentos representados pelas linhas b e c, respectivamente.

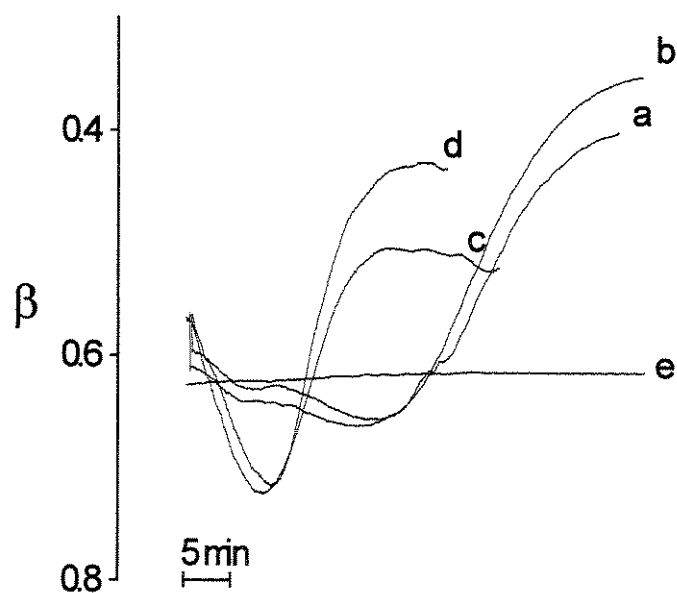
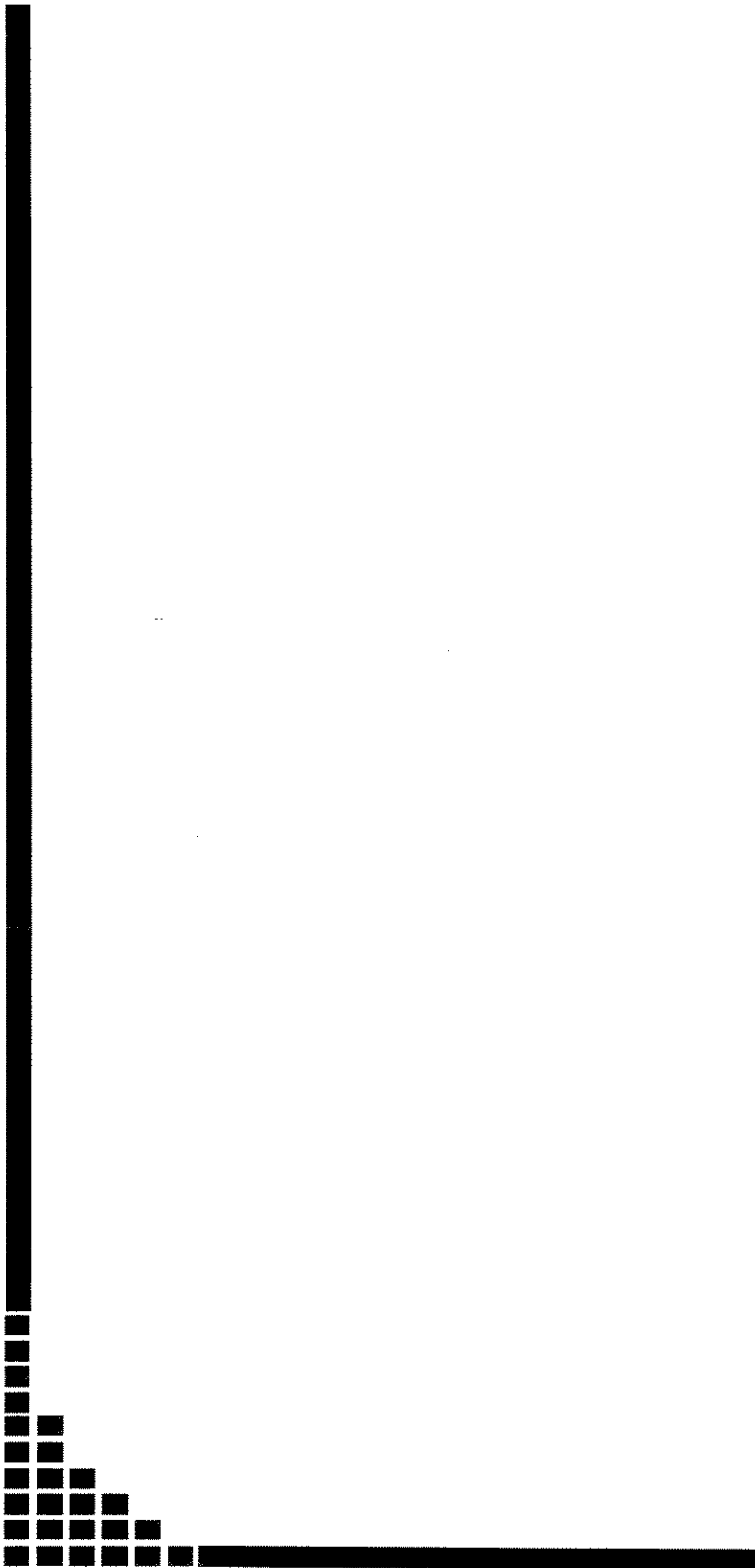


Figura. 15. Efeito da CsA sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} . Mitocôndrias de tubérculo de batata (0.2 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo Ca^{2+} 600 μM (*linha a*) e Ca^{2+} 2.5 mM (*linha c*). A CsA (2 μM) estava presente nos experimentos representados pelas linhas *b* e *d* (600 μM e 2.5 mM de Ca^{2+} respectivamente). A linha *e* representa um experimento na presença de EGTA mM.



5. DISCUSSÃO

A formação do poro de transição de permeabilidade de mitocôndrias de mamíferos pode ser mediada por uma ação sinérgica entre o Ca^{2+} e EROs, conduzindo uma oxidação de grupamentos tióis de proteínas de membrana (KOWALTOWSKI et al., 2001). De acordo com esta hipótese, Ca^{2+} pode estar envolvido no mecanismo de abertura do poro de transição de permeabilidade das seguintes maneiras: (i) através de sua ligação à cardiolipinas da membrana interna mitocondrial e estimulando a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (ânion radical superóxido) e consequentemente de H_2O_2 pela cadeia respiratória (VALLE et al., 1993; DIKENS, 1994; CASTILHO et al., 1995B; GRIJALBA et al., 1999; KOWALTOWSKI et al., 2001), (ii) estimulando a reação de Fenton através da mobilização de Fe^{2+} da matriz mitocondrial (CASTILHO et al., 1995B) e (iii) através de sua ligação a proteínas de membrana que regulam a abertura do poro de transição de permeabilidade (BERNARDI et al., 1992; CROMPTON, 1999; ZORATTI & SZABÒ, 1995). Os resultados apresentados neste trabalho indicam que altas concentrações de Ca^{2+} extramitocondrial promovem a permeabilização da membrana mitocondrial interna de batata e batata doce (*Solanum tuberosum* e *Ipomoea batatas*) respectivamente, através de um mecanismo sensível a catalase exógena e a ditiotreitól, sugerindo a participação de EROs e oxidação de grupos tióis de proteínas neste processo. Além disso, a potencialização induzida por diamida e mersalil no inchamento de mitocôndrias de *Solanum tuberosum* e *Ipomoea batatas* induzido por Ca^{2+} , confirma que grupos tiólicos de proteínas são alvos importantes de EROs no mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial destes vegetais. Assim como observado em mitocôndrias isoladas de mamíferos (ZORATTI & SZABÒ, 1995), a permeabilização da membrana de mitocôndrias de *Solanum tuberosum* induzida por Ca^{2+} ou Ca^{2+} e diamida se mostrou sensível a BSA, um quelante de ácidos graxos livres e dibucaína, um anestésico local que se liga a sítios de Ca^{2+} em fosfolipídeos de membranas, deslocando de uma forma competitiva íons Ca^{2+} ligados a membranas (LOW et al., 1979).

A presença do ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina, que potencializa a TPM de fígado de rato sob condições desenergizadas (VERCESI et al., 1998), não estimulou significativamente o inchamento de mitocôndrias de *Solanum tuberosum*, as quais não possuem um uniporte de Ca^{2+} operante. Este resultado demonstra que o Ca^{2+} intramitocondrial não é necessário para induzir TPM nestas mitocôndrias. Sob este aspecto,

é importante enfatizar que o vermelho de rutênio não inibiu completamente a TPM em mitocôndrias desenergizadas de fígado de rato incubadas na presença de altas concentrações de Ca^{2+} (VERCESI *et al.*, 1988). Isto sugere que, sob altas concentrações, a ligação do Ca^{2+} à parte externa da membrana mitocondrial interna pode resultar em alterações semelhantes àsquelas induzidas por altas concentrações de Ca^{2+} acumuladas na matriz de mitocôndrias energizadas. Estas alterações promovidas por Ca^{2+} aumentariam o vazamento de elétrons e a produção de EROs em mitocôndrias e podem ocorrer devido a desorganização de componentes da membrana mitocondrial interna, como de complexos da cadeia respiratória (GRIJALBA *et al.*, 1999). Corroborando esta hipótese, através da técnica de ressonância paramagnética (EPR), GRIJALBA *et al.* (1999) mostraram que o Ca^{2+} , na faixa de concentração utilizada neste trabalho, induz separação de fase lateral na fase lipídica da membrana de partículas submitocondriais de coração.

Nossos resultados mostraram que a permeabilização de mitocôndrias de *Solanum tuberosum* e *Impomoea batatas* induzida por Ca^{2+} não é sensível a inibidores clássicos da TPM de mamíferos, como o ADP e a CsA, e é parcialmente inibido por Mg^{2+} e pela acidificação do pH do meio de reação. Sabe-se que a propriedade inibitória da CsA sobre a transição de permeabilidade de mitocôndrias de mamíferos está relacionada à sua ligação a ciclofilina D presente na membrana mitocondrial interna, através de um processo associado com a inibição da atividade enzimática de peptidilprolil *cis-trans* isomerase (NICOLLI *et al.*, 1996; HALESTRAP *et al.*, 1997). Isto sugere que a ciclofilina é um componente estrutural do poro de transição de permeabilidade mitocondrial de mamíferos (BEUTNER *et al.*, 1998; NICOLLI *et al.*, 1996) ou que catalisaria a abertura deste poro de mitocôndrias de mamíferos através da sua atividade de isomerase ligada a peptídeo (BROEKEMEIER & PFEIFFER, 1995; NOVGORODOV *et al.*, 1994). As ciclofilinas compõem uma grande família de proteínas altamente conservadas encontradas em eucariontes (CONNERN & HALESTRAP, 1992, 1994) e inclusive em algumas plantas (MATOO, 1998; BREIMAN *et al.*, 1992). A dissociação entre a propriedade da CsA inibir a atividade da enzima peptidilprolil *cis-trans* isomerase e de inibir a transição de permeabilidade de membrana em mitocôndrias de *Solanum tuberosum* e *Impomoea batatas* indica que o papel das ciclofilinas deva ser outro em mitocôndrias isoladas destes vegetais. Estes resultados obtidos com mitocôndrias de batata estão de acordo com a hipótese de

Jung e colaboradores (1997) a qual afirma que as ciclofilinas constituem um componente filogenético relativamente recente da TPM, baseado em observações semelhantes de insensibilidade da TPM à CsA em organelas isoladas de leveduras. A inibição parcial da TPM de batata por acidificação do pH do meio de reação mostra que a protonação de um resíduo crítico de histidil da ciclofilina com sua dissociação do sítio de ligação no complexo do PTP mitocondrial (NICOLLI *et al.*, 1996) não é o único mecanismo de inibição do PTP por acidificação de pH. De fato, resultados de nosso grupo mostram que a inibição da TPM em mamíferos por pH ácido pode ser mediado pelo decréscimo da reatividade de tióis de proteínas de membrana devido a protonação de resíduos histidil de proteínas (TEIXEIRA *et al.*, 1999).

Mitocôndrias isoladas de *Solanum tuberosum* e de *Impomoea batatas* foram utilizadas em nossos estudos por apresentarem diferenças marcantes quanto à capacidade de captar e acumular o Ca^{2+} . Enquanto mitocôndrias de *Solanum tuberosum* não apresentam capacidade significativa de captação e acúmulo de Ca^{2+} (MARTINS & VERCESI, 1985), é conhecido que mitocôndrias de *Impomoea batatas* são capazes de captar e reter grandes quantidades de Ca^{2+} (CHEN & LEHNINGER, 1973). Estas mitocôndrias constituíram um modelo adequado para esclarecer a relação entre a presença de um sistema transportador operante de Ca^{2+} , a ocorrência de TPM, bem como se a sensibilidade da TPM à CsA estaria relacionada com a presença ou não de um sistema transportador de Ca^{2+} . Os resultados obtidos sugerem que a ausência ou presença de um sistema ativo de transporte de Ca^{2+} nestes vegetais não está relacionada com a insensibilidade da transição de permeabilidade destas mitocôndrias vegetais à CsA.

Considerando os resultados aqui apresentados, podemos concluir que foi identificada e caracterizada uma condição de transição de permeabilidade de membrana induzida por Ca^{2+} e espécies reativas de oxigênio, e insensível à CsA, em mitocôndrias isoladas de *Solanum tuberosum* e *Impomoea batatas*. Assim como em mamíferos (GREEN & REED, 1998), é possível que Ca^{2+} , mitocôndrias e TPM estejam envolvidos no desencadeamento e processo de morte celular em vegetais (JONES, 2001). Desta forma, acreditamos que os resultados apresentados nesta tese sejam de grande valia para estudos futuros sobre mecanismo de morte celular em vegetais, assim como para intervenções com o objetivo de acelerar ou retardar esta morte celular.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFOUTIT, C.; KRAB, K.; MOORE, A.L. Control of plant mitochondrial respiration. **Biochim Biophys Acta**, 1504: 58-69, 2001.

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

ÅKERMAN, K.E.O.; NICHOLLS, D.G. Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 95: 149-201, 1983.

ÅKERMAN, K.E.O.; WIKSTRÖM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett**, 68: 191-197, 1976.

ANTONIO, R.V.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; VERCESI, A.E. Alterations in mitochondrial Ca^{2+} flux by the antibiotic X537A (lasalocid A). **Biochem Biophys Acta**, 1056: 250-258, 1991.

ARPAGAU, S.; RAWYLER, A.; BRAENDLE, R. Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. **J Biol Chem**. 277: 1780-1787, 2002.

BANGERTH, F. Calcium-related physiological disorders in plants. **Annu Rev Phytopatol**, 17: 97-122, 1979.

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

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

BEAVIS, A.D.; VERCESI, A.E. Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg^{2+} -insensitive inner membrane anion channel. **J Biol Chem**, 267: 3079-3087, 1992.

BEAVIS, A.D.; BRANNAN, R.D.; GARLID, K.D. Swelling and contraction of the mitochondrial matrix I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. **J. Biol. Chem**. 260: 13424-13433, 1985.

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

BERLETT, S.B.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem**, 272: 20313-20316, 1997.

BERNARDES, C.F.; PEREIRA DA SILVA, L.; VERCESI, A.E. *t*-Butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and ATP. **Biochim Biophys Acta**, 850: 41-48, 1986.

BERNARDES, C.F.; MEYER-FERNANDES, J.R.; BASSERES, D.S.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Permeabilization of the rat liver inner membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) in the presence of Ca^{2+} is mediated by production of membrane protein aggregates. **Biochim Biophys Acta**, 1188: 93-100, 1994.

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. **J Biol Chem**, 267: 8334-8339, 1992.

BERNARDI, P.; BROEKEMEIER, K.M.; PFEIFFER, D.R. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. **J Bioenerg Biomembr**, 26: 509-517, 1994.

BERNARDI, P.; PETRONILLI, V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium: a critical appraisal. **J Bioenerg Biomembr**, 28: 131-138, 1996.

BERNARDI, P.; VASSANELLI, S.; VERONESE, P.; COLONNA, R.; SZABÒ, I.; ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. **J. Biol. Chem.** 267: 2934-2939, 1992.

- BERNARDI, P.; VERONESE, P.; PETRONILLI, V. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability. **J Biol Chem**. 268: 1005-1010, 1993.
- BERRIDGE, M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. **Ann Rev Biochem**, 56: 159-193, 1987.
- BERRIDGE, M.J. Inositol lipids and Intracellular Communication. In: **Cell Calcium Metabolism** (Fiskum G. ed.) Plenum Press, New York, 115-124, 1989
- BERRIDGE, M.J. Elementary and global aspects of calcium of calcium signalling. **J Physiol**, 499: 291-306, 1997.
- BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem J**, 128: 617-630, 1972.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, 134: 707-716, 1973.
- BRADSHAW, P.C.; JUNG, D.W.; PFEIFFER, D.R. Free fatty acids activate a vigorous Ca^{2+} :2 H^{+} antiport activity in yeast mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, 276: 40502-40509, 2001.
- BRAIDOT, E.; PETRUSSA, E.; VIANELLO, A.; MACRI, F. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. **FEBS Lett**, 451: 347-350, 1999.
- BRAND, M.D. Electroneutral efflux of Ca^{2+} from liver mitochondria. **Biochem J**, 225: 413-419, 1985A.
- BRAND, M.D. The stoichiometry of the exchange catalyzed by the mitochondrial calcium/sodium antiporter. **Biochem J**, 229: 161-166, 1985B.

BREIMAN, A.; FAWCETT, T.W.; GHIRARDI, M.L.; MATTOO, A.K. Plant organelles contain distinct peptidylprolyl *cis-trans*-isomerases **J Biol Chem**, 267:21293-21296, 1992.

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, 1977.

BRINLEY, F.J.; TIFFERT, T.; SCARPA, A. Kinetics of calcium accumulation by mitochondria, studied *in situ*, in squid giant axons. **FEBS Lett**, 91: 25-29, 1978.

BROEKEMEIER, K.M.; DEMPSEY, M.E.; PFEIFFER, D.R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. **J Biol Chem**, 264: 7826-7830, 1989.

BROEKEMEIER, K.M.; PFEIFFER, D.R. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. **Biochemistry**, 34:16440-16449, 1995.

BRUSTOVETSKY, N.N.; EGOROVA, M.V.; GNUTON, D.Y.U. The mechanism of calcium-dependent activation of respiration of liver mitochondria from hibernating ground squirrels, *Citellus undulatus*. **Comp Biochem Physiol**, 106: 423-426, 1993.

BUSH, D. S. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. **Plant Physiol Plant Mol Biol**, 46: 95-122, 1995.

BYGRAVE, F.L. Mitochondrial calcium transport. **Curr Top Bioenerg**, 6: 259-318, 1977.

CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C.I.; STOPPANI, A.O.M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 180: 248-257, 1977.

CADENAS, E.; BOVERIS, A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. **Biochem J**, 188: 31-37, 1980.

CANNON B; NEDERGAARD, J. In: **Essays in Biochemistry** 20 (Campbell, P. N., Marshall, R. D., eds.), Academic press, 110-164, 1985.

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Ann Rev Biochem**, 56: 395-433, 1987.

CARAFOLI, E. The plasma membrane calcium pump. In: **Cell Calcium Metabolism** (Fiskum, S. Ed.) Olenum Press, New Press, New York and London, 21-26, 1989.

CARAFOLI, E. Biogenesis plasma membrane calcium ATPase 15 year of work on the purified enzyme. **FASEB J**, 8: 993-1002, 1994.

CARAFOLI, E.; CROMPTON, M. The regulation of intracellular calcium. **Curr Top Membr Trans**, 10: 151-156, 1978.

CARNIERI, E.G.S.; MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. The mechanism and biological role of calcium transport by plant mitochondria. **Brazilian J Med Biol Res**, 20: 635-638, 1987.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or *t*-butyl hydroperoxide in the presence of Ca^{2+} : effect of coenzyme Q redox state. **Free Rad Biol Med**, 18: 55-59, 1995A.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Rad Biol Med**, 18: 479-486, 1995B.

CASTILHO, R.F., KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J Bioenerg Biomembr**, 28: 523-529, 1996.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. 3,5,3'-Triiodothyronine induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species and membrane protein thiol oxidation. **Arch Biochem Biophys**, 354: 151-157, 1998.

- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxyde metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, 59: 527-605, 1979.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv Enzymol**, 17: 65-134, 1956.
- CHEN, C. H.; LEHNINGER, A.L. Ca^{2+} transport in mitochondria from some plant tissues. **Arch Biochim Biophys**, 157:183-196, 1973.
- CLARK, A.; CARAFOLI, E. The stoichiometry of the Ca^{2+} pumping ATPase of erythrocytes. **Cell Calcium**, 4: 83-88, 1983.
- COELHO, J.L.; VERCESI, A.E. Retention of Ca^{2+} by rat liver and rat heart mitochondria: effect of phosphate, Mg^{2+} , and NAD(P) redox state. **Arch Biochem Biophys**, 204:141-147, 1980.
- COLL, K.E.; JOSEPH, S.K., CORKEY, B.E., WILLIAMSON, J.R.. Determination of the matrix free Ca^{2+} concentration and kinetics of Ca^{2+} efflux in liver and heart mitochondria. **J Biol Chem**, 257: 8696-8704, 1982.
- CONNERN, C.P.; HALESTRAP, A.P. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of an inner-membrane Ca^{2+} -dependent pore. **Biochem J**, 302: 321-324, 1994.
- CONNERN, C.P.; HALESTRAP, A.P. Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. **Biochem J**, 284:381-385, 1992.
- CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem J**, 341:233-249, 1999.
- CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} - dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem J**, 255: 357-360, 1988.

- CROMPTON, M.; VIRJI, S.; DOYLE, V.; JOHNSON, N.; WARD, J.M. The mitochondrial permeability transition pore. **Biochem Soc Symp**, 66:167-79, 1999.
- CURTIS, M.J.; WOLPERT, T.J. The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. **Plant J**, 29: 295-312, 2002.
- DAY, D.A.; WISKICH, J.T. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. **J Bioenerg Biomembr**, 27: 379-386, 1995.
- DAY, D.A.; WISKICH, J.T. Transport processes of isolated plant mitochondria. **Physiol Vég**, 22: 241-261, 1984.
- De LUCA, H.F.; ENGSTROM, G.W. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. **Proc Natl Acad Sci**, 47: 1744-1750, 1961.
- De MEIS, L.; VIANNA, A.L. Energy interconversion by the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. **Ann Rev Biochem**, 8: 275-292, 1979.
- DENTON, R.M.; RICHARDS, D.A.; CHIN, J.G. Calcium ions and regulation of the NAD^+ -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. **Biochem J**, 176: 899-906, 1978.
- DIETER, P.; MARMÉ, D. Ca^{2+} transport in mitochondrial and microsomal fractions. **Planta**, 150:1-8, 1980.
- DYKENS, J.A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^+ : implications for neurodegeneration. **J Neurochem**, 63:584-591, 1994.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.; VERCESI, A.E. Effect of thapsigargin on calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. **Mol Biochem Parasit**, 59: 305-314, 1993.
- DOCAMPO, R.; VERCESI, A.E. Characteristics of Ca^{2+} transport by *Trypanosoma cruzi* mitochondria "in situ". **Arch Biochem Biophys**, 272: 122-129, 1989A.

DOCAMPO, R.; VERCESI, A.E. Ca^{2+} transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria "in situ". **J Biol Chem**, 264: 108-111, 1989B.

DUCHEN, M.R. Mitochondria and calcium: from cell signaling to cell death. **J. Physiol**, 529: 57-68, 2000.

DUNFORD, H.B. Free radicals in iron-containing system. **Free Radical Biol Mol**, 3: 405-421, 1987.

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

FARBER, J.L. The role of calcium in cell death. **Life Sci**, 29: 1289-1295, 1981.

FISCHER, G.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; LANG, K.; KIEFHABER, T.; SCHIMID, F.X. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. **Nature**, 337:476-478, 1989.

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: 6236-6239, 1979.

FORTES, F.; CASTILHO, R.F.; CATISTI, R.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Ca^{2+} induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. **J Bioenerg Biomembr**, 33: 43-51, 2001.

GARLID, K.D. Mitochondrial cation transport: a progress report. **J Bioenerg Biomembr**, 26: 537-542, 1994.

GARLID, K.D.; BEAVIS, A.D. Swelling and contraction of the mitochondrial matrix II. Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. **J Biol Chem**, 260: 13434-13441, 1985.

GORNAL, A.G.; BARDWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **J Biol Chem**, 177: 751, 1949.

GREEN D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281:1309-1312, 1998.

GRIFFITHS, E.; HALESTRAP, A.P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischemia, but open upon reperfusion. **Biochem**, 307: 93-98, 1995.

GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHEREIER, S. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by respiratory chain. **Biochemistry**, 38: 13279-13287, 1999.

GROEN, B.H.; VAN MIL, H.G.J.; BERDEN, J.A.; VAN DARM, K. The efficiency of oxidative phosphorylation in potato-tuber mitochondria is different for succinate and external NADH. **Biochim Biophys Acta**, 1140: 37-44, 1992.

GUNTER, T.E.; BUNTINAS, L.; SPARAGNA, G.C.; GUNTER, K.K. The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients. **Biochim Biophys Acta**, 1366: 5-15, 1998.

GUNTER, T.E.; BUNTINAS, L.; SPARAGNA, G.C.; ELISEEV, R.; GUNTER, K.K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. **Cell Calcium**, 28: 285-296, 2000.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S.; GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am J Physiol**, 267: C313-C339, 1994.

GUNTER, T.E.; CHACE, J.H.; PUSKIN, J.S.; GUNTER, K.K. Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. **Biochemistry**, 22: 6341-6351, 1983.

GUNTER, T.E.; PFEIFFER, D.R. Mechanism by which mitochondria transport calcium. **Am J Physiol**, 258: C755-C786, 1990.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K. Transport of calcium by mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, 6: 471-485, 1994.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K. Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. **IUBMB Life**, 52: 197-204, 2001.

HALESTRAP, A.P. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. **Biochem J**, 278: 715-719, 1991.

HALESTRAP, A.P.; WOODFIELD, K.Y.; CONNERN, C.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. **J Biol Chem**, 272: 3346-3354, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine** Oxford Univ. Press. Oxford, UK, 188-277, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine** Oxford Univ. Press. Oxford, UK, 1999.

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

HANSFORD, R.G. Dehydrogenase activation by Ca^{2+} in cells and tissues. **J Bioenerg Biomembr**, 23: 823-854, 1991.

HANSFORD, R.G.; CASTRO, F. Intramitochondrial and extramitochondrial free calcium concentrations of suspensions of heart mitochondria with very low, plausibly physiological, contents of total calcium. **J Bioenerg Biomembr**, 14: 361-376, 1982.

HERMES-LIMA, M. How do Ca^{2+} and 5-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria? **Free Rad Biol Med**, 19: 381-390, 1995.

- HOEFNAGEL, M. H. N.; ATKIN, O.K.; WISKICH, J. T. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. **Biochim Biophys Acta**, 1366: 235-255, 1998.
- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria I: The protective mechanisms. **Arch Biochem Biophys**, 195: 453-459, 1979.
- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A.; SOUTHARD, J.H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. **J Biol Chem**, 251: 5069-5077, 1976.
- IGBAVBOA, U.; ZWIZINSKI, C.W.; PFEIFFER, D.R. Release of mitochondrial matrix proteins through a Ca requiring, cyclosporin-sensitive pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, 16: 619-625, 1989.
- JEWELL, S.A., BELLOMO, G., THOR, H., ORRENIUS, S.; SMITH, M.T. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. **Science**, 217: 1257-1259, 1982.
- JEZEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. **J Biol Chem**, 271: 32743-32748, 1996.
- JEZEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. **J. Biol Chem**, 272: 24472-24478, 1997.
- JOHANNES, E.; BROSNAN, J.M.; SANDERS, D. Calcium channels and signal transduction in plant cells. **Bio Essays**, 13: 331-336, 1991.
- JONES, A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? **Trends Plant Sci**, 5: 225-230, 2000.
- JONES, A.M. Programmed cell death in development and defense. **Plant Physiol**, 125:94-97, 2001.

JUNG, D.W.; BRADSHAW, P.C.; PFEIFFER, D.R. Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. **J Biol Chem**, 272: 21104-21112, 1997

KAPLAN, R.S.; PEDERSEN, P.L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochem J**, 212: 279-288, 1983.

KLIGENBERG, M. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 270: 1-14, 1989.

KOSOWER, N. S.; KOSOWER, E. M.; WERTHEIM, B. Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. **Biochem Biophys Res Commun**, 37: 593-566, 1969.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; GRIJALBA, M.T.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, 271: 2929-2934, 1996A.

KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. **Am J Physiol**, 269: C141-C147, 1995.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, 378: 150-152, 1996.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, 378: 150-152, 1996B.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Rad Biol Med**, 26: 463-471, 1999.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E.; CASTILHO, R.J. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with *N*-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, 1318: 395-402, 1997.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F. Ca^{2+} acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide. **Biochim Biophys Acta**, 1322: 221-229, 1997.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, 495: 12-15, 2001.

KOWALTOWSKI, A.J.; NETTO, L.E.S.; VERCESI, A.E. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. **J Biol Chem**, 273: 12766-12769, 1998.

LEHNINGER, A. L. **The mitochondrion: molecular basis of structure and function**. W. A. Benjamin, Inc. New York, USA, 1964.

LEHNINGER, A.L.; VERCESI, A.E.; BABABUMNI, E.A. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc Nat Acad Sci USA**, 75: 1690-1694, 1978.

LEMASTERS, J.J. The mitochondrial permeability transition: from biochemical curiosity to pathophysiological mechanism. **Gastroenterology**, 115: 783-786, 1998.

LENARTOWICS, E.; BERNARDI, P.; AZZONE, G.F. Phenylarsine oxide induced the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. **J Bioenerg Biomemb**, 23: 679-688, 1991.

LI, W.; SHARIAT-MADAR, Z.; POWERS, M.; SUN, X.; LANE, R.D.; GARLID, K.D. Reconstitution, identification, purification and immunological characterization of the 110kDa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from beef heart mitochondria. **J Biol Chem**, 267: 17983-17989, 1992.

LOW, P.S.; LLOYD, D.H.; STEIN, T.M.; ROGERS III, J.A. Calcium displacement by local anesthetics. Dependence on pH and anesthetic charge. **J Biol Chem**, 254: 4119-4125, 1979.

MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, 129: 943-948, 1985.

MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. **Biochem Biophys Acta**, 85: 49-56, 1986.

MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Mechanism of Ca^{2+} and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. **Current Topics in Plant Physiol**, 211-217, 1993.

MATOO, A.K. Peptidylprolyl *cis-trans*-isomerases from plant organelles. **Methods Enzymol**, 290: 84-100, 1998.

MATTSON, M.P.; CULMSEE, C.; YU, Z.F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. **Cell Tissue Res**, 529: 57-68, 2000.

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

McCORMACK, J.G.; DENTON, R.M. Role of calcium ions in the regulation of mitochondrial metabolism: properties of the Ca^{2+} -sensitive dehydrogenase within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat. **Biochem J**, 190: 95-105, 1980.

McCORMACK, J.G.; DENTON, R.M. Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria. **Trends Biochem. Sci**, 11: 258-262, 1986.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, 52: 711-760, 1983.

MILANI, G.; JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida*

parapsilosis: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. **FEBS Lett**, 508: 231-235, 2001.

MOLLER, I.M. The oxidation of cytosolic NAD(P)H by external NAD(P)H dehydrogenases in the respiratory chain of plant mitochondria. **Physiol Plant**, 100: 85-90, 1997.

MOLLER, I.M.; RASMUSSEN, A.G. The role of NADP in the mitochondrial matrix. **Trends Plant Sci**, 3: 21-27, 1998.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 52: 561-591, 2001.

MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R.; VERCESI, A. E. Calcium homeostasis in procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*. Lack of inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca^{2+} release. **J Biol Chem**, 267: 6020-6026, 1992.

MORENO, S.N.J.; SILVA, J.; VERCESI, A.E.; DOCAMPO, R. Cytosolic free calcium elevation in *T. cruzi* precedes calcium mobilization in myoblasts and is required for cell invasion. **J Exp Med**, 180: 1535-1540, 1994.

NAZARETH, W.; NASSER, Y.; CROMPTON, M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. **J Mol Cell Cardiol**, 23: 1351-1354, 1991.

NICHOLLS, D.G. Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. **Biochem J**, 170: 511-522, 1978.

NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics 2** Academic Press Inc. London, U.K, 1982.

NICHOLLS, D.G.; ÅKERMANN, K.E.O. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**, 683: 57-88, 1982.

- NICHOLLS, D.G.; BRAND, M.D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. **Biochem J**, 188: 113-118, 1980.
- NICOLLI, A.; BASSO, E.; PETRONILLI, V.; WEGNER, R.M.; BERNARDI, P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. **J Biol Chem**, 271: 2185-2192, 1996.
- NOVGORODOV, S.A.; GUDZ, T.I.; BRIERLEY, G.P.; PFEIFFER, D.R. Magnesium ion modulates the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to cyclosporin A and ADP. **Arch Biochem Biophys**, 311: 219-228, 1994.
- ORRENTUS, S.; MCCONKEY, D.J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. **Trends Pharm Sci**, 10: 281-283, 1989.
- PASTORINO, J.G.; SNYDER, J.W.; SERRONI, A.; HOEK, J.B.; FARBER, J.L. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of culture hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. **J Biol Chem**, 268: 13791-13798, 1993.
- PETRONILLI, V.; COSTANTINI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PASSAMONTI, S.; BERNARDI, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. **J Biol Chem**, 269: 16638-16642, 1994.
- POZAN, T.; RIZZUTO, R. The renaissance of mitochondrial calcium transport. **Eur J Biochem**, 267: 5269-5273, 2000.
- PUNTARULO, S.; SANCHEZ, R.A.; BOVERIS, A. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. **Plant Physiol**, 86: 626-630, 1988.
- PURVIS, A.C. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. **Physiol Plant**, 100: 165-170, 1997.

- PURVIS, A.C.; SHEWFELT, R.L.; GEGOGNE, J.W. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. **Physiol Plant**, 94: 743-749, 1995.
- PUSKIN, J.S., GUNTER, T.E., GUNTER, K.K.; RUSSEL, P.R. Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria. **Biochemistry**, 15: 3834-3842, 1976.
- REED, K.C.; BYGRAVE, F.L. Inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. **Biochem J**, 140: 143-155, 1974A.
- REED, K.C.; BYGRAVE, F.L. Accumulation of lanthanum by rat liver mitochondria. **Biochem J**, 138: 239-252, 1974B.
- REEVES, J.P.; HALE, C.C. The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. **J Biol Chem**, 259: 7733-7739, 1984.
- REEVES, J.P.; CHEON, J. The cardiac sodium-calcium exchange system. In **Cell Calcium Metabolism**. (Fiskum, G. ed.) Plenum Publish. Corp., New York, 27-31, 1989.
- RICH, P.R.; BONNER, W.D. Jr. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 188: 206-213, 1978.
- RICHTER, C.; FREI, B. Ca^{2+} release from mitochondria induced by prooxidants. **Free Radical Biol Med**, 4:365-375, 1988.
- ROSSI, C.S.; LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca^{++} and phosphate and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, 239: 3971-3980, 1964.
- ROTTENBERG, H.; SCARPA, A. Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. **Biochemistry**, 13: 4811-4817, 1974.
- RUGOLO, M.; PISTOCCHI, R.; ZANNONI, D. Calcium ion transport in higher plant mitochondria (*Helianthus tuberosus*) **Physiol Plant**, 79: 297-302, 1990.
- SARIS, N.E.L.; ÅKERMAN, K.E.O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. **Curr Topics Bioenerg**, 10: 104-179, 1980.

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

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

SIES, H.. Biochemistry of oxidative stress. **Chem Int Ed Eng**, 25: 1058-1071, 1986.

SILIPRANDI, D.; SCUTARI, F.; ZOCCARATO, F.; SILIPRANDI, N. Action of 'diamide' on some energy linked processes of rat liver mitochondria. **FEBS Lett**, 42: 197-199, 1974.

SILIPRANDI, D.; TONINELLO, A.; ZOCCARATO, F.; RUGOLO, M.; SILIPRANDI, N. Synergic action of calcium ions and diamide on mitochondrial swelling. **Biochem Biophys Res Commun**, 66: 956-961, 1975.

SILVA, M.A.P.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Calcium transport by corn mitochondria: evaluation of the role of phosphate. **Plant Physiol**, 98: 452-457, 1992.

SOMLYO, A.P.; URBANICS, R.; VADASZ, G.; KOVACH, A.G.B.; SOMLYO, A.V. Mitochondrial calcium and cellular electrolytes in brain cortex frozen in situ: electron probe analysis. **Biochem Biophys Res Commun**, 132: 1071-1078, 1985.

SORRENTINO, V.; VOLPE, P. Ryanodine receptors: how many, where and why? **Trends Pharmacol Sci**, 14: 98-103, 1993.

SUTTON, H.C.; WINTERBOURN, C.C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton Reactions. **Free Rad Med Biol**, 6: 53-60, 1989.

TAKAYAMA, N.; MATSUO, N.; TANAKA, T. Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca^{2+} -dependent inner membrane permeability transition. **Biochemistry**, 294: 719-725, 1993.

TEAGUE, W.M.; PETTIT, F.H.; WU, T.L.; SIBERMAN, S.R.; REED, L.J. Purification and properties of pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine heart and kidney. **Biochemistry**, 21: 5585-5592, 1982.

TEIXEIRA, B.M.A.R.; KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Inhibition of mitochondrial permeability transition by low pH is associated with less extensive membrane protein thiol oxidation. **Biosc Rep**, 19: 525-533, 1999.

THOMSON, L.; GADELHA, F.R.; PELUFFO, G.; VERCESI, A.E.; RADI, R. Peroxynitrite affects Ca^{2+} transport in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 98: 81-91, 1999.

TIWARI, B.S.; BELENGHI, B.; LEVINE, A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion , opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. **Plant Physiol**, 128: 1271-1281, 2002.

TURRENS, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**, 17: 3-8, 1997.

UYEMURA, S.A.; LUO, S.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. Oxidative phosphorylation, Ca^{2+} transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. **J Biol Chem**, 275: 9709-9715, 2000.

URIBE, A.; CHAVEZ, E.; JIMENEZ, M.; ZAZUETA, C.; MORENO-SANCHEZ, R. Characterization of Ca^{2+} transport in *Euglena gracilis* mitochondria. **Biochem Biophys Acta**, 1186: 107-116, 1994.

VALLE, V.G.R.; FAGIAN, M.M.; PARENTONI, L.S.; MEININCKE, A.R.; VERCESI, A.E. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Arch Biochem Biophys**, 307: 1-7, 1993.

VANDECASTEELE, G.; SZABADKAI, G.; RIZZUTO, R. Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules. **IUBMB Life**, 52: 213-219, 2001

VASINGTON, F.D.; MURPHY, J.V. Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. **J Biol Chem**, 237: 2670-2676, 1962.

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

VERCESI, A.E. Mitochondrial Ca^{2+} transport. Characteristics of NAD(P)^{+} -induced Ca^{2+} efflux. **Arq Biol Tecnol**, 27: 477-494, 1984A.

VERCESI, A.E. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)^{+} -stimulated Ca^{2+} efflux from mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, 119: 305-310, 1984B.

VERCESI, A.E. Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. **Brazilian J Med Biol Res**, 26: 441-457, 1993.

VERCESI, A.E.; BERNARDES, C.F.; HOFFMANN, M.E.; GADELHA, F.R.; DOCAMPO, R. Digitonin-permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* *in situ*. **J Biol Chem**, 266: 14431-14434, 1991A.

VERCESI, A.E.; CASTILHO, R.F.; MEINICKE, A.R.; VALLE, V.G.R.; HERMES-LIMA, M.; BECHARA, E.J.H. Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of Ca^{2+} ions and membrane protein thiols. **Biochim Biophys Acta**, 1188: 86-92, 1994.

VERCESI, A.E.; FERRAZ, V.L.; MACEDO, D.V.; FISKUM, G. Ca^{2+} -dependent NAD(P)^{+} -induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. **Biochem Biophys Res Commun**, 154: 934-94, 1988.

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

VERCESI, A.E.; HOFFMANN, M.E.; BERNARDES, C.F.; DOCAMPO, R. ATP and Ca^{2+} homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian J Med Biol Res**, 26: 355-366, 1993A.

VERCESI, A.E.; HOFFMANN, M.E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In **Methods in Toxicology "Mitochondrial Dysfunction"** (D.P. Jones, L.H. Lash, eds.) Vol. 2, Chapter 21, Academic Press, New York, 1993.

VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; GRIJALBA, M.T.; MEININKE, A.R.; CASTILHO, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosc Reports**, 17: 43-52, 1997.

VERCESI, A.E.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. **Biochem J**, 304: 227-233, 1994B.

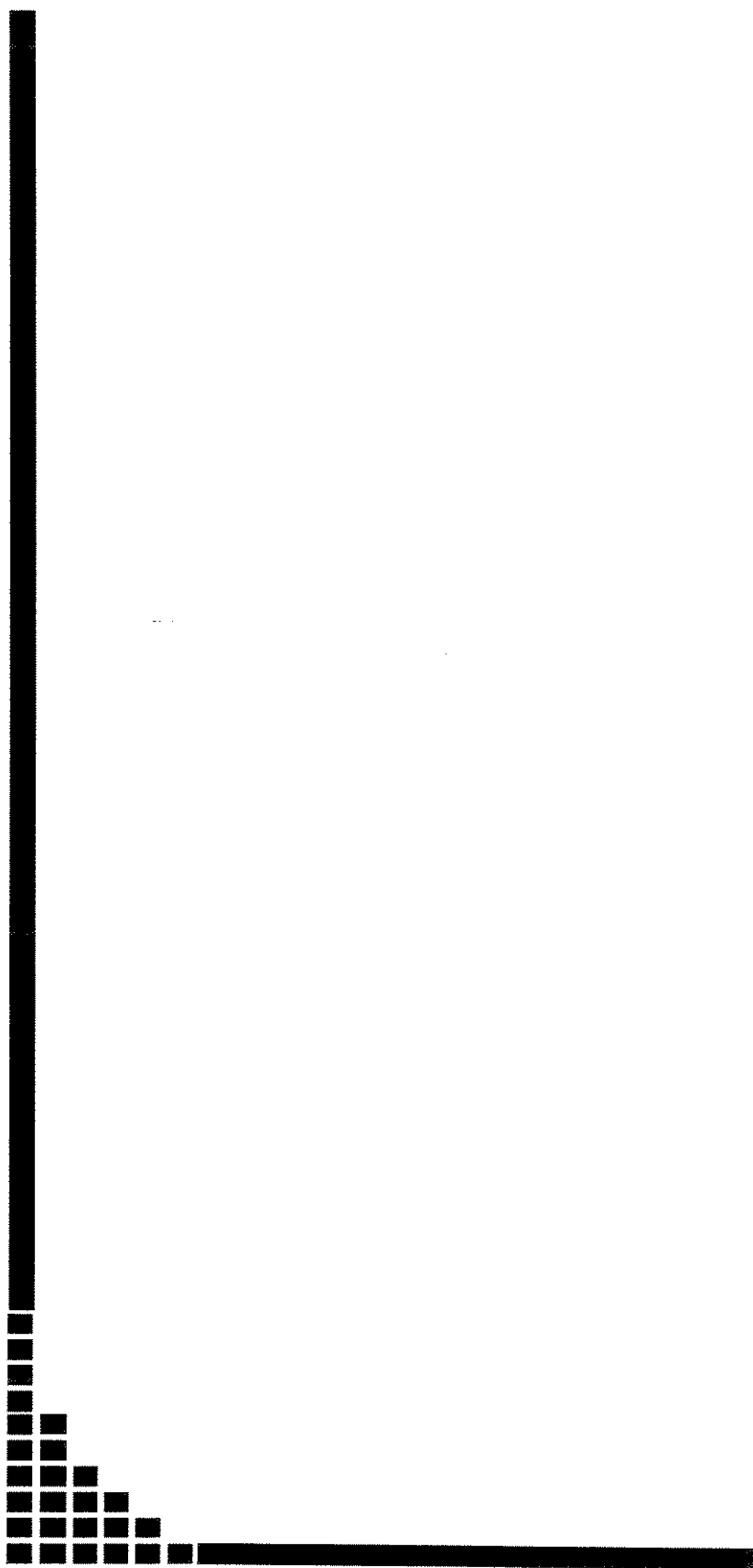
VERCESI, A.E.; MORENO, S.N.J.; BERNARDES, C.F.; MEINICKE, A.R.; FERNANDES, E.C.; DOCAMPO, R. Thapsigargin causes Ca^{2+} release and collapse of the membrane potential of the *Trypanosoma brucei* mitochondria "in situ" and of isolated rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, 268: 8564-8568, 1993B.

VERCESI, A.E., PEREIRA-DA-SILVA, L., MARTINS, I.S., CARNIERI, E.G.S., BERNARDES, C.F.; FAGIAN, M.M. **Cell calcium metabolism** (Fiskum G.ed.) pp.103-111. Plenum Press ed. New York, 1989.

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: 6379-6385, 1978.

VERCESI, A.E.; HOFFMANN, M.E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In **Methods in Toxicology "Mitochondrial Dysfunction"** (D.P.Jones, L.H.Lash, eds), Vol.2, Chapter 21, Academic Press, New York. 1993.

- VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.P.A.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, 375: 24, 1995.
- VIANELLO, A.; MACRI, F.; BRAIDOT, E.; MOKHOVA, E.N.. Effect of cyclosporin A on energy coupling in pea stem mitochondria. **FEBS Lett**, 371: 258-260, 1995.
- VINAGRADOV, A.S.; SCARPA, A. The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, 248: 5527-5531, 1973.
- VIROLAINEN, E.; BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K..Ca⁽²⁺⁾-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Ann Bot*, 90::509-516,. 2002
- VOTYAKOVA, T.V.; BAZHENOVA, E.N.; ZVJAGILSKAYA, R.A. Polyamines improve Ca²⁺ transport system of the yeast mitochondria. **FEBS Lett**, 261: 139-141, 1990.
- VOTYAKOVA, T.V.; BAZHENOVA, E.N.; ZVJAGILSKAYA, R.A. Yeast mitochondrial calcium uptake: regulation by poliamines and magnesium ions. **J Bioenerg Biomembr**, 25: 569-574, 1993.
- WEIR, I.E. Analysis of apoptosis in plant cells. **Methods Cell Biol**, 63: 506-526, 2001.
- YU, X-H.; PERDUE, T.D.; JONES,A.M. Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. **Cell Death Different**, 9: 189-198, 2002.
- YURKOV, I.S.; ZINCHENKO, V.P.; MAKAROV, P.R.; KUZNETSOVA, S.M. Intracellular distribution and characteristics of Ca²⁺-transporting systems in cells of ciliate *Tetrahymena pyriforms*. **Membr Cell Biol**, 10: 565-572, 1997.
- ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, 1241: 139-176, 1995.



7. ANEXOS

Ca²⁺ Induces a Cyclosporin A-Insensitive Permeability Transition Pore in Isolated Potato Tuber Mitochondria Mediated by Reactive Oxygen Species¹

Fabiane Fortes,² Roger F. Castilho,² Rosana Catisti,² Eva G. S. Carnieri,³ and Anibal E. Vercesi^{2,4}

Received July 1, 2000; accepted October 13, 2000

Oxidative damage of mammalian mitochondria induced by Ca²⁺ and prooxidants is mediated by the attack of mitochondria-generated reactive oxygen species on membrane protein thiols promoting oxidation and cross-linkage that leads to the opening of the mitochondrial permeability transition pore (Castilho *et al.*, 1995). In this study, we present evidence that deenergized potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria, which do not possess a Ca²⁺ uniport, undergo inner membrane permeabilization when treated with Ca²⁺ (>0.2 mM), as indicated by mitochondrial swelling. Similar to rat liver mitochondria, this permeabilization is enhanced by diamide, a thiol oxidant that creates a condition of oxidative stress by oxidizing pyridine nucleotides. This is inhibited by the antioxidants catalase and dithiothreitol. Potato mitochondrial membrane permeabilization is not inhibited by ADP, cyclosporin A, and ruthenium red, and is partially inhibited by Mg²⁺ and acidic pH, well known inhibitors of the mammalian mitochondrial permeability transition. The lack of inhibition of potato mitochondrial permeabilization by cyclosporin A is in contrast to the inhibition of the peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity, that is related to the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. Interestingly, the monofunctional thiol reagent-mersalyl induces an extensive cyclosporin A-insensitive potato mitochondrial swelling, even in the presence of lower Ca²⁺ concentrations (>0.01 mM). In conclusion, we have identified a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato mitochondria that is induced by reactive oxygen species.

KEY WORDS: Calcium; cyclosporin A; mitochondrial permeability transition; plant mitochondria; oxidative stress; *Solanum tuberosum*.

INTRODUCTION

It is well known that, under certain pathological conditions, mitochondrial matrix Ca²⁺ may reach a concentration that triggers the state of membrane permeability tran-

sition (MPT) in mammalian mitochondria (for reviews, see, Halestrap *et al.*, 1997; Lemasters, 1998; Kowaltowski and Vercesi, 1999; Crompton, 1999). MPT is defined as a Ca²⁺-dependent, nonspecific permeabilization of the mitochondrial inner membrane, inhibited by submicromolar concentrations of cyclosporin A (Zoratti and Szabò, 1995). This process begins as a mitochondrial membrane permeabilization to protons and small ions and progresses as a permeabilization to small sugars and osmotic support, finally resulting in permeabilization to low-molecular mass proteins (<1500 Da), accompanied by irreversible mitochondrial dysfunction (Zoratti and Szabò, 1995; Castilho *et al.*, 1996). MPT can be enhanced by various agents (inducers) including prooxidants, thiol cross-linking reagents, inorganic phosphate (P_i) and uncouplers

¹ Key to abbreviations: $\Delta\Psi$, membrane potential; DIDS, 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid; FCCP, carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone; MPT, mitochondrial permeability transition; ROS, reactive oxygen species.

² Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-970, Brazil.

³ Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

⁴ To whom all correspondence should be addressed; e-mail: anibal@obelix.unicamp.br

(Zoratti and Szabó, 1995; Kowaltowski and Vercesi, 1999).

Studies conducted in our laboratory (Valle *et al.*, 1993; Castilho *et al.*, 1995; Kowaltowski and Vercesi, 1999) and others (Zoratti and Szabó, 1995) have demonstrated that MPT, induced by prooxidants such as diamide or *t*-butyl hydroperoxide, is triggered by a Ca^{2+} -stimulated production of reactive oxygen species (ROS) (Castilho *et al.*, 1995; Grijalba *et al.*, 1999), which accumulates due to exhaustion of mitochondrial antioxidants GSH and NAD(P)H. Mitochondrially generated ROS promote the oxidation and cross-linkage of thiol groups on mitochondrial membrane proteins, leading to MPT (Valle *et al.*, 1993; Castilho *et al.*, 1995, 1996). Partial inhibition promoted by ruthenium red, an inhibitor of the Ca^{2+} uniporter, indicates that these processes are dependent on intramitochondrial Ca^{2+} (Vercesi *et al.*, 1988).

Ca^{2+} transport by plant mitochondria varies in many aspects between different plant species (Chen and Lehninger, 1973; Dieter and Marmé, 1980) and between different tissues and ages in the same species (Dieter and Marmé, 1980). The data available also show that Ca^{2+} transport in plant mitochondria operates differently from that in animals (Moore and Åkerman, 1984). For example, mitochondria isolated from the hypocotyls of plants such as coffee (*Coffea arabica*), soybean (*Glycine max*), bean (*Phaseolus vulgaris*), and corn (*Zea mays*) have the ability to transport Ca^{2+} (Martins and Vercesi, 1985; Carnieri *et al.*, 1986). Therefore potato tubers (*Solanum tuberosum*), red beet roots (*Beta vulgaris*), and white cabbage leaves (*Brassica oleraceae*) mitochondria are unable to accumulate Ca^{2+} , despite the ability to build up a high transmembrane electrical potential, the driving force for Ca^{2+} uptake (Martins and Vercesi, 1985; Silva *et al.*, 1992). This suggests that these mitochondria do not possess the electrophoretic Ca^{2+} uniporter and constitute good models to study the mechanism by which Ca^{2+} affects mitochondrial membrane permeability. Other interesting data obtained in these studies showed that potato tuber mitochondria possess a Mg^{2+} -insensitive inner membrane anion channel (PIMAC) (Beavis and Vercesi, 1992), an uncoupling protein (PUMP) (Vercesi *et al.*, 1995) and an alternative oxidase (for a recent review see, Sluse and Jarmuszkiewicz, 1998) that could potentially participate in the modulation of the MPT via their effects on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) and, hence, on the mitochondrial generation of ROS.

In this paper, we report the effect of Ca^{2+} , diamide, and thiol reagents on the permeability of potato tuber mitochondrial membrane, and its relationship with extramitochondrial Ca^{2+} . Our results indicate that potato mitochondrial membrane permeabilization occurs in a cyclosporin

A-insensitive mechanism and is due the oxidation of protein thiol groups by mitochondrially generated ROS.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Potato Tuber Mitochondria

Potato tuber mitochondria were isolated from potatoes (*Solanum tuberosum* L., cv. "Bintje") obtained from the local market using a sucrose medium as described by Beavis and Vercesi (1992). The extraction medium contained 0.25 M sucrose, 10 mM HEPES- K^+ , 2 mM EGTA, 3 mM cysteine, and bovine serum albumin (1 mg/ml); the pH was adjusted to 8.0 at 4°C. The wash medium contained 0.25 M sucrose, 2 mM HEPES- K^+ , and 0.1 mM EGTA and was adjusted to pH 7.1 at 4°C. Potatoes (1 kg) are peeled, diced into 1 to 2 cm cubes, transferred to 2 liters of extraction medium at 4°C, and disrupted in a Waring Blendor at high speed for 15 s. The filtrate is then centrifuged at $1000 \times g$ for 15 min and the pellet discarded. The mitochondria are then collected by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min, resuspended in about 40 ml wash medium, and then centrifuged twice at $250 \times g$ for 10 min, the starch pellets are discarded after each spin. The mitochondria are then collected by centrifugation at $6000 \times g$ for 15 min. The final pellet consists of a firm pellet with a "fluffy" layer on the top. The "fluffy" layer is discarded and the pellet resuspended in about 2 ml of 0.25 M sucrose to yield a stock suspension of about 20 to 30 mg/ml.

For purification of potato tuber mitochondria, portions (1 ml) of the final pellet were layered on top of gradients consisting of 40 ml of buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 0.3 mM EGTA, and 21% Percoll. The mixture was centrifuged at $39,000 \times g$ for 30 min. Two bands of membranes were recovered from the gradient: a dense band recovered from approximately two-thirds down the tube, corresponded to purified mitochondria, while most contaminants were isolated from the Percoll gradient from a band above the mitochondria. The purified mitochondria were removed with a Pasteur pipet, diluted with 30 ml of 0.25 M sucrose, 2 mM HEPES- K^+ , pH 7.1, and 0.1 mM EGTA and washed by centrifugation at $19,000 \times g$ for 15 min to remove the Percoll. The pellet was resuspended in about 1 ml of 0.25 M sucrose to yield a stock suspension of about 15 to 20 mg/ml.

Isolation of Rat Liver Mitochondria

Mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation of the livers of adult Wistar strain rats fasted overnight, as described by Castilho *et al.* (1995).

Standard Incubation Procedure

The experiments were carried out at 30°C in a standard reaction medium containing 300 mM sucrose, 10 mM HEPES-Na⁺ buffer (pH 7.2), 0.5 μM carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), and 1 μM antimycin A. In the experiments conducted at different pHs, the buffer used was 10 mM MOPS/Tris instead of HEPES. Other additions are indicated in the figure legends. The results shown are representative of a series of at least three experiments, using different mitochondrial preparations. The results were reproduced within 15% of variation.

Determination of Mitochondrial Swelling

Mitochondrial swelling was estimated from the decrease in the absorbance of the mitochondrial suspension at 520 nm measured in a Hitachi U-3000 spectrophotometer (Beavis *et al.*, 1985; Garlid and Beavis, 1985). This technique generates a light-scattering variable, "β," which normalizes reciprocal absorbance for mitochondrial protein concentration, "P" (mg/ml), according to the formula:

$$\beta = \frac{P}{P_s}(A^{-1} - a)$$

where *a* is a machine constant and *P_s* (equals 1 mg/ml) is a constant introduced to make β dimensionless.

Measurements of Mitochondrial Transmembrane Electrical Potential (Δψ)

Mitochondrial membrane potential (Δψ) was monitored by measuring the fluorescence changes of safranin O (5.0 μM), using a model F-4010 Hitachi spectrofluorometer (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) operated at excitation and emission wavelengths of 495 and 586 nm, respectively, and slit widths of 5 nm (Åkerman and Wikström, 1976).

Determination of Ca²⁺ Movements

Variations in the concentration of free extramitochondrial Ca²⁺ were followed by measuring the changes in the absorbance spectrum of arsenazo III (40 μM), using a SLM Aminco DW2000 spectrophotometer (SLM Instruments, Inc., Urbana, Illinois) set at the 675–685 nm wavelength pair (Scarpa, 1979).

Measurement of Peptidylprolyl *cis-trans* Isomerase Activity

The peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity was measured by the procedure of Fischer *et al.* (1989). This assay was based on *cis-trans* isomerization of the peptide *N*-succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanyl 4-nitroanilide. Chymotrypsin hydrolyzes the nitroanilide only when the Ala-Pro is *trans*. This reaction is followed by an increase in absorbance at 390 nm. Mitochondria (0.25 mg/ml) were preincubated for 2 min at room temperature in reaction medium containing 40 mM HEPES-K⁺ buffer (pH 8.0) and 0.05% Triton X-100, followed by 30 s of preincubation with 20 μM chymotrypsin. Absorbance measurements were initiated 2 s after the addition of 60 μM *N*-succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanyl 4-nitroanilide at 390 nm using a SLM Aminco DW2000 spectrophotometer.

Chemicals

Most of the chemicals, including ADP, catalase, chymotrypsin, cyclosporin A, diamide, dithiothreitol, EGTA, HEPES, MOPS, safranin O, succinate, ruthenium red, and *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe 4-nitroanilide were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri). All other reagents were commercial products of the highest purity grade available.

RESULTS

The study of inner mitochondrial membrane permeabilization induced by Ca²⁺ can be assessed by using the classic mitochondrial swelling technique to follow the net influx of the osmotic support associated with nonspecific increase in membrane permeability (Gunter and Pfeiffer, 1990). The experiments shown in Fig. 1 were conducted using deenergized mitochondria, a condition under which the Ca²⁺ influx can be driven by a gradient of the cation activity across the inner membrane if a Ca²⁺ uniport or a Ca²⁺ ionophore is present. This experimental condition has the advantage of eliminating the involvement of respiration, membrane potential, and Ca²⁺ cycling across the inner membrane in the mitochondrial swelling (Vercesi *et al.*, 1988). The results of Fig. 1 illustrate that the decrease in the absorbance of the mitochondrial suspension, induced by increasing Ca²⁺ concentrations (200–800 μM), occurs in a dose-dependent manner (lines b–e). The dotted line shows that in the presence of 300 μM

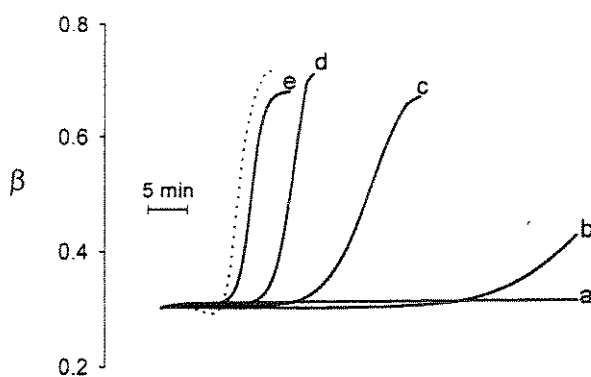


Fig. 1. Ca^{2+} -induced potato mitochondrial swelling: Effect of diamide. Potato tuber mitochondria (0.2 mg/ml) were incubated in standard reaction medium containing 200 μM Ca^{2+} (line b), 400 μM Ca^{2+} (line c), 600 μM Ca^{2+} (line d), 800 μM Ca^{2+} (line e) and 600 μM Ca^{2+} and 300 μM diamide (dotted line). Line a represents a control experiment without additions of Ca^{2+} and diamide.

diamide, a thiol oxidant (Kosower *et al.*, 1969), the lag phase that precedes swelling induced by 600 μM Ca^{2+} is shorter than when Ca^{2+} was added alone (line d).

Figure 2 (Panel A) confirms that potato tuber mitochondria (line a) are not able to take up Ca^{2+} (free $[\text{Ca}^{2+}] = 20 \mu\text{M}$) under our experimental conditions. Under the same conditions, rat liver mitochondria (line b) accumulated and retained the Ca^{2+} present in the medium, until the protonophore FCCP was included. Panel B shows that isolated potato tuber (line a) and rat liver (line b) mitochondria respiring on succinate were able to create a membrane potential ($\Delta\psi$) and maintain it for 10 min. The addition of ADP caused a transient decrease in safranin fluorescence (lines a and b) during ADP phosphorylation. In contrast to rat liver mitochondria, no change in $\Delta\psi$ was observed in potato mitochondria when 20 μM of Ca^{2+} was added, confirming the absence of a Ca^{2+} transport system dependent on $\Delta\psi$ in these mitochondria (line a).

The results shown in Fig. 3 (Panel A) indicate that 2 μM ruthenium red (line c), an inhibitor of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter, and 5 μM ionomycin (line d), an ionophore with a high selectivity for Ca^{2+} , did not significantly change the patterns of potato mitochondrial swelling induced by 600 μM Ca^{2+} and 300 μM diamide (line b). In contrast, in rat liver mitochondria (Panel B) the addition of ruthenium red (line c) partially inhibits, while ionomycin (line d) stimulates Ca^{2+} and diamide-induced mitochondrial swelling.

In Fig. 4, the effects of different mitochondrial permeability transition inhibitors were tested on potato tuber mitochondrial swelling induced by diamide in the presence of Ca^{2+} . It was observed that dithiothreitol (A, line c), a disulfide reductant, and catalase (A, line d), an enzyme

that degrades H_2O_2 , completely inhibit potato mitochondrial swelling (A, line b). On the other hand, cyclosporin A (B, line c) and ADP (B, line e), classical inhibitors of the permeability transition pore in mammalian mitochondria (Gunter and Pfeiffer, 1990), had no inhibitory effect. Mg^{2+} , which competes with Ca^{2+} for binding sites on the mitochondrial membrane (Kowaltowski *et al.*, 1998), partially inhibits this potato mitochondrial swelling (B, line d). Since crude potato mitochondria are well-known to be contaminated with intact peroxisomes and amyloplast ghosts, we have also carried out experiments with purified potato tuber mitochondria (Fig. 4C). It was observed that dithiothreitol (C, line c) and catalase (C, line d) completely inhibit Ca^{2+} and diamide-induced swelling of purified potato tuber mitochondria (C, line b), while cyclosporin A (C, line e) had no inhibitory effect. These results showed that purified mitochondria give the same results to that obtained with crude potato tuber mitochondria.

The results depicted in Fig. 5 show the effect of medium pH (pH 6.6–7.6) on Ca^{2+} and diamide-induced potato mitochondrial swelling. We observed that by increasing pH, the lag phase that precedes mitochondrial swelling was progressively decreased (pH 6.6–7.6, respectively, lines a–f). These results suggest that acidic pH inhibits Ca^{2+} -induced potato mitochondrial swelling in the same way that it occurs with rat liver mitochondria (Halestrap, 1991; Bernardi *et al.*, 1992).

Inhibition of mammalian MPT by cyclosporin A is correlated with binding of cyclosporin A to cyclophilin with inhibition of peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity (for reviews, see Halestrap *et al.*, 1997; Crompton, 1999). Since we observed no effect of cyclosporin A on Ca^{2+} -induced potato mitochondrial swelling, we investigated the presence of peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity in our preparations and its sensitivity to cyclosporin A. Figure 6 shows typical absorbance changes beginning 2 s after the assay of peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity was started, using the test peptide *N*-succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanyl 4-nitroanilide. Isomerization occurred in the absence of mitochondrial protein (lines c), but it was stimulated when rat liver (Panel A) or potato tuber (Panel B) mitochondria were present (lines a). Cyclosporin A (2 μM) inhibited the isomerase activity (lines b) in both types of mitochondria. These results show that there is no direct connection between the ability of cyclosporin A to inhibit peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity and potato mitochondrial permeabilization.

In order to further investigate the participation of protein thiol groups in Ca^{2+} -induced potato mitochondrial permeabilization, we tested the effects of monofunctional

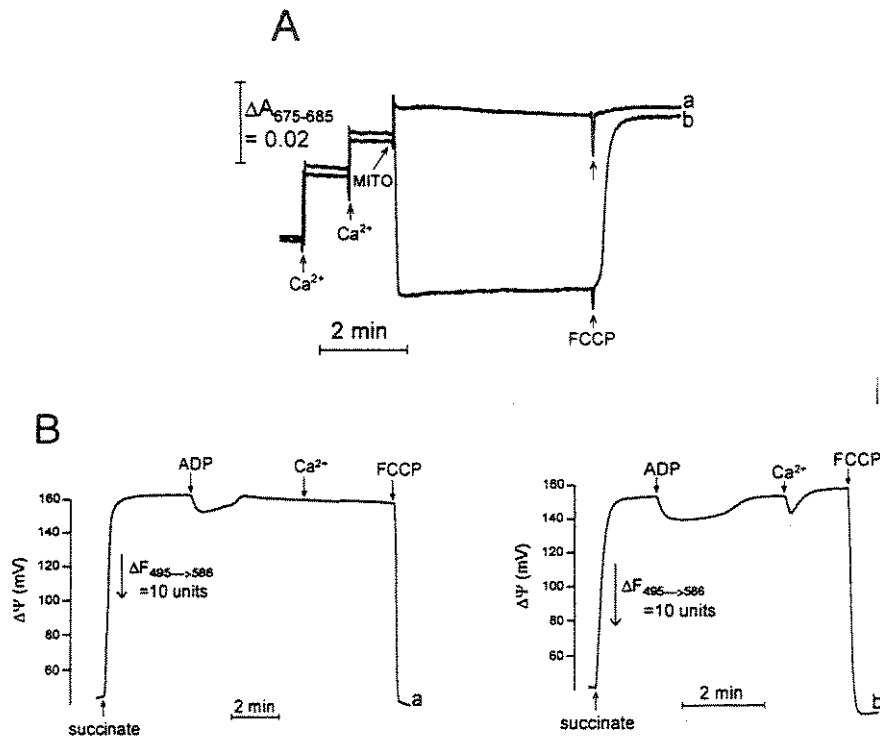


Fig. 2. Characteristics of Ca²⁺ uptake and membrane potential of potato tuber and rat liver mitochondria. Potato tuber (lines a) and rat liver mitochondria (lines b) were incubated in reaction medium containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.2, 1 mM P_i, 0.1 mg/ml BSA, 2 mM succinate, and 5 μM rotenone supplemented with 20 μM arsenazo III (A) or 5 μM safranin O (B). In (A), Ca²⁺ (two serial additions of 10 μM), 1 mg/ml mitochondria (MITO), and 1 μM FCCP were added where indicated (arrows). In (B), 100 μM ADP, 20 μM Ca²⁺, and 1 μM FCCP were added where indicated (arrows).

thiol reagents and thiol cross-linker reagents on potato mitochondrial swelling (Fig. 7). When the experiments were conducted in the presence of EGTA (free [Ca²⁺] < 0.01 μM) (Panel A), mersalyl (line a), but not phenylarsine oxide, DIDS, or *N*-ethylmaleimide, induced a slow mitochondrial swelling. Interestingly, mersalyl-induced mitochondrial swelling was strongly stimulated by 10 μM Ca²⁺ (Panel B, line a). In the presence of a higher Ca²⁺ concentration (600 μM; Panel C), all thiol reagents tested stimulated potato mitochondrial swelling. Mersalyl and Ca²⁺-induced potato mitochondrial swelling was insensitive to cyclosporin A and ADP and was only partially inhibited by Mg²⁺ (5.0 mM) (results not shown).

DISCUSSION

The formation of the mammalian MPT pore can be mediated by a concerted action between Ca²⁺ and ROS leading to oxidation of membrane protein thiols (for a recent review see Kowaltowski and Vercesi, 1999).

According to this model, Ca²⁺ ions are involved in the mechanism of MPT pore opening by: (1) binding to inner membrane cardiolipins and stimulating the production of O₂⁻ (superoxide anion radical) and, hence, H₂O₂, by the respiratory chain (Valle *et al.*, 1993; Dykens, 1994; Castilho *et al.*, 1995; Grijalba *et al.*, 1999), (2) stimulating the Fenton reaction through matrix Fe²⁺ mobilization (Castilho *et al.*, 1995), and (3) binding to membrane proteins that regulate MPT pore opening (Bernardi *et al.*, 1992; Crompton, 1999; Zoratti and Szabó, 1995). The results presented here indicate that high extramitochondrial Ca²⁺ concentrations promote permeabilization of the inner membrane of potato mitochondria in a mechanism sensitive to exogenous catalase and dithiothreitol (Fig. 4), suggesting the participation of ROS and protein thiol oxidation in this process. Moreover, the potentiation of Ca²⁺-induced potato mitochondrial swelling by diamide (Fig. 1), a thiol oxidant, and mersalyl (Fig. 7), a monofunctional thiol reagent, confirms that protein thiol groups are important targets to ROS inducing potato mitochondrial membrane permeabilization.

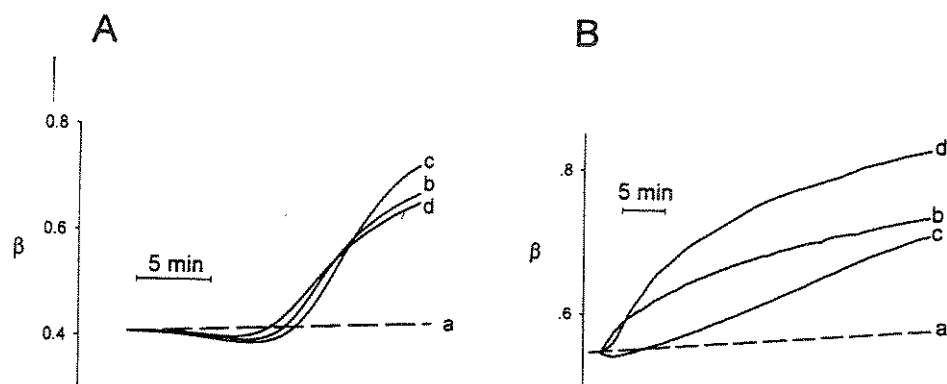


Fig. 3. Effect of ruthenium red and ionomycin on Ca^{2+} and diamide-induced mitochondrial swelling. Potato tuber (A) and rat liver mitochondria (B) (0.2 mg/ml) were incubated in standard reaction medium containing 300 μM diamide and 600 μM Ca^{2+} (lines b–d). Ruthenium red (2 μM) and 5 μM ionomycin were present in the experiments represented by lines c and d, respectively. The dashed lines represent control experiments without additions of Ca^{2+} and diamide.

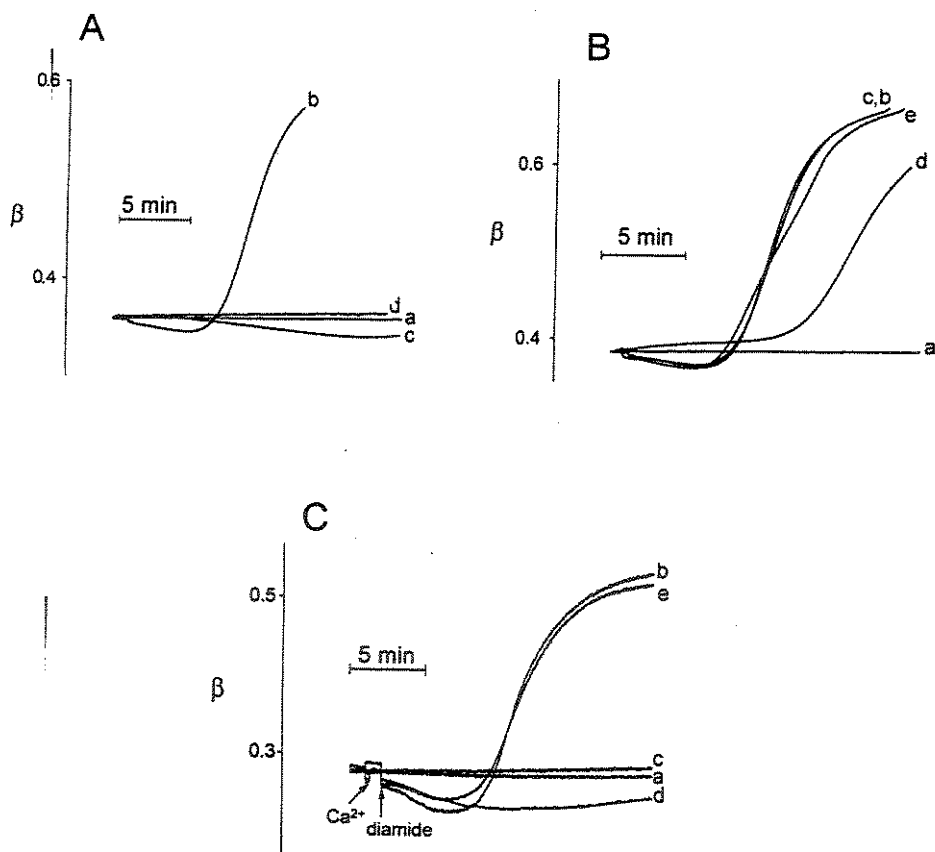


Fig. 4. Effect of antioxidants and permeability transition pore inhibitors on Ca^{2+} and diamide-induced potato tuber mitochondria swelling. Potato tuber mitochondria (0.2 mg/ml; crude mitochondria for (A and B), purified mitochondria for (C)) were incubated in standard reaction medium in the presence of 300 μM diamide plus 600 μM Ca^{2+} (A–C, lines b–e). In (A), the experiments were conducted in reaction medium containing 2 mM DTT (line c) or 5 μM catalase (line d). In (B), the experiments were conducted in reaction medium containing 1 μM CsA (line c), 5 mM Mg^{2+} (line d) or 200 μM ADP (line e). In (C), (using purified potato tuber mitochondria), the experiments were conducted in reaction medium containing 2 mM DTT (line c), 5 μM catalase (line d) or 1 μM CsA (line e). Lines a represent control experiments.

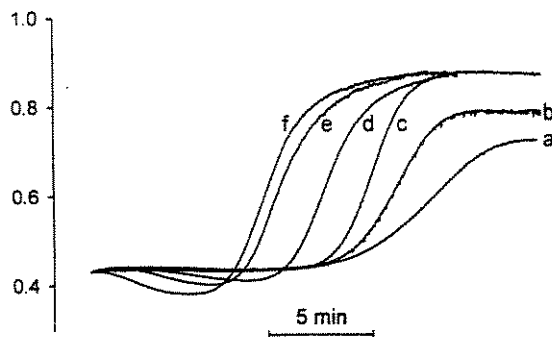


Fig. 5. Effect of pH on Ca²⁺ and diamide-induced potato tuber mitochondrial swelling. Potato tuber mitochondria (0.2 mg/ml) were incubated in the standard reaction medium buffered with 10 mM MOPS/Tris, in the presence of 300 μ M diamide and 600 μ M Ca²⁺, at different pH (6.6, line a; 6.8, line b; 7.0, line c; 7.2, line d; 7.4, line e; 7.6, line f).

The presence of the Ca²⁺ ionophore ionomycin, that potentiates Ca²⁺-induced rat liver MPT under deenergized conditions (Fig. 3B; Vercesi *et al.*, 1988), did not significantly stimulate swelling of potato mitochondria, which do not possess Ca²⁺ uniport. This result demonstrates that intramitochondrial Ca²⁺ is not necessary to induce potato MPT. In this regard, it is important to stress that ruthenium red did not totally inhibit opening of the MPT pore in deenergized rat liver mitochondria incubated in the presence of high Ca²⁺ concentrations (see Fig. 3B; Vercesi *et al.*, 1988). This suggests that, at high concentrations, the binding of Ca²⁺ to the external face of the inner membrane induces alterations similar to those induced by the high Ca²⁺ concentrations accumulated in the matrix of energized mitochondria. These alterations increase electron leakage and ROS production in mammalian mitochondria and seem to be mediated

by disorganization in the electron-transferring components of the respiratory chain (Grijalba *et al.*, 1999). Indeed, the electron paramagnetic resonance (EPR) technique (Grijalba *et al.*, 1999) showed that Ca²⁺, in the concentration range used in this work, induces lateral phase separation in "inside-out" heart submitochondrial particles.

Interestingly, in the present work, we have shown that potato mitochondria permeabilization induced by Ca²⁺ is poorly inhibited by the well-known inhibitors of the mammalian mitochondrial permeability transition, such as ADP and cyclosporin A, and it is only partially inhibited by Mg²⁺ and acidic pH. It is known that the inhibitory property of cyclosporin A on mammalian MPT is related to its binding to inner mitochondrial membrane cyclophilin D in a process associated with inhibition of the peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity (Nicolli *et al.*, 1996; Halestrap *et al.*, 1997). This implies that cyclophilin is a structural component of the mammalian MPT pore (Beutner *et al.*, 1998; Nicolli *et al.*, 1996) or catalyzes mammalian MPT opening via its peptide bond isomerase activity (Broekemeier and Pfeiffer, 1995; Novgorodov *et al.*, 1994). Cyclophilins are a large family of highly conserved proteins found in eukaryotes (Connern and Halestrap, 1992) and some plants (Mattoo, 1998; Breiman *et al.*, 1992). The dissociation between the property of cyclosporin A to inhibit peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity (Fig. 6) and to inhibit MPT pore opening in potato mitochondria (Fig. 5) suggests that peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity of cyclophilins may have other functions in potato mitochondria. Our results with potato mitochondria corroborate the recent proposal by Jung *et al.* (1997) that cyclophilin is a relatively recent phylogenetic component of the MPT, based on the observation of a similar cyclosporin A-insensitive MPT in yeast. Finally, the partial inhibition of potato MPT by acidic pH shows

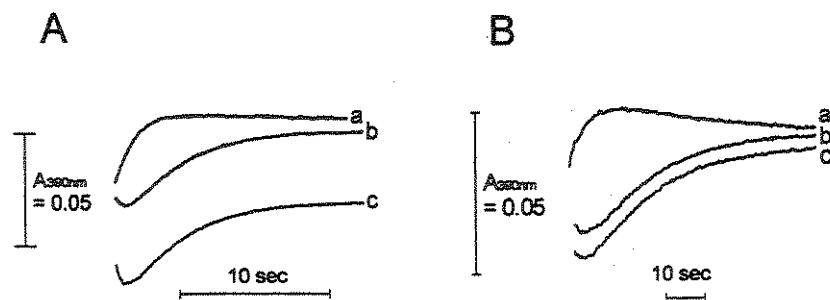


Fig. 6. Cyclosporin A inhibition of peptidylprolyl *cis-trans* isomerase in rat liver (A) and potato tuber mitochondria (B). Absorbance measurements were initiated 2 s after addition of chymotrypsin to assay buffer containing 0.25 mg/ml mitochondria (lines a), mitochondria plus 2 μ M cyclosporin A (lines b) or no additions (lines c).

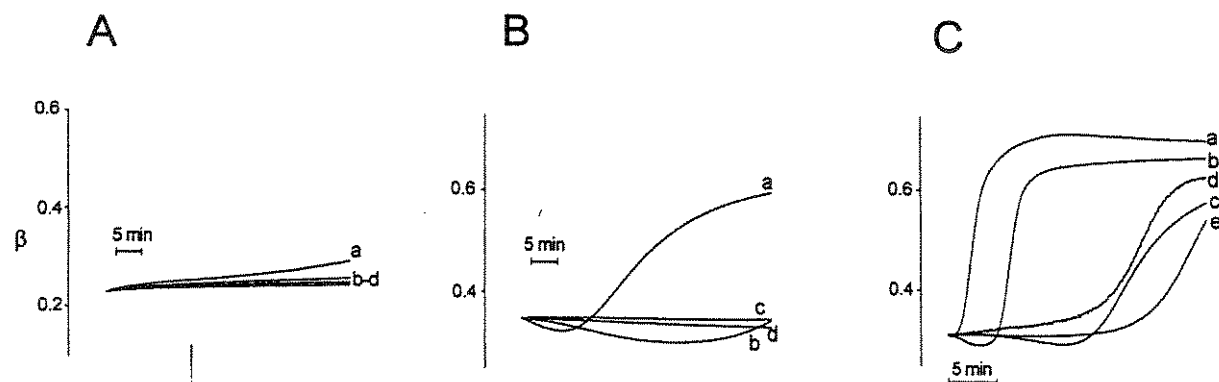


Fig. 7. Thiol reagent-induced potato mitochondrial swelling: Effect of Ca^{2+} . Potato tuber mitochondria (0.2 mg/ml) were incubated in standard reaction medium containing 1 mM EGTA (A), 10 μM Ca^{2+} (B) or 600 μM Ca^{2+} (C). Experiments were conducted in the presence of 50 μM of the thiol reagents: mersalyl (lines a), phenylarsine oxide (lines b), DIDS (lines c) or *N*-ethylmaleimide (lines d). Line e represents a control experiment in the presence of 600 μM Ca^{2+} and without addition of thiol reagents.

that protonation of a critical histidyl residue of cyclophilin with its dissociation from the binding site on the MPT pore complex (Nicolli *et al.*, 1996) is not the only mechanism of MPT inhibition under this condition. Indeed, we have recently demonstrated that the inhibition of mammalian MPT observed at lower incubation medium pH is mediated by a decrease in membrane protein thiol reactivity due to the protonation of protein histidyl residues (Teixeira *et al.*, 1999).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Claudia O. Silva for the preparation of potato tuber mitochondria. This work was partially supported by grants from the Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (FINEP/PRONEX), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Ph.D. grant to F.F.), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Ph.D. grant to R.C.).

REFERENCES

- Åkerman, K. E. O. and Wikström, M. K. F. (1976). *FEBS Lett.* **68**, 191–197.
- Beavis, A. D. and Vercesi, A. E. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 3079–3087.
- Beavis, A. D., Brannan, R. D., and Garlid, K. D. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 13424–13433.
- Bernardi, P., Vassaneli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabo, I., and Zoratti, M. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 2934–2939.
- Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., and Brdiczka, D. (1998). *Biochim. Biophys. Acta* **1368**, 7–18.
- Breiman, A., Fawcett, T. W., Ghirardi, M. L., and Mattoo, A. K. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 21293–21296.
- Broekemeier, K. M. and Pfeiffer, D. R. (1995). *Biochemistry* **34**, 16440–16449.
- Carnieri, E. G. S., Martins, I. S., and Vercesi, A. E. (1986). *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **28**, 525–531.
- Castilho, R. F., Kowaltowski, A. J., Meinicke, A. R., Bechara, E. J. H., and Vercesi, A. E. (1995). *Free Radical Biol. Med.* **18**, 479–486.
- Castilho, R. F., Kowaltowski, A. J., and Vercesi, A. E. (1996). *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 523–529.
- Chen, C. H. and Lehninger, A. L. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* **157**, 183–196.
- Connern, C. P. and Halestrap, A. P. (1992). *Biochem. J.* **284**, 381–385.
- Crompton, M. (1999). *Biochem. J.* **341**, 233–249.
- Dieter, P. and Marmé, D. (1980). *Planta* **150**, 1–8.
- Dykens, J. A. (1994). *J. Neurochem.* **63**, 584–591.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F. X. (1989). *Nature (London)* **337**, 476–478.
- Garlid, K. D. and Beavis, A. D. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 13434–13441.
- Grijalba, M. T., Vercesi, A. E., and Schreier, S. (1999). *Biochemistry* **38**, 13279–13287.
- Gunter, T. E. and Pfeiffer, D. R. (1990). *Amer. J. Physiol.* **258**, C755–C786.
- Halestrap, A. P. (1991). *Biochem. J.* **278**, 715–719.
- Halestrap, A. P., Connern, C. P., Griffiths, E. J., and Kerr, P. M. (1997). *Mol. Cell. Biochem.* **174**, 167–172.
- Jung, D. W., Bradshaw, P. C., and Pfeiffer, D. R. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 21104–21112.
- Kosower, N. S., Kosower, E. M., Wertheim, B., and Correa, W. S. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 593–596.
- Kowaltowski, A. J. and Vercesi, A. E. (1999). *Free Radical Biol. Med.* **26**, 463–471.
- Kowaltowski, A. J., Naia-da-Silva, E. S., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (1998). *Arch. Biochem. Biophys.* **359**, 77–81.
- Lemasters, J. J. (1998). *Gastroenterology* **115**, 783–786.
- Martins, I. S. and Vercesi, A. E. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**, 943–948.
- Mattoo, A. K. (1998). *Methods Enzymol.* **290**, 84–100.
- Moore, A. L. and Åkerman, K. E. O. (1984). *Plant Cell Environ.* **7**, 423–429.
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R. M., and Bernardi, P. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 2185–2192.
- Novgorodov, S. A., Gudiz, T. I., Brierley, G. P., and Pfeiffer, D. R. (1994). *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 219–228.

- Scarpa, A. (1979). *Methods Enzymol.* **56**, 301-338.
- Silva, M. P. A., Carnieri, E. G. S., and Vercesi, A. E. (1992). *Plant Physiol.* **98**, 452-457.
- Sluse, F. E. and Jarmuszkiewicz, W. (1998). *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **31**, 733-747.
- Teixeira, B. M., Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (1999). *Biosci. Rep.* **19**, 525-533.
- Valle, V. G. R., Fagian, M. M., Parentoni, L. S., Meinicke, A. R., and Vercesi, A. E. (1993). *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 1-7.
- Vercesi, A. E., Ferraz, V. L., Macedo, D. V., and Fiskum, G. (1988). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 934-941.
- Vercesi, A. E., Martins, I. S., Silva, M. A. P., Leite, H. M. F., Cuccovia, I. M., and Chaimovich, H. (1995). *Nature (London)* **375**, 24.
- Zoratti, M. and Szabò, I. (1995). *Biochem. Biophys. Acta* **1241**, 139-176.