

Regina Vasconcelos Antonio e aprovada pela Comissão Julgadora
Prof. Dr. Vercesi

REGINA VASCONCELLOS ANTONIO



EFEITO DE LASALOCID-A SOBRE O EFLUXO DE
 Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Tese apresentada ao Instituto de
de Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas, UNICAMP, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área Bioquí-
mica.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi

CAMPINAS-1989



Aos meus avós
Santina e Leopoldo,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi pela orientação e participação que tornaram possível a execução deste trabalho.

À minha família e aos meus amigos pelo incentivo e paciência por mim recebidos em todos os momentos.

Aos alunos, funcionários e professores do Departamento de Bioquímica pelo companheirismo, colaboração e ensinamentos adquiridos durante estes anos.

Aos amigos do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica, especialmente à Márcia M. Fagian Pansani e Regina C. Rosseto, não apenas pelo incentivo mas também pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Dra. Ione S. Martins, DR. Hiroshi Aoyama e Dra. Lucia Pereira da Silva do Departamento de Bioquímica IB-UNICAMP pelas correções e sugestões feitas a esta dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

/ EVIATURAS.....	01
INTRODUÇÃO.....	02
-Mecanismos de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias.....	03
-Mecanismos de Efluxo de Ca^{2+} mitocondrial.....	08
.Efluxo de Ca^{2+} sódio-dependente.....	10
.Efluxo de Ca^{2+} sódio-independente.....	12
-Efeito do antibiótico lasalocid-A sobre o transporte de Ca^{2+} mitocondrial.....	16
MATERIAL E MÉTODOS	
1-Isolamento de mitocôndrias hepáticas.....	20
2-Isolamento de mitocôndrias de coração.....	20
3-Dosagem de proteína mitocondrial.....	21
4-Determinação da concentração de Ca^{2+} livre.....	22
5-Determinação do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial por espectroscopia de absorção atômica.....	22
6-Determinação do potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$).....	24
7-Espectro de Fluorescência do lasalocid-A.....	26
8-Determinação da variação do volume mitocondrial.....	26
9-Meios de reação.....	27
10-Reagentes Empregados.....	27
RESULTADOS	
-Efeito de lasalocid-A sobre a velocidade de efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio em mitocôndrias de fígado carregadas com diferentes concentrações de Ca^{2+}	30
-Lasalocid-A estimula a troca K^+ / H^+ através da membrana	

mitochondrial interna.....	32
-Efeito do lasalocid-A sobre o potencial de membrana em mitocôndrias de fígado e coração.....	33
-Efeito de lasalocid-A sobre o efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio em mitocôndrias hepáticas e de coração.....	36
-Efeito de lasalocid-A sobre o efluxo de Ca^{2+} Na^{+} -dependente em mitocôndrias de coração.....	36
-A inibição do efluxo de Ca^{2+} por lasalocid-A é independente de variação em ΔpH	39
-Efeito da variação em $\Delta\psi$ sobre a liberação de Ca^{2+} mitocondrial.....	41
-Comportamento cinético da inibição do efluxo de Ca^{2+} induzido por lasalocid-A.....	44
-Efeito de lasalocid-A sobre a retenção de Ca^{2+} na matriz de mitocôndrias hepáticas na presença de agentes liberadores do cátion.....	47
-Efeito de lasalocid-A sobre a manutenção do potencial de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias hepáticas na presença de agentes liberadores de Ca^{2+}	49
-Possível complexação de Ca^{2+} por lasalocid-A.....	49
 DISCUSSÃO.....	 53
 RESUMO.....	 60
 SUMMARY.....	 62
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 64

ABREVIATURAS

Ac ⁻	- Acetato
ATP	- Adenosina trifosfato
BSA	- Soro albumina bovina
EGTA	- Ácido etileno glicol bis (-aminoetil éter) NN'- tetra acético
HEPES	- Ácido 4- (2- hidroxietil)-1-piperazinoetano sul- fônico
L.A.	- Lasalocid-A
MCR	- Miocôndria de coração de rato
MFR	- Miocôndria de fígado de rato
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	- Nicotinamida adenina fosfato dinucleotídeo
NEM	- N- etilmaleimida
Pi	- Fosfato inorgânico
t-But-OOH-	T-butil hidroperóxido
TPB ⁻	- Tetrafenilboro
TPP ⁺	- Tetrafenilfosfônio
VR	- Vermelho de rutênio
$\Delta\mu\text{H}^+$	- Gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$	- Gradiente eletroquímico de cálcio
$\Delta\psi$	- Potencial elétrico de membrana

INTRODUÇÃO

O transporte de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial vem sendo estudado desde 1962 (VASINGTON & MURPHY, 1962). Contudo os mecanismos moleculares de captação e, particularmente, os de liberação deste íon estão ainda sob investigação (VERCESI, 1984 a e b; SARIS, 1987; WINGROVE & GUNTER, 1987a e b; RIZZUTO et alii, 1986).

Mitocôndrias da maioria dos tecidos animais possuem um sistema de transporte de Ca^{2+} muito ativo. O Ca^{2+} entra na mitocôndria através de um transportador eletroforético sensível a vermelho de rutênio, em resposta ao potencial elétrico de membrana, negativo internamente, gerado pela respiração ou hidrólise de ATP (SELWIN et alii, 1970). Evidências experimentais indicam que o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial ocorre através de uma via independente e distinta da via de captação (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). A operação simultânea destas duas vias de transporte, em sentidos opostos, é responsável pela regulação cinética da distribuição de Ca^{2+} , entre a matriz e os compartimentos extramitocondriais. De acordo com este modelo, a distribuição de Ca^{2+} , no estado de equilíbrio dinâmico, entre a matriz e o citosol pode ser alterada pelo estímulo ou inibição de uma ou ambas as vias (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982).

O papel deste sistema de transporte de Ca^{2+} na fisiologia celular tem sido exaustivamente estudado, tendo sido verificado que mitocôndrias, na presença de Mg^{2+} e ATP, tamponam Ca^{2+} em concentrações bastante próximas daquelas encontradas no citosol, "in vivo", (NICHOLLS, 1978; BECKER et alii, 1980). Isto tem levado estes pesquisadores a suporem que a mitocôndria age como

um reservatório de Ca^{2+} , regulando desta maneira a concentração do Ca^{2+} citoplasmático. As determinações do conteúdo de Ca^{2+} mitocondrial "in situ" (SOMLYO et alii, 1981) ou de mitocôndrias isoladas em condições em que a captação de Ca^{2+} do meio de homogeneização é prevenida (HANSFORD & CASTRO, 1982) apresentam valores de 1 a 3 nmol de Ca^{2+} por mg de proteína mitocondrial. Esta faixa de concentração de Ca^{2+} é incompatível com as características cinéticas das vias de influxo e efluxo as quais permitem um tamponamento preciso da concentração do Ca^{2+} citoplasmático (HANSFORD, 1985). Alternativamente, estes valores parecem compatíveis com a hipótese de que o sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial regula a concentração deste cátion livre na matriz numa faixa que permite a regulação de três desidrogenases intramitocondriais (sistema piruvato desidrogenase, NAD- isocitrato desidrogenase e o complexo 2-oxoglutarato desidrogenase) que, acredita-se, exerçam papel regulatório no metabolismo oxidativo (HANSFORD, 1985; McCORMACK & DENTON, 1986). DENTON e McCORMACK (1985) sugeriram que o aumento do Ca^{2+} citosólico, por ação hormonal, pode estimular a produção de ATP através da ativação do metabolismo oxidativo.

MECANISMO DE CAPTAÇÃO DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS

Alguns pesquisadores (CHANCE, 1965; BRAND et alii, 1976; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1977; VERCESI et alii, 1978) verificaram que a adição de Ca^{2+} a uma suspensão de mitocôndrias energizadas resultava na captação do íon pela organela, estímulo da respiração e extrusão de dois prótons da matriz mitocondrial

para cada Ca^{2+} captado.

A teoria quimiosmótica (MITCHELL, 1976) fornece argumentos para que se possa compreender a capacidade e velocidade de captação de Ca^{2+} e outros cátions bivalentes (VASINGTON & MURPHY, 1962; LEHNINGER, 1970; BYGRAVE, 1977; SARIS & AKERMAN, 1980; FISKUM & LEHNINGER, 1981; TEDESCHI, 1981; NICHOLLS & AKERMAN, 1982), por mitocôndrias. Segundo MITCHELL (1976), a respiração ou a hidrólise de ATP, através da atividade da ATPase mitocondrial, induzem um transporte vetorial de prótons para o exterior da mitocôndria com conseqüente alcalinização da matriz, gerando, desta forma, um gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta \mu \text{H}^+$), constituído por um componente químico (ΔpH) e pelo potencial elétrico de membrana ($\Delta \Psi$) com polaridade negativa interiormente. Estes componentes estão relacionados através da equação abaixo, quando seus valores são expressos em milivolts e a temperatura é 30°C (MITCHELL & MOYLE, 1969; NICHOLLS, 1976).

$$\Delta \mu \text{H}^+ = \Delta \Psi - 60 \Delta \text{pH} \quad (1)$$

Alguns trabalhos mostram que a captação de Ca^{2+} está diretamente relacionada ao potencial de membrana (SCARPA & AZZONE, 1970; SELWIN et alii, 1970; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Porém, a força motriz responsável pelo acúmulo do íon é o gradiente eletroquímico de Ca^{2+} ($\Delta \mu \text{Ca}^{2+}$) que relaciona-se ao potencial de membrana pela equação de Nernst:

$$\Delta \mu \text{Ca}^{2+} = 2 \Delta \Psi - 60 \log \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}} \quad (2)$$

onde $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ e $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ são as atividades de Ca^{2+} na matriz e no citosol respectivamente (LEHNINGER, 1970; BYGRAVE, 1977;

CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et alii, 1978a; SARIS & AKERMAN, 1980; FISKUM & LEHNINGER, 1981; TEDESCHI, 1981; NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982).

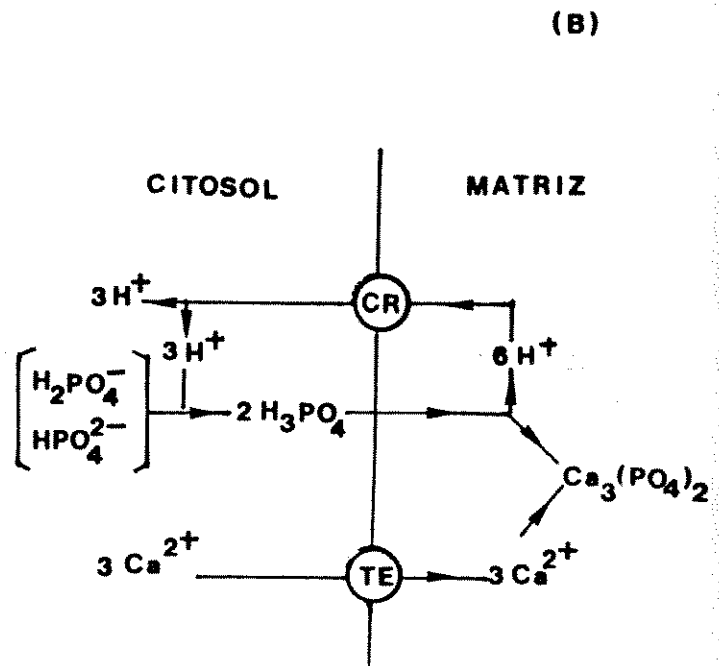
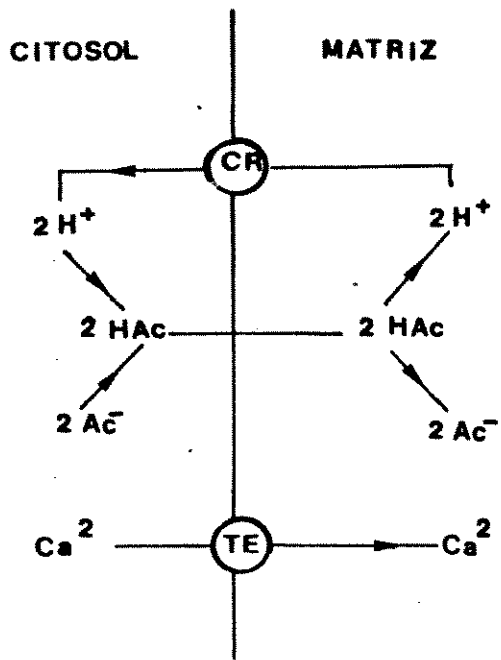
Existe uma relação inversa entre a velocidade de respiração e o valor de $\Delta\mu\text{H}^+$ (MITCHELL, 1961; MITCHELL, 1966). Logo, a entrada de Ca^{2+} na mitocôndria leva a uma diminuição de $\Delta\psi$, o que induz estímulo da respiração e ejeção de prótons para manter $\Delta\mu\text{H}^+$ constante. A manutenção de $\Delta\mu\text{H}^+$ ocorre às custas do aumento de ΔpH . Assim, a entrada de Ca^{2+} converte o potencial de membrana em gradiente de pH que passa a inibir a respiração e limitar a captação do cátion (NICHOLLS, 1978).

Quando, porém, o transporte de Ca^{2+} ocorre na presença de ânions com capacidade de migrar para o interior da mitocôndria na forma protonada, neutralizando o gradiente de pH, a respiração restaura o potencial elétrico (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). Nestas condições, a captação do Ca^{2+} torna-se praticamente ilimitada (LEHNINGER, 1974). Alguns ânions, dentre os quais se incluem fosfato, acetato, bicarbonato (ELDER & LEHNINGER, 1973; HARRIS, 1978), hidroxibutirato (BRAND et alii, 1976) e glutamato (DEBISE & DURAND, 1978) permeam a membrana interna mitocondrial em cotransporte com prótons ou em troca por hidroxila, de maneira eletroneutra, acumulando-se na matriz em resposta ao gradiente de pH (veja Fig. 1 A e B). Na ausência de tais ânions permeantes ou quando o transporte destes é inibido, apenas 1 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína é suficiente para descarregar totalmente o potencial elétrico de membrana (DRAHOTA et alii, 1965).

Inúmeras linhas de evidências tem mostrado que o Ca^{2+} é captado por mitocôndrias através de um transporte mediado: (1)- especificidade do transportador para Ca^{2+} (ainda que transporte também Sr^{2+} , Mn^{2+} e Ba^{2+} com menor afinidade) (LEHNINGER et alii,

Figura 1- Movimento de íons associados ao acúmulo líquido de Ca^{2+} através de membrana interna mitocondrial.

(A) Acúmulo líquido de Ca^{2+} na presença de acetato (Ac^-) como ânion permeante; Ac^- permeia a membrana interna mitocondrial na forma protonada (HAc). (B) O acúmulo líquido de Ca^{2+} pode utilizar fosfato como ânion permeante; fosfato permeia a membrana interna mitocondrial como ácido fosfórico (H_3PO_4). Onde CR, cadeia respiratória e TE, transportador eletroforético.



1967); (2)- o transportador apresenta alta afinidade por Ca^{2+} com Km entre 1 a 10 μM (BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; SARIS & ÅKERMAN, 1980; NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982; VERCESI; 1984); (3)- comportamento cinético apresentando saturação e sigmoidicidade, sugerindo cooperatividade a nível do transportador (BYGRAVE, 1977; SARIS & ÅKERMAN, 1980); (4)- inibição do transporte por lantanídeos e vermelho de rutênio (MELA, 1969; MOORE, 1971; REED & BYGRAVE, 1974); (5)-identificação de sítios de ligação na membrana, sensíveis a lantanídeos e vermelho de rutênio, que ligam Ca^{2+} com alta afinidade (MELA, 1969; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1969; REED & BYGRAVE, 1974); (6)-estequiometria definida entre acúmulo de Ca^{2+} , ejeção de prótons e consumo de oxigênio (BRAND, et alii, 1976; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1977; VERCESI et alii, 1978). Sabe-se também que a baixos valores de potencial de membrana, a distribuição de Ca^{2+} , entre a matriz e o espaço extramitocondrial, é mais compatível com um mecanismo de transporte eletroforético do que com um mecanismo de troca eletroneutra (ROTTENBERG & SCARPA, 1974; HEATON & NICHOLLS, 1976; NICHOLLS, 1978).

Várias características deste transporte provam a existência de um transportador do tipo canal. Entre estas características destacam-se a dificuldade de saturação do transportador eletroforético por altas concentrações de Ca^{2+} (NICHOLLS & ÅKERMAN), a relativa falta de especificidade pelo cátion (TEW, 1977; CROMPTON et alii, 1979), a alta velocidade de transporte do cátion por unidade de transportador deduzido a partir da existência de pequeno número de sítios de ligação para

lantanídeos (REED & BYGRAVE, 1974), o baixo coeficiente de temperatura (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982), e particularmente o fato da atividade do transportador ser mantida mesmo a temperaturas abaixo de zero (CHANCE et alii, 1979).

MECANISMOS DE EFLUXO DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Tendo-se em vista que o potencial de membrana é da ordem de 180 mV, nas condições de repouso (MITCHELL & MOYLE, 1969; PADAN & ROTTENBERG, 1973; LOTSCHER et alii, 1980), pode-se deduzir, pela equação (2), que o gradiente de Ca^{2+} livre, através da membrana seria de 10^6 , se o único meio de transporte de Ca^{2+} pela mitocôndria fosse o eletroforético. Porém a concentração de Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial não excede 1mM, devido à formação de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Se a razão entre Ca^{2+} intra e extramitocondriais fosse 10^6 , a concentração de Ca^{2+} citosólico estaria na faixa de 10^{-9} M e a mitocôndria acumularia o cátion continuamente, levando à sua calcificação irreversível.

Uma alternativa teórica para este comportamento seria a existência de um mecanismo eletroneuro para o efluxo do Ca^{2+} mitocondrial. De fato há evidências para a existência de uma via de efluxo eletroneutra independente da via de influxo. A primeira destas evidências encontra apoio em aspectos termodinâmicos, ou seja, enquanto a distribuição de Ca^{2+} observada através da membrana interna é consistente com o equilíbrio estabelecido exclusivamente pelo transportador eletroforético em baixos valores de $\Delta\psi$ e altas concentrações de Ca^{2+} externo (NICHOLLS, 1978; CROMPTON & HEID, 1978; ROTTENBERG & SCARPA, 1974; PUSKIN et

alii, 1976), em valores superiores de $\Delta\Psi$ e de baixo Ca^{2+} externo, crescentes desvios são observados (PUSKIN et alii, 1976; MASARI & POZZAN, 1976; AZZONE et alii, 1977 a; POZZAN et alii, 1977; NICHOLLS, 1978). A segunda linha de evidência para o mecanismo de efluxo independente, vem do efeito do vermelho de rutênio na distribuição de Ca^{2+} mitocondrial. A inibição da via de influxo de Ca^{2+} pela adição deste composto a uma suspensão mitocondrial, após a distribuição do mesmo haver alcançado o estado de equilíbrio dinâmico, leva a uma liberação líquida do íon (MOORE, 1971; VASINGTON et alii, 1972; REED & BYGRAVE, 1974; HEATON & NICHOLLS, 1976; FISKUM & LEHNINGER, 1981).

POZZAN et alii (1977) sugeriram que o efluxo de Ca^{2+} deveria ser mediado pelo transportador eletroforético situado em regiões onde o potencial de membrana estivesse diminuído. No entanto, existem evidências que sugerem que a via de efluxo de Ca^{2+} seja estruturalmente distinta do transportador eletroforético: (1)- a potência relativa da série dos lantanídeos na inibição do efluxo em mitocôndrias de coração é bastante diferente da extensão com a qual estes inibem o transportador eletroforético (CROMPTON et alii, 1979); (2) anticorpos preparados contra a fração glicoproteica, com características semelhantes ao transportador eletroforético, obtida de mitocôndrias por choque hipotônico, são efetivos na inibição do influxo, mas não na inibição do efluxo (PANFILI, 1981).

As vias de efluxo de Ca^{2+} de diferentes tecidos podem ser divididas em duas categorias com base em sua habilidade em serem ou não ativadas por sódio, como será descrito a seguir.

EFLUXO DE Ca^{2+} SÓDIO-DEPENDENTE

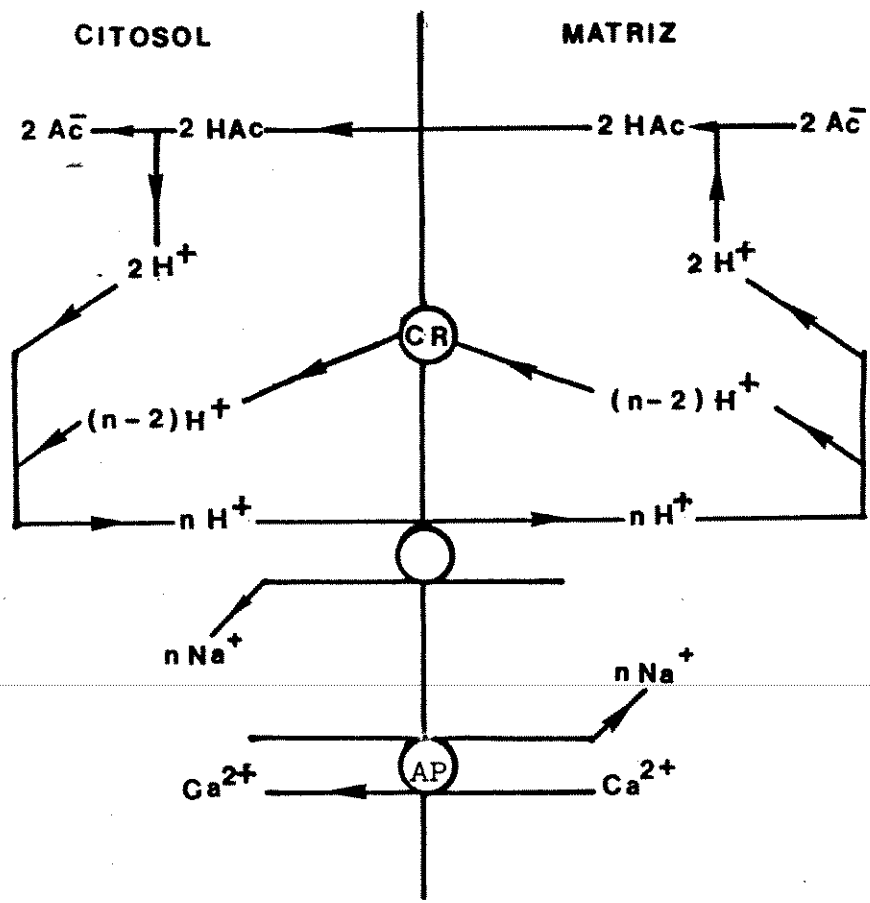
Em mitocôndrias de alguns tecidos como coração, músculo esquelético, cérebro, glândula parótida, tecido gorduroso marron, córtex adrenal e rim, o efluxo de Ca^{2+} é fortemente estimulado pela adição de NaCl ao meio de reação (NICHOLLS, 1978; AFFOLTER & SIEGEL 1979; NICHOLLS, 1980; CROMPTON, 1977; CROMPTON, 1978; AL-SKAIKHALY, 1979). Quando vermelho de rutênio é adicionado a estas mitocôndrias após o acúmulo de Ca^{2+} em meio livre de Na^+ , observa-se apenas um efluxo líquido lento do cátion. A adição posterior de 10 mM de NaCl aumenta a velocidade de efluxo em até dez vezes (NICHOLLS, 1978; AFFOLTER, 1979; CROMPTON, 1977; CROMPTON, 1978).

A cinética do efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração tem sido estudada com detalhes por alguns pesquisadores (CARAFOLI, & CROMPTON 1978; SARIS & ÅKERMAN 1980; NICHOLLS, 1980; RIZZUTO et alii, 1987). O efluxo de Ca^{2+} nestas mitocôndrias na ausência de Na^+ é muito lento (2 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína.min) porém na presença de Na^+ 20mM esta via apresenta atividade de 20 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína.min (RIZZUTO et alii, 1987).

AFFOLTER e CARAFOLI (1980) estudaram o mecanismo de troca Na^+ - Ca^{2+} em mitocôndrias de coração, através do monitoramento de $\Delta\Psi$ e concluíram que este efluxo era eletroneutro. Verificaram, ainda que, independentemente da estequiometria da troca Ca^{2+} - Na^+ , $\Delta\Psi$ não deveria variar e que esta eletroneutralidade era assegurada pela translocação de prótons através da cadeia respiratória particularmente na presença de um ânion permeante, como acetato (Veja esquema Fig. 2)

Até a algum tempo atrás, o efluxo de Ca^{2+} de mitocôndrias de

Figura 2- Movimento de íons durante o efluxo líquido de Ca^{2+} através da membrana interna mitocondrial. Na presença de um ânion permeante como acetato (Ac^-), ocorre um efluxo líquido de Ca^{2+} de mitocôndrias energizadas de coração ou cérebro. Seja qual for a estequiometria da troca $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, não deve ocorrer nenhuma mudança em $\Delta\psi$ ou ΔpH . Onde CR, cadeia respiratória e AP, antiporter.



fígado era considerado como sendo insensível a adição de sódio, porém, mais recentemente, HAWORTH et alii (1980), NEDERGAARD e CANNON (1980), HEFFRON e HARRIS (1981) e WINGROVE e GUNTER (1986b) verificaram uma baixa atividade do efluxo de Ca^{2+} dependente de sódio nestas mitocôndrias.

Preparações de mitocôndrias de cérebro exibem um estímulo substancial do efluxo induzido por vermelho de rutênio na presença de Na^+ (CROMPTON, 1978; NICHOLLS, 1978; NICHOLLS, 1980). Nestas as contribuições relativas dos efluxos dependente e independente de sódio diferem das de coração dependendo do ânion permeante presente no meio de reação. ZOCARATTO et alii (1981) observaram que na presença de acetato, como ânion permeante, ocorria um efluxo de Ca^{2+} , mesmo em meio livre de sódio, sendo significativamente acelerado na presença deste cátion. Parece portanto que mitocôndrias de cérebro, assim como as de coração e fígado, possuem ambas as vias de efluxo dependente e independente de sódio.

EFLUXO DE Ca^{2+} SÓDIO-INDEPENDENTE

CROMPTON et alii (1978) descreveram um mecanismo de efluxo independente de Na^+ para mitocôndrias de fígado, pulmão, músculo de íleo e músculo de útero.

Vermelho de rutênio induz um efluxo líquido de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado na ausência de Na^+ (CARAFOLI & CROMPTON, 1978; CROMPTON, 1978; SARIS, 1980). Em altos valores de $\Delta\psi$, pH 7,2 e temperatura de 37°C, este efluxo está entre 1 a 5 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína.min, dependendo do ânion permeante presente

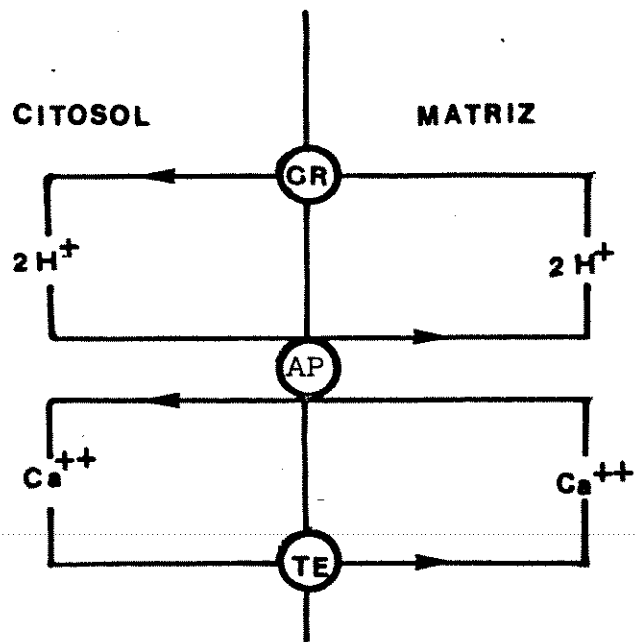
no meio, mesmo quando a concentração de Na^+ total é inferior a $50 \mu\text{M}$ (ZOCARATTO, 1982).

O mecanismo de efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado é controverso. Contudo, para que um contínuo movimento cíclico do cátion ocorra através da membrana mitocondrial, este deve ser eventualmente trocado por prótons (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982; veja também a figura 3). Embora o antiporter $\text{Ca}^{2+}/\text{NH}^+$ pareça ser o mecanismo mais provável para o efluxo a alto $\Delta\psi$, é importante enfatizar que há pouca evidência direta para este mecanismo (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982).

Embora tenha sido proposta a existência de uma troca eletroneutra para o efluxo sódio independente, GUNTER et alii (1983) observaram uma ampla variação da estequiometria $\text{Ca}^{2+}/\text{NH}^+$, a medida que o pH variava, enquanto ÅKERMAN (1978) e TSOKOS et alii (1980) observaram que o efluxo não aumentava com o aumento do gradiente de pH.

LOTSCHER et alii (1979) observaram um consumo de Ca^{2+} insensível a vermelho de rutênio em partículas submitocondriais e especularam acerca da existência de um cotransporte Ca^{2+} -Pi no entanto nenhum estudo avançou no sentido de sustentar esta idéia.

Em presença de Mg^{2+} e ATP, para manter a estabilidade da membrana, a atividade da via de efluxo de mitocôndrias de fígado é independente do conteúdo de Ca^{2+} mitocondrial total, mesmo quando este é variado de 10-100 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína, desde que Pi esteja presente no meio de reação (ZOCARATTO & NICHOLLS, 1982). Por outro lado, quando mitocôndria depletada de Pi, acumula Ca^{2+} na presença de acetato como ânion permeante, o efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio aumenta a medida que o Ca^{2+} da matriz aumenta, sendo que a 80 nmol de Ca^{2+}



/mg de proteína, a velocidade de efluxo é de 5 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína.min, ao invés de 1 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína.min, quando na presença de Pi (ZOCARATTO & NICHOLLS, 1982). Disto se conclui que é o complexo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ que mantém o Ca^{2+} livre da matriz abaixo da concentração necessária para saturar a via de efluxo.

A liberação de Ca^{2+} sódio independente em mitocôndrias é estimulada por uma série de compostos capazes de causar ou a oxidação de nucleotídeos de piridina ou de glutatona ou de ambos (LEHNINGER et alii, 1978a; COELHO & VERCESI, 1980). Alguns autores defendem a idéia de que as mitocôndrias estejam intactas durante este processo (FISKUM & LEHNINGER, 1979; RICHTER & FREI, 1985; MASINI et alii, 1986), porém muitos dos dados disponíveis indicam que a liberação de Ca^{2+} , sob estas condições, está associada ao abaixamento do potencial de membrana e vazamento de prótons, potássio, magnésio, nucleotídeos de adenina, etc. (BEATRICE et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1980; BARDSLEY & BRAND, 1982; BERNARDES et alii, 1986; RILEY & PFEIFFER, 1986).

Alguns estudos com mitocôndrias de fígado (LEHNINGER, 1978) e coração (COELHO & VERCESI, 1980) mostraram que ocorria um acentuado estímulo do efluxo de Ca^{2+} da matriz quando os nucleotídeos de piridina mitocondriais endógenos encontravam-se no seu estado mais oxidado. O fato de que o efluxo de Ca^{2+} induzido por NAD(P)^+ ocorrer através de uma troca de Ca^{2+} da matriz por 2H^+ do meio, e de maneira insensível a vermelho de rutênio, levou à suposição de que a velocidade da troca eletroneutra Ca^{2+} por 2H^+ seja regulada pelo estado redox do NAD(P) mitocondrial (FISKUM & LEHNINGER, 1979). Também foi sugerido que a oxidação de glutatona reduzida a glutatona

dissulfeto, e não a oxidação de NAD(P)H, leva à liberação de Ca^{2+} (JEWELL et alii, 1982; RILEY & PFEIFFER, 1985; VERCESI 1987).

Podemos concluir que a operação simultânea de vias distintas de captação e liberação resulta em um movimento cíclico e contínuo de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna e que estas vias operam a uma velocidade muito baixa em condições fisiológicas (CARAFOLI, 1986) caracterizando a existência de uma condição de fluxo constante real (CROMPTON et alii, 1976; ÅKERMAN & NICHOLLS, 1983). A operação simultânea destes dois fluxos em sentidos opostos fornece as bases para uma regulação cinética da distribuição de Ca^{2+} entre os compartimentos intra e extramitocondriais.

EFEITO DO ANTIBIÓTICO LASALOCID-A SOBRE O TRANSPORTE DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

A alta energia de ativação necessária para inserir um íon dentro de uma região hidrofóbica é a razão para a extremamente baixa permeabilidade de membranas biológicas aos mesmos. Desde que a carga do íon possa ser protegida da bicamada lipoproteica, a permeabilidade ao íon deve aumentar. Isto é conseguido por vários antibióticos produzidos por alguns microrganismos, bem como por alguns compostos sintéticos. Estes compostos são conhecidos como ionóforos.

Os ionóforos são compostos que tipicamente apresentam pesos moleculares entre 500 e 2000 e possuem um exterior hidrofóbico, sendo solúvel em lipídeos, e um interior hidrofílico onde se liga o íon (PRESSMAN, 1976). Há dois mecanismos pelos quais os ionóforos podem funcionar: como carreadores móveis ou como

formadores de canal . Os carreadores móveis difundem-se através da membrana e podem catalisar o transporte de aproximadamente 1000 íons por segundo (PRESSMAN, 1976); estes possuem alta especificidade, podem permear membranas artificiais e são afetados pela fluidez da membrana (PRESSMAN, 1976). Os formadores de canal mostram pouca discriminação entre diferentes íons, mas podem ser muito ativos, transportando acima de 10^9 íons por canal por segundo (PRESSMAN, 1976).

O antibiótico X-537A ou lasalocid-A (figura 4A) é obtido do microrganismo streptomyce (BERGER et alii, 1951). Sabe-se-que este antibiótico, semelhantemente a nigericina (figura 4B) forma complexos lipófilicos com cátions monovalentes, aumentando a permeabilidade de membranas naturais e artificiais para Na^+ , K^+ , Cs^+ e H^+ (HENDERSON et alii, 1971; PRESSMAN, 1976). Lasalocid-A é também capaz de complexar cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} , embora com menor afinidade e por esta razão tem se mostrado útil na manipulação da permeabilidade destes íons em membranas biológicas (CASWELL & PRESSMAN, 1972).

LIN e KUN (1973a) verificaram que o lasalocid-A, em concentrações entre 0,05 e 0,1 μM , isto é, bem abaixo daquela em que atua como ionóforo de Ca^{2+} e Mg^{2+} , inibe a oxidação de glutamato ativada por DNF ou ADP e sugerem que esta inibição está relacionada à complexação de Mg^{2+} pelo antibiótico. Em outro trabalho (LIN & KUN, 1973b) estes mesmos autores observaram que em concentrações também abaixo daquela em que atua como ionóforo, lasalocid-A inibe a oxidação de glutamato e isocitrato por mitocôndrias de fígado no estado respiratório .3, mantendo NADP no estado oxidado.

Esta propriedade do lasalocid-A em causar oxidação de nucleotídeos de piridina mitocondriais, levou PEREIRA DA SILVA et

alii (1984) a estudarem o efeito deste antibiótico sobre o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial. Contrariamente ao esperado, estes autores verificaram que o antibiótico em concentrações da ordem de nanomolar, inibe o efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio em mitocôndrias de fígado. Esta inibição leva a uma perturbação na distribuição de Ca^{2+} livre através da membrana em condições de equilíbrio dinâmico, abaixando a concentração externa de Ca^{2+} livre em até $0,2 \mu\text{M}$ (PEREIRA DA SILVA et alii, 1984).

O objetivo deste trabalho foi estudar o mecanismo pelo qual lasalocid-A inibe o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias animais. Acreditamos que os resultados obtidos trouxeram informações relevantes, não apenas acerca deste mecanismo, bem como sobre outras propriedades deste sistema de transporte de Ca^{2+} localizado na membrana mitocondrial.

MATERIAL E MÉTODOS

1- ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo SCHNEIDER & HOGEBOM (1950), por centrifugação fracionada, de ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 180-250 g, mantidos em jejum por 12 horas e sacrificados por concussão cerebral.

O fígado, retirado imediatamente após a morte do animal, foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo EGTA 1,0 mM, e tampão HEPES 2,0 mM pH 7,2, picado com o auxílio de tesoura e homogeneizado em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Este material foi centrifugado por 5 min a 755xg em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado por 10 min a 7.900xg. Desta vez, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em sacarose 250 mM contendo EGTA 0,3 mM e tamponada com HEPES 1,0 mM em pH 7,2, e finalmente centrifugado a 7.900xg por 10 min. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em sacarose 250 mM tamponada com HEPES 1,0 mM pH 7,2, de maneira a se obter uma suspensão mitocondrial de concentração aproximada de 100 mg de proteína mitocondrial por ml de suspensão.

2- ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CORAÇÃO

As mitocôndrias de coração foram isoladas segundo VERCESI et alii (1978), de ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 180-200g.

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral e o coração retirado foi imediatamente mergulhado em meio de isolamento contendo de sacarose 250 mM, tampão HEPES 1,0 mM (pH 7,2) e EGTA 0,5 mM. O material foi limpo de tecidos que não fossem o miocárdio e picado com tesoura o mais finamente possível. Lavou-se com a solução de isolamento por decantação até que não saísse mais sangue do material. Ao material suspenso em em aproximadamente 10 ml de solução de isolamento, foi adicionado 0,1 mg de Nagarse (uma enzima proteolítica), e o material permaneceu mergulhado neste solução por exatamente 10 min. Após este período o material foi lavado três vezes com a solução de isolamento por decantação e então homogeneizado com o auxílio de homogeneizador Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado por 5 min a 480xg em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi recolhido e mais uma vez centrifugado por 10 min a 7700xg. O precipitado obtido foi ressuspenso em solução de isolamento modificada pela ausência de EGTA e finalmente centrifugado por 10 min a 7700xg. O precipitado foi então recolhido e ressuspenso em sacarose 250 mM, tamponada com HEPES 1,0 suficiente para que a concentração da suspensão fosse de 75 mg de proteína mitocondrial por mililitro de suspensão.

3- DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

As dosagens de proteína de mitocôndrias de fígado e de coração foram feitas pelo método de biureto (GORNALL et alii, 1949) modificado pela adição de colato 1%. Foi utilizado como padrão uma solução de soro albumina bovina 1%.

4- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} LIVRE

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

Em cada experimento, o eletrodo seletivo foi calibrado por adições de solução padrão de cálcio ao meio de reação para concentrações de cálcio total acima de $10 \mu\text{M}$, como mostrado na figura 5A. Para a faixa de concentração de $0,25$ a $2,0 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} livre a calibração foi feita pela adição ao meio de reação de uma mistura $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$, usando-se como constante de dissociação do complexo $\text{Ca}^{2+}\text{-EGTA}$ em pH 7,2 e temperatura de 30 C o valor de $4,5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ (PORTZEHL et alii, 1964, como mostrado na figura 5B).

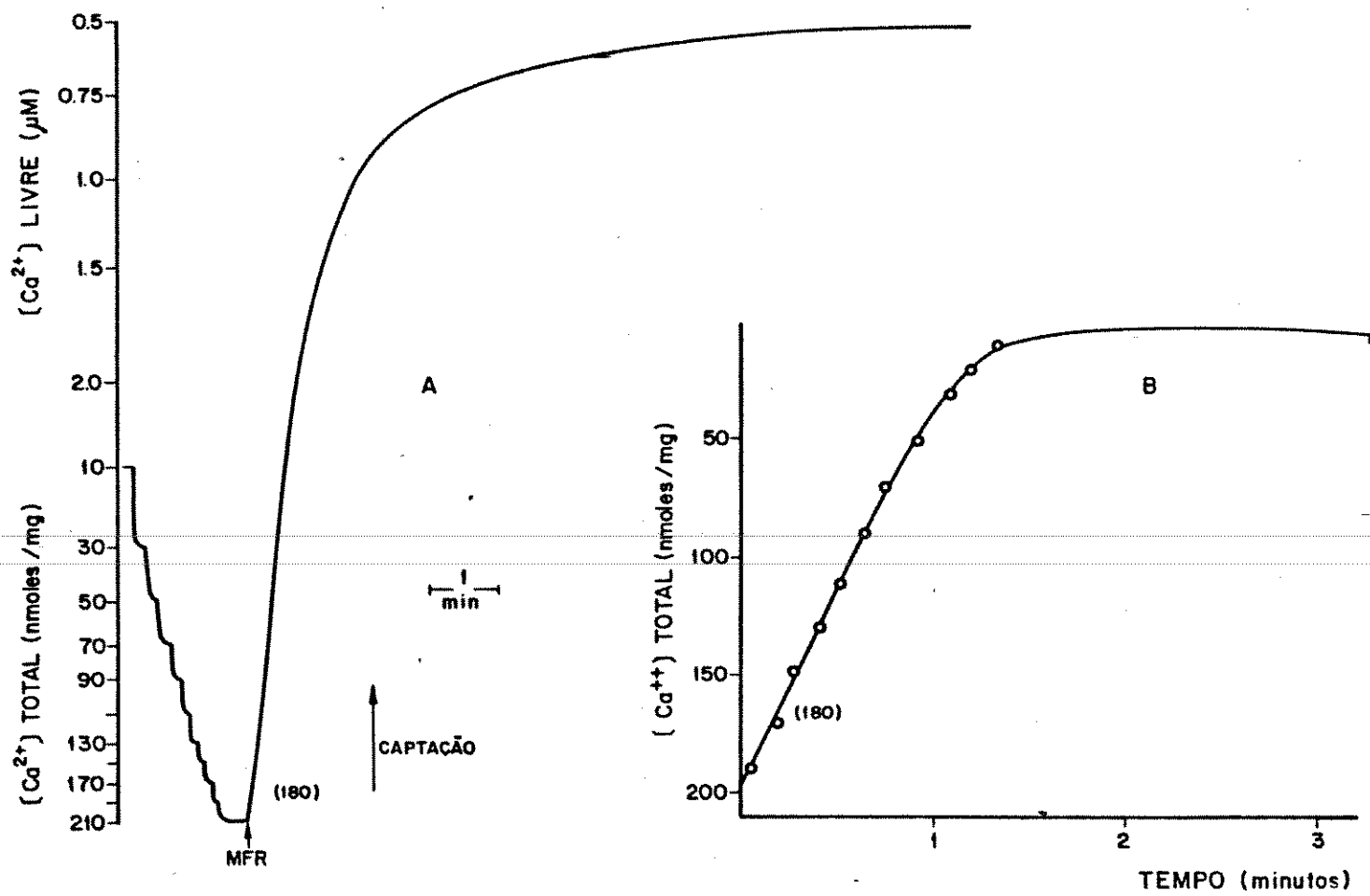
A concentração de Ca^{2+} contaminante do meio de reação foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (Atomic Absorption Perkin Elmer, modelo 303). As amostras e as soluções da curva padrão foram diluídas em uma mistura de óxido de lantânio, ácido clorídrico, n-butanol e água, de acordo com GOLCHMAN & GIVELBER (1970) e as concentrações de cálcio determinadas por comparação com a curva padrão previamente determinada.

5- DETERMINAÇÃO DO EFLUXO DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Em meio adequado foram incubados, sob agitação constante, 3 mg de proteína mitocondrial por ml de meio de reação. Dois

Figura 5- Calibração do eletrodo seletivo de Ca^{2+} (A) e gráfico linearizado dos dados da calibração (B).

A adição de 200 nmol de Ca^{2+} em alíquotas de 20 nmol, ao meio básico de reação (1,0 ml a 25-30 °C), permite observar não linear do eletrodo e fornece os dados para a linearização gráfica da figura B. A calibração em termos da Ca^{2+} livre foi feita com adição de uma mistura Ca^{2+} /EGTA que permite que a concentração de Ca^{2+} livre fosse de 2,0 μM . Em seguida foram feitas adições de EGTA para obtermos concentrações menores de Ca^{2+} (0,25-0,50-0,75-1,0 e 1,5 μM). A figura A mostra as adições de Ca^{2+} total até 200 nmol, adição de mitocôndrias de fígado de rato (MFR) e o estabelecimento do estado de equilíbrio dinâmico à concentração de 0,5 μM de Ca^{2+} livre.



minutos depois da adição da proteína, foi adicionado 0,7 μM de vermelho de rutênio e exatamente 2 min após, retirou-se uma alíquota de 2,5 ml e centrifugou-se imediatamente por 2 min em microcontrífuga a 10.000xg. Recolheu-se 2ml do sobrenadante, aos quais foram acrescentados 3ml de solução de óxido de lantânio/n-butanol/água (segundo GOLCHMAN & GIVELBER, 1970). As leituras de absorção foram feitas em um espectrofotômetro de absorção atômica PERKIN ELMER 303. As determinações das concentrações de Ca^{2+} no sobrenadante foram feitas por extrapolações na curva de calibração obtidas com concentrações conhecidas de Ca^{2+} .

6-DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ($\Delta\psi$)

O potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP^+), entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, com eletrodo específico contruido no laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica, IB-UNICAMP, de acordo com KAMO et alii (1979).

A membrana do eletrodo foi preparada da seguinte maneira, a 10 ml de de tetrahidrofurano, contendo 0,5g de policloreto de vinila e 1,5 ml de dioctilftalato, foram adicionados 3,0 ml de tetrafenilborato de sódio 10 mM (dissolvidos em tetrahidrofurano). A solução obtida foi derramada em uma placa de Petri (9.0 cm de diâmetro) e foi deixado que o solvente evaporasse à temperatura ambiente. A membrana assim obtida é transparente e tem a espessura de 0,15 a 0,20 cm. Um fragmento desta membrana foi colado, com auxílio de tetrahidrofurano, à extremidade de um tubo de PVC de 5,0cm de comprimento e 0,3 de

extremidade de um tubo de PVC de 5,0cm de comprimento e 0,3 de diâmetro. Este tubo foi então preenchido com solução de TPP⁺ 10 mM [TPP⁺ in]. O contato entre esta solução de TPP⁺ com o eletrodo de referência Ag /AgCl foi feito através de uma ponte salina de agar-KCl saturado. A diferença de força eletromotriz (ΔE) entre o eletrodo de referência e o de TPP⁺, foi medida por um potenciômetro (Beckman Expandomatic SS-2) ligado a um registrador potenciométrico (Linear Instruments Co.). As concentrações de TPP⁺ no meio de reação foram monitoradas continuamente e os valores de Δψ calculados, usando-se a equação abaixo:

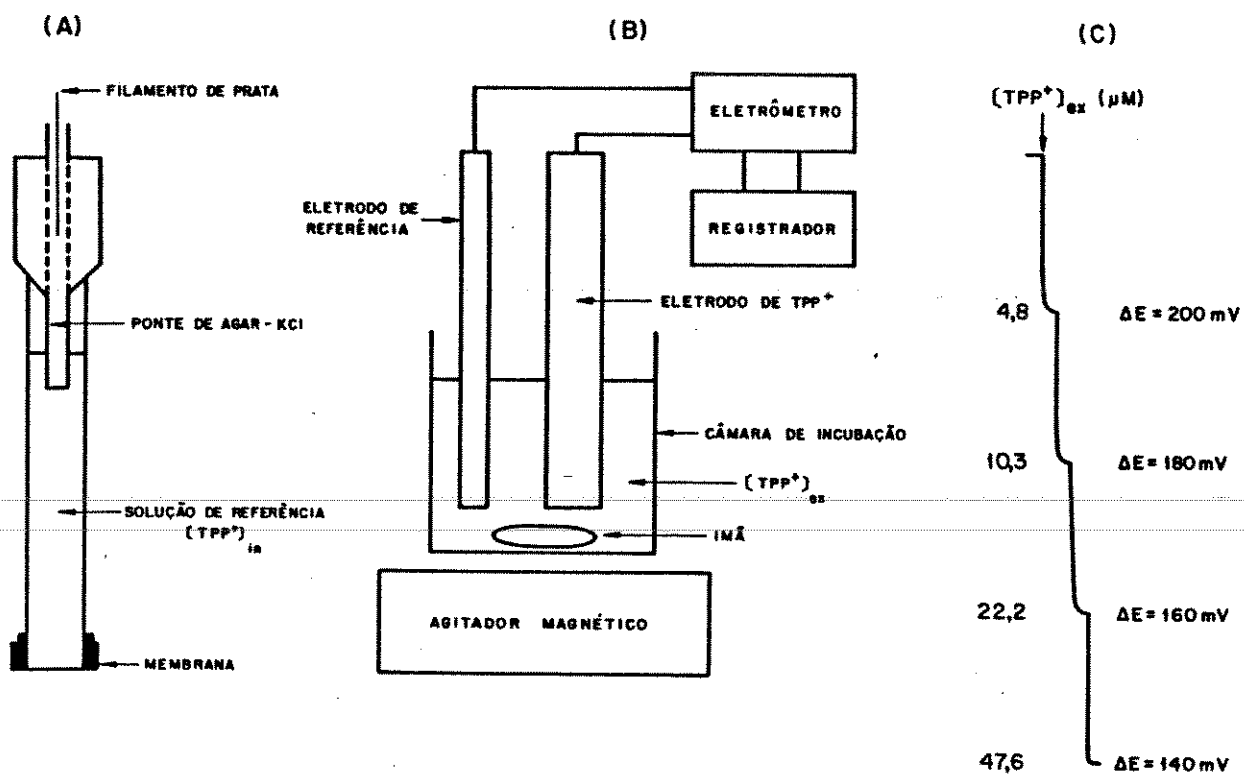
$$\Delta\psi = \frac{2,3 RT}{F} \log \frac{v}{V} - \frac{2,3 RT}{F} \log (10^{F\Delta E/2,3RT} - 1)$$

onde v, V e ΔE representam o volume mitocondrial (tomado como 1,4 μl), o volume do meio de reação e o potencial do eletrodo, respectivamente. O potencial de eletrodo é dado pelo gradiente de concentração de TPP⁺ ([TPP⁺]in/[TPP⁺]ex) através da membrana do mesmo (figura 6). Os valores de ΔE na calibração foram calculados pela equação:

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

onde [TPP⁺]ex refere-se à concentração de TPP⁺ no meio de reação e [TPP⁺]in= 10 mM. Os sinais do eletrodo (ΔE) foram quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de TPP⁺ ao meio de reação (figura 6C).

Figura 6- (A) Construção do eletrodo de TPP⁺;
(B) diagrama dos aparelhos usados para medir o potencial elétrico de membrana de mitocôndrias;
(C) curva de calibração do eletrodo de TPP⁺.



7- ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DO LASALOCID-A

Uma solução de lasalocid-A 5 μ M foi preparada em etanol 98 %. O espectro da solução foi tirado em um espectrofluorímetro AMINCO BOWMAN acoplado a um registrador. O comprimento de onda de excitação selecionado para a obtenção do espectro de emissão foi 295 nm.

8- DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DO VOLUME MITOCONDRIAL

Suspensões mitocondriais são turvas e espalham luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença do índice de refração entre o conteúdo da matriz e o meio. Um aumento no volume da matriz mitocondrial (ou tamanho da partícula em suspensão) associado à entrada de solutos permeáveis resulta na aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio, com conseqüente diminuição do espalhamento de luz.

Em nossos experimentos, o acompanhamento deste processo foi feito através da leitura da absorbância da suspensão mitocondrial, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O ajuste do valor máximo de absorbância foi feito com a suspensão mitocondrial básica (sem adição da droga a ser testada); enquanto que o ajuste do valor zero foi feito com o meio básico na ausência das mitocôndrias. Foi conectado um registrador ao espectrofotômetro para que pódéssemos acompanhar as variações de absorbância (ou volume mitocondrial) em função do tempo. A diminuição da absorbância significou aumento do volume mitocondrial (ou inchamento mitocondrial).

9- MEIOS DE REAÇÃO

Os meios de reação empregados na maioria dos experimentos foram compostos de dois meios básicos:

Meio básico I- Sacarose 125 mM;

KCl 65 mM

HEPES 3 mM, pH 7,2

Succinato 2 mM

Rotenona 2 μ M

Mg²⁺ 1 mM

BSA 0,01 mg/ml

Meio básico II- KCl 130 mM

HEPES 3 mM

Succinato 5 mM

Rotenona 1 μ M

Nas legendas das figuras apresentadas nos resultados os meios serão designados por meio básico I ou II e qualquer alteração destes serão detalhadas nas legendas.

Os experimentos foram realizados à temperatura de 30° C.

Os volumes dos meios de reação utilizados em cada experimento são dados nas legendas das figuras apresentadas nos resultados.

10-REAGENTES EMPREGADOS

Diamida, succinato, malonato, ATP, HEPES, EGTA, rotenona, oligomicina, tetrafenilhidroborato de sódio, tetrafenilfosfônio, tetrahidrifurano e N-etimaleimida foram fornecidos pela Sigma Chemical Company. Policloreto de vinila foi fornecido pela Aldrich Chemical Company, o t-butilhidroperóxido por Boehringer-

Ingelhem, lasalocid-A por Hoffman-La Roche e cloreto de cálcio da Merck AG-Darmstad.

Os demais reagentes utilizados foram produtos comerciais nacionais do máximo grau de pureza. Sempre que possível os reagentes foram utilizados na forma de sais de potássio dissolvidos em água.

Com excessão do experimento de determinação dos espectros de fluorescência do lasalocid-A, este reagente encontra-se dissolvido em água.

RESULTADOS

EFEITO DE LASALOCID-A SOBRE A VELOCIDADE DE EFLUXO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR VERMELHO DE RUTÊNIO EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO CARREGADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Ca^{2+} .

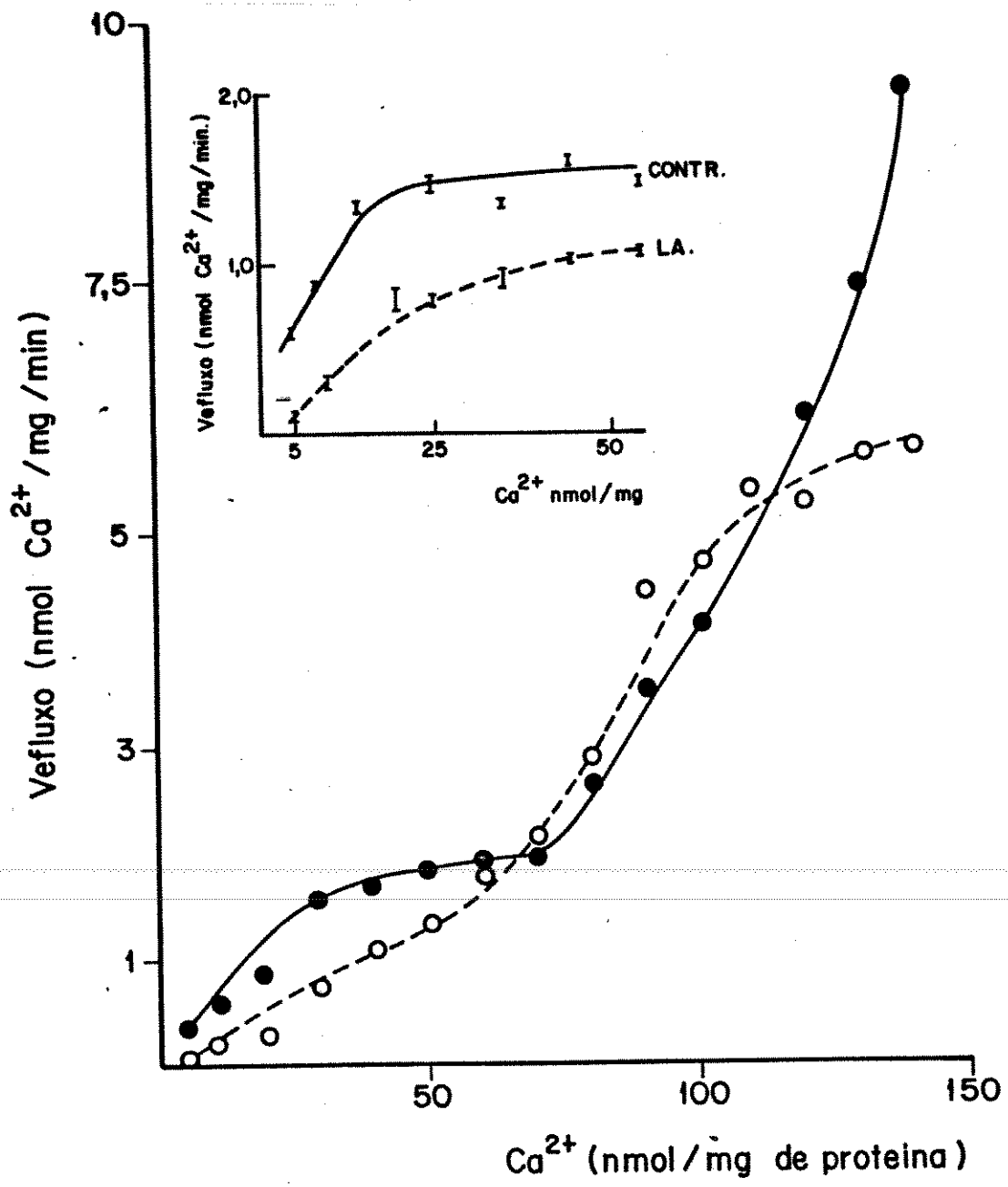
Como discutimos anteriormente (INTRODUÇÃO), o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial mediado pelo antiporter $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, tem uma velocidade máxima bastante pequena ($V_{\text{max}}=1,4$ nmol de Ca^{2+}/mg de proteína.min) (RIZZUTO et alii, 1987) e podem ser determinada quando as mitocôndrias estão carregadas com baixas concentrações de Ca^{2+} . Contudo, quando as mitocôndrias estão carregadas com concentrações altas de Ca^{2+} , a adição de vermelho de rutênio induz liberação líquida de Ca^{2+} com velocidades bem maiores, provavelmente devido a alterações da permeabilidade da membrana causadas pelo cátion, permitindo que um efluxo não mediado do mesmo ocorra (WINGROVE & GUNTER, 1986a e b).

Com o objetivo de esclarecer se o efeito inibitório do lasalocid-A sobre o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial está relacionado com o mecanismo de liberação mediado pelo antiporter ou por uma via inespecífica estudamos o efeito deste antibiótico em mitocôndrias hepáticas carregadas com diferentes concentrações do íon.

A figura 7 mostra as velocidades de efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias carregadas com concentrações de 5 a 130 nmoles de Ca^{2+}/mg de proteína. A linha cheia mostra as velocidades de efluxo na ausência do inibidor. Pode-se observar que na faixa de 5 a 70 nmoles de Ca^{2+}/mg de proteína, o aumento da velocidade de efluxo é compatível com a cinética de um processo mediado, cuja

Figura 7- Efeito do lasalocid-A sobre a velocidade de efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio em mitocôndrias de fígado carregadas com diferentes concentrações de Ca^{2+} .

Nestes experimentos foi utilizado o meio básico-I, na ausência de Mg^{2+} e BSA, com adição de Pi 0,5 mM, lasalocid-A 250 pmol/mg de proteína (linha tracejada) ou na ausência de lasalocid-A (linha contínua) e concentrações variáveis de Ca^{2+} (de 5 a 140 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína). Os experimentos foram iniciados pela adição de proteína mitocondrial (1mg/ml) a 1ml de meio de reação. Após 2 min foi adicionado vermelho de rutênio (0,7 μM) e as velocidades de efluxo foram determinadas com base na de calibração semelhante à descrita na figura 5A mostrada em MATERIAL E MÉTODOS. Nos experimentos mostrados na figura inserida foram adicionados ATP 0,6 mM, Mg 1,6 mM e BSA 0,05% e a determinação do Ca^{2+} mitocondrial foi feita por espectroscopia de absorção atômica conforme descrito em MATERIAL E MÉTODOS. Os resultados mostrados na figura inserida representam as médias de cinco experimentos realizados com diferentes preparações mitocondriais e os da figura maior o mais representativo de cinco experimentos realizados com preparações mitocondriais diferentes.



saturação é atingida em concentrações de cerca de 25 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína, de acordo com WINGROVE e GUNTER (1986a). Todavia, em concentrações acima de 70 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína, as velocidades de efluxo aumentam bruscamente para valores de até 10 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína. min, valores estes compatíveis com um aumento da permeabilidade inespecífica da membrana. A linha tracejada mostra um efeito inibitório do lasalocid-A sobre o efluxo, que decresce entre 5 a 70 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína, está ausente entre 70 a 110 nmol Ca^{2+} /mg de proteína e se torna bastante acentuado para valores acima de 110 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína. No gráfico inserido na figura 7 são mostradas as curvas de velocidade de efluxo de Ca^{2+} na presença de ATP + Mg^{2+} no meio de reação. Neste experimento, o Ca^{2+} mitocondrial foi determinado por espectroscopia de absorção atômica. Verifica-se nesta figura que, na ausência do antibiótico, um platô acentuado é estabelecido acima de 20 nmol de Ca^{2+} , semelhantemente ao obtido nas condições da figura maior. Na presença de lasalocid-A, o platô se apresenta menos acentuado e um pouco deslocado para a direita, porém significativamente mais nítido que na figura maior.

LASALOCID-A ESTIMULA A TROCA K^+/H^+ ATRAVÉS DA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

Com o objetivo de esclarecer se a inibição do efluxo de Ca^{2+} por lasalocid-A está relacionado à alterações causadas em um ou ambos componentes do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) realizamos experimentos para avaliar a atividade deste antibiótico como ionóforo catalisador da troca K^+/H^+ (PRESSMAN, 1976) na faixa de concentração em que este inibe o efluxo de Ca^{2+}

mitocondrial (PEREIRA DA SILVA et alii, 1984). Isto deve ser verificado uma vez que a troca de K^+ interno por H^+ externo, em mitocôndrias energizadas, colapsa ΔpH , componente químico de $\Delta \mu H^+$, e como consequência aumenta o valor do componente elétrico ($\Delta \Psi$) (NICHOLLS & AKERMAN, 1982). O esquema inserido na figura 8 mostra a troca de K^+ externo por H^+ interno, na presença de nigericina ou de lasalocid-A em mitocôndrias desenergizadas. É importante notar que nestas condições se dá em sentido contrário à troca em mitocôndrias energizadas.

A figura 8 mostra que na faixa de concentração de 0,025 a 0,5 nmol de lasalocid-A/mg de proteína, este, analogamente à nigericina, causou inchamento de mitocôndrias hepáticas não energizadas suspensas em acetato de potássio. Este inchamento mostrou ser dependente da concentração do antibiótico na faixa de concentração estudada. O esquema inserido na figura 8 mostra como se dá a troca K^+/H^+ em meio contendo acetato de potássio, através da membrana interna mitocondrial. O acúmulo de acetato de potássio e água na matriz mitocondrial é o responsável pelo aumento do volume mitocondrial que pode ser verificado pela diminuição da absorbância da suspensão mitocondrial.

EFEITO DO LASALOCID-A SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO E CORAÇÃO

A troca K^+/H^+ catalisada por lasalocid-A e o consequente colapso de pH causou um aumento do potencial de membrana de aproximadamente 10mV tanto em mitocôndrias de fígado quanto de coração como pode ser visto nas figuras 9 A e B. É interessante notar que tanto na presença do antibiótico (linha tracejada) quanto na sua ausência (linha contínua) a adição de

Figura 8- Efeito do lasalocid-A sobre o inchamento mitocondrial. O meio utilizado continha acetato de potássio 100 mM, oligomicina 1 µg/ml e rotenona 5 µM. Foram adicionados 0,5 mg de proteína mitocondrial a 2ml de meio. Os experimentos foram iniciados pela adição 25, 62,5, 125, 250, 500 pmol do lasalocid-A ou 0,5µg de nigericina (Nig.) 1min após as mitocôndrias, ou na ausência do antibiótico (C). O esquema inserido mostra o mecanismo da troca de K^+ / H^+ em mitocôndrias desenergizadas.

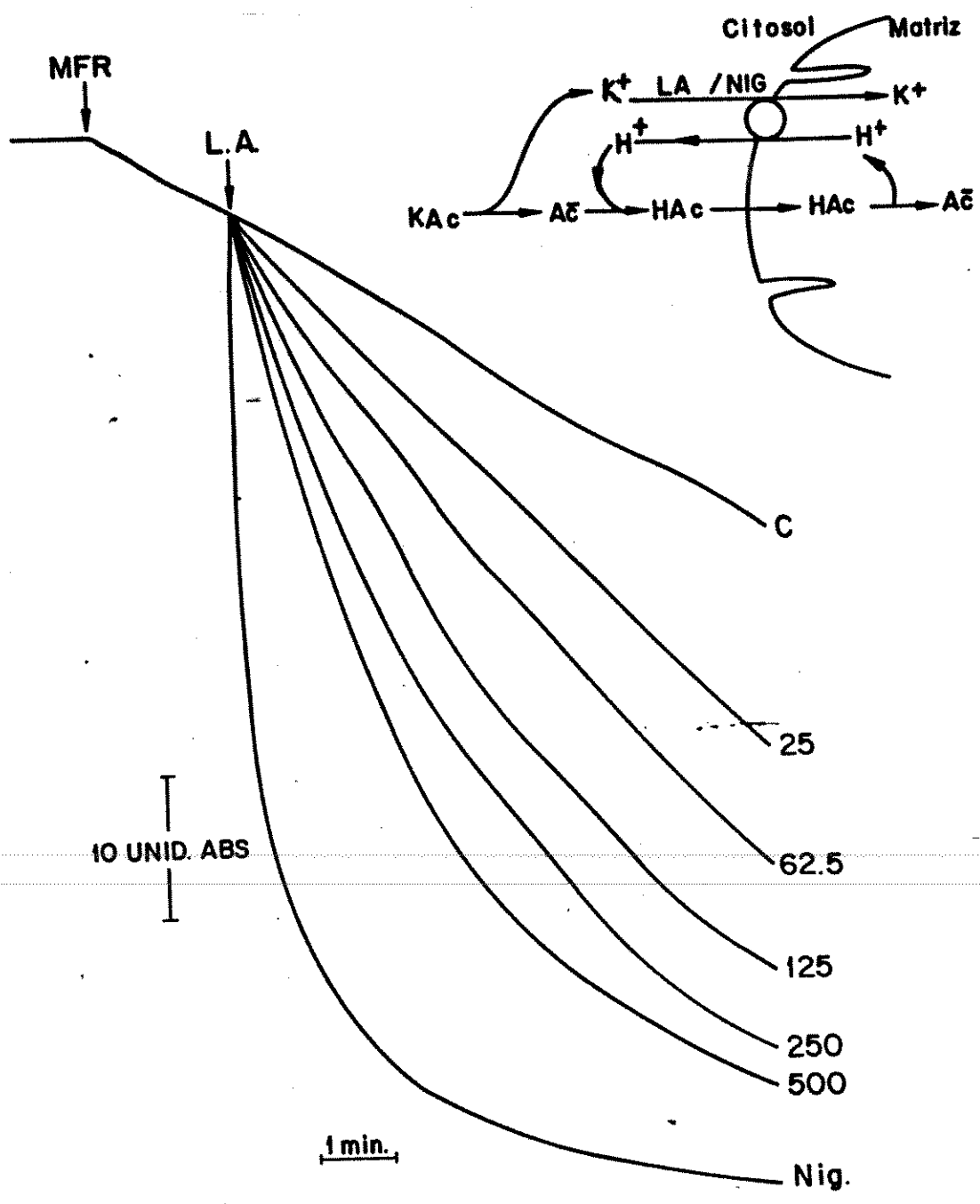
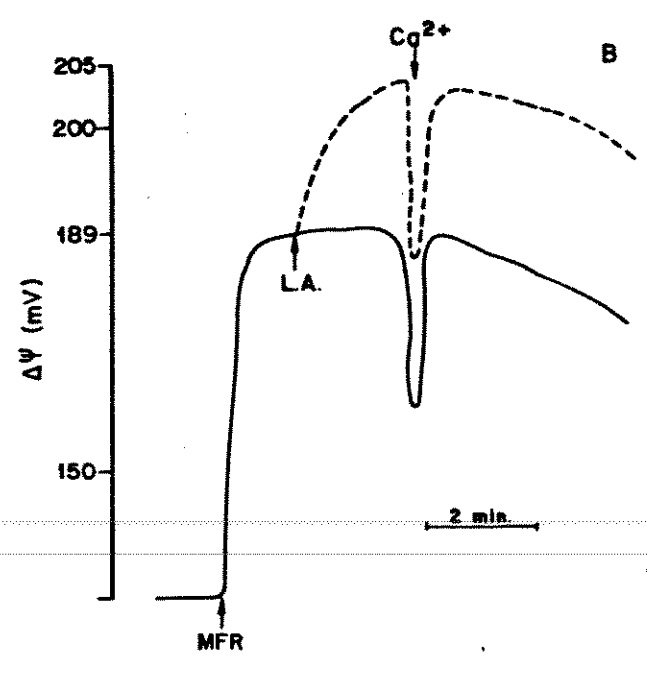
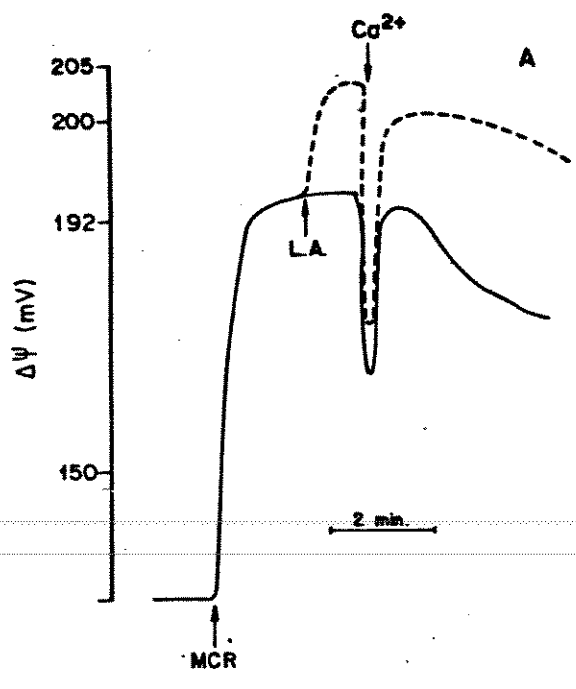


Figura 9 -Efeito do lasalocid-A sobre o potencial elétrico de membrana de mitocôndrias hepáticas e cardíacas. Em ambos os experimentos foi empregado o meio básico-II com adição de TPP^+ 3 μM . Os experimentos foram iniciados pela adição de 1 mg de proteína mitocondrial de coração (MCR), figura B, ou de fígado (MFR), figura A, a 1 ml de meio de reação. Nos locais indicados nas figuras, foram adicionados 250 pmol de lasalocid-A (linha tracejada) e posteriormente 20 nmol de Ca^{2+} . As linhas contínuas representam os experimentos na ausência do antibiótico. Nos experimentos com mitocôndrias de coração o meio de reação II, onde a concentração de KCl é maior, é empregado devido a maior estabilidade destas mitocôndrias neste meio.



Ca^{2+} causou uma diminuição transitória do potencial de membrana ($\Delta\psi$); porém na presença do inibidor $\Delta\psi$ se mantém mais estável.

EFEITO DE LASALOCID-A SOBRE O EFLUXO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR VERMELHO DE RUTÊNIO EM MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS E DE CORAÇÃO

Os efeitos de lasalocid-A tanto na distribuição de Ca^{2+} no estado de equilíbrio dinâmico, quanto na velocidade de liberação de Ca^{2+} induzida por vermelho de rutênio, são mostrados nas figuras 10 A (mitocôndrias de coração) e B (mitocôndrias de fígado). Podemos observar que tanto em mitocôndrias de fígado quanto nas de coração a adição do antibiótico (linha tracejada) diminuiu a concentração de Ca^{2+} extramitocondrial no estado de equilíbrio dinâmico. A subsequente adição de vermelho de rutênio a estas preparações causou uma liberação líquida do cátion devido à inibição do influxo eletroforético. Como esperado, as velocidades de liberação de Ca^{2+} foram menores na presença de lasalocid-A, o que explica a mudança no nível de tamponamento do cátion no estado de equilíbrio dinâmico.

EFEITO DO LASALOCID-A SOBRE O EFLUXO DE Ca^{2+} SÓDIO-DEPENDENTE EM MITOCÔNDRIAS DE CORAÇÃO

A figura 11 mostra que quando se adiciona vermelho de rutênio à suspensão de mitocôndrias de coração, após estabelecido o estado de equilíbrio dinâmico, ocorre um efluxo de Ca^{2+} lento; porém na presença do lasalocid-A (linha tracejada) este efluxo é inibido em aproximadamente 30%. Quando NaCl foi adicionado, após vermelho de rutênio verificamos um acentuado estímulo do efluxo passando de 1,2 nmol de Ca^{2+} /mg de

Figura 10-Efeito do lasalocid-A sobre o efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio em mitocôndrias hepáticas e cardíacas.

Em ambos os experimentos foram usados 1 ml de meio básico-II com adição de 20 nmol de Ca^{2+} e Pi 1 mM. Os experimentos foram iniciados pela adição de (A) 1 mg de proteína mitocondrial de coração ou (B) 1 mg de proteína mitocondrial de fígado. Lasalocid-A foi adicionado no local mostrado na figura, assim como vermelho de rutênio 0,6 μM . As linhas contínuas representam os experimentos controle e as tracejadas representam presença de 250 pmol de lasalocid A.

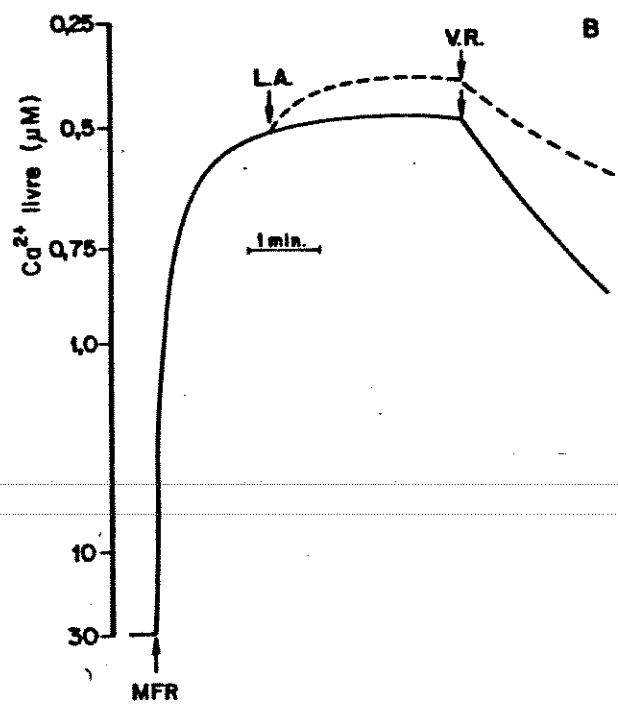
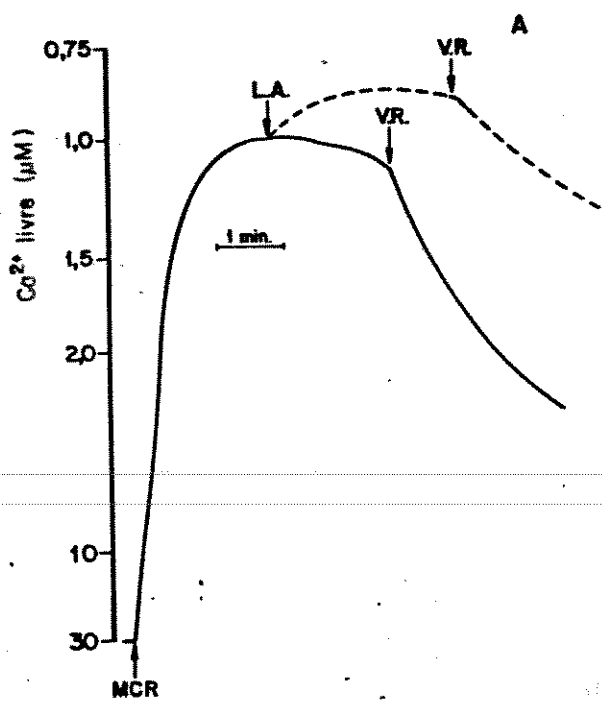
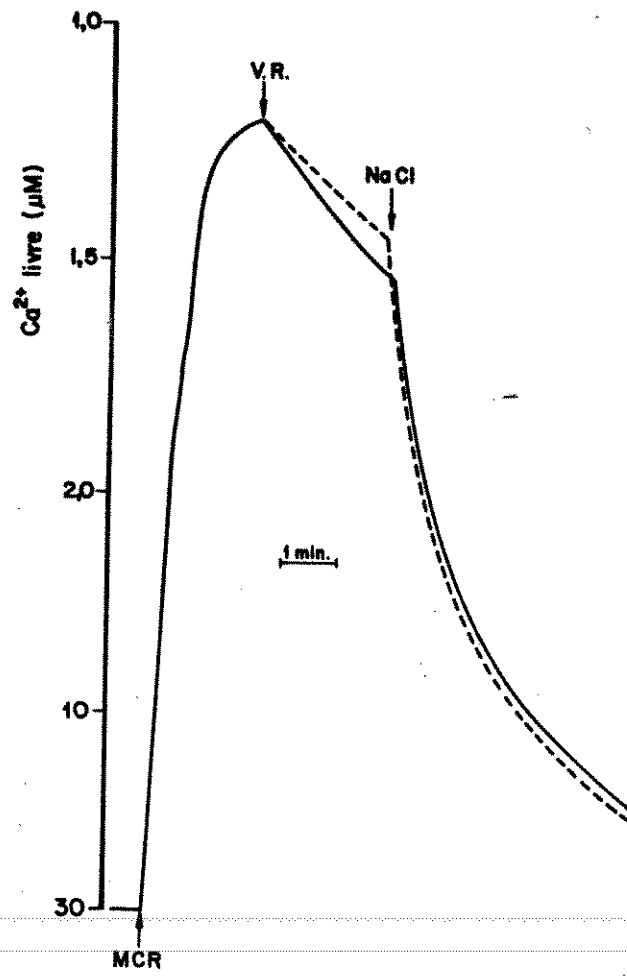


Figura 11-Efeito de lasalocid A sobre o efluxo de Ca^{2+} sódio-dependente em mitocôndrias de coração.

O meio empregado neste experimento foi o meio básico-II com a adição de P_i 1mM e lasalocid-A 250 pmol (linha tracejada). Os experimentos foram iniciados pela adição de 1 mg de proteína mitocondrial de coração (MCR) a 1 ml de meio de reação. Em intervalos de dois minutos, $0,6 \mu\text{M}$ de vermelho de rutênio e NaCl 5 mM foram adicionados ao meio. O traçado em linha contínua representa ausência do antibiótico. Foram adicionados ao meio 20 nmol de Ca^{2+} antes das mitocôndrias.



proteína.min (na ausência do lasalocid-A) para 15 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína .min. Verificamos que este efluxo (sódio-dependente) não é inibido pelo antibiótico.

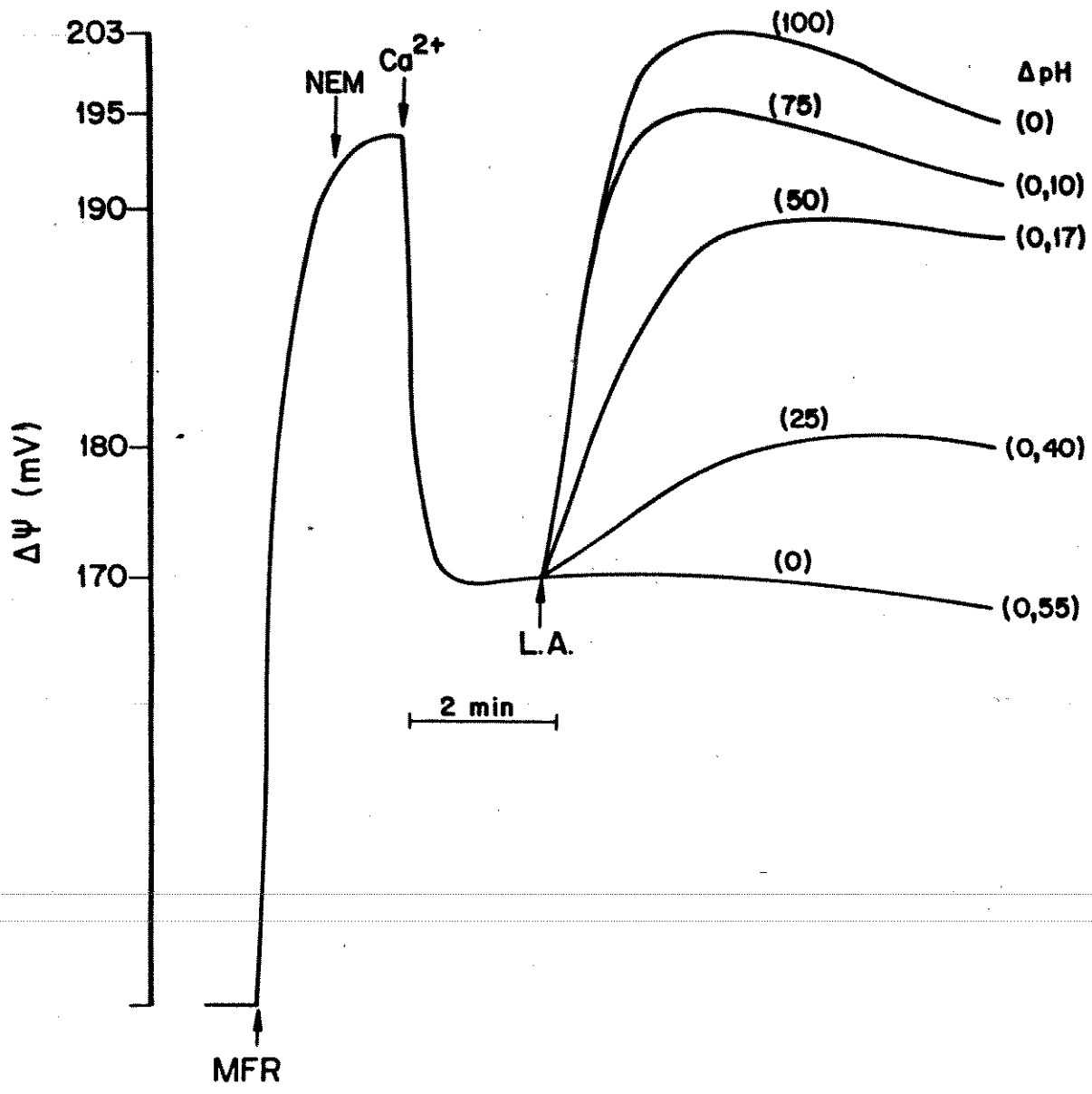
A INIBIÇÃO DO EFLUXO DE Ca^{2+} PELO LASALOCID-A É INDEPENDENTE DE VARIAÇÃO EM ΔpH

Com base nos experimentos anteriores pode-se assumir, como hipótese, que o lasalocid-A inibe a troca $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ em baixas concentrações de Ca^{2+} total, por causar a diminuição no valor de ΔpH , através da membrana mitocondrial interna. Realizamos alguns experimentos com o propósito de testar esta hipótese. Assim testamos o efeito de diferentes concentrações do antibiótico sobre as velocidades de efluxo de Ca^{2+} , em condições experimentais nas quais uma grande variação de ΔpH foi observada.

A figura 12 mostra que o potencial de membrana, medido por eletrodo seletivo de tetrafenilfosfônio, não foi completamente regenerado após a adição de 20 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína, na presença de NEM, o qual inibe o influxo paralelo de fosfato e a consequente queda em ΔpH (NICHOLLS, 1978; HAWORT et alii, 1980). Nestas condições experimentais, a adição de concentrações crescentes de lasalocid-A, causou a regeneração de $\Delta\psi$ e a consequente diminuição de ΔpH , devido a troca de K^+ interno por H^+ externo. Assumindo que na presença de concentrações de lasalocid-A de 100 pmoles/ mg de proteína, ou seja, na maior concentração empregada, ΔpH foi completamente colapsado pela troca de K^+ interno por H^+ externo, foi possível calcular ΔpH para diferentes concentrações do antibiótico, nas condições da figura 12, pelo uso da equação (1), mostrada na

Figura 12-Variação em ΔpH e $\Delta\psi$ causadas pelo lasalocid-A na presença de N-etilmaleimida (NEM) e Ca^{2+} .

A 1ml de meio básico-I foram adicionados TPP^+ 3 μM . Os experimentos foram iniciados pela adição de 1 mg de proteína mitocondrial (MFR) ao meio, seguido das adições de 60 μM de NEM e 20 nmol de Ca^{2+} em intervalos de 1 min. Finalmente foram adicionados 0, 25, 50, 75, 100 pmol de lasalocid-A. Acima desta última concentração de lasalocid-A não se verificou nenhuma elevação de $\Delta\psi$. Os valores de $\Delta\psi$ foram calculados como na curva de calibração mostrada em MATERIAL E MÉTODOS.



página 4. Os valores obtidos em cada concentração de lasalocid-A são apresentados entre parenteses na frente dos respectivos traçados.

A figura 13 mostra que em presença de acetato de potássio 30 mM, $\Delta\psi$ é quase que totalmente regenerado após a adição de 20 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína. Nestas condições ΔpH é pequeno e as mudanças causadas por lasalocid-A, tanto em ΔpH quanto em $\Delta\psi$, são mínimas.

Nas condições experimentais descritas nas figuras 12 e 13 foram determinadas as velocidades de efluxo de Ca^{2+} induzidas por vermelho de rutênio.

No gráfico apresentado na figura 14 vemos que tanto sob as condições da figura 12, ou seja, na presença de NEM (traçado a) quanto nas da figura 13, na presença de acetato (traçado b) os valores máximo de inibição da liberação de Ca^{2+} alcançado pelo antibiótico, foram praticamente iguais nas duas condições (cerca de 55% de inibição). Contudo, notamos que nas condições da figura 13, em que tanto ΔpH quanto $\Delta\psi$ praticamente não variaram a inibição da liberação de Ca^{2+} foi, para as concentrações menores do antibiótico, significativamente maior.

EFEITO DA VARIAÇÃO DE $\Delta\psi$ SOBRE A LIBERAÇÃO DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Com o objetivo de testar se o menor grau de inibição do efluxo de Ca^{2+} nas condições experimentais da figura 12, estava associado ao abaixamento de $\Delta\psi$, realizamos os experimentos apresentados na figura 15 A e B.

Mantendo ΔpH constante e em valores pequenos, pela presença de acetato de potássio medimos as velocidades de efluxo de Ca^{2+} induzidas por vermelho de rutênio, em diferentes valores

Figura 13-Efeito de lasalocid A sobre $\Delta\psi$ na presença de acetato de potássio.

A 1ml de meio meio básico-I foram adicionados acetato de potássio 30 mM e 3 μ M de TPP⁺ O experimento foi iniciado pela adição de 1 mg de proteína mitocondrial (MFR); em intervalos de 1 min foram adicionados, sucessivamente, NEM 60 μ M, Ca²⁺ 20 μ M e finalmente 100 pmol de lasalocid-A. Os valores dos potenciais foram determinados como descrito em MATERIAL E MÉTODOS.

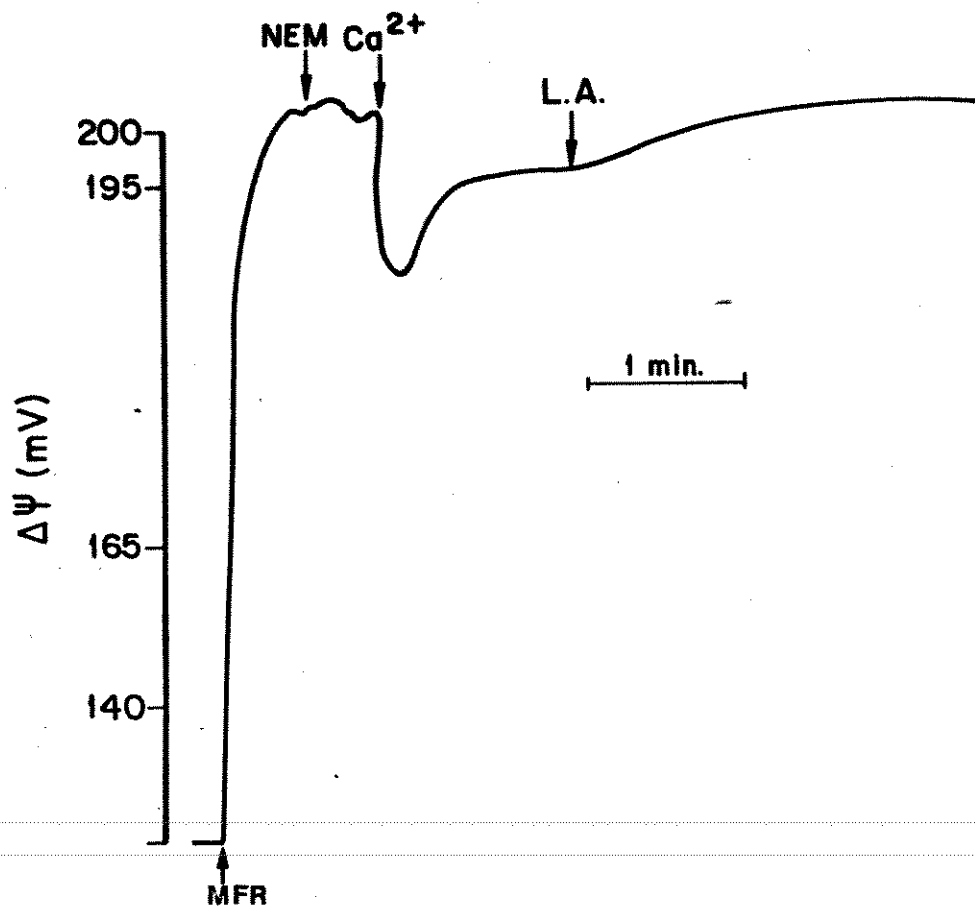
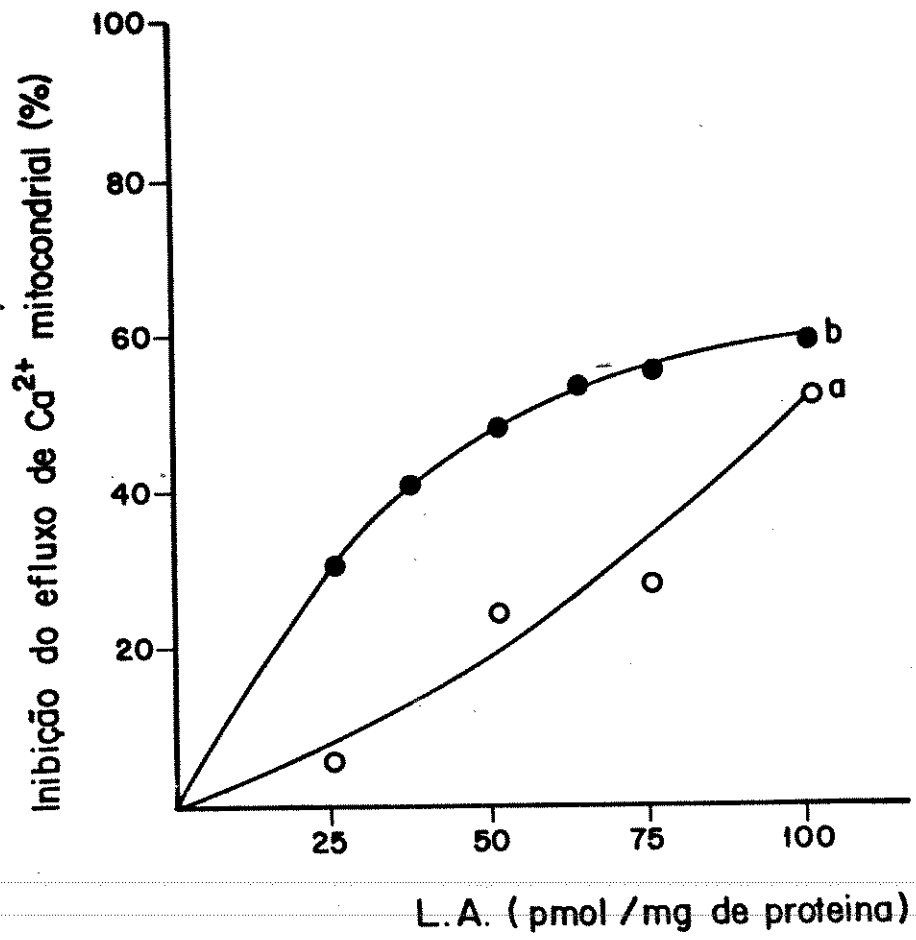


Figura 14-Efeito da concentração de lasalocid-A sobre a velocidade de liberação de Ca^{2+} .

Com auxílio de eletrodo seletivo de Ca^{2+} foram determinadas as velocidades de efluxo de Ca^{2+} induzidos por vermelho de rutênio (V.R) nas mesmas condições experimentais descritas na Fig. 12 (traçado a) e na Fig. 13 (traçado b). Para que se verificasse o efluxo líquido de Ca^{2+} , V.R 4 μM foi adicionado 2min. após a adição de Ca^{2+} , em ambos os experimentos. Em ambos os traçados os pontos representam médias de três experimentos, com preparações mitocondriais diferentes.



de $\Delta\psi$. Isto foi possível através da inibição progressiva da oxidação de succinato por concentrações crescentes de malonato. A figura 15 A mostra a titulação de $\Delta\psi$ com este inibidor da desidrogenase succínica, e a figura 15 B as velocidades de efluxo de Ca^{2+} nos diferentes valores de $\Delta\psi$, obtidos pela titulação com malonato, na ausência (círculo vazio) e na presença de 100 pmol de lasalocid-A (círculo cheio).

Podemos observar que, em valores menores de $\Delta\psi$, embora as velocidades de efluxo de Ca^{2+} sejam maiores, a percentagem de inibição pelo antibiótico diminui, sendo de 7% quando $\Delta\psi$ é igual a 152 mV e de 40% quando $\Delta\psi$ é igual a 205 mV.

COMPORTAMENTO CINÉTICO DA INIBIÇÃO DO EFLUXO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR LASALOCID-A

Na figura 16A são mostradas as retas obtidas quando colocamos em um gráfico o inverso da velocidade de efluxo em função da concentração de lasalocid-A (modelo de Dixon). O tipo de intersecção obtida pelo traçado das duas retas indica que lasalocid-A inibe o efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio por um processo competitivo.

Estes resultados são confirmados quando colocamos em um gráfico do tipo duplo recíproco, os dados obtidos no experimento inserido na figura 7. A partir deste gráfico obtivemos um V_{max} de efluxo de 2,0 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína.min, $K_m = 13$ nmol de Ca^{2+} /mg de proteína mitocondrial, na ausência do antibiótico, e $K_m = 62,5$ nmol de Ca^{2+} /mg de proteína mitocondrial, na presença do antibiótico. O valor da constante de inibição para lasalocid-A foi de 67 pmol de lasalocid-A/mg de proteína mitocondrial. WINGROVE e GUNTER (1986a) encontraram valores menores que os

Figura 15-Efeito da variação de $\Delta\psi$ sobre a velocidade de efluxo de Ca^{2+} mitocondrial.

A 1 ml do meio básico I foram adicionados 20 nmol de Ca^{2+} , 20 mM de acetato de potássio e 3 μM de TPP^+ . Iniciamos os experimentos pela adição de 1 mg de proteína mitocondrial. Um minuto e meio após foi iniciada a titulação do potencial pela adição de malonato de maneira que sua concentração final fosse 0,5, 0,7, 1,0, 1,2 e 1,5 mM (nos pontos indicados pelas setas) Com o auxílio de eletrodo de TPP^+ foram determinados os valores de potencial de membrana ($\Delta\psi$) nos patamares estabelecidos (A). As velocidades de efluxo de Ca^{2+} foram determinadas em cada um destes valores de $\Delta\psi$, na presença de 100 pmol e ausência de lasalocid-A, após adição de V.R. 2 μM e os resultados obtidos estão apresentados B. Em (B) os pontos obtidos representam as médias de três experimentos com preparações mitocondriais diferentes.

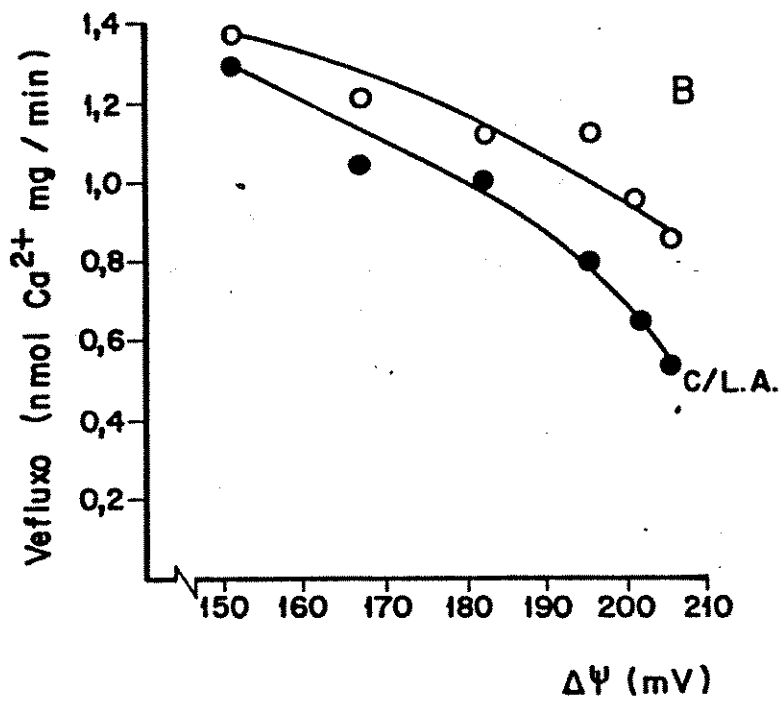
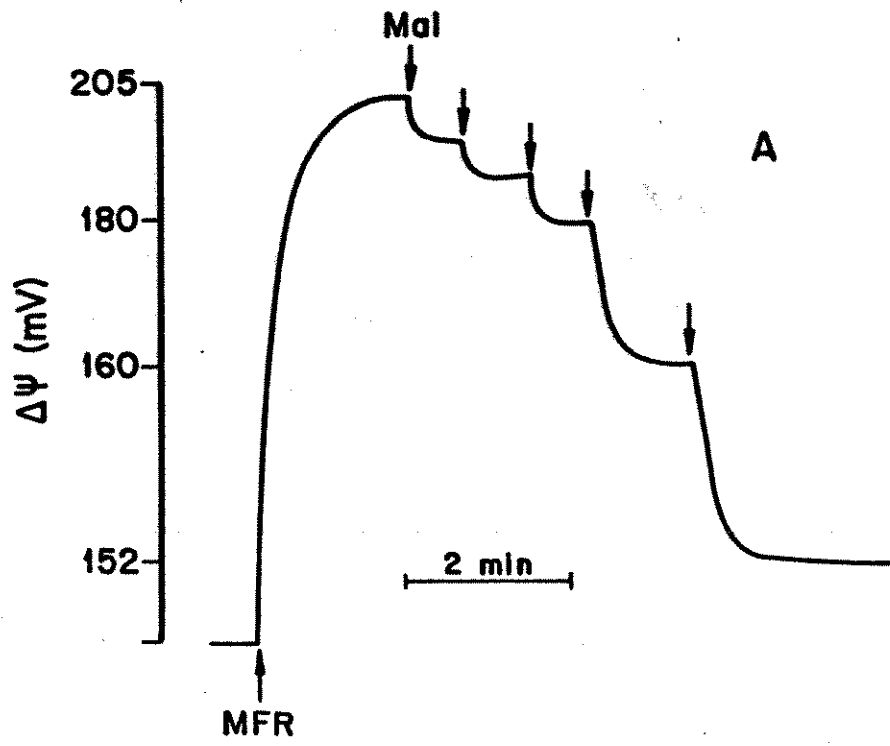
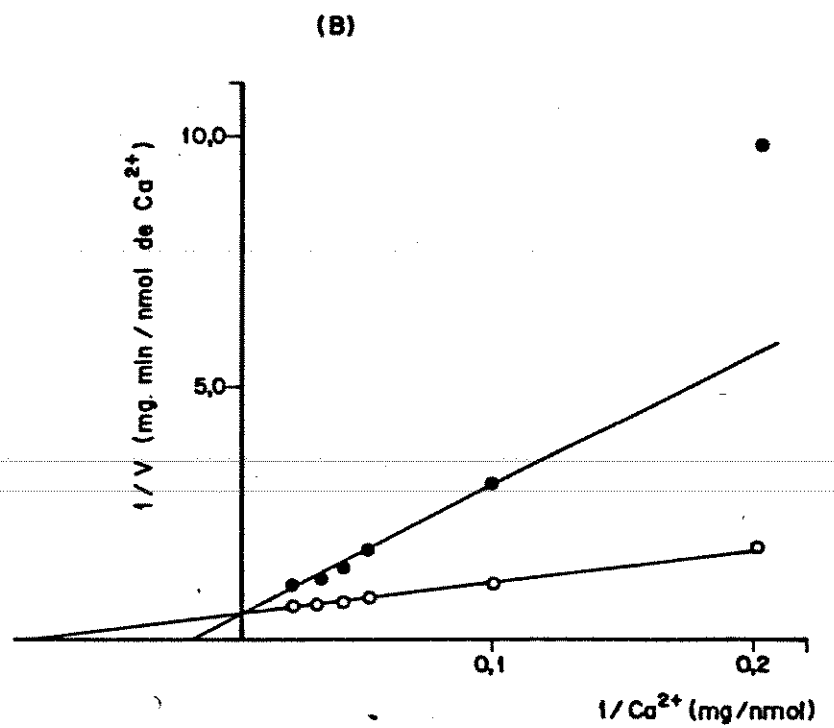
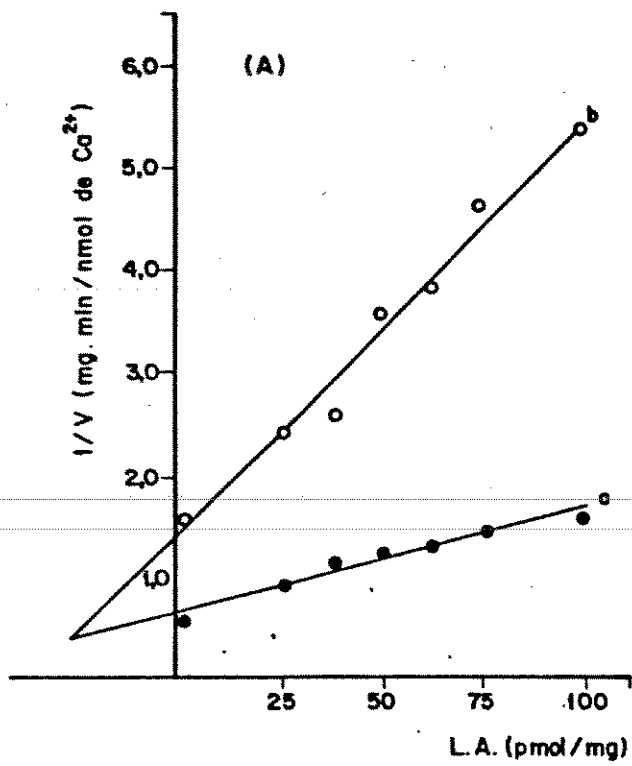


Figura 16-Comportamento cinético da inibição do efluxo de Ca^{2+} por lasalocid-A.

Nas condições experimentais descritas na Fig. 13, (a) na presença de Ca^{2+} contaminante ($10 \mu\text{M}$) e (b) com adição de mais 10 nmol de Ca^{2+} (concentração final de Ca^{2+} $20 \mu\text{M}$) com concentrações variáveis de lasalocid-A, foram determinadas as velocidades de efluxo de Ca^{2+} induzidas por vermelho de rutênio ($4 \mu\text{M}$). O inverso das velocidades ($1/V$) foram colocadas em gráfico em função da concentração de lasalocid-A empregada (Fig. A). A figura B mostra o gráfico de duplo recíproco feito a partir dos dados do gráfico inserido na Fig. 7, os círculos vazios correspondem ao experimento na presença de 250 pmol de lasalocid-A e os círculos cheios na ausência do antibiótico.



apresentados aqui sendo $V_{max} = 1,2$ nmol de Ca^{2+} /mg de proteína. min e $K_m = 8,4$ nmol/mg proteína, contudo estes autores desenvolveram um procedimento no qual a mitocôndria é depletada de Ca^{2+} endógeno. Eles acreditam que mitocôndrias depletadas de Ca^{2+} são mais resistentes à permeabilidade induzida por Ca^{2+} . Nossos experimentos, pelo contrário, são realizados em concentrações maiores de Ca^{2+} .

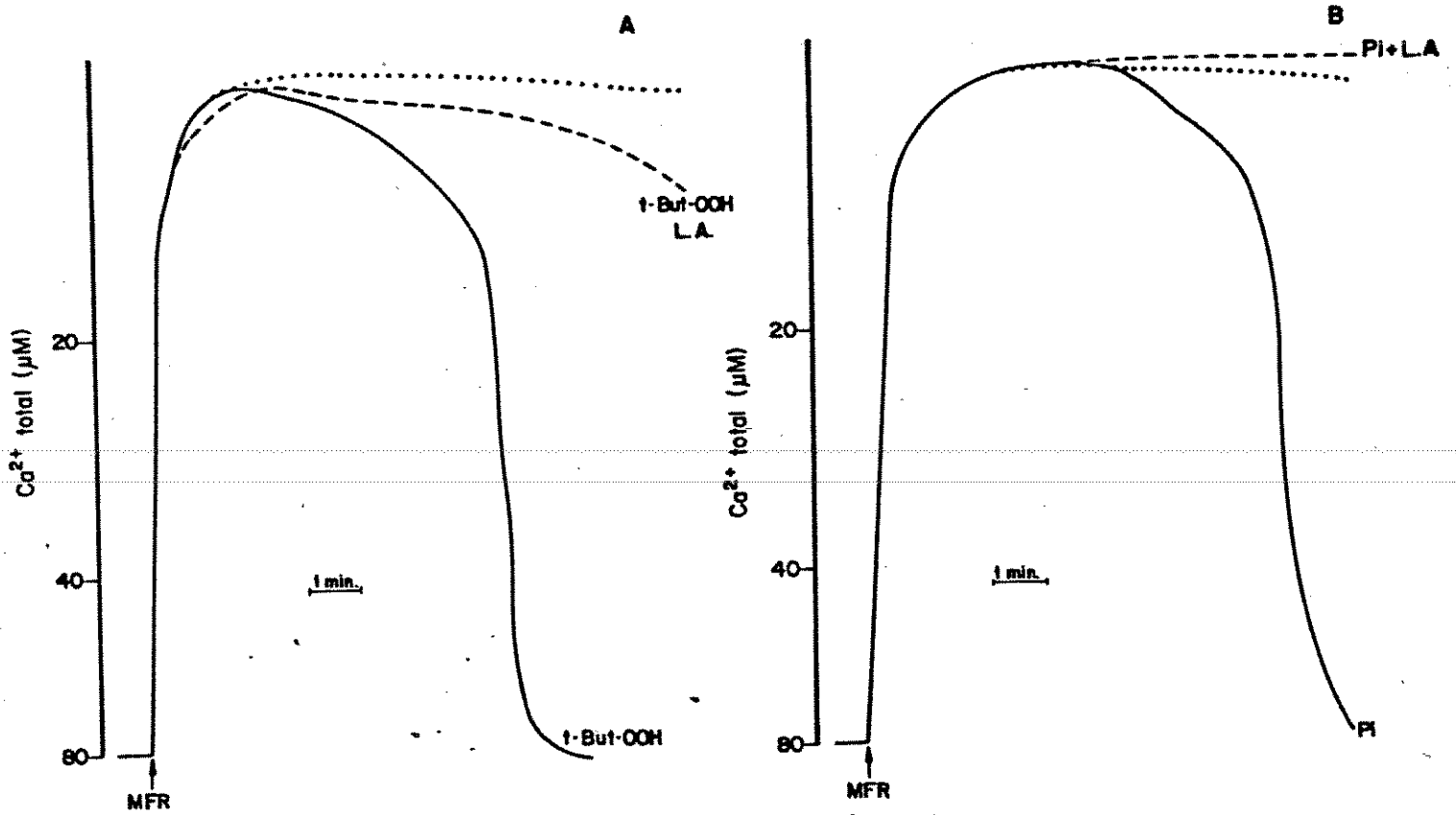
EFEITO DE LASALOCID-A SOBRE A RETENÇÃO DE Ca^{2+} NA MATRIZ DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS NA PRESENÇA DE AGENTES LIBERADORES DO CÁTION

As figuras 17 A e B mostram o efeito de lasalocid-A sobre a retenção de Ca^{2+} por mitocôndrias quando estas são submetidas à presença de altas concentrações de fosfato (A) e t-butil hidroperóxido (B). Os hidroperóxidos induzem liberação de Ca^{2+} de mitocôndrias intactas por um mecanismo controlado pela razão entre os nucleotídeos de piridina oxidados e reduzidos (VERCESI et alii, 1978; LOTSCHER et alii, 1980; HOFSTETTER et alii, 1981). A diamida também induz liberação de Ca^{2+} mitocondrial (dado não mostrado) por ser um oxidante de grupos SH de membranas e de nucleotídeos de piridina (KURANTSI-MILLS & LESSIN, 1981; RIZZUTO et alii, 1987b). Nada se conhece sobre o mecanismo molecular de liberação de Ca^{2+} induzido por fosfato, porém, fortes evidências indicam que todos estes agentes na presença de Ca^{2+} induzem aumento inespecífico da permeabilidade da membrana mitocondrial (PFEIFFER et alii, 1979; VERCESI et alii, 1988).

Verificamos que na presença do antibiótico (linhas tracejadas) a retenção de Ca^{2+} na presença destes agentes, é

Figura 17-Efeitos de lasalocid-A sobre a retenção de Ca^{2+} na matriz de mitocôndrias hepáticas incubadas na presença de agentes liberadores do íon.

A 1 ml de meio básico-I (na ausência de BSA e Mg^{2+}) foram adicionados 80 nmol de Ca^{2+} e 100 μM de t-butil hidroperóxido (t- But-OOH) (A) ou Pi 3 mM (B). A linha pontilhada representa o experimento controle (na ausência de lasalocid-A e de agentes liberadores) enquanto a tracejada, a presença de 250 pmol de lasalocid-A e agentes liberadores e a linha contínua, presença apenas dos agentes liberadores, no meio de reação. experimentos foram iniciados pela adição de 1 mg de proteína mitocondrial (MFR) ao meio de reação. A linha pontilhada representa ausência de lasalocid-A e t-But-OOH.



maior que na sua ausência (linha cheia). Os resultados na presença de diamida (dados não mostrados) são similares aos observados em presença de t-butil hidroperóxido.

EFEITO DE LASALOCID-A SOBRE A MANUTENÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\psi$) DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS NA PRESENÇA DE AGENTES LIBERADORES DE Ca^{2+}

Nas figuras 18 A e B são mostrados os traçados de potencial de membrana, obtidos com o auxílio de eletrodo seletivo de tetrafenilfosfônio, em condições experimentais semelhantes às dos experimentos da figura 17.

Como podemos observar, na presença de fosfato o potencial de membrana decresce progressivamente na ausência de lasalocid-A (linha cheia), contudo, na sua presença (linha tracejada) a retenção de um alto potencial de membrana é mantido por um maior período de tempo. Verificamos efeito semelhante na presença de diamida (dado não mostrado) ou de t-butil hidroperóxido, que causam, na ausência do antibiótico um rápido decréscimo no potencial de membrana.

POSSÍVEL COMPLEXAÇÃO DE Ca^{2+} POR LASALOCID-A

Alguns trabalhos têm mostrado que o antibiótico lasalocid-A forma complexos com cátions mono e divalentes (PRESSMAN, 1976; HENDERSON, 1971; DEGANI & FRIEDMAN, 1974) e que estes complexos são estabilizados pela diminuição da polaridade do meio no qual os mesmos se encontram (DEGANI & FRIEDMAN, 1974). O antibiótico lasalocid-A apresenta, graças às suas características estruturais, a propriedade de fluorescência

Figura 18-Efeito de lasalocid-A sobre a manutenção do potencial elétrico de membrana (Ψ) de mitocôndrias hepáticas na presença de agentes liberadores de Ca^{2+} . A 1ml de meio básico-I (na ausência de BSA e Mg^{2+}) foram adicionado 60 nmol de Ca^{2+} , TPP^+ 3 μM , lasalocid-A 250 pmol e 100 μM de t-butil hidroperóxido (A) ou Pi 0,2 mM (B) e a seguir 1mg de proteína mitocondrial. A linha tracejada representa a presença de lasalocid-A e agentes liberadores e a contínua, apenas agentes liberadores. A linha pontilhada represe o controle (ausência de lasalocid-A e de t-But-OOH).

(B)

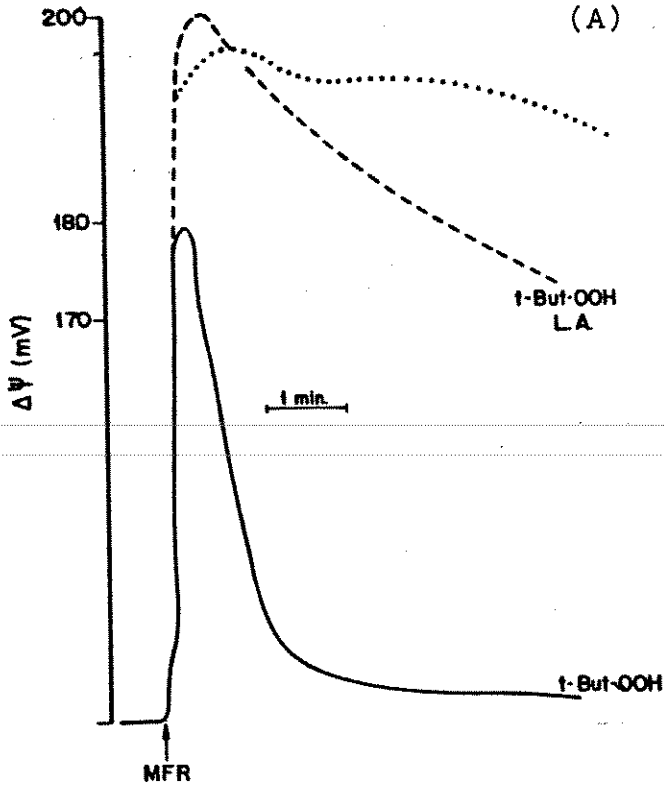
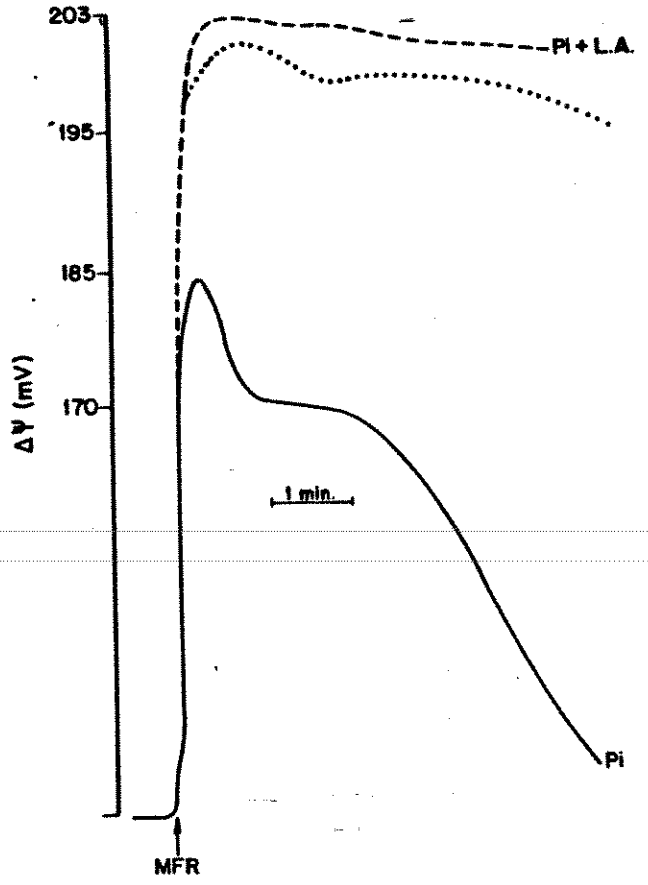
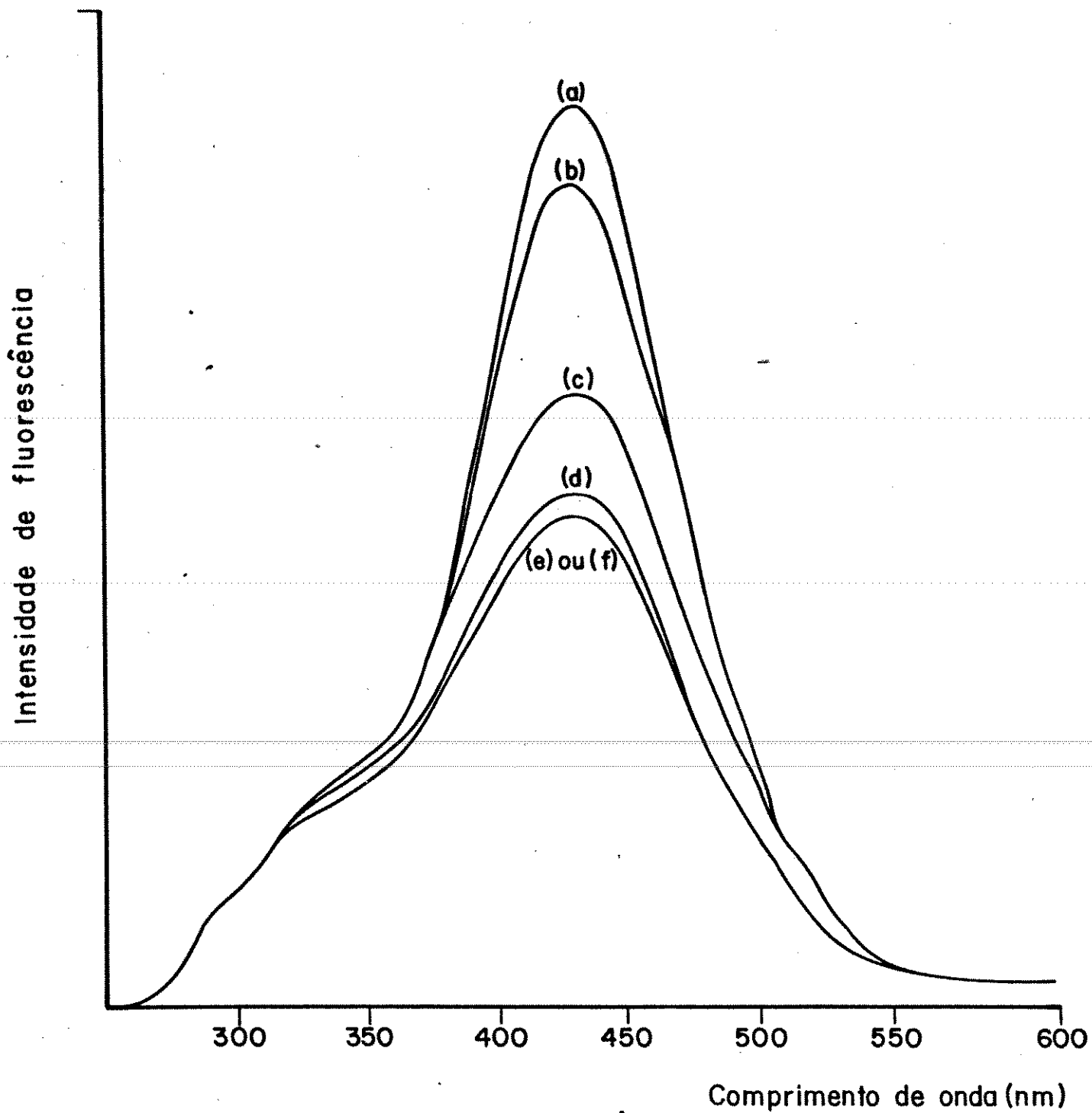


Figura 19-Efeito de diferentes concentrações de Ca^{2+} sobre o espectro de fluorescência de lasalocid-A

O espectro de emissão de fluorescência do lasalocid-A 5 μM em etanol 98% foi obtido com comprimento de onda de excitação de 295 nm. Os espectros foram obtidos na presença de (a) 0, (b) 50, (c) 100, (d) 150, (e) 200 e (f) 300 μM de Ca^{2+} .



quando excitado em comprimento de onda adequado. Contudo, quando este encontra-se complexado a um cátion, a intensidade de fluorescência diminui (DEGANI & FRIEDMAN, 1974).

A Fig. 19 mostra a diminuição da intensidade de emissão de fluorescência, pelo antibiótico excitado em 295 nm, à medida que aumenta a concentração de Ca^{2+} adicionado à solução do antibiótico em etanol.

DISCUSSÃO

Embora haja consenso no que se refere ao mecanismo de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de vertebrados, os mecanismos e o controle das vias de efluxo ainda não são bem compreendidos. Enquanto o transporte eletroforético parece ser a única via de influxo de Ca^{2+} nestas mitocôndrias, a saída do cátion pode ocorrer através de diferentes vias. Estas apresentam importâncias relativas diferentes dependendo do tecido de origem e da quantidade de Ca^{2+} com a qual a mitocôndria tenha sido carregada (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). Além disto há uma série de agentes e condições que são determinantes da retenção ou liberação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias (VERCESI et alii, 1978a b; NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). Neste trabalho estudamos o efeito de lasalocid-A sobre o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado e coração em algumas destas condições e acreditamos que os resultados obtidos trazem algumas informações relevantes relacionadas aos mecanismos de efluxo do Ca^{2+} mitocondrial.

Acreditamos que a discussão sobre o efeito do lasalocid-A na liberação de Ca^{2+} mitocondrial deveria ser dividida em três partes, se considerarmos a amplitude do carregamento de Ca^{2+} imposto às mitocôndrias. Com base nos diferentes efeitos observados em função das concentrações de Ca^{2+} empregadas, consideraremos como níveis intermediários de Ca^{2+} uma faixa entre 70 e 110 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína mitocondrial. Nesta faixa de concentração, lasalocid-A estimula levemente o efluxo do íon. Assim, consideraremos como baixo ou alto os níveis inferiores ou superiores ao intermediário, respectivamente. Nestas últimas

condições, o lasalocid-A causou inibição do efluxo de Ca^{2+} , embora por mecanismos claramente distintos em cada condição. Nas condições de baixo carregamento, o efeito inibitório do lasalocid-A parece ser devido à sua interação direta com o translocador responsável pelo efluxo do cátion. Em altos níveis do cátion, a inibição poderia ser causada pela prevenção da abertura de poros induzidos por Ca^{2+} na membrana (Al-NASER & CROMPTON, 1986 a e b; HAYAT & CROMPTON, 1987; CROMPTON et alii, 1988), pelo lasalocid-A. De fato a manutenção do potencial elétrico de membrana, nestas condições, apoiam este tipo de interpretação.

Deve ser mencionado também que observamos uma variação significativa nos limites destes intervalos em função das diferentes preparações mitocondriais e da composição dos meios de incubação (resultados não mostrados). Esta última observação está de acordo com outros dados da literatura indicando que diferentes preparações mitocondriais, incubadas em condições idênticas, ou uma mesma preparação, incubada em meios de composições químicas diferentes, apresentam respostas distintas a uma mesma concentração de Ca^{2+} (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982; PFEIFFER et alii, 1979; RIZZUTO et alii, 1987b). Acredita-se que estas variações de respostas mitocondriais ao Ca^{2+} dependem de vários fatores, entre eles: conteúdo de nucleotídeos de adenina e de Mg^{2+} endógenos (NICHOLLS & BRAND, 1980; NICHOLLS & SCOTT, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1981; ZOCCARATO et alii, 1981), estado de oxido-redução dos nucleotídeos de piridina (LEHNINGER et alii, 1978a; PALMER & PFEIFFER, 1981), conteúdo de glutatona reduzida (ORRENIUS et alii, 1983; BEATRICE et alii, 1984) e atividades das enzimas mitocondriais fosfolipase A2 (PFEIFFER et alii,

1979) e NAD-glicohidrolase (MOSER et alii, 1983).

Os dados obtidos a partir do estudo cinético, indicam que o lasalocid A, em baixos níveis de Ca^{2+} , inibe competitivamente a liberação de Ca^{2+} Na^+ -independente em mitocôndrias de fígado. Isto favorece a interpretação de que há uma interação direta do antibiótico e o carreador do efluxo de Ca^{2+} e sustenta os resultados que descartam um mecanismo indireto dependente das alterações em ΔpH e/ou $\Delta\psi$.

A diferença de comportamento da inibição do efluxo por Lasalocid-A (Fig. 7), dependente da presença ou não de ATP e MgCl no meio de incubação, pode estar relacionada a um possível efeito duplo do antibiótico como será discutido adiante. Uma outra diferença observada, refere-se ao efeito de concentrações crescentes do antibiótico em mitocôndrias carregadas com baixo Ca^{2+} em presença ou não de altas concentrações de acetato, o qual colapsa o componente químico (ΔpH) do potencial eletroquímico de prótons. Como foi observado na Fig. 14 e em outros experimentos não mostrados, em altas concentrações de lasalocid-A, a inibição máxima alcançada na presença de acetato (Fig. 14 traçado b) ou na ausência do ânion permeante (Fig. 14 traçado a) são praticamente iguais. Este fato é indicativo de que a inibição do efluxo de Ca^{2+} Na^+ -independente não é secundária à diminuição em ΔpH . Contudo, o menor grau de inibição observado na ausência de acetato, em baixas concentrações de lasalocid-A, pode ser explicada pelo menos em parte, em função de diferenças em $\Delta\psi$.

Com respeito à relação entre $\Delta\psi$ e a distribuição de Ca^{2+} através da membrana mitocôndrial interna, uma série de estudos (ROTTENBERG & SCARPA, 1974; PUSKIN et alii, 1976; POZAN et alii, 1977; NICHOLLS, 1978) indicam que em $\Delta\psi$ superiores a 130 mV, a distribuição de Ca^{2+} não está em equilíbrio com o potencial de

membrana. Todavia, outros autores mostram que alguns fatores, como condições experimentais diferentes, podem causar modificações nesta distribuição (BERNARDI et alii, 1983). Nas nossas condições experimentais, observamos que as velocidades de efluxo de Ca^{2+} induzidas por vermelho de rutênio aumenta levemente à medida que $\Delta\psi$ diminui de 200 a 150 mV (Fig. 15). Estes resultados certamente explicam o menor grau de inibição do efluxo de Ca^{2+} em $\Delta\psi$ inferiores, condições nas quais parte do efluxo de Ca^{2+} ocorre, presumivelmente, pelo reverso da via de influxo, a qual não está sujeita à inibição por lasalocid-A (PEREIRA DA SILVA et alii, 1984). Esta hipótese é confirmada pelo experimentos da Fig.15, em que é mostrado que quando $\Delta\psi$ é diminuído pelo uso de malonato, a percentagem de inibição do efluxo de Ca^{2+} pelo antibiótico, também diminui. Nesta figura é mostrada uma inibição do efluxo de Ca^{2+} de aproximadamente 40% quando $\Delta\psi$ é igual a 200 mV, e de apenas 7% quando o valor de $\Delta\psi$ é 152 mV.

A similaridade entre os efeitos do lasalocid-A sobre as velocidades de liberação de Ca^{2+} Na^+ -independente, em mitocôndrias de fígado e coração e a ausência de efeito na liberação de Ca^{2+} Na^+ -dependente em mitocôndrias de coração apoiam as propostas (RIZZUTO et alii, 1987a; WINGROVE & GUNTER, 1986a) de que as vias de efluxo Na^+ -dependente e independente são entidades distintas e que em mitocôndrias de coração o efluxo Na^+ -independente não representa um componente residual da via Na^+ -dependente.

Em relação ao estímulo do efluxo de Ca^{2+} induzido por lasalocid-A, em níveis intermediários de Ca^{2+} , devemos recordar os resultados de LIN e KUN (1973a) mostrando que este antibiótico na faixa de concentração usada neste trabalho, causa

dissociação de Mg^{2+} ligado à membrana, se $ATP + Mg^{2+}$ não estiverem presentes no meio de incubação. Outros estudos têm mostrado, também, que a perda de Mg^{2+} ligado à membrana está associada ao aumento na permeabilidade da mesma ao Ca^{2+} (KUN et alii, 1969; BINNET & VOLFIN, 1975; HOSER et alii, 1976; COELHO & VERCESI, 1980). Por esta razão, acreditamos que o aumento nas velocidades de liberação do cátion nesta faixa de concentração, está na verdade, relacionado ao aumento na permeabilidade da membrana causada pela perda de Mg^{2+} estrutural induzido por Ca^{2+} (KUN et alii, 1969; BINNET & VOLFIN, 1975; HOSER et alii, 1976) e que este efeito é potencializado por lasalocid-A. Esta interpretação, poderia explicar também a diferença entre os efeitos de lasalocid-A, em mitocôndrias carregadas com baixos níveis de Ca^{2+} , na presença ou ausência de $ATP+Mg^{2+}$. Na ausência de $ATP+Mg^{2+}$, condições em que lasalocid-A promove dissociação de Mg^{2+} ligado à membrana (LIN & KUN, 1973a), a liberação de Ca^{2+} por uma via insensível ao antibiótico estaria estimulada. Isto faz com que a extensão do platô da curva tracejada da Fig.7 (lasalocid-A presente) seja diminuído deslocando-a para a esquerda. Nestas condições a velocidade de liberação de Ca^{2+} na presença de lasalocid-A se iguala e posteriormente supera a velocidade observada na ausência do antibiótico. Isto não ocorre na presença de $ATP + Mg^{2+}$, condições em que a dissociação de Mg^{2+} estrutural da membrana, por lasalocid-A é prevenida (LIN & KUN, 1973). Nestas condições as características de permeabilidade da membrana não são alteradas pelo antibiótico e o efluxo de Ca^{2+} Na^+ -independente é mediado e portanto sensível ao lasalocid-A. É importante enfatizar que este estímulo do efluxo de Ca^{2+} pelo lasalocid-A, em uma faixa intermediária de concentração do íon, foi reproduzido em uma série de preparações

de mitocôndrias de fígado de rato.

Se estas interpretações são corretas, poder-se-ia, então, concluir que o carregamento limite de Ca^{2+} , no qual ocorre a transição de um processo puramente mediado para um processo misto de efluxo mediado e não mediado, depende da manutenção ou não de uma quantidade determinada de Mg^{2+} ligada à membrana. Portanto, os vários agentes ou condições que promovem ou previnem uma dissociação do Mg^{2+} da membrana, deve mudar os limites de carregamento de Ca^{2+} que causam esta transição de permeabilidade para valores inferiores ou superiores, respectivamente. Contudo, os experimentos realizados com mitocôndrias carregadas com altos níveis de Ca^{2+} , indicam que outras alterações na estrutura da membrana, as quais podem ser prevenidas por lasalocid-A, devem ser responsáveis por velocidades maiores de liberação de Ca^{2+} , como pode ser verificado nos experimentos da figura 7. Nesta faixa de concentração de Ca^{2+} as velocidades de liberação do mesmo aumentam drasticamente com o aumento da concentração do cátion, na ausência de lasalocid-A, enquanto que na sua presença, este intenso aumento é bloqueado. Esta propriedade do lasalocid-A, favorece a retenção de Ca^{2+} , pela mitocôndria, mesmo na presença agentes liberadores tais como fosfato, e oxidantes de nucleotídeos de piridina e de grupos tiólicos de membrana.

Sabe-se que os anestésicos locais apresentam a habilidade de deslocar Ca^{2+} ligado à membranas biológicas, devido a sua propriedade de inserir-se entre dois pontos de ligação do cátion na superfície da membrana, aumentando desta forma a distância de ligação entre o Ca^{2+} e o ligante (LOW et alii, 1978). Segundo estes autores a modulação de funções biológicas pelo deslocamento de Ca^{2+} induzidas por anestésicos locais, poderia

ocorrer por um dos dois processos descritos a seguir:(i)- a ligação do Ca^{2+} a um sítio específico da membrana poderia ser um requerimento funcional para um processo biológico, então, seu deslocamento levaria à interrupção do processo; (ii)- a elevação dos níveis do Ca^{2+} livre (deslocado) poderia levar à saturação de certos sítios de ligação de Ca^{2+} que deveriam permanecer desocupados nas condições fisiológicas.

Em trabalho recente deste laboratório são mostradas evidências de que o processo de permeabilização da membrana mitocondrial por Ca^{2+} mais agentes liberadores do cátion, é dependente da ligação do mesmo a sítios localizados na face interna da membrana e que os anestésicos locais protegem contra estes efeitos (VERCESI et alii, 1988). Com base nos efeitos causados pelos anestésicos locais e por analogia com a propriedade do lasalocid-A em dissociar Mg^{2+} (KUN & LIN, 1973a), e possivelmente Ca^{2+} , da membrana mitocondrial, nós propomos que o lasalocid-A favorece a retenção do cátion no interior de mitocôndrias de fígado por promover o deslocamento do mesmo de sítios de ligação relacionados à permeabilização da membrana. De fato os experimentos da figura 16 A e B indicam que o lasalocid-A também compete com Ca por sítios de ligação associados ao mecanismo de seu efluxo mediado.

É importante mencionar que as baixas concentrações de lasalocid-A empregados nestes experimentos não são suficientes para explicar o mecanismo de inibição do efluxo de Ca^{2+} em função da diminuição da forma livre do cátion, devido a sua complexação com lasalocid-A.

RESUMO

Em trabalho anterior, PEREIRA DA SILVA et alii (1984), apresentaram evidências de que lasalocid-A, em concentrações bastante abaixo da necessária para agir como ionóforo de Ca^{2+} , inibe o efluxo do mesmo em mitocôndrias de fígado. No presente trabalho, estudamos o mecanismo desta inibição em mitocôndrias de fígado e de coração. Primeiramente, observamos que lasalocid-A, na faixa de concentração usada nestes experimentos (0-250 nM), promove a troca eletroneutra de K^+ por H^+ através da membrana interna mitocondrial e como consequência pode causar alterações importantes nos valores de ΔpH e $\Delta\Psi$ (os componentes químico e elétrico do potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$)). O efeito indireto destas alterações na inibição da liberação de Ca^{2+} mitocondrial foi descartado pelos nossos experimentos nos quais são mostrados três padrões do efeito de lasalocid-A, dependendo do carregamento de Ca^{2+} mitocondrial. Em baixo carregamento de Ca^{2+} (5-70 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína), sob condições experimentais nas quais a liberação de Ca^{2+} é supostamente mediada por um antiporter $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, os dados cinéticos, indicam que lasalocid-A inibe o efluxo do cátion por um mecanismo competitivo. A troca $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^{2+}$, a via dominante para o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração, não foi afetada por lasalocid-A. Em carregamento intermediário de Ca^{2+} (70-110 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína), lasalocid-A estimula levemente a liberação de Ca^{2+} . Este efeito parece estar relacionado a um aumento da permeabilidade da membrana causada pelo deslocamento de uma quantidade determinada de Mg^{2+} estrutural ligado à membrana. Finalmente, em alto carregamento de Ca^{2+} (110-140 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína), lasalocid-A aumentou a habilidade

de retenção de Ca^{2+} pela mitocôndria, mesmo na presença de agentes liberadores de Ca^{2+} , tais como fosfato e agentes oxidantes de nucleotídeos de piridina mitocondriais. A manutenção de valores altos de potencial de membrana nestas condições, podem sugerir que lasalocid-A é um potente inibidor da abertura de "poros" induzidos na membrana pelo cátion.

SUMMARY

A previous communication (PEREIRA DA SILVA et alii, 1984) presented evidence that lasalocid-A, at concentrations far below those required to act as Ca^{2+} ionophore, significantly inhibited Ca^{2+} efflux from liver mitochondria. In the present work we have studied the mechanism of this inhibition in liver and heart mitochondria. Firstly it was observed that lasalocid-A, in the range of concentration used in these experiments (0-250 nM), promotes the electroneutral exchange of K^+ for H^+ across the inner mitochondrial membrane and as a consequence can cause important alterations in the values of ΔpH and $\Delta\psi$ (chemical and electrical components, respectively, of the electrochemical membrane potential ($\Delta\mu\text{H}^+$)). The indirect effect of those alterations in the inhibition of mitochondrial Ca^{2+} release was ruled out by our experiments which have shown three patterns of lasalocid-A effect, depending on the size of the mitochondrial Ca^{2+} load. At low Ca^{2+} loads (5-70 nmol Ca^{2+} /mg protein), under experimental conditions in which Ca^{2+} release is supposed to be mediated by a $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ antiporter, the kinetic data indicated that lasalocid-A inhibits the efflux of the cation by competitive mechanism. The $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$ antiporter, the dominant pathway for Ca^{2+} efflux from heart mitochondria, was not affected by lasalocid-A. At intermediate Ca^{2+} loads (70-110 nmol Ca^{2+} /mg protein), lasalocid-A slightly stimulates Ca^{2+} release. This effect appears to be due to an increase in membrane permeability caused by the displacement of a pool of structural membrane bound Mg^{2+} . Finally, at high Ca^{2+} loads (110-140 nmol Ca^{2+} /mg protein) lasalocid-A, enhances the ability of Ca^{2+} retention by liver mitochondria even in presence of Ca^{2+} releasing agents such

as phosphate and oxidants of the mitochondrial pyridine nucleotides. The maintenance of a high membrane potential under these conditions may suggest that lasalocid-A is a potent inhibitor of "pore" opening induced in the membrane by the cation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFOLTER, H. & CARAFOLI, E. The Ca^{2+} - Na^{+} antiporter of heart mitochondria operates electroneutrally. Biochim. Biophys. Acta., 95: 193-196, 1980.

AFFOLTER, H. & SIEGEL, E., A simple system for the measurement of ion activities with solvent polymeric membrane electrodes, Anal. Biochem., 97: 315-319, 1979.

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

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

AL-NASSER, I. & CROMPTON, M.; The reversible Ca^{2+} -induced permeabilization of rat liver mitochondria; Biochem. J., 239: 19-29, 1986a.

AL-NASSER, I & CROMPTON, M; The entrapment of the Ca^{2+} indicator asenazo III in the matrix space of rat liver mitochondria by permeabilization and resealing; Biochem. J.; 239: 31-40, 1986b.

AL-SKAIKHALY, M. H., NEDERGAARD, J. AND CANNON, B.; Sodium-

induced calcium release from mitochondria in brown adipose tissue; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76: 2350-53, 1979.

AZZONE, G. F.; POZZAN, T.; MASSARI, S.; BRAGADIN, M. AND DELL'ANTONE, P. H^+ /Site ratio and steady state distribution of divalent cations in mitochondria. FEBS Lett., 78: 21- 24, 1977.

BARDSLEY, M. E. & BRAND, M. D., Oxaloacetate and acetoacetate-induced calcium efflux from mitochondria occurs by reversal of the uptake pathway. Biochem J., 202: 197-201, 1982.

BEATRICE, M. C., PALMER, J. W. AND PFEIFFER, D. R., The relationship between mitochondrial membrane potential and the retention of Ca^{2+} by mitochondria. J. Biol. Chem., 255: 8663-71, 1980.

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

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

BERGER, J.; RACHLIN, A. I.; SCOTT, W.; STERNBACH, L.H. and GOLDBERG, M. W.; The isolation of three new crystalline antibiotics from streptomycetes. J. Am. Chem. Soc., 73, 5295, 1951.

- BERNARDES, C.F.; PEREIRA DA SILVA, L. and VERCESI, A. E.;
T-butyl hydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver
mitochondria in the presence of physiological concentrations
of Mg^{2+} and ATP. Biochim. Biophys. Acta, 850: 41-48, 1986.
- BERNARDI, P. & AZZONE, G. F. Regulation of Ca^{2+} efflux in rat
liver mitochondria. Role of membrane potential. Eur. J.
Biochem. 134: 377- 383, 1983.
- BINET, A. & VOLFIN, P. Effect of the A23187 ionophore on
mitochondrial membrane Mg^{2+} and Ca^{2+} . FEBS. Lett., 49:
400-403, 1975.
- BYGRAVE, F. L., Mitochondrial calcium transport ., Curr. Top.
Bioenerg., 6: 259-318, 1977.
- BRAND, M. D., REYNAFARJE, B. AND LEHNINGER, A. L., Re-evaluation
of the H^+ /site ratio of mitochondrial electron transport
with oxygen pulse technique. J. Biol. Chem., 251: 5670-96,
1976.
- CARAFOLI, E., Mitochondrial pathology: an overview., Annals New
York Acad. Sci., 488: 1-18, 1986.
- CARAFOLI, E & CROMPTON, M. The regulation of intracellular
calcium. Curr. Top. Membr. Trans. 10: 151-216, 1978.
- CASWELL, A. H. & PRESSMAN, B. C. Kinetics of transport of
divalent cation across sarcoplasmic reticulum vesicles
induced ionophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49 (1):

292- 298, 1978.

CHAMBERLIN, J.W. & AGTARAP, A.; Observation on the mass spectrometry of monensin and related compounds. Org. Mass. Spectrom., 3 (1): 271-285, 1970.

CHANCE, B. The energy-linked reation of calcium with mitochondria. J. Biol. Chem. 240: 2729-2748, 1965.

- CHANCE, B. NAKASE, Y. AND ITSHAK, F. Membrane energization at subzero temperatures: calcium uptake and oxonol-responses. Arch. Biochem. Biophys. 198: 360- 369, 1979.

COELHO, J. L. C. AND VERCESI, A. E., Retention of Ca^{2+} by heart mitochondria: effect of phosphate, Mg^{2+} and $NAD(P)^+$ redox state., Arch. Biochem. Biophys., 204(1): 141-147, 1980.

CROMPTON, M. The calcium-induced and sodium-induced efflux of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. Eur. J. Biochem. 79: 549- 558, 1977.

CROMPTON, M. The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. Eur. J. Biochem. 82: 25- 31, 1978.

CROMPTON, M., CAPANO, M. and CARAFOLI, E. The sodium-induced efflux of calcium from heart mitochondria; a possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J. Biochem., 69: 453-462, 1976.

- CROMPTON, M., CAPANO, M. AND CARAFOLI, E., The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues, Eur. J. Biochem., 82: 25-31, 1978.
- CROMPTON, M. & HEID, I. The cycling of calcium sodium and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. Eur. J. Biochem. 91: 599- 608, 1978.
- CROMPTON, M.; HEID, I.; BASCHERA, C. AND CARAFOLI, E. Resolution of liver mitochondria using the lanthanide series. FEBS Lett. 104: 352-354, 1979.
- CROMPTON, M.; HEIDRUN, E. and ANDREAS, C.; Inhibition by cyclosporin A of Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. Biochem. J., 255: 357-360, 1988.
- DEBISE, R., GACHON, P. and DURAND, R.; Correlation between glutamate and Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria. FEBS Lett., 85:25-29, 1978.
- DEGANI, H. & FRIEDMAN, H.L.; Ion binding by X-537A: Formulas, formation constantes, and spectra of complexes. Biochemistry, 13(24): 5022-5032, 1974.
- DENTON, R. M. & McCORMACK, J. G. The role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. FEBS Lett., 119: 1-8, 1980.

DENTON, R.M. & McCORMACK, J.G., Ca^{2+} transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. Am. J. Physiol., 249(12): E543-E554, 1985.

DRAHOTA, Z.; CARAFOLI, E.; ROSSI, C.G.; GAMBLE, R.L. and LEHNINGER, A.L.; The steady-state maintenance of accumulated Ca^{2+} in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 240: 2712-20, 1965.

ELDER, J. A. & LEHNINGER, A. L. Respiration dependent transport of carbon dioxide into rat liver mitochondria. Biochemistry 12: 976- 982, 1973.

FISKUM, G. AND LEHNINGER, A. L., Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{2+}$ antiporter. J. Biol. Chem. 254(14): 6236-39, 1979.

FISKUM, G. AND LEHNINGER, A. L., In: Cheung, W. Y., ed. Calcium and cell functions. New York Academic, 1981, V-2, p. 38-80.

GOCHMAN, N. & GIVELBER, H.; Automated simultaneous microdetermination of calcium and magnesium by atomic absorption. Clin. Chem., 16(3): 229-234, 1970.

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

GUNTER, T. E., CHACE, H. H., PUSKIN, J. S. AND GUNTER, K. K., Mechanism of sodium of independent calcium efflux from rat

- liver mitochondria., Biochemistry., 22: 6341-51, 1983.
- HAYAT, L.H & CROMPTON, M.; The effects of Mg^{2+} and nucleotides on the sensitivity of the heart mitochondrial Na^+-Ca^{2+} carrier to extramitochondrial Ca^{2+} . Biochem. J., 244: 533-38, 1987.
- HANSFORD, R.G.; Regulation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 102: 1-72, 1985.-
- HANSFORD, R.G. & CASTRO, F.; Intramitochondrial and extramitochondrial free calcium ion concentrations of suspensions of heart mitochondria with very low, plausibly physiological, contents of total calcium. J. Bioenerg. Biomemb., 14: 361-376, 1982.
- HARRIS, E. J. Importance of CO_2 for Ca^{2+} uptake by some mitochondria. Nature, 274: 820-821, 1978.
- HAWORTH, R. A.; HUNTER, D. R. AND BERKOFF, H. A. The phosphate requirement for Ca^{2+} -uptake by heart and liver mitochondria. FEBS Lett, 79: 284-290, 1980.
- HEATON, G. M. & NICHOLLS, D. G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. Biochem. J. 156: 635-646, 1976.
- HEFFRON, J. J. A. AND HARRIS, E. J.; Stimulation of calcium-ion

efflux from liver mitochondria by sodium ions and its response to ADP and energy state. Biochem. J., 194: 925-29, 1981.

HENDERSON, P. J. F. Ion transport by energy-conserving biological membranes. Annu. Rev. Microbiol. 25: 393-428, 1971.

HOFSTETTER, W.; MUHLEBACH, T.; WINTERHALTER, K.H. and RICHTER, C.; ATP prevents both hydroperoxide-induced hydrolysis of pyridine nucleotides and release of calcium in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 117: 361-367, 1981.

HOGEBOM, G.H.; SCHNEIDER, W.C. and PALADE, G.H.; Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J. Biol. Chem., 172: 619, 1949.

HOSER, N.; DARGEL, R.; DAWCZYNSKI, H. and WINNEFELD, K.; Respiration-dependent stimulation by inorganic phosphate of Mg^{2+} release from rat liver mitochondria. FEBS Lett., 72: 193-196, 1976.

HUTSON, S. M.; PFEIFFER, D. R. AND LARDY, H. A. Effect of cation and anion on the steady state kinetics of energy- dependent Ca^{2+} transport in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 251: 5251-5258, 1976.

JEWELL, S. A.; BELLOMO, G.; THOR, H. and ORRENIUS, S.; Bled formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbance in thiol and ion homeostasis. Science, 217: 1257-59, 1982.

KAMO, N.; MARATSUGU, M.; RUJI, H. AND KOBATAKE, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential phosphorylation potential in steady state. J. Membr. Biol., 48: 105-121, 1979.

KUN, E.; KEARNEY, E. B.; WIEDMANN, I. and LEE, N.M.; Regulation of mitochondrial metabolism by specific cellular substances. II- The nature of stimulation of mitochondrial glutamate metabolism by a cytoplasmic component. Biochemistry, 8: 4443-50, 1969.

KURANTSIN-MILLS, J. & LESSIN, L.S.; Aggregation of intermembrane particles in erythrocyte membrane treated with diamide. Biochim. Biophys. Acta, 64: 129-137, 1981.

LEHNINGER, A. L., Mitochondria and calcium ion transport: The fifth jubilee lecture., Biochem. J., 119: 129-138, 1970.

LEHNINGER, A.L.; Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration coupled transport of calcium by mitochondria. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 71: 1520-24, 1974.

LEHNINGER, A.L.; CARAFOLI, E. and ROSSI, C.S.; Energy linked ion movements in mitochondrial systems. Adv. Enzymol., 29: 259-320, 1967.

LEHNINGER, A. L., REYNAFARJE, B., VERCESI, A. E. AND TEW, W.;

Transport and accumulation of calcium in mitochondria., Ann. N. Y. Acad. Sci., 307: 160-176, 1978a.

LEHNINGER, A. L., VERCESI, A.E. AND BABABUNMI, E. A., Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75(4): 1690-94, 1978b.

LIN, D. C. & KUN, E. Mode of action of the antibiotic X-537A on mitochondrial glutamate oxidaton. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50(3): 820- 825, 1973a.

LIN, D. C. & KUN, E. Inhibition of the oxidation of glutamate and isocitrate in liver mitochondria at a specific NADP^+ - reducing site. Proc. Nat. Acad. Sci.-USA. 70(12): 3450-3453, 1973b.

LOTSCHER, H.R.; WINTERHALTER, K.L.; CARAFOLI, E. and RICHTER, C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76(9): 4340-44, 1979.

LOTSCHER, H. R.; WINTERHALTER, K. H.; CARAFOLI, E. and RICHTER, C. Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mtochondria. Eur. J. Biochem. 110:211-216, 1980.

LOW, P. S.; LLOYD, D.H.; STEIM, T. M. and ROGERS, J. A.; Calcium displacement by local anesthetics; dependence on pH and

anesthetic charge. J. Biol. Chem., 245:4119-25, 1978.

MADEIRA, V. M. C. A rapid and ultrasensitive method to measure Ca movements across biological membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64: 870-876, 1975.

MASINI, A., BOTTI, B., CECCARELLI, D., MUSCATELLO, V. AND VANNINI, V.; Induction of calcium efflux from isolated rat-liver mitochondria by 1,2-dibromoethane. Biochim. Biophys. Acta; 852: 19-24, 1980.

MASSARI, S. & POZZAN, T. The accumulation ratio of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and tetrapropylammonium in steady-state mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 173: 332-340, 1976.

MCCORMACK, J.G. & DENTON, R.M.; Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria. Trends Biochem. Sci., 11: 258-62, 1986.

MELA, L.; Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria; effects of lanthanides and local anesthetic drugs. Biochemistry, 8: 2481-86, 1969.

MITCHELL, P.; Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, Lond., 191: 144-48, 1961.

MITCHELL, P.; Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev., 41: 445-502, 1966.

MITCHELL, P.; Vectorial chemistry and molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. Biochem. Soc. Trans. 4: 399-430, 1976.

MITCHELL, P. & MOYLE, M. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 7: 471-484, 1969.

MOORE, C. L.; Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42: 298-305, 1971.

MOSER, B.; WINTERHALTER, K.H. and RICHTER, C.; Purification and properties of a mitochondrial NAD^+ -glycohydrolase. Arch. Biochem. Biophys., 224(1): 358-64, 1983.

NEDERGAARD, J. Na^+ -dependent regulation of extrmitochondrial Ca^{2+} by rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 144: 159-168, 1984.

NEDERGAARD, J. & CANNON, B.; Effects of monovalent cations on Ca^{2+} transport in mitochondria. A comparison between brown fat and liver mitochondria from rat. ACTA CHEM. SCAND., B34: 149-151, 1980.

NICHOLLS, D. G. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton electrochemical gradient across the inner membrane of rat liver mitochondria as determined by ion distribution. Eur. J. Biochem. 50: 305-315, 1974.

NICHOLLS, D. G. Calcium transport and proton electrochemical

- potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and heart. Biochem. J. 170: 511-522, 1978.
- NICHOLLS, D. G. Mitochondrial calcium transport. FEBS Lett. 111: 261-268, 1980.
- NICHOLLS, D. G. & AKERMAN, K. E. O. Mitochondrial calcium transport. Biochim. Biophys. Acta. 638: 57-8, 1982.
- NICHOLLS, D.G. & BRAND, M.D.; The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. Biochem. J. 188:113-118, 1980.
- NICHOLLS, D.G. and SCOTT, I. D.; The regulation of brain mitochondria calcium transport, the role of ATP in the discrimination between kinetic and membrane potential dependent calcium efflux mechanism. Biochem. J. 186: 833-839, 1980.
- ORRENIUS, S.; JEWELL, S.A.; BELLOMO, G.; THOR, H.; JONES, D. P. and SMITH, M. T.; Regulation of calcium compartmentation in the hepatocyte. A critical role of glutathione. Larsson, A et alii (Eds), Functions of glutathione biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects. Raven Press., New York, p.2261-2271, 1983.
- PADAN, E. & ROTTENBERG, H. Respiratory control and the proton electrochemical gradient in mitochondria. Eur. J. Biochem. 40: 431-437, 1973.

PALMER, J.W. & PFEIFFER, D.R., The control of Ca^{2+} release from heart mitochondria. J. Biol. Chem., 256(13): 6742-50, 1981.

PANFILI, E.; CROMPTON, M. AND SOTTOCASA, G. L. Immunochemical evidence of independence of Ca^{2+}/Na^{+} antiporter and electrophoretic Ca^{2+} uniporter in heart mitochondria. FEBS Lett. 123: 30-32, 1981.

PEREIRA DA SILVA, L.; BERNARDES, C.F. and VERCESI, A.E.; Inhibition of ruthenium red-induced Ca efflux from liver mitochondria by the antibiotic X-537A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 124(1): 80-86, 1984.

PFEIFFER, D.R.; SCHMID, P.C.; BEATRICE, M.C. and SCHMID, H.H.O.; Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca^{2+} plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. J. Biol. Chem., 254(22): 11485-11495, 1979.

PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C. and RUEG, J.G.; The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of calcium ions. Biochim. Biophys. Acta, 79:581-591, 1964.

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

- PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. Annu. Rev. Biochem. 45: 501-529, 1976.
- PUSKIN, J. S.; GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K. AND RUSSEL, P. R. Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria. Biochemistry, 15:3834, 1976.
- REED, K. C. & BYGRAVE, F. L. The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanidic and ruthenium red. Biochem. J. 140:143-145, 1974.
- REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L.; High affinity and low affinity binding of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. J. Biol. Chem.; 244: 584-593, 1969.
- REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L., Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria., Biochem. Biophys. Res. Commun., 77: 1273-79, 1977.
- RICHTER, C. & FREI, B., Ca^{2+} movements induced by hydroperoxides. In: Sies, H. H., ed. Oxidative stress, Academic Press Inc. (London) LTD, 1985, p. 221-239.
- RILEY, W.W. & PFEIFFER, D.R.; Ca^{2+} movements induced by hydroperoxides. In: Sies, H.; ed. Oxidative Stress. Academic Press. Inc. (London)ltda, 1985. p.221-239.
- RILEY, W. W. & PFEIFFER, D. R., The effect of Ca^{2+} and acylcoenzyme A: lysophospholipid acyltransferase inhibitors on permeability properties of the liver mitochondrial inner

membrane, J. Biol. Chem., 261(30): 14018-24, 1986.

RIZZUTO, R., BERNARDI, P., FAVARON, M. AND AZZONE, G. F.,
Pathways for Ca^{2+} efflux in heart and liver mitochondria.,
Biochem. J. 246: 271-277, 1987.

RIZZUTO, R., PITTON, G. AND AZZONE, G. F., Effect of Ca^{2+}
peroxides, SH reagents, phosphate and aging on the
permeability of mitochondrial membrane. Eur. J. Biochem.,
162: 239-249, 1987.-

ROTTENBERG, H. & SCARPA, A., Calcium uptake and membrane
potential in mitochondria., Biochemistry, 13: 4811-17, 1974.

SARIS, N.E.L.; Non-respiring mitochondria do not have a $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$
antiporter. Acta Chem. Scand., B41: 79-82, 1987.

SARIS, N.E.L. & ÅKERMAN, K.E.O.; Uptake and release of bivalent
cations in mitochondria., Curr. Top. Bioenerg., 10: 103-179,
1980.

SCARPA, A. & AZZONE, G.F.; The mechanism of ion translocation in
mitochondria. Coupling of K^{+} efflux with Ca^{2+} uptake. Eur.
J. Biochem., 12: 328-335, 1970.

SCHNEIDER, W. C. & HOGEBROOM, G. H., Intracellular distribution
of enzymes. V-further studies on the distribution of
cytochrome c in rat liver homogenates., J. Biol. Chem., 183:
123-8, 1950.

- SELWYN, M. J., DAWSON, A. P. AND DUNNET, S. J., Calcium transport in mitochondria., FEBS Lett., 10(1): 1-5, 1970.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V.; SHUMAN, H. SCARPA, A.; ENDO, M. and INESI, G.; Mitochondria do not accumulate significant Ca^{2+} concentrations in normal cells. In: Bronner, F. and Peterlick, M. (eds). Calcium and phosphate transport across biomembranes. Academic, New York, p. 87-93, 1981.
- TEDESCHI, H., The transport of cations in mitochondria., Biochim. Biophys. Acta., 639: 157-196, 1981.
- TEW, W. P., Use of the coulombic interactions of lanthanide series to identify two classes of Ca^{2+} binding sites in mitochondria., Biochem. Biophys. Res. Commun., 78:624-30, 1977.
- TSOKOS, J. CORNWELL, T.F. AND VLASUK, G., Ca^{2+} efflux from liver mitochondria induced by a decrease in extramitochondrial pH., FEBS. Lett., 119: 297-300, 1980.
- VASINGTON, F. D., GAZZOTTI, P., TIOZZO, R. AND CARAFOLI, E., Effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria., Biochim. Biophys. Acta, 256(1): 43-54, 1972.
- VASINGTON, F. D. & MURPHY, J. V., Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation., J. Biol. Chem., 237: 2670-76, 1962.

VERCESI, A. E., Dissociation of NAD(P)^+ stimulated mitochondrial Ca^{2+} efflux from swelling and membrane damage., Arch. Biochem. Biophys., 232(1): 86-91, 1984a.

VERCESI, A. E., Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)^+ -stimulated Ca^{2+} efflux from mitochondria., Biochem. Biophys. Res. Commun., 119: 305-318, 1984b.

VERCESI, A. E., Mitochondrial Ca^{2+} transport characteristics of NAD(P)^+ -induced Ca^{2+} efflux., Arg. Bio. Tecnol., 27: 47, 1984c.

VERCESI, A.E.; The participation of NAD(P)^+ , the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P)^+ transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 252(1): 171-178, 1987.

VERCESI, A. E., REYNAFARJE, B. AND LEHNINGER, A. L., Stoichiometry of H^+ ejection and uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria., J. Biol. Chem., 253(18): 6379-85, 1978.

VERCESI, A.E.; FERRAZ, V.L.; MACEDO, D.V. and FISKUM, G.; Ca^{2+} -dependent NAD(P)^+ -induced alterations of mitochondrial membrane permeability. Biochem. Biophys. Res. Commun., 154(3): 934-941, 1988.

WINGROVE, E. D. & GUNTER, E. G., Kinetics of mitochondrial calcium transport. I- Characteristics of the sodium-

independent calcium efflux mechanism of liver. J. Biol. Chem. 261: 15159-65, 1986a.

WINGROVE, E. D. & GUNTER, E. G., Kinetics of mitochondrial calcium transport. II- A kinetics description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetrapheyolphosphonium. J. Biol. Chem. 261: 15166-71, 1986b.

ZOCARATTO, F. & NICHOLLS, D. G., The role of phosphate in the regulation of the independent calcium efflux pathway of mitochondria., Eur. J. Biochem., 127: 333-338, 1982.

ZOCARATTO, F., RUGOLO, M. SILIPRANDI, D. AND SILIPRANDI, N., Correlated effluxes of adenine nucleotides, Mg^{2+} , and Ca^{2+} induced in rat liver mitochondria by external Ca^{2+} and phosphate. Eur. J. Biochem., 114: 195-199, 1981.