

Denise Vaz de Macedo

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DO IB

ENVOLVIMENTO DO CARREADOR ADP/ATP NOS PROCESSOS DE
PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

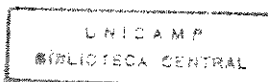
Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do título
de Doutor em Ciências, área Bioquímica.

ORIENTADOR

Profa.Dra. Lucia Pereira da Silva

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Denise Vaz de Macedo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Campinas.1993



Lucia
03/09/93

93/09/93

"Ao contrário do que podemos pensar, o progresso científico não consiste simplesmente na observação, acúmulo de fatos experimentais e redação de uma teoria baseado nestes. Ele se inicia com a invenção de um mundo possível ou um fragmento dele, que pode então ser comparado por experimentação, com o mundo real. E é este diálogo constante entre a imaginação e o experimento que permite que possamos formar um conceito preciso do que é chamado realidade".

François Jacob

Dedico esta tese ao meu amigo,
sócio e avô,

JADER VAZ

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Lucia Pereira-da-Silva pela confiança, paciência e parceria;

Aos meus pais, o porto seguro de todas minhas viagens;

Aos meus alunos, meu estímulo constante;

Ao Caetano, pela colaboração na parte experimental e leitura, sugestões e correções do texto final;

A Regina Rosseto pelas mitocôndrias do início do trabalho;

As estagiárias Soraya e Renata por toda ajuda e pelas mitocôndrias e partículas sub-mitochondriais que tornaram possível a conclusão deste trabalho e a continuidade da rotina do laboratório;

A Dona Clair, por seu trabalho e dedicação no laboratório, fundamental para a obtenção de todos nossos bons resultados;

Aos profs. Drs. Regina Spadari, Satie Ogo e Sergio Marangoni pela leitura, críticas e sugestões, que tornaram mais clara a forma final do texto;

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

INDICE

RESUMO.....	01
Palavras chave.....	02
ABSTRACT.....	03
Key words.....	04
INTRODUÇÃO.....	05
Homeostase do Ca^{2+} celular - Sistemas de transporte envolvidos.....	05
Sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial.....	08
Transição de Permeabilidade da membrana mitocondrial.....	11
Carreador ADP/ATP.....	20
OBJETIVOS.....	26
MATERIAIS E METODOS.....	27
Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato.....	27
Preparação de partículas sub-mitochondriais.....	27
Determinação do consumo de oxigênio.....	28
Determinação da concentração de Ca^{2+} livre.....	27
Determinação das variações do volume mitocondrial.....	29
Determinação do potencial elétrico de membrana.....	30
Determinação do conteúdo de carreadores ADP/ATP ativos na membrana mitocondrial.....	31
RESULTADOS.....	33

Efluxo de Ca^{2+} por mitocôndrias incubadas em condições oxidativas.....	33
Inchamento de mitocôndrias incubadas na presença de Ca^{2+} e Pi	40
Os efeitos protetores do ADP e da ciclosporina A sobre o colapso em U induzido por altas concentrações de Ca^{2+} e Pi são distintos.....	44
Efeito do Ca^{2+} sobre o conteúdo de carreadores ADP/ATP ativos na membrana.....	48
Três condições impedem a inativação do carreador ADP/ATP na membrana mitocondrial pelo Ca^{2+}	50
Caracterização do poro dependente de Ca^{2+} em partículas sub-mitocondriais.....	53
DISCUSSAO.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	66
TESE DE DOUTORADO: Comunicações em Congresso.....	83
TESE DE DOUTORADO: Publicações.....	85

ABREVIATURAS

AA, antimicina A

AAC, carreador ADP/ATP

ADP, difosfato de adenosina

ATR, atractilato

ATP, trifosfato de adenosina

BKA, boncrecato

BSA, albumina de soro bovino

CAT, carboxiatractilato

CsA, ciclosporina A

DTT, ditiotreitól

EGTA, ácido etileno glicol bis(B-aminoetil éter) NN'-tetra
acético

FCCP, p-trifluoro-metoxicarbonil cianeto fenil hidrazina

GSH, glutatona reduzida

GSSG, glutatona dissulfeto

HEPES, ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico

MFR, mitocôndrias de fígado de rato

NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADP, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

OLIGO, oligomicina

Pi, fosfato inorgânico

PSM, partículas sub-mitocondriais

ROT, rotenona

RR, vermelho de rutênio

SUC, succinato

TPP⁺, tetrafenilfosfonio

TPB⁻, tetrafenilbora

t-buOOH, t-butil hidroperóxido

$\Delta\mu\text{H}^+$, gradiente eletroquímico de prótons

$\Delta\psi$, potencial elétrico transmembrana

RESUMO

Neste trabalho, apresentamos evidências experimentais suficientes para propor o envolvimento direto do carreador ADP/ATP no processo de abertura do poro dependente de Ca^{2+} , responsável pelo fenômeno de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Comparando a proteção conferida pelo ADP - substrato do carreador ADP/ATP, ditioneitol - redutor de grupamentos sulfidríla e butil hidroxitolueno - sequestrador de radicais livres, mostramos que o ADP sempre foi o mais efetivo contra o dano mitocondrial, quando presente no meio de reação desde o início. Esta proteção conferida pelo ADP parece ser contra os efeitos específicos do Ca^{2+} sobre a membrana, independente do agente liberador utilizado ser um oxidante ou fosfato inorgânico. Esses resultados descartaram a possibilidade de um ataque de radicais de oxigênio aos lipídeos ou proteínas da membrana como o evento primário que dispara a permeabilização mitocondrial.

Quando pré-incubamos mitocôndrias desenergizadas com Ca^{2+} , mostramos uma diminuição no conteúdo de translocases ativas na membrana, sensível à presença de ciclosporina A. Estes dados indicaram um envolvimento direto do carreador ADP/ATP na abertura do poro dependente de Ca^{2+} . Nossos resultados descartaram também a oxidação de grupos tiólicos desta proteína como a responsável por sua inativação.

Nos experimentos com partículas sub-mitochondriais, demonstramos pela primeira vez a abertura do poro dependente de Ca^{2+} , sensível à ciclosporina A também na membrana invertida das partículas, o que descarta definitivamente a interação da ciclofilina com o carreador ADP/ATP como o mecanismo responsável pela abertura do poro dependente de Ca^{2+} . Esses experimentos também forneceram evidências da existência de dois sítios de ligação para Ca^{2+} na membrana, com efeitos opostos sobre sua abertura.

Os resultados apresentados neste trabalho, no seu conjunto, nos permitiram apresentar a nossa hipótese para o mecanismo molecular de abertura do poro dependente de Ca^{2+} , modulado pelo carreador ADP/ATP. Sugerimos que a ligação do Ca^{2+} ao carreador, quando este está no estado conformacional "c" induz a dissociação da estrutura dimérica funcional desta proteína, transformando gradativamente o próprio carreador ADP/ATP no poro dependente de Ca^{2+} .

Palavras Chave:

transição de permeabilidade, poro dependente de Ca^{2+} , carreador ADP/ATP, ciclosporina A, permeabilização da membrana mitocondrial interna.

ABSTRACT

In this work we presented sufficient experimental evidences to propose the direct involvement of the ADP/ATP carrier in the permeabilization processes of the inner mitochondrial membrane. Comparing the protection conferred by ADP - a substrate of the ADP/ATP carrier, dithiothreitol - a disulfide reductant and butylhydroperoxide - a radical scavenger, it was found that ADP was always the most effective against the mitochondrial damage, when present in the incubation medium from the beginning. Our results also indicate that the protection of ADP is against the specific Ca^{2+} effect in the membrane, independently an pyridine nucleotide oxidant - t-butylhydroperoxide or inorganic phosphate were used and discard the possibility of an attack of oxygen radicals on lipids or proteins of the mitochondrial membrane as the primary event that triggers the permeability transition of the inner mitochondrial membrane.

Experiments where deenergized mitochondria were preincubated with Ca^{2+} showed a decrease on the content of active ADP/ATP carrier, indicating a direct involvement of this protein in the formation of an unespecific Ca^{2+} -dependent pore. They also discard the -SH oxidation as a cause of the carrier inactivation. Our experiments with submitochondrial particles provide good evidence for the existence of two binding sites for Ca^{2+} in the mitochondrial

membrane. These results also discard cyclophilin as mediator of the pore opening.

Key Words

permeability transition, pore Ca^{2+} -dependent, ADP/ATP carrier, cyclosporin A, mitochondrial inner membrane.

INTRODUÇÃO

HOMEOSTASE DO Ca^{2+} CELULAR - SISTEMAS DE TRANSPORTE ENVOLVIDOS

A demonstração de que variações na concentração de Ca^{2+} citosólico livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) são imprescindíveis na regulação de vários processos celulares fundamentais (contração muscular, secreção e glicogenólise, entre outros) evidenciou a importância do Ca^{2+} como segundo mensageiro no mecanismo de sinalização celular. Em condições de repouso sua concentração no citosol é sempre mantida muito baixa (cerca de 100nM) quando comparada à existente no líquido extracelular (da ordem de mM). Assim, toda vez que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta em resposta a hormônios ou outros fatores extrínsecos, acontece algum tipo de resposta intracelular (Murphy et alii, 1980; Rasmussen & Waisman, 1983; Williams et alii, 1986; Carafoli, 1987; Cobbold & Rink, 1987; Duddy et alii, 1989; Kawanishi et alii, 1989).

A figura 1 mostra que a manutenção deste gradiente entre os compartimentos intra e extracelulares envolve sistemas de transporte de Ca^{2+} principalmente através da membrana plasmática, a qual, uma vez cessado o estímulo, possui mecanismos bastante sensíveis para remover rapidamente o Ca^{2+} que entrou (Rega, 1985; Hosey & Lazdunski, 1988) e da membrana do retículo endoplasmático, principal responsável pelo sequestro do Ca^{2+} intracelular (Sekar & Hokin, 1986; Berridge & Irvine, 1989; Gill et

alii,1989). Além desses, as células também possuem um sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial, que parece estar relacionado principalmente

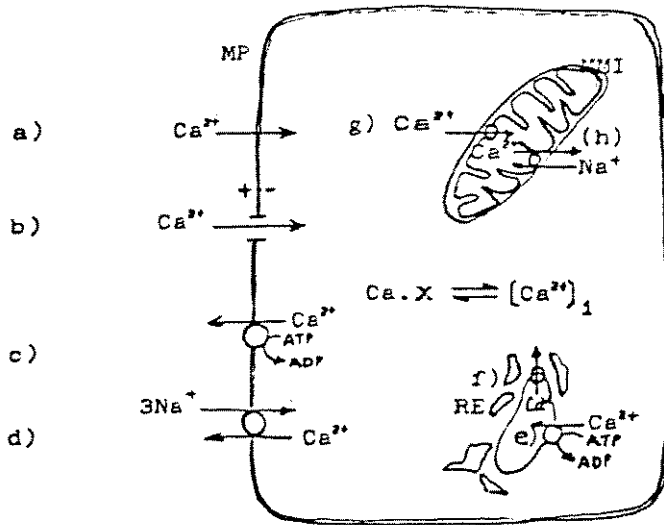


Figura 1. Principais sistemas de transporte de Ca^{2+} envolvidos na manutenção de sua homeostase. MP - Membrana plasmática: a) difusão passiva; b) canal sensível à voltagem; c) Ca^{2+} -ATPase; d) trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (sua direção depende do balanço termodinâmico entre os gradientes eletroquímicos de Na^+ e Ca^{2+} e pode variar de acordo com os tecidos ou condições). RE - Retículo endoplasmático: e) Ca^{2+} /ATPase; f) efluxo ativado por segundo mensageiro. MMI - Membrana mitocondrial interna: g) transportador eletroforético; h) trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ca.X - Ca^{2+} ligado a proteínas. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - Concentração de Ca^{2+} livre no citosol.

com a ativação do metabolismo oxidativo (Hansford,1985; Unitt et alii,1989; McCormack et alii,1990). Convém ressaltar que, em alguns casos há a necessidade da formação de um complexo entre o Ca^{2+} e uma classe especial de proteínas de baixo peso molecular para se obter a resposta desejada. Desta ligação ocorre a exposição de sítios hidrofóbicos que facilitam a interação do complexo com enzimas moduladas por este sistema. Troponina C,

parvalbumina e calmodulina são exemplos destas proteínas que ligam Ca^{2+} com alta afinidade (Klee & Vanaman, 1982; Means & Rasmussen, 1988).

Recentemente caracterizou-se a existência de um gradiente de concentração de Ca^{2+} entre o núcleo e o citoplasma, sugerindo a existência de um sistema de transporte também na membrana nuclear. Este sistema parece operar com a concentração de Ca^{2+} normalmente presente no citosol de células de mamíferos, gasta ATP e pode ser regulado pela calmodulina (Nicotera et alii, 1983; Hernandez-Cruz et alii, 1990).

Todos estes sistemas de transporte de Ca^{2+} diferem tanto na afinidade quanto na capacidade de transporte e eventualmente na sua importância na manutenção de estados fisiológicos ou patológicos nas células. Na verdade, também tem sido amplamente demonstrado que quando ocorrem danos em algumas destas membranas envolvidas na manutenção da homeostase do Ca^{2+} há o conseqüente aumento na concentração de Ca^{2+} no citosol. Este aumento, se mantido por um longo período de tempo, pode induzir a formação de numerosas evaginações na membrana das células além de ativar enzimas catabólicas dependentes de Ca^{2+} , tais como fosfolipases, endonucleases e proteases (LeMasters et alii, 1987; Bond, 1988; Trump & Berezesky, 1989; Orrenius et alii, 1989). Esta ação conjunta pode levar à morte celular, conforme sumarizado na figura 2.

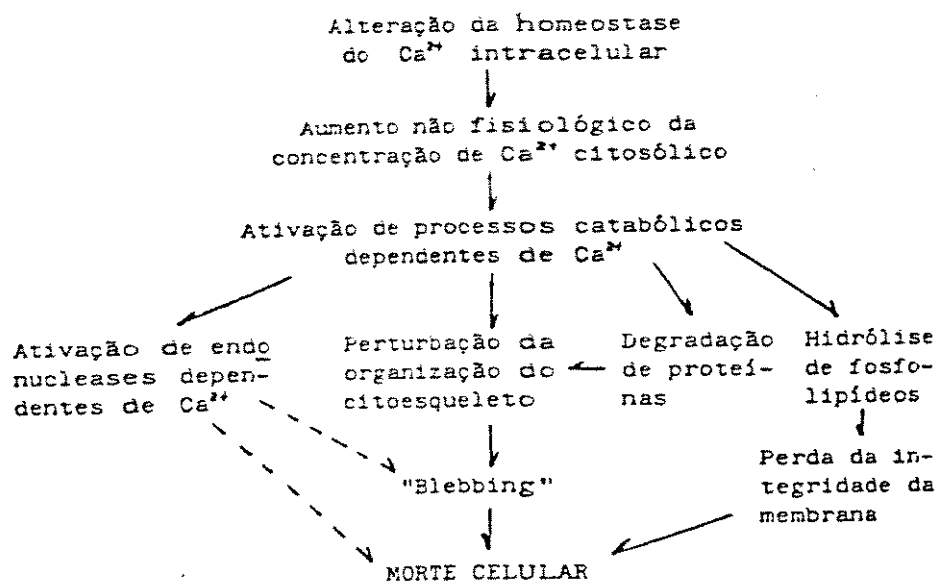


Figura 2. Papel hipotético de ação do Ca^{2+} no mecanismo de da no celular letal.

SISTEMA DE TRANSPORTE DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Uma das funções do aumento fisiológico do íon Ca^{2+} ($0,5-2,0\mu\text{M}$) no citosol é sinalizar a necessidade do aumento na produção de ATP pelas células. Isto ocorre após o Ca^{2+} ser captado pelas mitocôndrias que, ao contrário das membranas plasmática e do retículo, não possui ATPase transportadora. A membrana mitocondrial interna possui um sistema de transporte de Ca^{2+} cujo mecanismo baseia-se na teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa (Mitchell, 1961; Mitchell & Moyle, 1969). Esta, envolve a formação de um potencial protônico ($\Delta\mu\text{H}^+$) durante a respiração celular, composto por um componente elétrico ($\Delta\psi$) e por um componente químico (ΔpH), relacionados entre si de acordo com a equação: $\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\psi - 60\Delta\text{pH}$.

Assim, o bombeamento unidirecional de prótons pelos sítios de conservação de energia da cadeia respiratória,

armazenado na forma deste $\Delta\mu\text{H}^+$, está acoplado à síntese de ATP, além de fornecer a força próton motriz para o transporte ativo de metabólitos através da membrana interna. Desta forma, a entrada do Ca^{2+} nas organelas ocorre por um processo eletroforético, em resposta ao potencial elétrico ($\Delta\psi$) negativo internamente e que constitui o principal componente do $\Delta\mu\text{H}^+$. O transportador responsável por este processo é sensível a vermelho de rutênio e a lantanídeos e transporta outros cátions bivalentes além do Ca^{2+} . Por outro lado, o efluxo do íon ocorre por outra via, envolvendo possivelmente um mecanismo eletroneutro que troca Ca^{2+} por Na^+ ou H^+ , dependendo do tipo de tecido em questão (Scarpa & Azzone, 1970; Selwyn et alii, 1970; Moore, 1971; Crompton et alii, 1976; Nicholls & Akerman, 1982; Akerman & Nicholls, 1983; Gunter & Pfeiffer, 1990). (figura 3).

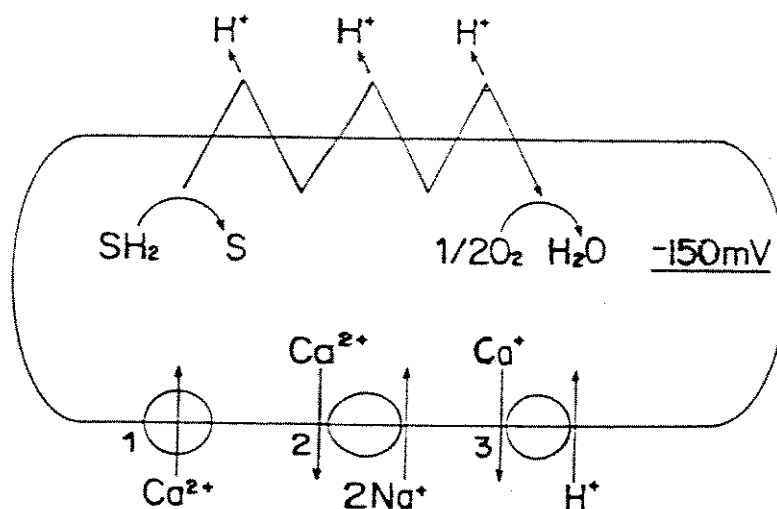


Figura 3. Sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondrial.
 (1) transportador eletroforético; (2) trocador $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$, particularmente ativo em mitocôndrias de tecidos excitáveis; (3) trocador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, presente em mitocôndrias de fígado e outros tecidos. SH_2 -substrato reduzido; S-substrato oxidado.

A existência de vias distintas para captação e liberação do íon estabelece um movimento cíclico e ininterrupto de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna. Porém, este movimento cíclico é bastante lento em condições fisiológicas normais (Carafoli, 1986). No repouso, o transportador eletroforético está praticamente inativo e a concentração de Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial $[\text{Ca}^{2+}]_m$ é de aproximadamente 0,6 μM (Somlyo et alii, 1981; Tsien, 1981). Entretanto, quando a concentração citosólica aumenta o suficiente, Ca^{2+} é captado pelas mitocôndrias, estimulando a atividade de três enzimas da matriz: complexo piruvato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e complexo 2-oxoglutarato desidrogenase. Nestas duas últimas enzimas ele atua como um modulador alostérico positivo, mas sua ação sobre o complexo piruvato desidrogenase está no estímulo da fosfatase específica, que promove o aumento na forma ativa do complexo (Hansford, 1985; Unitt et alii, 1989; McCormack et alii, 1990).

Além disso, aumentos fisiológicos de Ca^{2+} no citosol também alteram o fluxo específico de íons H^+ e K^+ através da membrana mitocondrial interna (Panov, 1992). Estas alterações na condutividade específica para H^+ e K^+ da membrana, que ocorrem, por exemplo, em resposta a hormônios estimuladores da gliconeogênese (glucagon, adrenalina) e de hormônios mobilizadores de Ca^{2+} (vasopressina, ocitocina) parecem estar relacionados às mudanças conformacionais que ocorrem no carreador ADP/ATP (Panov et alii, 1980), e postula-se que sua principal função seria a de estimular a captação do

próprio Ca^{2+} pelas organelas através de sua energização (Halestrap, 1989; Panov, 1992), conforme discutiremos mais adiante.

TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

I. Considerações Gerais

A manutenção de uma baixa permeabilidade a H^+ , cátions e ânions pela membrana mitocondrial faz parte da hipótese quimiosmótica e, de fato, o movimento de solutos através da membrana normalmente é feito por transportadores específicos. Entretanto, existe um mecanismo de transporte, aparentemente latente, que pode tornar as mitocôndrias transitoriamente permeáveis. A ativação deste sistema é conhecida como *transição de permeabilidade*. Ela pode ser facilmente observada após a ligação de íons Ca^{2+} a sítios internos na membrana (Lê Quóc & Lê Quóc, 1988; Vercesi et alii, 1988), precedendo ou seguindo a administração de outros compostos, genericamente definidos como "agentes liberadores de Ca^{2+} ". Estas substâncias são bastante diversas com respeito às suas propriedades químicas e atividades biológicas. Para se ter uma idéia, Gunter e Pfeiffer (1990), em uma revisão recente, enumeraram cerca de 65 compostos capazes de desencadear a transição de permeabilidade na presença de Ca^{2+} . Dentre eles temos fosfato, prooxidantes, inibidores do carreador ADP/ATP e vários outros (Asimakis & Sordhal, 1977; Siliprandi et alii, 1978; Harris et alii, 1979; Pfeiffer et alii, 1979; Roos et alii, 1980; Wolkowics &

McMillin-Wood,1980; Beatrice et alii,1979; DiMonte et alii,1984; Vercesi,1984; Rizzuto et alii,1987; Macedo et alii,1988; Moore et alii,1988; Pfeiffer et alii,1988; Richter & Frei,1988; Le Quóc & Lê Quóc,1989). Embora a forma pela qual estes compostos ativam a transição de permeabilidade não esteja totalmente esclarecida, parece haver um consenso de que o produto final dela é uma mitocôndria desacoplada, que perdeu constituintes da matriz, perdendo sua capacidade de sintetizar ATP pois tornou-se incapaz de manter o potencial protônico ($\Delta\mu H^+$).

Na verdade, a existência da transição de permeabilidade (embora ainda não exista um consenso sobre isto) tem sido evidenciada desde o início dos trabalhos com mitocôndrias, sob os mais variados nomes (Gunter e Pfeiffer,1990). Há quase três décadas vários grupos de pesquisa estudam o mecanismo molecular envolvido no processo de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial mas, apesar de terem ocorrido grandes avanços no campo experimental ao longo destes últimos anos, ele ainda não está totalmente caracterizado. Embora a literatura existente sobre este assunto seja muito ampla e fragmentada, tentaremos, na introdução deste trabalho, revisar a discussão sobre o mecanismo molecular envolvido no disparo deste fenômeno.

Atualmente a discussão se concentra na eventual abertura de um poro inespecífico, dependente de Ca^{2+} , o verdadeiro responsável pela transição de permeabilidade, conforme proposto por Crompton e colaboradores (Al-Nasser &

Crompton,1986; Crompton & Costi,1990; Crompton et alii,1992). Embora a existência deste suposto poro tenha sido postulada desde 1979 por Hunter e Haworth somente agora, na década de 90, esta hipótese está sendo considerada mais seriamente (Bernardi,1992; Crompton et alii,1992; Novgorodov et alii,1992).

A abertura de tal poro poderia ser a base do dano mitocondrial que se observa durante situações de hipóxia e isquemia de um órgão, durante a subsequente restauração do fluxo sanguíneo pela reperfusão ou no caso de ações tóxicas de drogas e seus metabólitos (Crompton & Costi,1990; Sokolov,1990). De acordo com este ponto de vista, no início da reperfusão, após uma isquemia prolongada, quando a $[Ca^{2+}]_i$ está elevada há uma sobrecarga de Ca^{2+} nas mitocôndrias que, somada a outras condições que também ocorrem na isquemia, tais como concentração de fosfato elevada, baixos níveis de ATP e "stress oxidativo", disparariam a abertura deste poro (Crompton et alii,1987). O conhecimento dos mecanismos envolvidos nesta perturbação das funções mitocondriais pode ser útil, por exemplo, na prática médica, para o desenvolvimento de métodos de profilaxia e tratamento de órgãos isquêmicos ou em hipóxia ou durante o transplante de órgãos.

A demonstração de que concentrações extremamente baixas de ciclosporina A (CsA) é capaz de inibir a abertura deste poro (Fournier et alii,1987; Halestrap & Davidson,1990; Bernardi et alii,1992) sugere que este seja um poro

proteico, embora ainda não tenha sido demonstrado qual ou quais as proteínas de fato envolvidas na sua abertura. Recentemente, tem sido discutida na literatura uma possível participação do carreador ADP/ATP (AAC) no processo de abertura deste poro dependente de Ca^{2+} (Halestrap & Davidson, 1990; Novgorodov et alii, 1991; Crompton et alii, 1992; Novgorodov et alii, 1992).

Por outro lado, a transição de permeabilidade é um processo que pode ser totalmente revertido apenas com a retirada do Ca^{2+} do meio de reação. Mais recentemente inclusive, a transição de permeabilidade tem sido investigada como um terceiro mecanismo de efluxo de Ca^{2+} , além daqueles já descritos, que trocam Ca^{2+} da matriz por 2H^+ ou 2Na^+ , que funcionaria em algumas circunstâncias especiais (Gunter & Pfeiffer, 1990; Nicolli et alii, 1993). Esta é, de fato, uma hipótese atraente, pois a abertura transitória de um poro contribuiria para a ejeção de metabólitos acumulados pelas mitocôndrias em algumas situações para as quais não há, por exemplo, transportador específico (Halestrap & Davidson, 1990).

II. Permeabilização mitocondrial - Uma breve revisão das hipóteses propostas para explicar seu mecanismo de ação.

Durante a década de 70 foram estabelecidas algumas condições metabólicas que na presença de Ca^{2+} induziam um aumento extraordinariamente alto na permeabilidade da membrana mitocondrial interna para íons e pequenas moléculas. As primeiras evidências experimentais sugeriam

que o Ca^{2+} mitocondrial podia ser controlado direta ou indiretamente por mudanças no estado redox do NAD(P)H e GSH intramitocondriais. Grande número de publicações mostravam que a oxidação destes "pools" pelo oxaloacetato, diamida, acetoacetato ou t-butilhidroperóxido (t-buOOH), através do sistema glutathione peroxidase/glutathione reductase, era condição suficiente para se registrar efluxo de Ca^{2+} de mitocôndrias isoladas quando previamente carregadas com o cátion (Lehninger et alii, 1978; Vercesi et alii, 1978; Richter et alii, 1983; Beatrice et alii, 1984; Broekemeier et alii, 1985; Bernardes et alii, 1986; Vercesi, 1987). Isto levou a uma primeira proposta, formulada por Lehninger e colaboradores, de que esta oxidação ativaria a via de efluxo $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ (Lehninger et alii, 1978; Vercesi et alii, 1978). Em uma modificação desta idéia, Richter e seu grupo propuseram que, seguindo sua oxidação, o NAD^+ seria hidrolizado a ADP-ribose, nicotinamida e AMP por uma NADase da membrana sensível a ATP. Isto resultaria na ADP-ribosilação de uma proteína da membrana interna, que estaria diretamente envolvida no mecanismo molecular de liberação do Ca^{2+} , hipótese defendida até hoje por esse grupo (Frei et alii, 1985; Riley & Pfeiffer, 1985; Richter & Kass, 1991; Schlegel et alii, 1992).

Paralelamente, a literatura registrava que este efluxo era resultado de um aumento inespecífico na permeabilidade da membrana, refletido por um grande inchamento mitocondrial, registrado pela diminuição na absorbância da suspensão a 520 nm. Este, por sua vez, estava associado ao

colapso total em $\Delta\psi$ e a liberação de outros componentes da matriz tais como K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} , além de outros ions e moléculas com massa molecular menor que 1500 daltons.

Dentre as hipóteses que emergiram dessas observações, uma das que durante muito tempo esteve em discussão foi a proposta por Pfeiffer e seu grupo, sugerindo que a transição de permeabilidade seria consequência da remoção de lipídeos da membrana. De acordo com esta hipótese, a ação do Ca^{2+} , ativando a fosfolipase A2 mitocondrial, associada à queda na razão GSH/GSSG, perturbaria o ciclo normal de deacilação-reacilação dos fosfolipídeos da membrana. Isto, por sua vez, implicaria no acúmulo dos produtos de degradação da fosfolipase A2; ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos, na opinião desse grupo, os verdadeiros responsáveis pelo dano. Além disso, a concomitante queda na razão GSH/GSSG diminuiria a atividade das enzimas responsáveis pela reacilação (acil CoA sintetase e/ou acil CoA transferase). Esses autores demonstraram ainda que na presença de inibidores da fosfolipase A2 o processo de permeabilização das mitocôndrias também era inibido (Broekemeier et alii, 1985; Riley & Pfeiffer, 1986; Pfeiffer et alii, 1988).

Nesta mesma linha de raciocínio, Carbonera e colaboradores descreveram que uma grande variedade de agentes e condições, todos levando à liberação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias e à permeabilização da membrana, aparentemente envolviam a formação de espécies reativas de oxigênio, independentemente da concentração de GSH intramitocondrial.

Esses autores mostraram que o butil-hidroxitolueno (BHT), um sequestrador de radicais livres, protegia as organelas sem a necessidade da restauração ou manutenção dos níveis normais de GSH. De acordo com esta hipótese, o aumento na permeabilidade inespecífica seria consequência de danos na membrana induzidos pela peroxidação de seus lipídeos (Carbonera & Azzone, 1988; Carbonera et alii, 1988).

Uma outra hipótese em discussão é a sustentada pelo grupo liderado por Vercesi, que propõe que este processo estaria associado ao "cross-linking" de grupos tiólicos de algumas proteínas da membrana (Fagian et alii, 1990; Vercesi, 1993). De fato, esses autores mostraram formação de agregados proteicos em partículas sub-mitochondriais e mitoplastos incubados na presença de Ca^{2+} e diamida ou t-buOOH. Eles mostraram também que tanto o processo de permeabilização quanto a polimerização podiam ser prontamente revertidos pela adição de ditioneitol (DTT) ou β -mercaptoetanol, conhecidos redutores de grupos SH (Fagian et alii, 1990).

Ao mesmo tempo, a partir dos trabalhos do grupo liderado por Crompton, ficou demonstrado que as organelas podiam se re-selar em poucos segundos após terem sofrido a transição de permeabilidade, apenas com a adição de EGTA ao meio de reação (Al-Nasser & Crompton, 1986; Crompton et alii, 1987; McGuinness et alii, 1990). Estes autores propuseram então que a transição de permeabilidade refletiria a presença de um poro, seletivo e ativado por

Ca^{2+} , que abriria quando o Ca^{2+} intramitocondrial excedesse seu limite normal e fecharia com a simples remoção do íon. De fato, na literatura mais recente, parece não haver mais dúvidas de que a transição de permeabilidade seja mediada por um poro sensível a ciclosporina A (Bernardi,1992; Crompton et alii,1992; Novgorodov et alii,1992), embora exista alguns grupos que ainda discordam deste ponto de vista (Kass et alii,1992; Schlegel et alii,1992).

Cabe ressaltar que a população mitocondrial não responde de maneira homogênea durante essa transição de permeabilidade. Uma sub-população mais susceptível parece sofrer a transição inicialmente, e o Ca^{2+} liberado por esta fração se torna disponível para ser acumulado por uma sub-população mais estável. Quando esta também se torna permeabilizada, a população como um todo se move para o estado de poro aberto. Há assim uma distribuição dinâmica entre os estados aberto e fechado do poro na mitocôndria permeabilizada (Novgorodov et alii,1992).

A demonstração recente de que a ciclosporina A, em concentrações extremamente baixas (60-100pmoles/mg de proteína mitocondrial), também é capaz de inibir a abertura deste poro (Fournier et alii,1987), embora não se saiba ainda exatamente por qual mecanismo, vem em favor do ponto de vista mais atual que defende que a transição de permeabilidade resultaria de um sistema de transporte específico que pode ser regulado (Bernardi,1992; Novgorodov et alii,1992, Bernardi et alii,1993; Nicolli et alii,1993).

Recentemente, Bernardi e colaboradores publicaram uma série de artigos que indicam que o poro pode ser modulado pelos componentes do $\Delta\psi$, ou seja, o poro permanece fechado quando o pH da matriz está abaixo de 7,0 e/ou quando $\Delta\psi$ está alto (Bernardi et alii, 1992), e se abre com a despolarização da membrana (Bernardi, 1992). Esses autores definiram também três sítios regulatórios na membrana: um sítio de ligação interno, que quando ocupado por Ca^{2+} aumenta a probabilidade do poro se abrir; um sítio de ligação externo, que quando ligado ao cátion aumenta a probabilidade do poro permanecer fechado; e um sítio de ligação independente para ciclosporina A, que quando ocupado pela droga também aumenta a probabilidade do poro permanecer no estado fechado (Bernardi et alii, 1993; Petronilli et alii, 1993).

Hoje em dia, a principal hipótese alternativa de que a transição de permeabilidade seria mediada por alterações nos lipídeos da membrana, após a ativação da fosfolipase A₂ pelo Ca^{2+} , parece menos provável. Foi demonstrado que concentrações nanomolares de ciclosporina A inibem completamente a transição de permeabilidade sem afetar a atividade da fosfolipase A₂ (Broekemeier et alii, 1989) e há sugestões que a produção de acil-lisofosfolípídeo verificada nos ensaios seja devido à contaminação das preparações mitocondriais com traços de retículo endoplasmático (Broekemeier et alii, 1991), ou mesmo a uma ação posterior do sistema de fosfolipase A₂, ativado numa segunda fase do processo de permeabilização, como proposto por Morselli & Pereira da Silva (1992).

CARREADOR ADP/ATP (AAC)

I. Considerações Gerais.

A translocase de nucleotídeos de adenina ou carreador ADP/ATP (AAC) é uma proteína característica das células eucariotas e especializada para a troca de ADP^{3-} e ATP^{4-} entre o citoplasma e a matriz mitocondrial. A translocase desempenha um papel importante na regulação da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (Tager et alii, 1983) e na determinação do conteúdo e da razão dos nucleotídeos de adenina nas células (Davis & Lumeng, 1975). Experimentos com inibidores altamente específicos que se ligam seletivamente a ela ou do lado externo da membrana {atractilato (ATR) ou carboxiatractilato (CAT)} ou do lado interno, voltado para a matriz mitocondrial {boncrecato (BKA)}, forneceram dados importantes para o entendimento das propriedades e mecanismos de funcionamento do carreador não somente como um trocador ADP/ATP (Klingenberg, 1985) mas também como um sítio de regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (Panov et alii, 1992).

Há muito tempo foi demonstrado que a mudança na velocidade de consumo de oxigênio do estado respiratório 4 para o estado respiratório 3, após a adição de ADP era seguida por uma contração de baixa amplitude que podia ser observada através do registro do aumento na absorbância a 540nm. Durante algum tempo se acreditou que este efeito era devido a transição do estado respiratório do repouso para o "ativo". Na década de 70 entretanto, Klingenberg e seu grupo

demonstraram que os inibidores do carreador ADP/ATP também influíam nesse processo. Scherer & Klingenberg (1974) mostraram que o ATR abolia este aumento na absorbância induzido pelo ADP, enquanto o BKA aumentava ligeiramente esta absorbância. Este mesmo grupo havia também verificado efeitos distintos destes inibidores sobre a ligação do ADP ao carreador (ATR ou CAT desligavam imediatamente ADP dos sítios de ligação enquanto BKA inclusive aumentava um pouco essa ligação) (Klingenberg & Buchholz, 1973). Estes dados, tomados em conjunto, levaram ao conceito aceito até hoje de que o carreador pode ocupar essencialmente dois estados conformacionais diferentes na membrana, dependendo da orientação dos sítios de ligação de nucleotídeos de adenina; o estado "c", com os sítios voltados para o citosol, e o estado "m", com os sítios de ligação voltados para a matriz mitocondrial (Weideman et alii, 1970; Klingenberg, 1985, 1992). Por esta interpretação, o estado expandido, medido através da diminuição na absorbância em 520nm, estaria associado com o acúmulo do carreador sobre a superfície externa e o estado contraído com um acúmulo sobre a superfície interna da membrana. Desta forma, foi formulado na década de 70 o mecanismo molecular de "passagem por poro através de um único centro de ligação" (Klingenberg, 1989).

II. Efeito de nucleotídeos de adenina e inibidores do AAC sobre a permeabilidade específica da membrana mitocondrial.

As primeiras evidências favorecendo a participação da translocase de nucleotídeos de adenina na regulação da condutividade específica para H^+ e K^+ da membrana mitocondrial foram obtidas através de experimentos sobre o inchamento osmótico de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, incubadas em meio de KNO_3 ou NH_4NO_3 , na presença de concentrações fisiológicas de Ca^{2+} (Panov et alii, 1980). Como as mitocôndrias se comportam como osmômetros ideais, podemos escolher a composição do meio, condições de incubação ou ionóforos, de forma que o inchamento seja limitado pela penetração nas organelas de um ânion ou cátion específico.

Assim, de acordo com Panov e colaboradores (1980), a condutividade para H^+ e K^+ na membrana estaria relacionada às mudanças conformacionais que ocorrem no AAC. Quando o carreador está no estado conformacional "m", pela presença de ADP ou de BKA, ocorre uma diminuição na condutividade para H^+ e K^+ na membrana mitocondrial. Foi proposto que isto facilitaria a energização mitocondrial, com o consequente aumento na captação do Ca^{2+} para o estímulo do metabolismo oxidativo (Zoccarato et alii, 1981; Lê Quóc & Lê Quóc, 1988; Halestrap, 1989). Por outro lado, na presença de CAT ou ATR este efeito do ADP é revertido, ocorrendo inclusive um aumento na permeabilidade específica para H^+ e K^+ da membrana (Panov, 1992).

III. Participação do AAC no processo de formação do poro inespecífico dependente de Ca^{2+} .

Embora desde a década de 70 se demonstrasse que o carreador ADP/ATP também estava de alguma maneira envolvido na transição de permeabilidade (Harris et alii, 1979; Haworth & Hunter, 1979; Hunter & Haworth, 1979a,b) foi somente a partir dos trabalhos dos Lê Quóc em 1988 que ficou evidente a capacidade desta proteína favorecer ou impedir a abertura do poro dependente de Ca^{2+} . Esses autores demonstraram que na presença de concentrações suprafisiológicas de Ca^{2+} agentes ou condições que estabilizam o carreador ADP/ATP no estado conformacional "c" favorecem a permeabilização da membrana mitocondrial (Lê Quóc & Lê Quóc, 1988, 1989). Por outro lado, quando o carreador está no estado conformacional "m" (com os sítios de ligação voltados para a matriz mitocondrial), são prevenidos todos os danos, mesmo na presença de alto carregamento de Ca^{2+} . A demonstração da potente ação inibitória da ciclosporina A sobre a abertura do poro vem dando uma contribuição importante para o entendimento do tipo de relação que existe entre o carreador ADP/ATP e o poro dependente de Ca^{2+} .

Acredita-se que o alvo principal da ciclosporina A nas células seja a ciclofilina, uma proteína hidrossolúvel, localizada no citosol celular. A ciclofilina bovina é idêntica à enzima peptidil prolil *cis-trans* isomerase, cuja principal função parece ser acelerar o "folding" proteico (Fisher & Schmid, 1990). A ciclosporina impede a atividade enzimática desta proteína por se ligar ao seu sítio ativo (Crompton et alii, 1992). A ciclofilina foi também localizada na matriz mitocondrial de Neurospora crassa (Tropschug et

alii,1988) e recentemente Halestrap e colaboradores detectaram atividade prolil isomerase também na matriz de mitocôndrias isoladas de fígado de rato e coração bovino (Halestrap & Davidson,1990), embora ainda não se saiba ao certo qual a função da ciclofilina intramitocondrial.

A discussão mais recente sobre o tipo de relação existente entre o poro e o carreador ADP/ATP baseia-se em duas propostas. Os trabalhos pioneiros de Hunter e Haworth sugerem a existência de estruturas separadas, poro e translocase, mas que interagem entre si (Haworth & Hunter,1979; Hunter & Haworth,1979a,b). Em favor desta proposta, o grupo de Novgorodov demonstrou recentemente que o efeito da ciclosporina A pode ser modulado pela interação do ADP com um sítio de baixa afinidade, insensível a CAT, sugerindo uma ação sinérgica dos dois agentes para fechar o poro (Novgorodov et alii,1990; 1992). Segundo esses autores, esses dados favorecem a idéia da presença de um sítio de ligação na membrana para ADP, diferente do carreador ADP/ATP e possivelmente componente do poro. Estes pesquisadores não descartam entretanto, que o poro possa, de alguma maneira, estar intimamente relacionado com o carreador.

Por outro lado, o grupo de Halestrap propõem que o próprio carreador ADP/ATP pode ser convertido em um poro inespecífico (Halestrap & Davidson,1990). Esses autores mostraram através de titulações do efeito da ciclosporina A sobre a inibição da transição de permeabilidade e ligação à

ciclofilina, que esta interação bloqueia indiretamente a abertura do poro. De acordo com a hipótese deste grupo, o poro seria formado pela interação da ciclofilina com o carreador ADP/ATP, que estaria favorecida quando este está na conformação "c" e liga PPi ou Pi do lado do citosol e Ca^{2+} do lado da matriz (Halestrap & Davdison, 1990).

Assim, resolvemos neste trabalho investigar mais detalhadamente a participação do carreador ADP/ATP no processo de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial e, caso isso se confirmasse, a necessidade ou não da interação do carreador com a ciclofilina para a abertura do poro dependente de Ca^{2+} .

OBJETIVOS

Nosso objetivo no presente trabalho foi investigar mais detalhadamente o envolvimento do carreador ADP/ATP na ativação da transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna e abertura do poro inespecífico dependente de Ca^{2+} .

MATERIAIS E METODOS

Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato (MFR).

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo Schneider & Hogeboom (1951), por centrifugação fracionada, de ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 180-250g, mantidos em jejum por 12 horas e sacrificados por concussão cerebral. O fígado, retirado imediatamente após a morte do animal, foi lavado em solução de sacarose 250mM tamponada com HEPES 10mM, pH 7,4, contendo EGTA 0,5mM, picado delicadamente com uma tesoura e homogeneizado três vezes em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Este material foi submetido a uma primeira centrifugação a 800xg por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 12.100xg por 10 minutos. A fase lipídica superior foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o sedimento ressuspensionado na mesma solução de sacarose 250mM contendo EGTA 0,3mM e novamente centrifugado a 12.100xg por 10 minutos. O sedimento foi suspenso em solução de sacarose 250mM (sem EGTA), obtendo-se uma suspensão mitocondrial com concentração aproximada de 100mg de proteína/ml. Todo o processo foi realizado a uma temperatura entre 0-4°C. A dosagem proteica foi feita pelo método do biureto, modificado pela adição de colato (Gornall et alii, 1949), utilizando-se albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

Preparação de Partículas Sub-Mitocondriais (PSM).

As partículas sub-mitocondriais foram preparadas de acordo com Lee e Ernster (1967), a partir de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias foram congeladas imediatamente após seu isolamento, e mantidas a -60°C até obtenção de material suficiente (aproximadamente 1,5g) para a preparação das partículas. A suspensão foi então descongelada e diluída a uma concentração de proteína de aproximadamente 30mg/ml em meio de sacarose 250mM, ATP 6mM, MgCl_2 6mM, pH 7,4 e sonicadas três vezes por 45s com intervalos de 1 min. Durante este passo as mitocôndrias foram mantidas em banho de gelo. Este material foi submetido a uma centrifugação a 15.000xg por 15 minutos, o sobrenadante novamente centrifugado a 100.000xg por uma hora e o sedimento, após ser ressuspensão no mesmo meio de sacarose, foi centrifugado mais 2 vezes a 100.000xg por 1 hora. O sedimento final foi ressuspensão em um meio de sacarose 250mM, Tris-HCl 10mM, pH 7,4, com uma concentração proteica final de aproximadamente 30mg/ml.

Determinação do Consumo de Oxigênio.

A respiração mitocondrial foi medida através do consumo de oxigênio, determinado com eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.). A qualidade da preparação mitocondrial foi deduzida diariamente em função dos valores do controle respiratório (CR), obtido após o término do isolamento das mitocôndrias. O CR é definido como a razão entre a velocidade de consumo de O_2 no estado respiratório 4 (respiração de repouso subsequente ao término da

fosforilação do ADP) e a velocidade de respiração de fosforilação, obtida após a adição de ADP (estado respiratório 3) {Chance & Williams,1956}. A suspensão mitocondrial foi utilizada para os experimentos quando o CR era igual ou superior a 5,0.

Determinação da Concentração de Ca^{2+} livre.

As variações nas concentrações de Ca^{2+} livre no meio de incubação foram acompanhadas por eletrodo seletivo (Calcium Selectrode F2112,Radiometer), que registra as variações do Ca^{2+} presente no meio de reação (Madeira,1975). Os sinais foram amplificados através de um acessório de alta impedância (Incibrás), ligado a um registrador potenciométrico.

Determinação das Variações do Volume Mitocondrial (Inchamento Mitocondrial).

Como as suspensões mitocondriais são turvas, elas espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença no índice de refração entre a matriz e o meio e qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada (Nicholls & Akerman,1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio com a consequente diminuição da luz espalhada. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As

mitocôndrias prestam-se bem para a aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramentos de suas pregas. O acompanhamento deste processo foi feito em função da diminuição da absorbância em um espectrofotômetro, ajustado para um comprimento de onda de 520nm, conectado a um registrador potenciométrico.

Condições Experimentais para os experimentos realizados com eletrodo de Ca^{2+} e para a determinação do inchamento mitocondrial.

Os experimentos com eletrodo de Ca^{2+} e determinação do inchamento mitocondrial a 520nm foram realizados a 30°C, em meio básico contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, Hepes 10mM, pH 7,2, succinato 5mM e rotenona 5uM. Para observarmos o efeito protetor máximo do ADP, aumentamos o conteúdo de ATP endógeno pré-incubando a suspensão mitocondrial com P_i 2mM por 30s e adicionando oligomicina 0,5ug/mg em seguida para paralisar a reação (Klingenberg, 1985). Este procedimento permitiu uma maior velocidade de troca quando ADP exógeno foi adicionado, favorecendo a ligação do ADP ao AAC que, nestas condições, se encontra na conformação "m" {Lê Quóc & Lê Quóc, 1988}.

Determinação do Potencial Elétrico de Membrana ($\Delta\psi$).

O potencial elétrico de membrana foi determinado a partir da distribuição do cátion (tetrafenilfosfônio, TPP^+) ou ânion (tetrafenilboro, TPB^-) lipofílicos, entre o meio de

reação e o interior das organelas. Estas determinações foram feitas com eletrodos específicos construídos em nosso laboratório de acordo com Kamo e colaboradores (1979) para TPP⁺ e Vuokila & Hassinen (1988) para TPB⁻.

Condições experimentais para os experimentos sobre determinação do potencial elétrico na membrana.

Nos experimentos de formação de $\Delta\psi$ com mitocôndrias isoladas, incubamos a 30°C 1mg de proteína mitocondrial/ml de meio de reação contendo sacarose 250mM, Hepes 10mM, pH 7,2, succinato 5mM, rotenona 4uM, Pi 5mM e TPP⁺ 3uM. . Para os experimentos de formação de potencial elétrico em PSM, incubamos por 3 minutos PSM (0,5mg) em 1 ml de meio de reação contendo sacarose 250mM, Tris/acetato 10mM, pH 7,4 e TPB⁻ 3uM, após o que as partículas foram energizadas com a adição de NADH 5mM. As demais condições experimentais estão descritas nas legendas de cada figura

Determinação do Conteúdo de carreadores ADP/ATP ativos, presentes na membrana mitocondrial.

Como o CAT é um inibidor competitivo que se liga ao carreador ADP/ATP com uma estequiometria de 1:1 (Klingenberg,1985), podemos estimar o conteúdo de AAC ativos na membrana pela titulação do estado respiratório 3ADP com CAT (Henke & Jung,1991).

Para estes experimentos, pré-incubamos mitocôndrias desenergizadas por 3 minutos na presença de diferentes concentrações de Ca²⁺. O excesso de Ca²⁺ foi então quelado

pela adição de EGTA 0,5mM. Após 1 minuto adicionamos succinato 5mM e iniciamos a determinação do consumo de oxigênio. Para a titulação foi adicionado ADP 1mM, para a determinação do estado respiratório 3ADP e ADP 1mM mais CAT 200pmoles/mg, para se determinar a inibição de cerca de 25% do conteúdo de translocases ativas na membrana (Schonfeld,1990). As demais condições experimentais estão nas legendas de cada figura.

RESULTADOS

Efluxo de Ca^{2+} por mitocôndrias incubadas em condições oxidativas.

A figura 4 mostra que a adição de Ca^{2+} 50 μM , seguida de t-buOOH 50 μM induz uma rápida liberação de todo o Ca^{2+} acumulado (traçado d), indicando que nestas condições experimentais ocorre a transição de permeabilidade na membrana mitocondrial. Este efluxo é prevenido na mesma extensão tanto por ADP quanto por DTT (traçados a,b). BHT por sua vez somente retarda o efluxo (traçado c) enquanto a presença de ATR, como esperado, potencializa o dano (traçado e).

A proteção conferida pelo ADP mostrou-se altamente dependente da concentração de t-buOOH utilizada. A figura 5 mostra que na presença de uma concentração baixa de oxidante (50 μM), ADP foi capaz de prevenir o efluxo mesmo com altos carregamentos de Ca^{2+} . Nestas condições, na presença de ADP, a adição combinada de t-buOOH 50 μM e cerca de 90nmoles Ca^{2+} /mg de proteína mitocondrial causou somente um efluxo transitório do íon (traçado c).

Por outro lado, DTT, quando comparado ao ADP, sempre foi mais efetivo em proteger as organelas incubadas com concentrações mais altas do oxidante, como mostrado na figura 6, traçado b. Podemos verificar que após a adição de Ca^{2+} 50 μM e t-buOOH 100 μM , o ADP não impede que ocorra um efluxo transitório do íon (traçado a).

A figura 7A mostra que a ação do DTT parece estar relacionada apenas com a prevenção do efeito do oxidante na membrana sem influir no efeito do Ca^{2+} . A resposta das organelas ao efeito protetor do DTT sobre o efluxo de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} 30 μM e t-buOOH 100 μM (traçado a) é igual ao efeito da presença apenas de Ca^{2+} 30 μM no meio de reação (traçado b). Esta ação é oposta à do ADP, que parece não ter efeito "per se" na oxidação tiólica, embora seja capaz de proteger a membrana dos efeitos do íon (figura 7B).

De fato, podemos observar pela figura 8 que o ADP é o único - entre os agentes testados - capaz de prevenir o efluxo de Ca^{2+} induzido por altos carregamentos do íon (traçado a). Neste caso, a presença de DTT antes da adição do Ca^{2+} não exerceu efeito protetor algum sobre a membrana (traçado b).

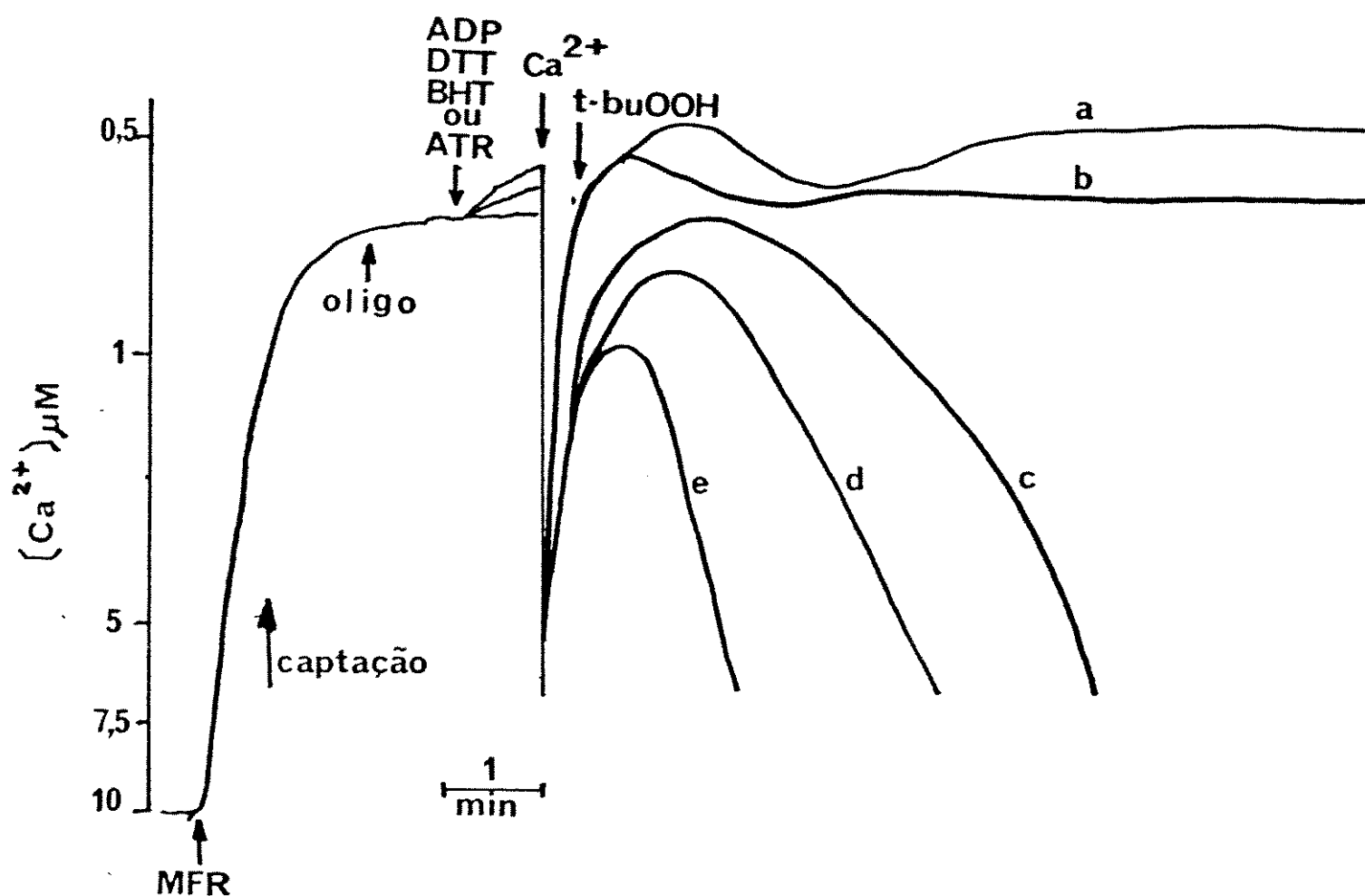


Figura 4. Efeito de ADP, DTT, BHT e ATR sobre o efluxo de Ca^{2+} induzido por t-buOOH em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. MFR (1mg/ml) foram incubadas segundo as condições descritas em Materiais e Métodos. (a) ADP 200 μM ; (b) DTT 1mM; (c) BHT 50 μM ou (e) ATR 50 μM foram adicionados 1 minuto antes da adição de Ca^{2+} 30 μM e t-buOOH 50 μM . O traçado (d) representa o experimento controle, onde somente Ca^{2+} e oxidante foram adicionados após a oligomicina (oligo).

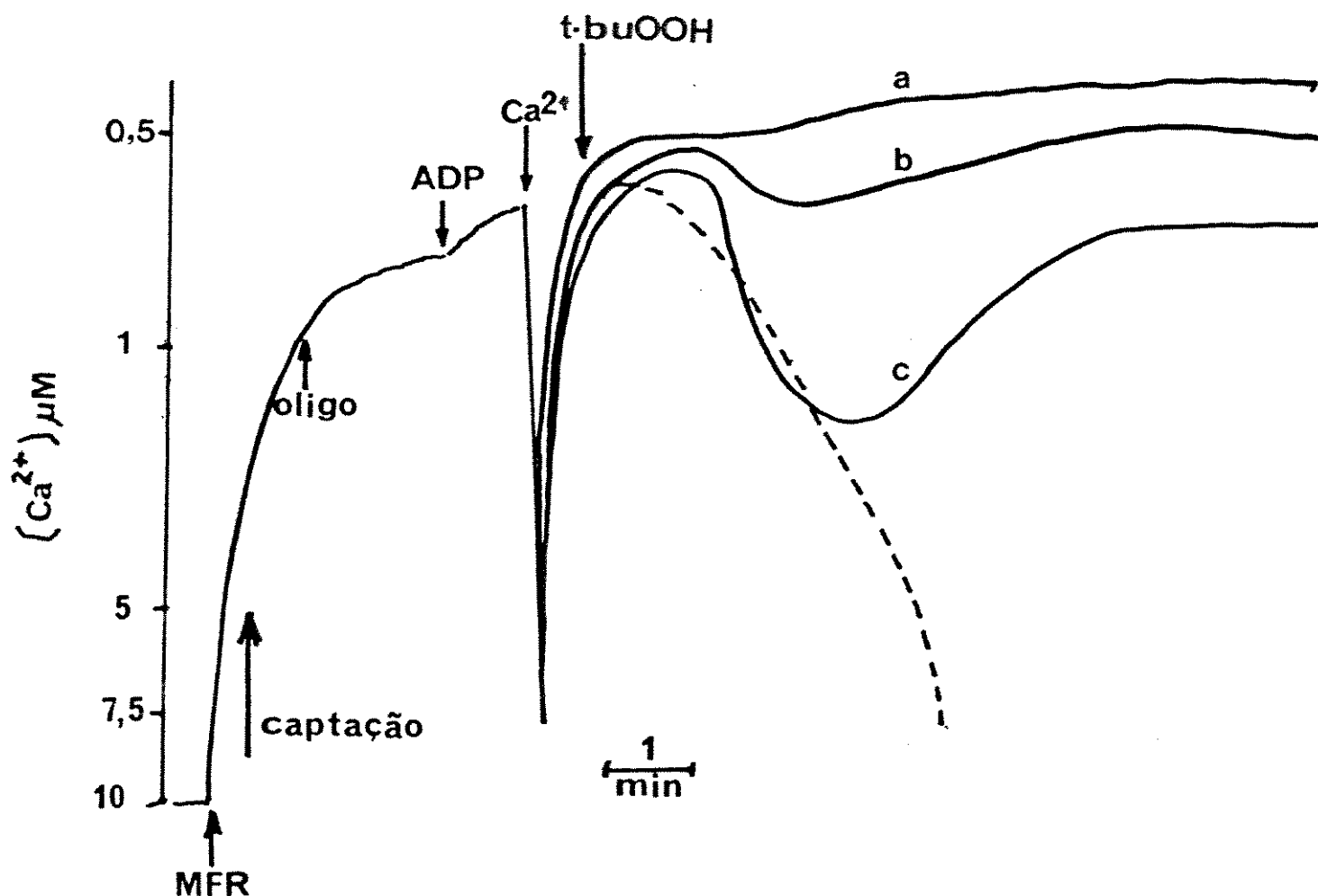


Figura 5. O efeito do ADP sobre o efluxo de Ca^{2+} induzido por t-buOOH depende do carregamento de Ca^{2+} . MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na figura 4, na presença de ADP 200 μM onde indicado. t-buOOH 50 μM e diferentes concentrações de Ca^{2+} (a) 30 μM ; (b) 50 μM e (c) 90 μM , foram adicionados 1 minuto após o ADP. A linha tracejada representa o mesmo experimento do traçado (c) mas na ausência de ADP.

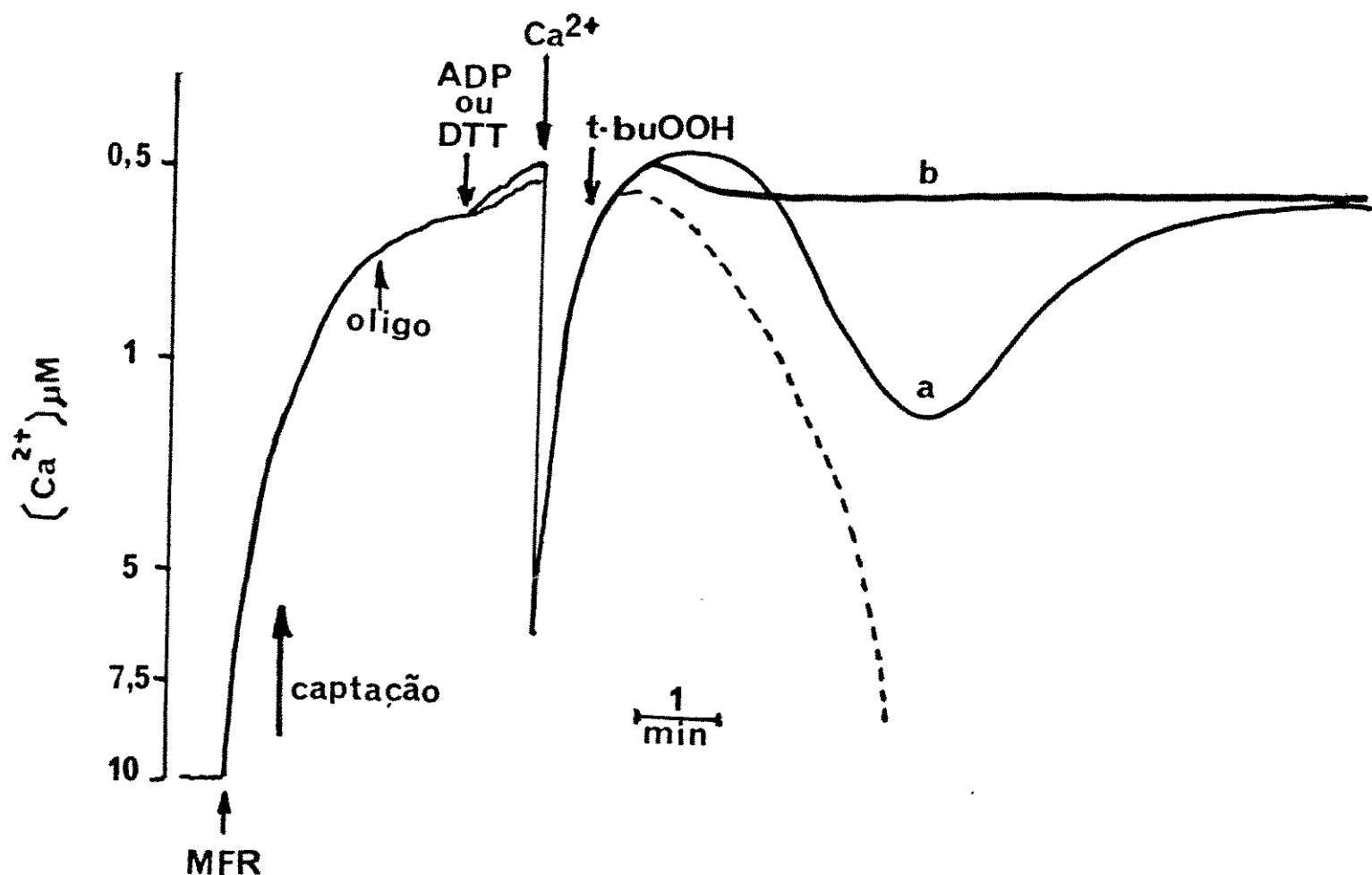


Figura 6. DTT é o mais efetivo na inibição do efluxo de Ca^{2+} induzido por concentrações maiores de t-buOOH. MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na figura 4. (a) ADP 200 μM ; (b) DTT 1mM, foram adicionados 1 minuto antes do Ca^{2+} 50 μM e t-buOOH 100 μM . A linha tracejada representa o experimento controle, onde somente Ca^{2+} e oxidante foram adicionados.

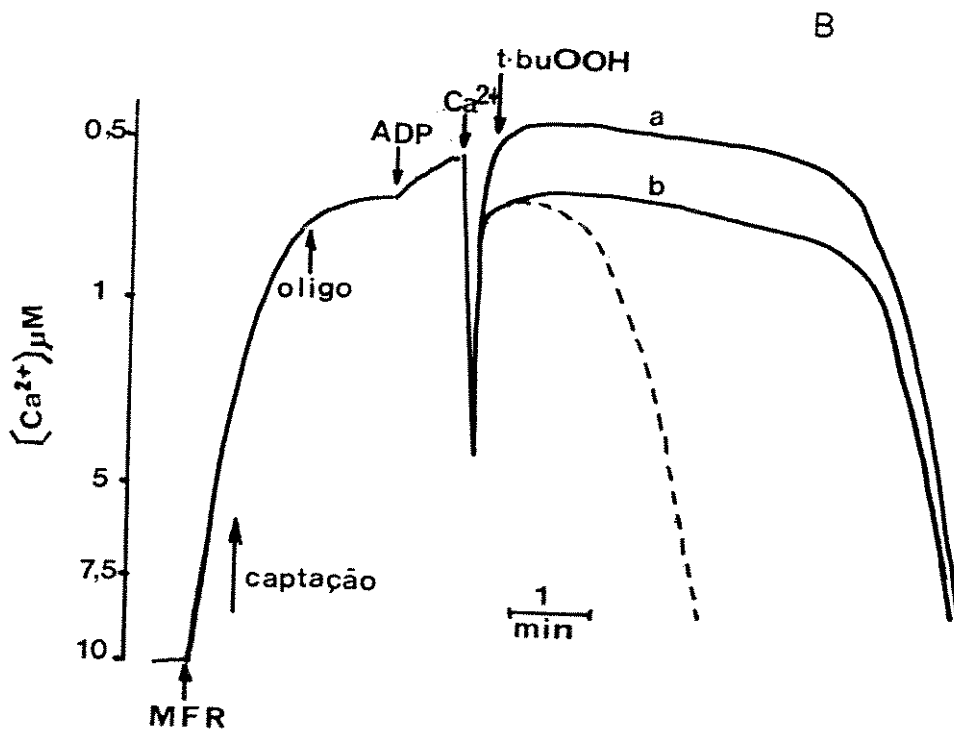
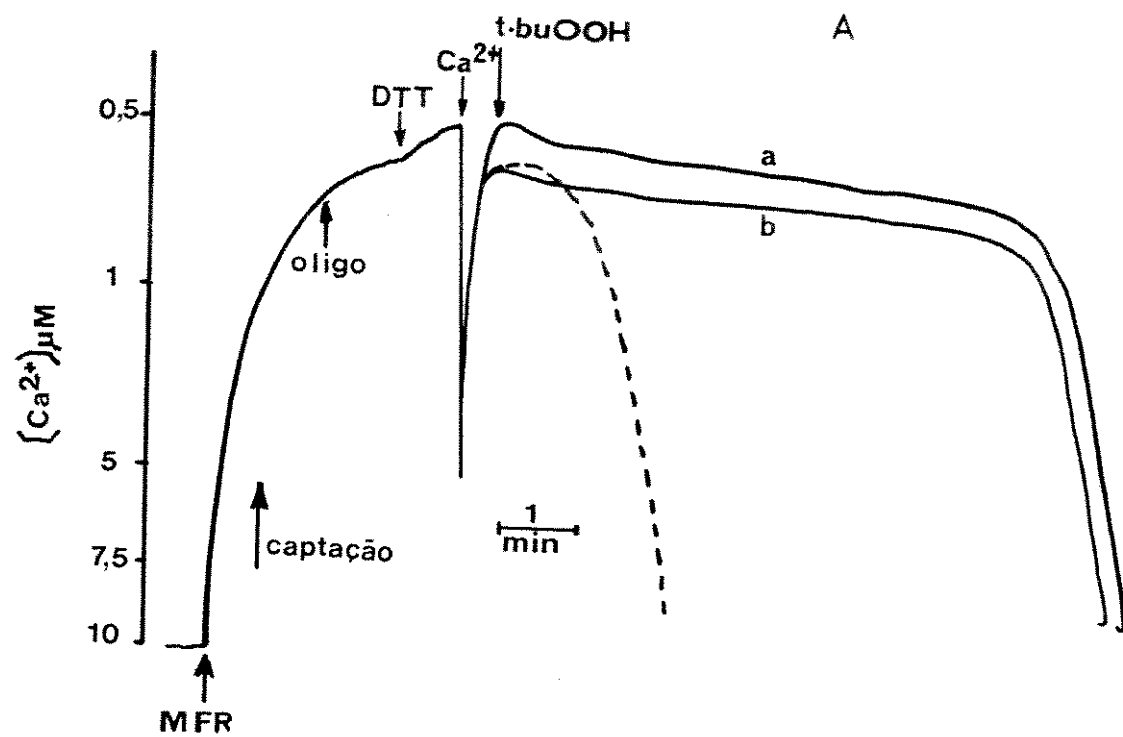


Figura 7. Papel do DTT (A) e ADP (B) sobre a transição de permeabilidade induzida por Ca^{2+} e t-buOOH. MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na figura 4. Em (A): (a) DTT 1mM foi adicionado 1 minuto antes da adição de Ca^{2+} 30 μM e t-buOOH 100 μM ; (b) mesmo que (a) mas na ausência de DTT e t-buOOH. Em (B): (a) ADP 200 μM foi adicionado 1 minuto antes da adição de Ca^{2+} 30 μM e t-buOOH 100 μM ; (b) mesmo que (a), mas na ausência de ADP e Ca^{2+} . A linha tracejada representa o experimento controle, onde somente o Ca^{2+} e oxidante foram adicionados.

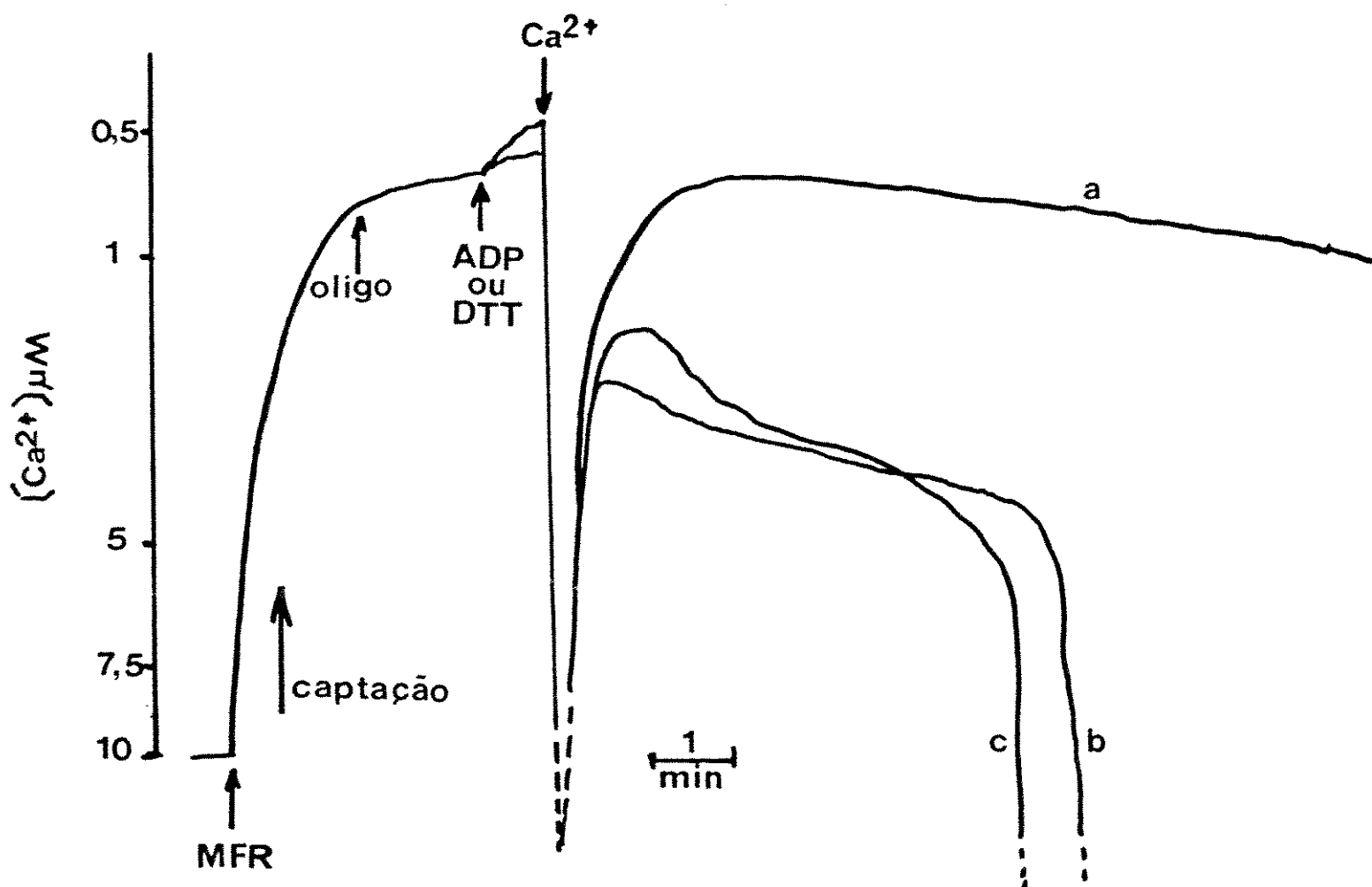


Figura 8. Efeito do ADP e DTT sobre o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias carregadas com alto Ca^{2+} . MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 4. (a) ADP 200 μM ; (b) DTT 1mM foram adicionados um minuto antes da adição de Ca^{2+} 150 μM . O experimento (c) representa o experimento controle, apenas com a adição de Ca^{2+} 150 μM onde indicado.

Inchamento de mitocôndrias incubadas na presença de Ca^{2+} e Pi .

Quando, ao invés do oxidante, utilizamos Pi como agente indutor da permeabilização mitocondrial, podemos observar que a adição de Ca^{2+} 50 μM seguida por Pi 10mM induz uma diminuição na absorbância a 520nm que corresponde a um aumento na permeabilidade inespecífica da membrana mitocondrial interna (figura 9, traçado d). Podemos observar que somente o ADP, dos inibidores testados foi capaz de inibir totalmente a transição de permeabilidade (traçado a). O traçado b mostra que o DTT foi capaz somente de atrasar a fase inicial do processo enquanto o BHT praticamente não teve efeito protetor algum (traçado c). Aqui, novamente como esperado, o ATR acelerou os efeitos combinados de Ca^{2+} e Pi (traçado e).

Como a proteção conferida pelo ADP é semelhante à do EGTA quando se registra o inchamento mitocondrial de mitocôndrias carregadas com Ca^{2+} e Pi , realizamos os experimentos das figuras 10 e 11 com o objetivo de verificar a participação do carreador ADP/ATP no processo. A figura 10 mostra que esta proteção ocorre especificamente com nucleotídeos de adenina (traçados a, b), sendo que GDP inclusive potencializa o dano (traçado c). Além disso, podemos verificar pela figura 11 que a adição de atracilato (ATR) onde indicado, foi capaz de reverter somente o efeito protetor dos nucleotídeos de adenina, sem afetar a ação do EGTA.

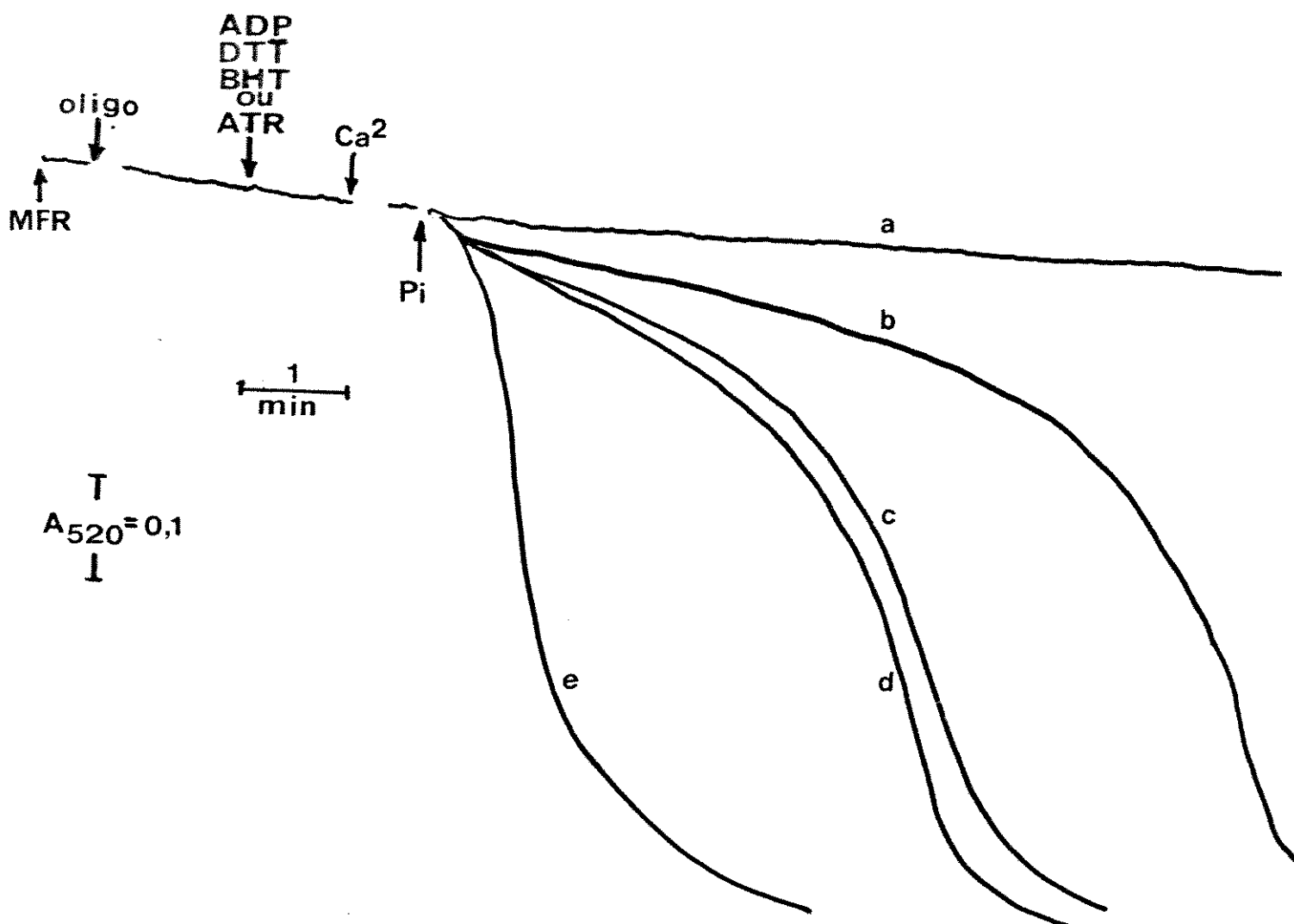


Figura 9. Efeito de ADP, DTT, BHT e ATR sobre o inchamento mitocondrial induzido por altas concentrações de Ca^{2+} e fosfato. MFR (1mg/ml) foram incubados nas mesmas condições experimentais descritas em Materiais e Métodos. (a) ADP 200 μ M; (b) DTT 1mM; (c) BHT 50 μ M e (e) ATR 50 μ M foram adicionados 1 minuto antes da adição de Ca^{2+} 50 μ M e P_i 10mM. O tracado (d) representa o experimento controle, onde somente Ca^{2+} e P_i foram adicionados onde indicado.

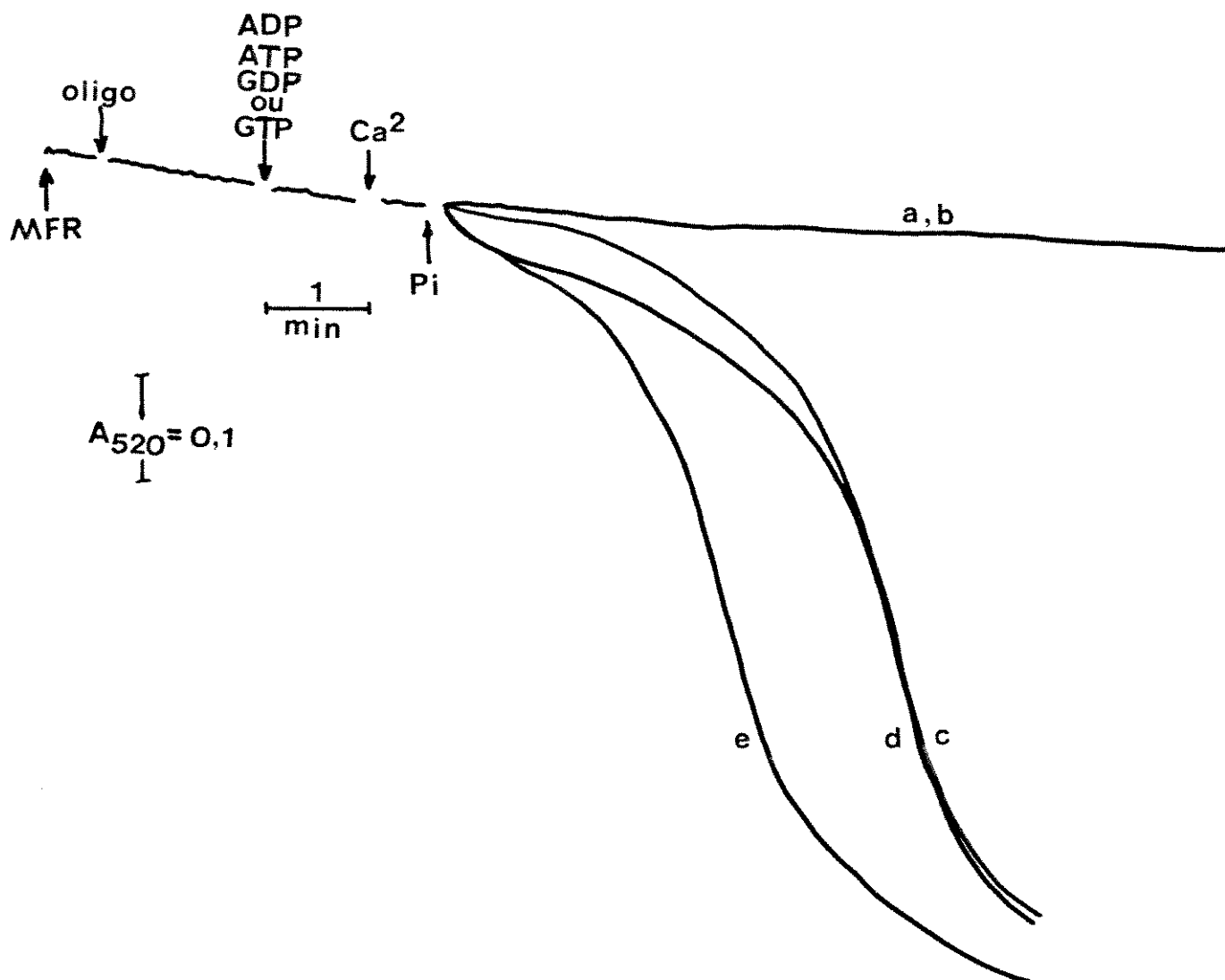


Figura 10. Especificidade do efeito protetor de nucleotídeos de adenina sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e Pi . MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na figura 9. (a,b) ADP ou ATP 200 μM ; (c) GTP 200 μM ; (e) GDP 200 μM foram adicionados 1 minuto antes da adição de Ca^{2+} 50 μM e Pi 10mM. O traçado (d) representa o experimento controle, feito somente na presença de Ca^{2+} e Pi .

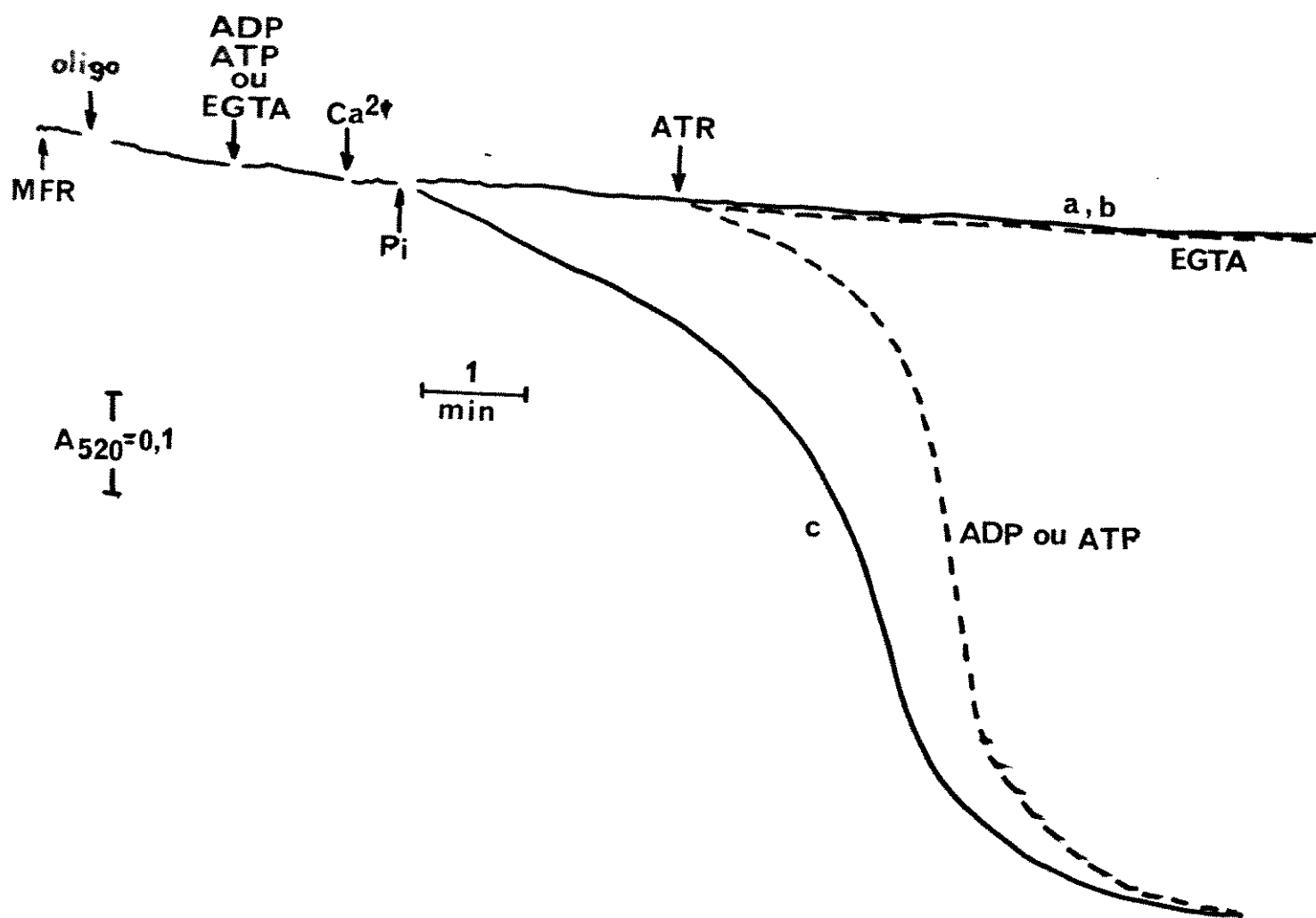


Figura 11. ATR reverte somente a proteção conferida por nucleotídeos de adenina ao inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e P_i . MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 9. (a) ADP ou ATP 200 μ M e (b) EGTA 500 μ M foram adicionados 1 minuto antes da adição de Ca^{2+} 50 μ M e P_i 10mM. O traçado (c) representa o experimento controle, feito somente na presença de Ca^{2+} e P_i . ATR 50 μ M foi adicionado onde indicado (linha tracejada).

Os efeitos protetores do ADP e da ciclosporina A sobre o colapso em $\Delta\psi$ induzido por altas concentrações de Ca^{2+} e Pi são distintos.

As figuras 12 e 13 mostram que a adição de Ca^{2+} 50 μM a mitocôndrias incubadas na presença de Pi 5mM induz uma rápida queda no potencial devido ao acúmulo do íon no interior das organelas, seguida por uma fase mais lenta de diminuição em $\Delta\psi$ a níveis muito baixos (traçado a). Esta fase é indicativa de um aumento na transição de permeabilidade na membrana mitocondrial. Podemos verificar pela figura 12 que o ADP 200 μM , quando adicionado antes do Ca^{2+} protege totalmente as organelas da despolarização na membrana (traçado b). O ADP também é capaz de reverter parcialmente o processo de permeabilização quando adicionado imediatamente após o início da queda em $\Delta\psi$ (traçado c). Entretanto, quando adicionado na ausência de um potencial mensurável, ele perde a capacidade de repolarizar a membrana (traçado d).

Quando realizamos o mesmo experimento da figura 12 substituindo o ADP por ciclosporina A (CsA), podemos observar que a presença de CsA é capaz de reverter totalmente o efeito do Ca^{2+} sobre a queda do potencial elétrico de membrana (Figura 13, traçados b,c,d) mesmo naquelas condições onde o ADP já não é mais capaz de atuar (traçado d). A linha tracejada mostra que a adição anterior de CAT não impede a reversão da queda em $\Delta\psi$ pela CsA. Além disso, os dados da figura 14 mostram que na presença de CsA

e na ausência de ADP, a adição posterior de CAT não tem efeito algum sobre o $\Delta\psi$ (Figura 14, traçado a). Entretanto, quando ADP também está presente no meio de reação a adição de CAT induz uma queda parcial em $\Delta\psi$ (Figura 14, traçado b).

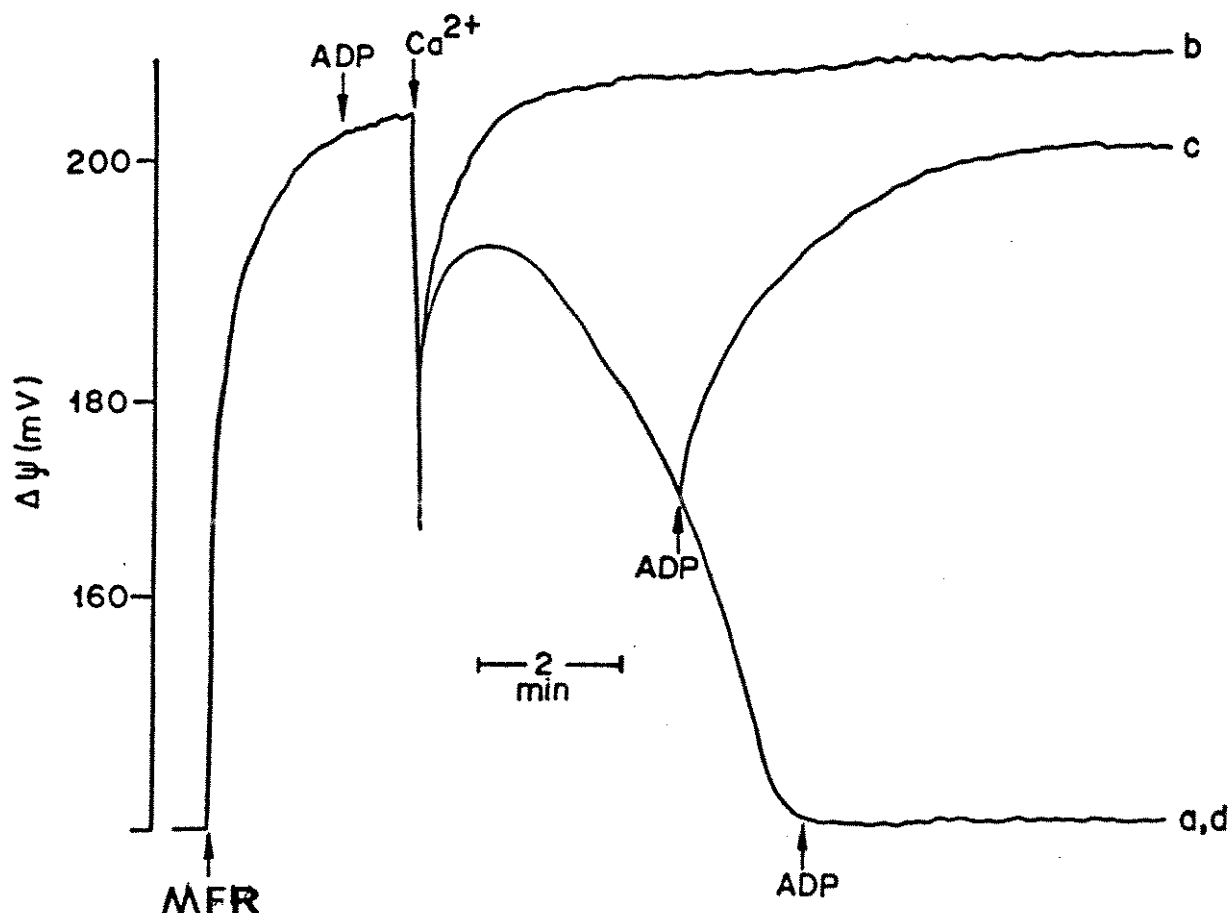


Figura 12. Efeito de ADP sobre a queda em $\Delta\psi$ induzida por Ca^{2+} e P_i . MFR (1mg/ml) foram incubadas segundo as condições descritas em Materiais e Métodos e Ca^{2+} 50 μM foi adicionado em todos os experimentos onde indicado. (a) nenhuma outra adição; (b) ADP 200 μM adicionado antes da adição de Ca^{2+} ; (c) ADP 200 μM adicionado durante a queda no $\Delta\psi$; (d) ADP 200 μM adicionado após o colapso em $\Delta\psi$.

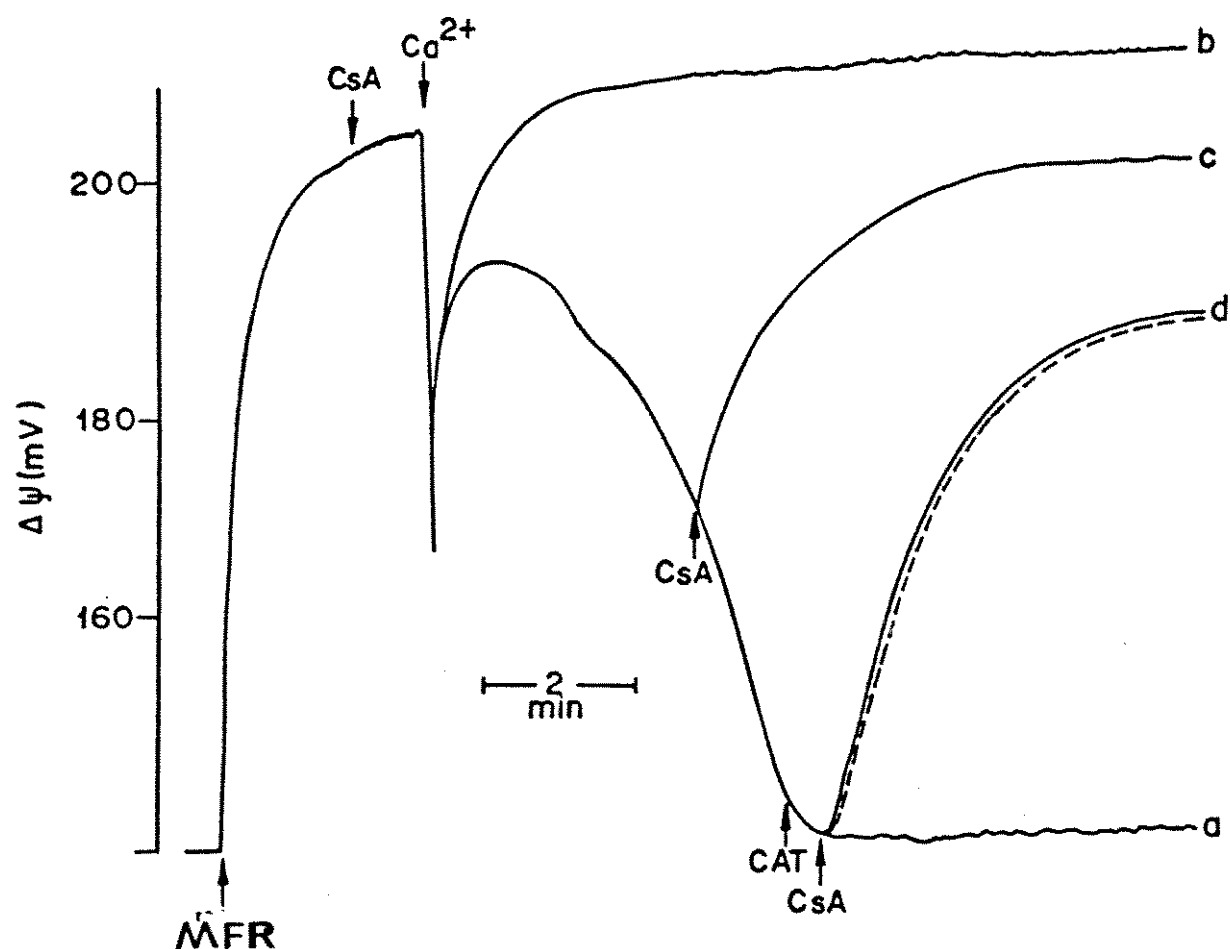


Figura 13. Efeito da ciclosporina A sobre a queda em $\Delta\psi$ induzida por Ca^{2+} e Pi. MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 12, substituindo-se ADP por ciclosporina A (CsA) 0,5 μ M. A linha tracejada representa o mesmo experimento de (d), com a adição de CAT 2,5 μ M onde indicado.

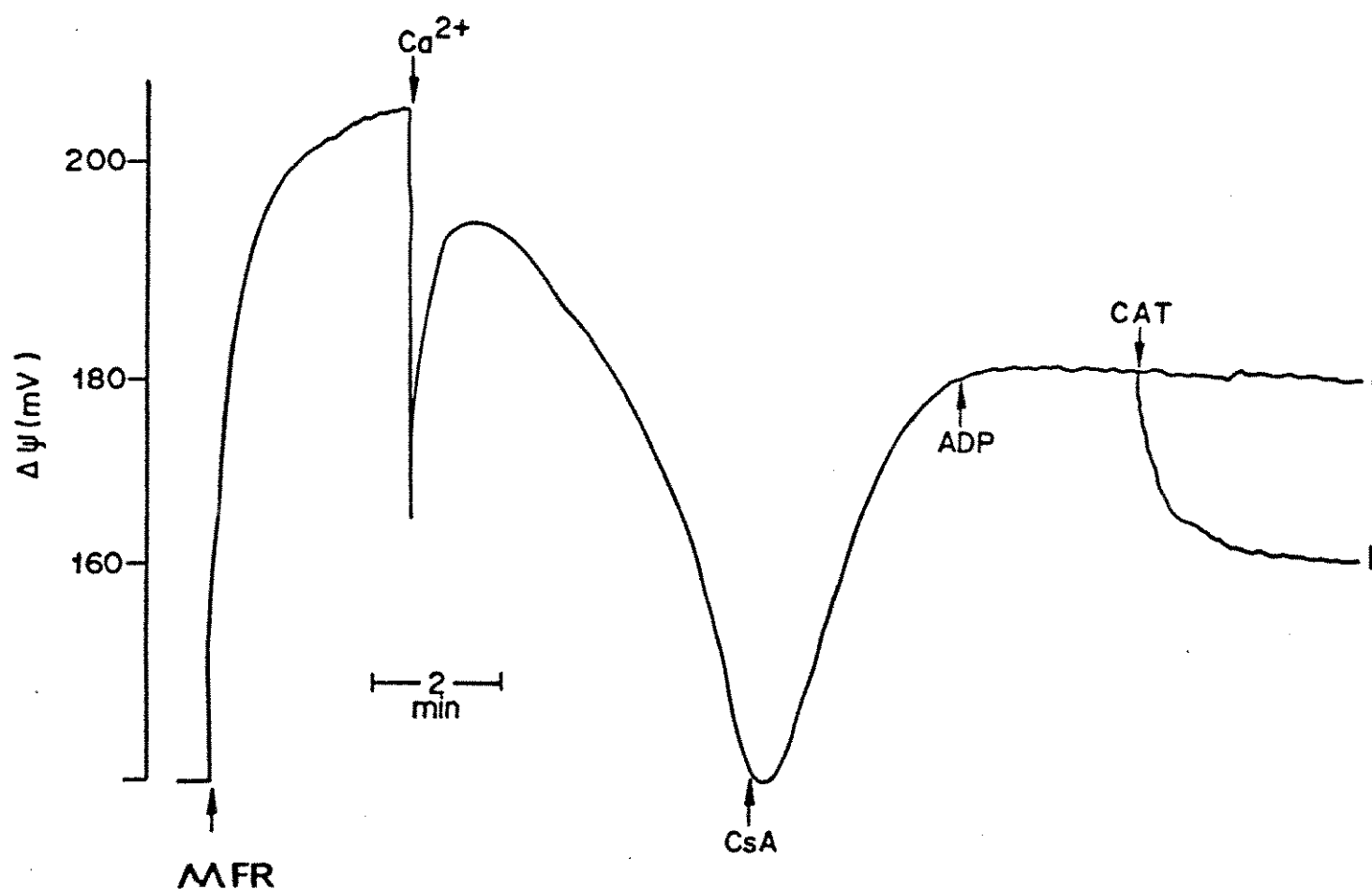


Figura 14. CAT reverte parcialmente o efeito combinado de CsA e ADP sobre a queda em $\Delta\psi$ induzida por Ca^{2+} e Pi. MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais da figura 12, com a adição de CsA 0,5 μM seguida da adição de CAT 2,5 μM onde indicado, na ausência (a) ou na presença de ADP 200 μM (b).

Efeito do Ca^{2+} sobre o conteúdo de carreadores ADP/ATP ativos na membrana

O CAT é um inibidor específico do carreador ADP/ATP, com uma estequiometria de inibição de 1:1. Assim, podemos estabelecer quantos pmoles de carreador estão ativos na membrana diretamente da concentração em pmoles de CAT necessários para inibir totalmente a respiração estimulada pelo ADP. Realizamos então os experimentos da figura 15 cujo protocolo estabelecia um tempo de pré-incubação das mitocôndrias com Ca^{2+} na ausência de substrato respiratório, com o objetivo de simular as condições da figura 12d. Podemos observar claramente pela figura 15 que a velocidade de respiração no estado 3_{ADP} foi sendo gradativamente inibida com o aumento na concentração de Ca^{2+} presente no período de pré-incubação. Na presença de $60\mu\text{M}$ de Ca^{2+} , a mesma quantidade de CAT (200pmoles/mg) que no experimento controle era suficiente para inibir cerca de 25% dos carreadores ativos na membrana (figura 15 A, traçado c) inibe agora totalmente a entrada do ADP (figura 15 C, traçado c). Estes dados mostram que mitocôndrias que sofreram a transição de permeabilidade também sofrem inativação do carreador ADP/ATP, dependendo da quantidade de Ca^{2+} presente no meio de reação (figura 15 A,B,C).

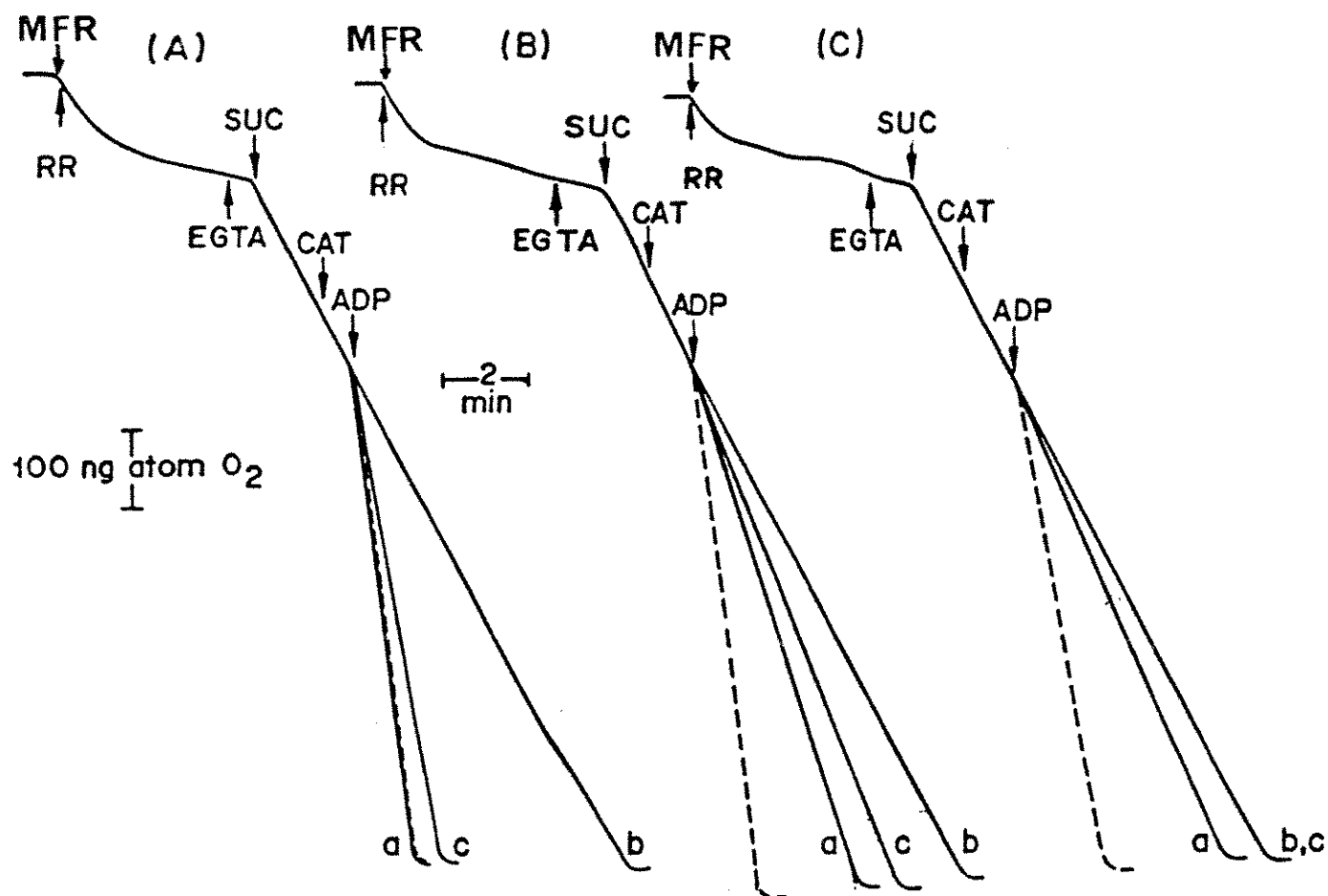


Figura 15. Incubação de mitocôndrias desenergizadas com Ca²⁺ diminui o conteúdo de translocases ativas na membrana mitocondrial. MFR (1mg/ml) foram incubadas como descrito em Materiais e Métodos com 3 concentrações de Ca²⁺ diferentes: (A) 10 μM; (B) 30 μM e (C) 60 μM. Após 3 minutos de pré-incubação, EGTA 0,5mM foi adicionado antes do succinato (SUC) 5mM. As outras adições foram: (a) ADP 1mM; (b) nenhuma outra adição; (c) CAT 200pmoles/mg, adicionado 1 minuto antes do ADP. A linha tracejada representa os mesmos experimentos de (a) feitos na presença de vermelho de rutênio (RR) 5 μM.

Três condições impedem a diminuição do conteúdo de AAC ativos na membrana mitocondrial pelo Ca^{2+} .

Como a ciclosporina A é um potente inibidor do poro dependente de Ca^{2+} , realizamos a titulação do conteúdo de AAC ativos na membrana nas mesmas condições descritas para a figura 15, porém na presença de ciclosporina A (CsA) durante o período de pré-incubação com o íon. Os resultados da figura 16 mostram claramente que a ciclosporina A foi capaz de proteger o carreador da perda de atividade que ocorre com a pré-incubação de mitocôndrias desenergizadas com alto Ca^{2+} (traçados d,e,f).

Convém ressaltar que, embora a ciclosporina seja capaz de impedir a inativação do carreador ADP/ATP induzida pelo Ca^{2+} , ela praticamente não tem efeito sobre a quantidade de carreadores ativos na membrana na ausência do íon, conforme pode ser observado na Tabela I. A Tabela I mostra ainda que a velocidade de consumo de oxigênio pode ser restaurada a valores muito próximos dos níveis do controle em mais duas situações distintas, além daquela descrita na figura 16: com a adição de vermelho de rutênio no período de pré-incubação ou com a adição de FCCP - um desacoplador - após o estímulo do consumo de oxigênio pelo ADP. O fato do FCCP ser capaz de restabelecer a velocidade máxima de consumo de oxigênio indica que a inibição observada na respiração estimulada pelo ADP é de fato devida à inibição do carreador ADP/ATP. Além disso, podemos observar pela tabela I que a presença de

DTT no período de pré-incubação não foi suficiente para prevenir o efeito do Ca^{2+} sobre a atividade do carreador.

Tabela I. Titulação do conteúdo de translocases ativas na membrana em diferentes condições experimentais. Mitocôndrias de fígado de rato (1mg/ml) foram pré-incubadas nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 15. Quando presentes, DTT 1mM, RR 5 μM ou CsA 0,5 μM foram adicionados ao meio de pré-incubação. FCCP 0,8 μM , quando presente foi adicionado após o ADP.

Condições Experimentais	velocidade de consumo de O_2 (ng átomo $\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		
	estado 4	estado 3 _{ADP}	estado 3 _{FCCP}
EGTA 0,5 mM	63,9	336,6	
EGTA 0,5mM + CAT		191,7	
Ca^{2+} 10 μM	70,8	340,0	
Ca^{2+} 10 μM + CAT		190,8	
Ca^{2+} 50 μM	71,0	142,0	
Ca^{2+} 50 μM + CAT		85,2	
Ca^{2+} 50 μM + DTT	70,9	128,0	
Ca^{2+} 50 μM + FCCP	71,0	142,0	338,5
Ca^{2+} 50 μM + RR	65,8	341,2	
Ca^{2+} 50 μM + CsA	70,8	344,3	
EGTA 0,5mM + CsA	68,2	335,9	
EGTA 0,5mM + CAT + CsA		193,0	

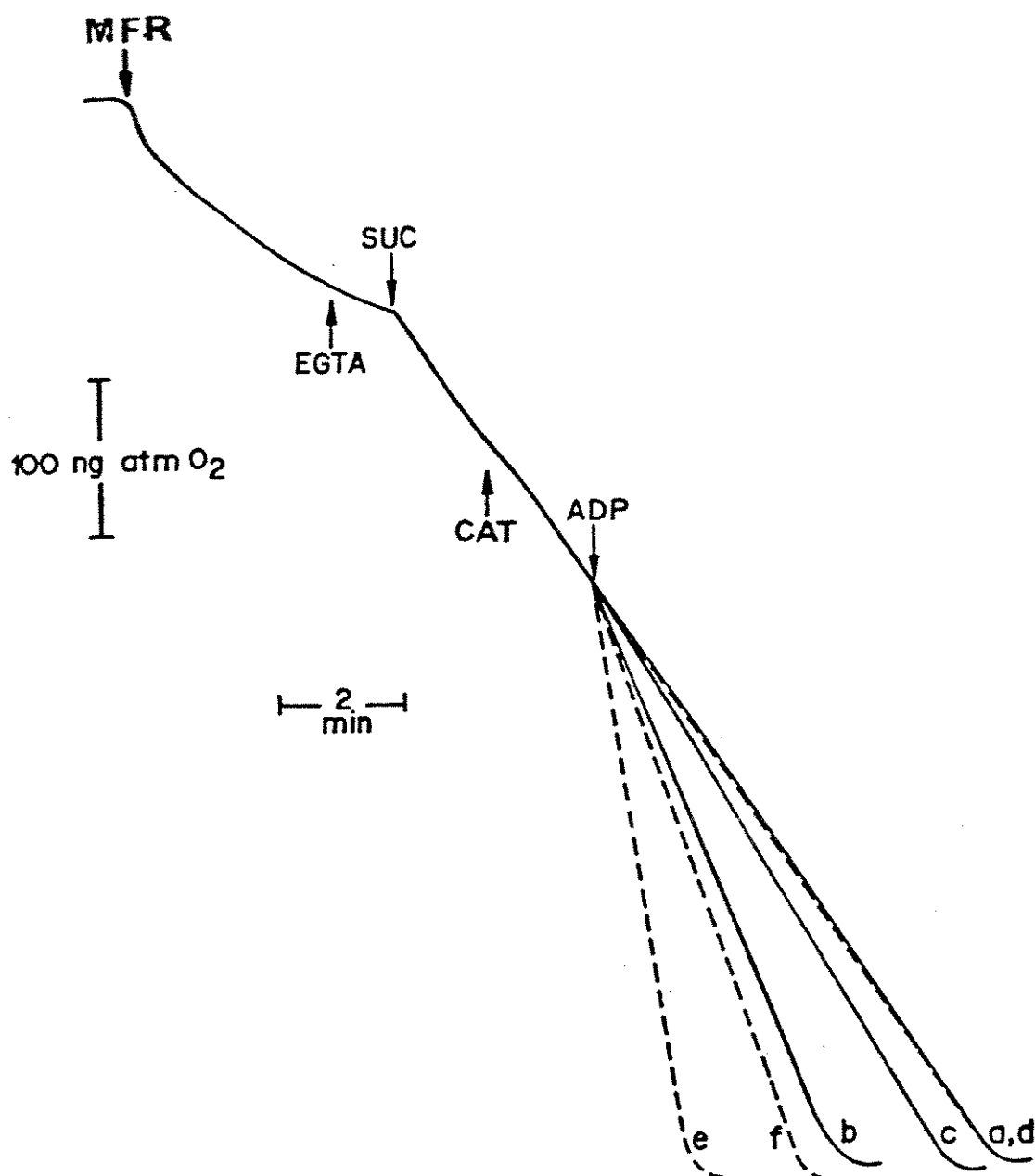


Figura 16. Titulação do conteúdo de translocases ativas na membrana mitocondrial na presença de ciclosporina A no período de pré-incubação com Ca²⁺. MFR (1mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições da figura 15, na ausência (linha cheia) ou presença de CsA 0,5μM (linha tracejada). Após 3 minutos de pré-incubação, EGTA 0,5mM foi adicionado antes do succinato (SUC) 5mM. (a) e (d) nenhuma outra adição; (b) e (e) ADP 1mM adicionado onde indicado; (c) e (f) CAT 200pmoles/mg, adicionado antes do ADP 1mM.

Caracterização do poro dependente de Ca^{2+} em Partículas Sub-Mitocondriais (PSM).

Com o objetivo de testarmos a necessidade da interação da ciclofilina com o carreador ADP/ATP para a abertura do poro dependente de Ca^{2+} , realizamos os experimentos das figuras 17 a 19 com partículas sub-mitocondriais (PSM), que são destituídas de ciclofilina por não possuírem os componentes da matriz mitocondrial. Podemos observar pela figura 17, através do eletrodo de TPB⁻ que nossa preparação de PSM é do tipo invertido, uma vez que é capaz de gerar um potencial elétrico na membrana (positivo internamente) após a adição de NADH. Esse potencial pode ser inibido na presença de rotenona, sendo restaurado por adições de succinato. Assim, a medida deste potencial pode ser utilizada para registrar mudanças nas características de permeabilidade da membrana das partículas.

Curiosamente, quando adicionamos uma grande quantidade de Ca^{2+} ao meio de incubação (500 μM), observamos que não havia qualquer alteração no potencial formado pela adição de NADH (figura 18, traçado a). Pelo contrário, a adição de Ca^{2+} 100 μM ao potencial já formado era sempre seguida pelo aumento na captação de TPB⁻, que voltava em seguida para os mesmos níveis anteriores. Por outro lado, na presença de EGTA 1mM as partículas exibiam o mesmo perfil de resposta após a adição de NADH (traçado b). Realizamos então os experimentos da figura 19 com uma concentração bastante baixa de Ca^{2+} e podemos observar que, na presença de

aproximadamente $5\mu\text{M}$ de Ca^{2+} ocorre uma lenta liberação de TPB^- para o meio de reação, indicando que nesta situação é possível desencadear a transição de permeabilidade em partículas sub-mitocondriais (figura 19, traçado a). Podemos verificar também que a presença de ciclosporina A (traçado b) é capaz de impedir esta queda no $\Delta\psi$, da mesma maneira que altas concentrações de Ca^{2+} ou a quelação total do íon pela presença de EGTA (figura 18, traçados a, b).

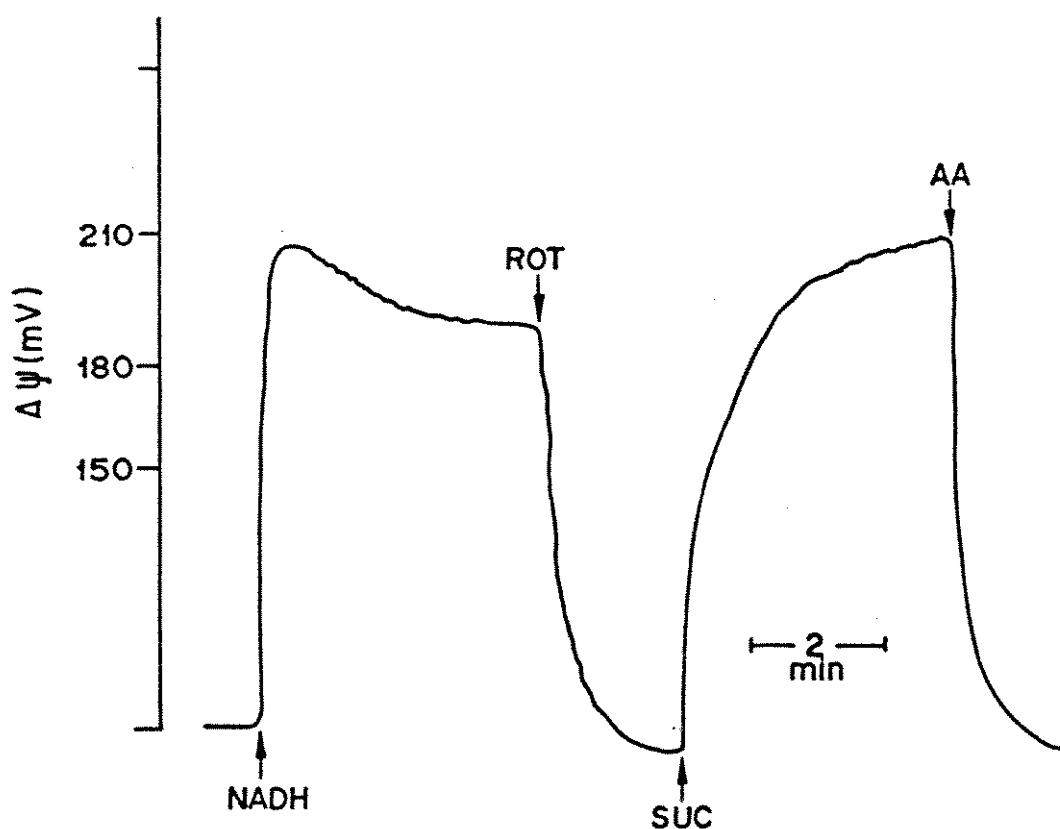


Figura 17. As partículas sub-mitocondriais isoladas são do tipo invertido, capazes de gerar um potencial transmembrana. PSM (0,5mg/ml) foram incubadas como descrito em Materiais e Métodos. NADH 5mM, rotenona (ROT) $5\mu\text{M}$, succinato (SUC) 5mM e antimicina A (AA) $1\mu\text{M}$ foram adicionados onde indicado.

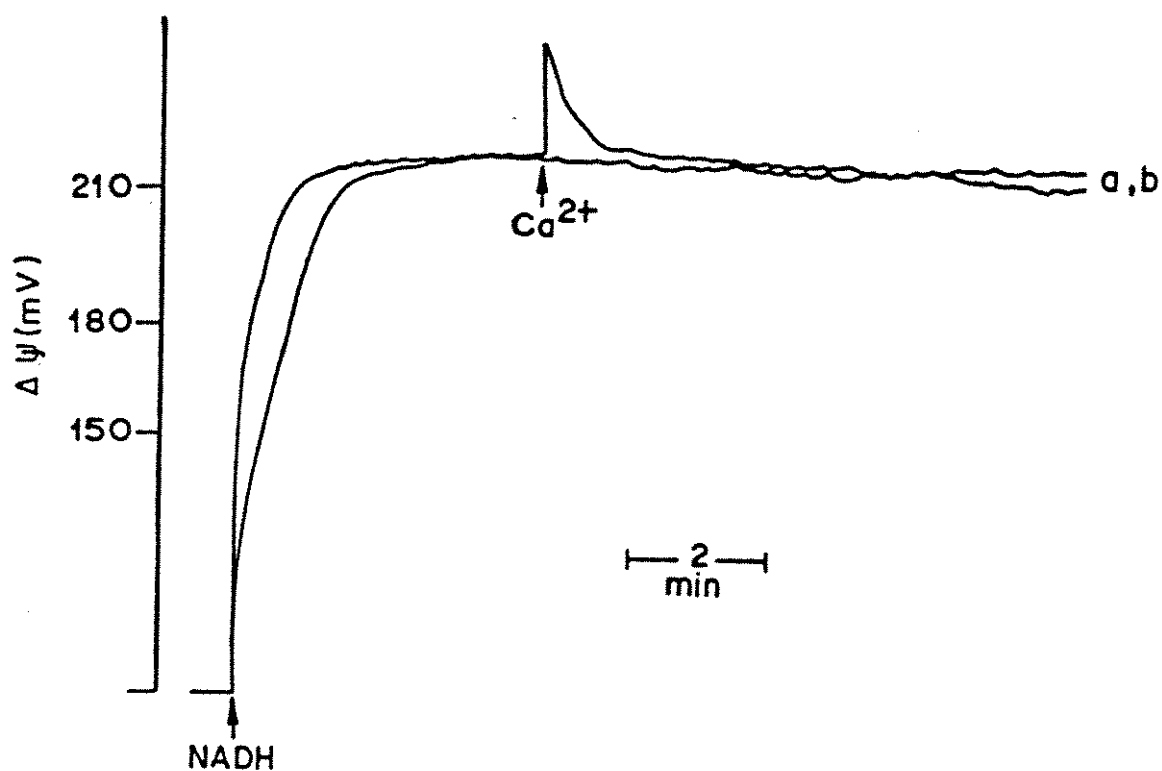


Figura 18. Altos carregamentos de Ca^{2+} impedem a abertura do poro dependente de Ca^{2+} em partículas sub-mitochondriais. PSM (0,5mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais da figura 17, na presença de (a) Ca^{2+} 500 μM ou (b) EGTA 1mM. Ca^{2+} 100 μM foi adicionado em (a), onde indicado.

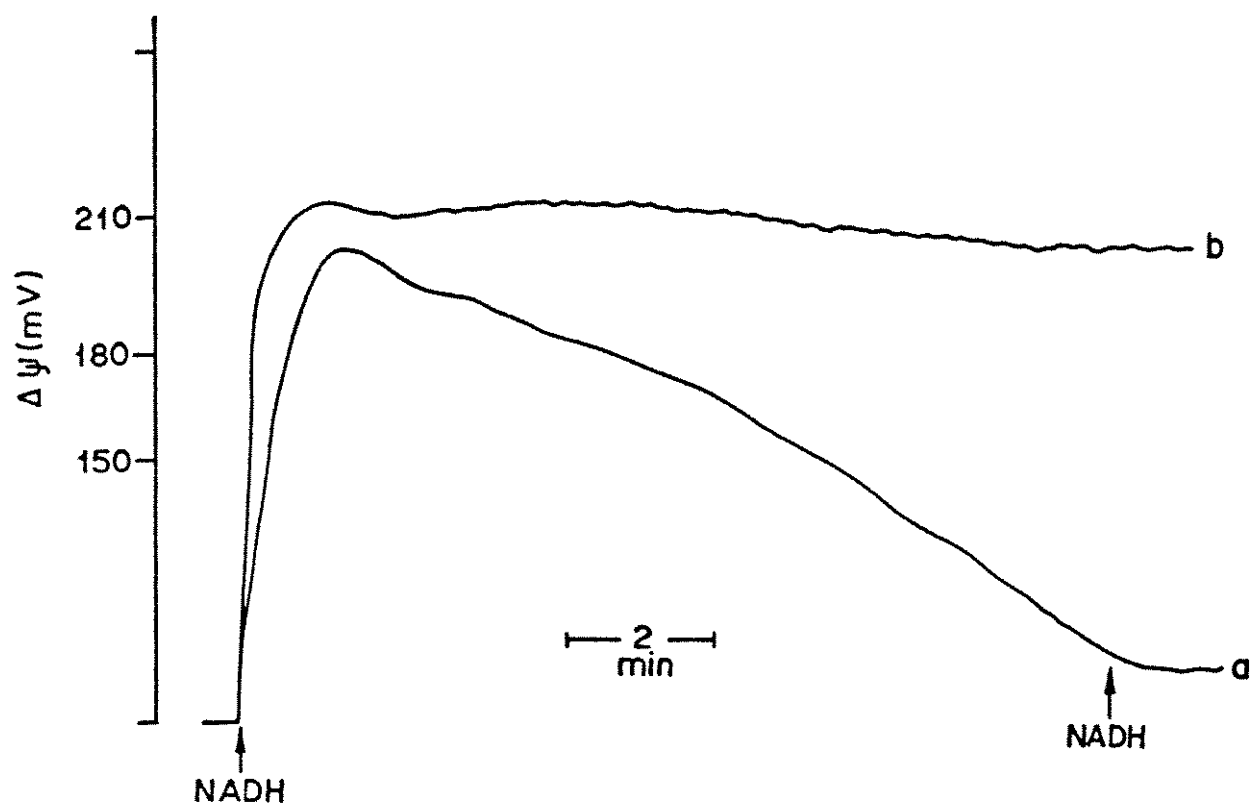


Figura 19. Concentrações baixas de Ca^{2+} induzem abertura do poro dependente de Ca^{2+} em partículas sub-mitochondriais. PSM (0,5mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas na figura 17. (a) Ca^{2+} 5 μM ; (b) mesmo que (a) mas na presença de CSA 0,5 μM .

DISCUSSÃO

Nosso objetivo neste trabalho foi verificar a participação do carreador ADP/ATP no fenômeno de abertura do poro dependente de Ca^{2+} , responsável pela transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna. As várias hipóteses existentes para explicar seu mecanismo a nível molecular foram formuladas principalmente após o estudo da sensibilidade desta transição de permeabilidade à ação de vários inibidores (Broekemeier et alii, 1985; Carbonera & Azzone, 1988; Fagian et alii, 1990). Assim, ao iniciarmos nosso trabalho, em 1990, a primeira pergunta que tentamos responder foi qual seria a extensão da participação do carreador ADP/ATP no processo de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Realizamos então os experimentos das figuras 4 a 11 nas mesmas condições experimentais, com o objetivo de comparar a efetividade de alguns inibidores da permeabilização mitocondrial induzida por Ca^{2+} , na presença de dois agentes liberadores: t-butil hidroperóxido (t-buOOH), um oxidante de nucleotídeos de piridina e de GSH intramitocondriais, e fosfato inorgânico (Pi). Os inibidores utilizados foram ADP - substrato do carreador ADP/ATP (Lê Quóc & Lê Quóc, 1988, 1989), ditiotreitól (DTT) - redutor de grupos sulfidríla (Pfeiffer et alii, 1988; Fagian et alii, 1990) e butilhidroxitolueno (BHT) - sequestrador de radicais livres (Carbonera & Azzone, 1988; Carbonera et alii, 1988).

Esses experimentos nos mostraram que o ADP foi sempre o mais efetivo em proteger as organelas. O DTT, que age por manter os grupos sulfidrila no estado reduzido, foi capaz de inibir o dano somente em condições oxidativas. Isto nos leva a concluir que a presença de Ca^{2+} e Pi , embora seja capaz de desencadear a transição de permeabilidade na membrana das mitocôndrias, não resulta na oxidação significativa de proteínas da membrana, embora nestas condições haja um estímulo do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias que pode ser acompanhado por um aumento no vazamento de elétrons. Na verdade, a explicação do dano mitocondrial ser proveniente de um ataque de radicais de oxigênio aos lipídeos e proteínas da membrana (Carbonera & Azzone, 1988; Carbonera et alii, 1988) pode ser descartada devido ao modesto efeito do BHT quando comparado aos outros dois agentes nas figuras 4 e 9.

Outra conclusão importante que pudemos tirar destes experimentos é a de que a ação do ADP parece estar em impedir especificamente o efeito do Ca^{2+} sobre a membrana, independente do agente liberador utilizado. Além disso, os experimentos da figura 10 e 11 nos indicam que o carreador está, de alguma maneira, envolvido na ação do Ca^{2+} nesse processo de permeabilização da membrana mitocondrial, pois a proteção é específica para nucleotídeos de adenina e o atracilato (ATR), que desliga especificamente nucleotídeos de adenina dos sítios de ligação da translocase (Klingenberg, 1985), reverte apenas o efeito protetor dos mesmos.

Nesta etapa do trabalho a literatura registrava uma opinião quase consensual de que a transição de permeabilidade induzida por Ca^{2+} seria mediada pela abertura de um poro sensível à ciclosporina A (Crompton et alii,1992; Novgorodov et alii,1992; Bernardi,1992). Resolvemos então investigar mais detalhadamente a ação do ADP, da ciclosporina A e a atividade do carreador ADP/ATP em mitocôndrias incubadas na ausência de substrato respiratório, ou seja, sem um potencial elétrico mensurável, segundo alguns autores condição suficiente para induzir a abertura do poro dependente de Ca^{2+} (Bernardi,1992).

Os resultados da figura 12 estão em concordância com dados da literatura que indicam que com a membrana despolarizada o ADP pode, inclusive estimular a abertura do poro (Crompton & Costi,1990). Foi proposto que, nestas condições, o ADP poderia permitir a interconversão de qualquer carreador da conformação "m" para a conformação "c" (Halestrap & Davidson,1990). Por outro lado, os experimentos da figura 13 mostram que a ciclosporina ainda é capaz de reverter a despolarização da membrana em condições nas quais o ADP já não é mais capaz de agir. Esses experimentos sugerem claramente que o ADP e a ciclosporina A previnem o colapso em $\Delta\psi$ em mitocôndrias carregadas com Ca^{2+} e Pi , por mecanismos distintos. O fato do CAT não interferir com a ação da ciclosporina a menos que ADP também esteja presente no meio de reação (figura 14) indica que a proteção conferida pela ciclosporina A ocorre através de um mecanismo

que não envolve a ligação da droga com o sítio de ligação de nucleotídeos do carreador (Halestrap & Davidson, 1990; Novgorodov et alii, 1992. Bernardi, 1992). Além disso, a ligação da ciclosporina a seu sítio parece não impedir a ligação do ADP ao carreador ADP/ATP, pois a adição de CAT, quando ambos, ADP e CsA também estão presentes é capaz de induzir um colapso parcial no potencial elétrico (figura 14).

Muito recentemente foi mostrado que o efeito da ciclosporina A pode ser modulado pela interação do ADP com um sítio de baixa afinidade, insensível a CAT (Novgorodov et alii, 1992). Estes dados favorecem a idéia, proposta inicialmente por Hunter e Haworth em 1979, da existência na membrana de duas estruturas independentes embora interativas: o poro dependente de Ca^{2+} e o carreador ADP/ATP. Por outro lado, há outro grupo que sugere que o carreador ADP/ATP seja convertido, ele mesmo, no suposto poro (Halestrap & Davidson, 1990).

Nossos resultados, da titulação do conteúdo de translocases ativas na membrana indicam que em mitocôndrias desenergizadas, condição suficiente para ocorrer a abertura do poro (Bernardi, 1992), a incubação com Ca^{2+} leva a uma diminuição no conteúdo de translocases ativas na membrana. Esta inativação, por sua vez, é prevenida pela presença de ciclosporina A no período de pré-incubação (Figura 16). Apesar da ciclosporina A não ter ação direta no carreador, ela impede a ação do Ca^{2+} sobre ele. Isto nos leva a

concluir por um envolvimento direto do carreador com o processo de abertura do poro dependente de Ca^{2+} . Como esta inativação não é prevenida pela presença de DTT no período de pré-incubação podemos concluir que embora o carreador apresente pelo menos 2 grupamentos SH na sua estrutura (Aquila & Klingenberg, 1982; Aquila et alii, 1982), estes não estão envolvidos no mecanismo de inativação do carreador pelo Ca^{2+} e portanto não são os responsáveis pelo mecanismo de abertura do poro dependente de Ca^{2+} (Fagian et alii, 1990; Vercesi, 1993).

Além disso, esses resultados também favorecem a proposta da existência de um sítio de ligação para a ciclosporina A independente do sítio de ligação para Ca^{2+} e de que há uma ação sinergística entre eles (Novgorodov et alii, 1992; Petronilli et alii, 1993).

As mitocôndrias contêm pelo menos dois componentes que ligam CsA com alta afinidade (McGuinness et alii, 1990) sendo que o de maior afinidade foi identificado como sendo a ciclofilina (Halestrap & Davidson, 1990). Para testar a hipótese da abertura do poro ser consequência da ligação do carreador ADP/ATP com a ciclofilina (Halestrap & Davidson, 1990), realizamos experimentos com partículas sub-mitochondriais que são destituídas dos constituintes da matriz e com os lados da membrana invertidos, com a exposição do lado voltado para a matriz mitocondrial nas mitocôndrias intactas agora diretamente para o meio de reação.

De fato, os experimentos sobre a formação de $\Delta\psi$ em partículas sub-mitochondriais se mostraram uma boa alternativa para testar alguns eventos regulatórios do processo de abertura do poro. Observamos que quando estas partículas foram energizadas com NADH, houve a geração de um potencial elétrico, positivo dentro que, surpreendentemente não foi colapsado com alto carregamento de Ca^{2+} (Figura 18). Estes dados aparentemente estavam em concordância com aqueles obtidos recentemente por Crompton e colaboradores (1992), que sugeriam que as partículas sub-mitochondriais não eram capazes de sofrer a abertura do poro dependente de Ca^{2+} . Entretanto, aqueles resultados obtidos com a adição de Ca^{2+} ao potencial já formado (figura 18) nos intrigava. Nestas condições, parecia estar havendo entrada do íon para o interior das partículas, apesar delas estarem com a membrana invertida, do tipo "inside out" (figura 17). Revendo a literatura, observamos o registro de captação de Ca^{2+} por partículas sub-mitochondriais do tipo "inside out" (Loyter et alii, 1969; Gunter et alii, 1978).

Partindo do proposto por Petronilli e colaboradores (1993) de que existem dois sítios de ligação para Ca^{2+} na membrana mitocondrial (um externo, inibitório da abertura do poro e outro interno, estimulatório da abertura do mesmo), nas partículas estes sítios também estariam invertidos e com sua entrada poderia estar havendo ligação do Ca^{2+} aos sítios inibitórios, o que explicaria o fato de não observarmos efeito algum do íon sobre o potencial elétrico. Se esta nossa hipótese estivesse correta, na presença de uma

concentração de Ca^{2+} baixa o suficiente para se ligar somente aos sítios externos das partículas, deveríamos observar abertura do poro dependente de Ca^{2+} . De fato, quando apenas os sítios estimulatórios estão ligados com Ca^{2+} , observamos facilmente a ocorrência da transição de permeabilidade (figura 19). Esses resultados têm o mérito de demonstrar, pela primeira vez na literatura a abertura do poro dependente de Ca^{2+} também em partículas sub-mitocondriais.

Os resultados apresentados nas figuras 18 e 19 confirmam assim a existência de dois sítios de ligação para Ca^{2+} (localizados em lados opostos da membrana), um estimulatório e outro inibitório da abertura do poro. Estes dados aparentemente explicam os resultados negativos obtidos por Crompton e colaboradores pois estes autores trabalharam com altas concentrações de Ca^{2+} para induzir a transição nas partículas (100 μM). Nestas condições, parece estar havendo entrada do íon para o interior das partículas sub-mitocondriais (Loyter et alii, 1969; Gunter et alii, 1978) e ligação deste aos sítios inibitórios (figura 18).

A observação de que a ciclosporina A é capaz de prevenir o efeito do Ca^{2+} também nas partículas sub-mitocondriais descarta definitivamente a necessidade da interação com a ciclofilina para o carreador ADP/ATP se transformar no poro dependente de Ca^{2+} (Halestrap & Davidson, 1990) e sugere que o sítio de ligação da ciclosporina A, capaz de aumentar a probabilidade do poro

estar fechado, esta localizado na membrana mitocondrial (figura 19). Esses resultados indicam que a ciclosporina A, quando ligada a seu sítio na membrana, impede de alguma maneira a ligação do Ca^{2+} aos sítios estimulatórios da abertura do poro. Ao mesmo tempo, os resultados com mitocôndrias intactas mostraram que a interação da ciclosporina A com seu sítio também impede a inativação do carreador ADP/ATP induzida pelo Ca^{2+} . Esses dados sugerem que o carreador se converte no poro dependente de Ca^{2+} através da ligação do cátion a ele. Neste sentido, Halestrap e colaboradores já haviam proposto que o Ca^{2+} se liga ao carreador ADP/ATP principalmente quando este está no estado conformacional "c" (Halestrap & Davidson, 1990).

Uma parte essencial do modelo que propõe o mecanismo de "passagem por poro através de um único centro de ligação" para explicar o mecanismo de ação do carreador na membrana, prevê a existência de portões ("gates"), presentes em ambos os lados do canal de translocação (Klingenberg, 1989). Este modelo estipula que ou o "gate" externo ou o interno estará fechado quando o carreador estiver aberto ou fechado. Recentemente, Klingenberg propôs que a manutenção da estrutura dimérica funcional do carreador (Hackenberg & Klingenberg, 1981) seja feita através de interações eletrostáticas entre resíduos negativos móveis, presentes em ambos os lados do centro de ligação, com resíduos positivos do centro de ligação ou dos portões ("gates"), de acordo com um modelo chamado de "modelo de cargas oscilantes" (Klingenberg, 1992). Nossos resultados, mostrando que o ADP

perde a capacidade de proteger as organelas em condições de baixo $\Delta\psi$, devido à perda de atividade do carreador ADP/ATP induzida pelo Ca^{2+} , sugerem que a ligação do íon ao carreador pode estar desestabilizando estas interações eletrostáticas e induzindo a dissociação do dímero funcional. Esta dissociação, por sua vez, transformaria gradualmente o próprio carreador ADP/ATP no poro dependente de Ca^{2+} . Trabalhos estão em curso em nosso laboratório para provar essa nossa hipótese.

BIBLIOGRAFIA

- Akerman, K.E.O. and Nicholls, D.G. (1983). Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **95**:149-201.
- Al-Nasser, I. and Crompton, M. (1986). The reversible Ca^{2+} induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **239**:19-29.
- Aquila, H. and Klingenberg, M. (1982). The reactivity of -SH groups in the ADP/ATP carrier isolated from beef heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **122**:141-145.
- Aquila, H., Eiermann, W. and Klingenberg, M. (1982). Incorporation of N-ethylmaleimide into the membrane bound ADP/ATP translocator. *Eur. J. Biochem.* **122**:133-139.
- Asimakis, G.K. and Sordhal, L.A. (1977). Effects of atractilaside and palmitoil Coenzyme A on calcium transport in cardiac mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **179**:200.
- Beatrice, M.C., Palmer, J.W. and Pfeiffer, D.R. (1979). The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential and the retention of Ca^{2+} by mitochondria. *J. Biol. Chem.* **255**:8663-8671.
- Beatrice, M.C., Stiers, D.L. and Pfeiffer, D.R. (1984). The role of glutathione in the retention of Ca^{2+} by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**:1279-1287.

Bernardes, C.F., Pereira-da-Silva, L. and Vercesi, A.E. (1986). 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.

Bernardi, P. (1992). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. *J.Biol.Chem.* 267:8834-8839.

Bernardi, P., Veronese, P. and Petronilli, V. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. *J.Biol.Chem.* 268:1005-1010.

Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1989). Inositol Phosphates and cell signalling. *Nature.* 341:197-205.

Bond, M. (1988). Elevated cellular calcium in disease states: cause or effect? *Cell Calcium.* 9:201-203.

Broekemeier, K.M., Carpenter-Deyo, L., Reed, D.J. and Pfeiffer, D.R. (1992). Cyclosporin A protects hepatocytes subjected to high Ca^{2+} and oxidative stress. *FEBS lett.* 304:192-194.

Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E. and Pfeiffer, D.R. (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner permeability transition in liver mitochondria *J.Biol.Chem* 264:7829-7830.

- Broekemeier, K.M., Schmid, P.C., Dempsey, M.E. and Pfeiffer, D.R. (1991). Generation of the mitochondrial permeability transition does not involve inhibition of lysophospholipid acylation. *J. Biol. Chem.* 266:20700-20708.
- Broekemeier, K.M., Schmid, P.C., Schmid, H.H.O. and Pfeiffer, D.R. (1985). Effects of phospholipase A₂ inhibitors on ruthenium red induced Ca²⁺ release from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260:105-113.
- Carafoli, E. (1986). Mitochondrial Pathology: An overview. *Annals. New York Acad. Sci.* 468:1-18.
- Carafoli, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56:395-433.
- Carbonera, D. and Azzone, G.F. (1988). Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta.* 943:245-255.
- Carbonera, D., Angrilli, A. and Azzone, G.F. (1988). Mechanism of nitrofurantoin toxicity and oxidative stress in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 936:139-147.
- Chance, B. and Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* 17:65-134.
- Cobbold, P.H. and Rink, T.J. (1987). Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J.* 248:313-328.

- Crompton, M. and Costi, A. (1990). A heart mitochondrial Ca^{2+} -dependent pore of possible relevance to reperfusion-induced injury. *Biochem. J.* **266**:33-39.
- Crompton, M., Capano, M. and Carafoli, E. (1976). The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria: a possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. *Eur. J. Biochem.* **69**:453-462.
- Crompton, M., McGuinness, O. and Nazareth, W. (1992). The involvement of cyclosporin A binding proteins in regulating and uncoupling mitochondrial energy transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1101**:214-217.
- Crompton, M., Costi, A. and Hayat, L. (1987). Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* **245**:915-918.
- Davis, E. J. and Lumeng, L. J. (1975). Relationship between the phosphorylation potentials generated by liver mitochondria and respiratory state under conditions of adenosine diphosphate control. *J. Biol. Chem.* **250**:2275-2282.
- DiMonte, D., Bellomo, G., Thor, H., Nicotera, P. and Orrenius, S. (1984). Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca^{2+} homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* **235**:343-350.

- Duddy, S.K., Kass, G.E.N. and Orrenius, S. (1989). Ca^{2+} -mobilizing hormones stimulate Ca^{2+} efflux from hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **264**:20863-20868.
- Fagian, M.M., Pereira-da-Silva, L., Martins, I.S. and Vercesi, A.E. (1990). Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. *J. Biol. Chem.* **265**:19955-19960.
- Fisher, G. and Schmid, F.X. (1990). The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding model for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry.* **29**:2205-2212.
- Fournier, N., Ducet, G. and Crevat, A. (1987). Action of cyclosporin on mitochondrial calcium fluxes. *J. Bioenerg. Biomemb.* **19**:297-303.
- Frei, B., Winterhalter, K.H. and Richter, C (1985). Quantitative and mechanistic aspects of the hydroperoxide-induced Ca^{2+} release from rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **149**:633-639.
- Gill, D.L., Mullaney, J.M., Ghosh, T.K. and Chueh, S-H. (1989). Mechanism of intracellular calcium movement activated by guanine nucleotides and inositol-1,4,5-trisphosphate. In: *Cell Calcium Metabolism.* (Fiskum, G. ed.) pp.157-177.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and Daid, M.M. (1949). *J. Biol. Chem.* **177**:751-766.

- Gunter, T.E., Restrepo, D. and Gunter, K.K. (1978). Uptake of calcium and manganese by rat liver submitochondrial particles. *Ann. NY. Acad. Sci.* 307:246-247.
- Gunter, T.E. and Pfeiffer, D.R. (1990). Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258:C755-C786.
- Hackenberg, H and Klingenberg, M. (1980). Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in triton X-100. *Biochemistry.* 19:548-555.
- Halestrap, A.P. (1989). The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 973:355-382.
- Halestrap, A.P. and Davidson, A.M. (1990). Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* 268:153-160.
- Hansford, R.G. (1985). Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 102:1-72.

- Haworth, R.A. and Hunter, D.R. (1979). The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* 195:460-467.
- Henke, W. and Jung, K. (1991). Ischemia decreases the content of the adenine nucleotide translocator in mitochondria of rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* 1056:71-75.
- Hernandez-Cruz, A., Sala, F. and Adams, P.R. (1990). Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron. *Science.* 247:858-862.
- Hosey, M.M., Lazdunski, M. (1988). Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Memb. Biol.* 104:81-105.
- Hunter, D.R. and Haworth, R. (1979). The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 195: 453-459.
- Hunter, D.R. and Haworth, R.A. (1979). The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. III. Transition Ca^{2+} release. *Arch. Biochem. Biophys.* 195:468-477.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, J. (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Memb. Biol.* 49:105-121.

- Kass,G.E.N., Juedes,M.J. and Orrenius,S. (1992). Cyclosporin A protects hepatocytes against prooxidant-induced cell killing. *Biochem.Pharmacol.* **44**:1995-2003.
- Kawanishi,T., Blank,L.M., Harootunion,A.T., Smith,M.T. and Tsien,R.Y. (1989). Ca^{2+} oscillations induced by hormonal stimulation of individual fura-2 loaded hepatocytes. *J.Biol.Chem.* **264**:12859-12866.
- Klee,C.B. and Vanaman,T.C. (1982). Calmodulin. *Adv.Protein.Chem.* **35**:213-321.
- Klingenberg,M. (1985). The ADP/ATP carrier in mitochondrial membranes. In: *The Enzymes of Biological Membranes.* (Martonosi,A.ed.)pp.383-483. Plenum Press New York and London.
- Klingenberg,M. (1989). Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* **270**:1-14.
- Klingenberg,M. (1992). Structure-function of the ADP/ATP carrier. *Biochem.Soc.Trans.* **20**:547-550.
- Klingenberg,M. and Buchholz,M. (1973). On the mechanism of bongkrekate effect on the mitochondrial adenine nucleotide carrier as studied through the binding of ADP. *Eur.J.Biochem.* **38**:246-358.
- Lee,C.P. and Ernester,L. (1967). Energy-coupling in nonphosphorylating submitochondrial particles. *Meth. in Enzymol.* **10**:543-548.

- Lehninger, A.L., Vercesi, A.E. and Bababunmi, E.A. (1978). Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1690-1694.
- LeMasters, J.J., DiGiuseppi, J., Nieminen, A-L. and Herman, B. (1987). Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*. 325:78-81.
- Le Quóc, D and Lê Quóc, K. (1989). Relationship between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 273:466-478.
- Lê Quóc, K. and Lê Quóc, D. (1988). Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability. *Arch. Biochem. Biophys.* 265:249-257.
- Loyter, A., Christiansen, R.O., Steensland, H., Saltzgaber, J. and Racker, E. (1969). Energy-linked ion translocation in submitochondrial particles. 1. Ca^{2+} accumulation in submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 244:4422-4427.
- Macedo, D.V., Ferraz, V.L., Pereira-da-Silva, L. and Vercesi, A. E. (1988). Ca^{2+} -dependent NAD(P) $^{+}$ -induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. In: *Integration of Mitochondrial Functions* (LeMasters, J.J. et al. eds.) pp535-542. Plenum Press, New York and London.

- Madeira, V.M.C. (1975). A rapid and ultrasensitive method to measure Ca^{2+} movements across biological membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**:870-876.
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P. and Denton, R.M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* **70**:391-425.
- McGuinness, O., Yafei, N., Costi, A. and Crompton, M. (1990). The presence of two classes of high-affinity cyclosporin A binding sites in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **194**:671-679.
- Means, A.R. and Rasmussen, C.D. (1988). Calcium, calmodulin and cell proliferation. *Cell Calcium.* **9**:313-319.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* **191**:144-148.
- Mitchell, P. and Moyle, M. (1969). Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **7**:471-484.
- Moore, C.L. (1971). Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**:298-305.
- Moore, G.A., Weis, M., Orrenius, S. and O'Brien, P.J. (1988). Role of sulfhydryl groups in benzoquinone-induced Ca^{2+} release by rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **267**:539-550.

- Morselli, A.L. and Pereira-da-Silva, L. (1992). Alterations to the permeability of plant and animal mitochondria submitted to Ca^{2+} releasing agents. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:569-574.
- Murphy, E., Coll, K., Rich, T.L. and Williamson, J.R. (1980). Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 255:660-6608.
- Nicholls, D.G. and Akerman, K. (1982). Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 683:57-88.
- Nicolli, A., Petronilli, V. and Bernardi, P. (1993), Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry.* 32:4461-4465.
- Nicotera, P., McConkey, D.J., Jones, D.P. and Orrenius, S. (1983). ATP stimulates Ca^{2+} uptake and increases the free Ca^{2+} concentrations in isolated rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:453-457.
- Novgorodov, S.A., Gudz, T.I., Jung, D.W. and Brierley, G.P. (1991). The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:33-38.
- Novgorodov, S.A., Gudz, T.I., Milgrom, Y.M. and Brierley, G.P. (1992). The permeability transition in heart mitochondria

is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A.
J.Biol.Chem. 267:16274-16282.

Orrenius, S., McConckey, D.J. and Nicotera, P. (1989). Role of calcium in oxidative cell injury. In: *Cell Calcium Metabolism* (Fiskum, G.ed.).

Panov, A.V. (1992). Regulation of specific and nonspecific ion conductivities of mitochondria by adenine nucleotide translocator. *Biokhimiya.* 57:483-493.

Panov, A.V., Filippova, S.N. and Lyakhovich, V.V. (1980). Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability to H⁺ and K⁺ ions. *Arch.Biochem.Biophys.* 199:420-426.

Petronilli, V., Cola, C. and Bernardi, P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. *J.Biol.Chem.* 268:1011-1016.

Pfeiffer, D.R., Broekemeier, K.M., Igbauba, U., Reers, M. and Riley, W.W. (1988). Permeability pathways of Ca²⁺ efflux from mitochondria: H⁺ specificity and reversibility of the permeability defect. In: *Cellular Ca²⁺ Regulation* (Pfeiffer et al.eds.)pp.15-23. Plenum Press New York and London.

Pfeiffer, D.R., Schmid, P.C., Beatrice, M.C. and Schmid, H.H.O. (1979). Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca²⁺ plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. *J.Biol.Chem.* 254:11485-11494.

- Rasmussen, H. and Waisman, D.M. (1983). Modulation of cell function in the calcium messenger system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 95:111-148.
- Rega, A.F. (1985). The Ca^{2+} homeostasis. In: *The Ca^{2+} pump of plasma membranes*. (Rega, A.F. and Garrahan, P.J. eds.) pp.13-20. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Richter, C., Winterhalter, K.H., Baumhuter, S., Lotscher, H.R. and Moser, B. (1983). ADP-ribosylation in inner membrane of rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 80:3188-3192.
- Richter, C. and Frei, B. (1988). Ca^{2+} release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Rad. Biol. & Med.* 4:365-375.
- Richter, C. and Kass, G.E.N. (1991). Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca^{2+} homeostasis, cell death, proliferation and differentiation. *Chem. Biol. Interactions.* 77:1-23.
- Riley, W.W. and Pfeiffer, D.R. (1985). Relationship between Ca^{2+} release, Ca^{2+} cycling and Ca^{2+} mediated permeability changes in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260:12416-12425.
- Riley, W.W. and Pfeiffer, D.R. (1986). The effects of Ca^{2+} and acyl Coenzyme A:lysophospholipid acyltransferase inhibitors on permeability properties of the liver mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 261:14018-14024.

- Rizzuto,R., Pitton,G. and Azzone,G.F. (1987). Effect of Ca^{2+} , peroxides, SH reagents, phosphate and aging on the permeability of mitochondrial membrane. *Eur.J.Biochem.* 162:239-249.
- Roos,L., Crompton,M. and Carafoli,E. (1980). The role of inorganic phosphate in the release of Ca^{2+} from rat liver mitochondria. *Eur.J.Biochem.* 110:319-325.
- Scarpa,A. and Azzone,G.F. (1970). The mechanism of ion translocation in mitochondria. *Eur.J.Biochem.* 12:328-335.
- Scherer,B. and Klingenberg,M. (1974). Demonstration of the relationship between the adenine nucleotide carrier and the structural changes of mitochondria as induced by adenosine 5'-diphosphate. *Biochemistry.* 13:161-170.
- Schlegel,J., Schweizer,M. and Richter,C. (1992). "Pore" formation is not required for the hydroperoxide-induced Ca^{2+} release from rat liver mitochondria. *Biochem.J.* 285: 65-69.
- Schonfeld,P (1990). Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? *FEBS lett.* 264:246-248.
- Sekar,C.M. and Hokin,L.E. (1986). The role of phosphoinositides in signal transduction. *J.Memb.Biol.* 89:193-210.
- Selwin,M.J., Dawson,A.P. and Dunnett,S.J. (1970). Calcium transport in mitochondria. *FEBS lett.* 10:1-5.

- Siliprandi,D., Toninello,A., Zoccarato,F., Rugolo,M. and Siliprandi,N. (1978). Efflux of magnesium and potassium ions from liver mitochondria induced by inorganic phosphate and by diamide. *J.Bioenerg.Biomembr.* 10:111.
- Sokolove,P.M. (1990). Inhibition by cyclosporin A and butylated hydroxytoluene of the inner mitochondrial membrane permeability transition induced by adriamycin aglycones. *Biochem.Pharmacol.* 40:2733-2736.
- Somlyo,A.P., Somlyo,A.V., Shuman,H., Scarpa,A., Endo,M. and Inesi,G. (1981). Mitochondria do not accumulate significant Ca^{2+} concentrations in normal cells. In: *Calcium and Phosphate transport across biomembranes.* (Bronner,F. and Peterlick,M.eds.)pp.87-93. Academic New York.
- Tager,J.M., Wanders,R.J.A., Groen,A.K., Kunz,W., Bohnensack,R., Kuster,U., Letko,G., Bohme,G., Duszynski,J and Wojtczak,D. (1983). Control of mitochondrial respiration. *FEBS lett.* 151:1-9.
- Tropschug,M. Nicholson,D.W., Hartl,F.U., Kohler,H., Pfanner,N., Wachter,E. and Neupert,W. (1988). Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of *Neurospora crassa*. *J.Biol.Chem.* 263:14433-14440.
- Trump,B.F. and Berezesky,I.K. (1989). Role of ion regulation in cell injury, cell death and carcinogenesis. In: *Cell Calcium Metabolism.* (Fiskum,G.ed.)pp.441-450.

- Tsien, R.Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*. 290:572.
- Unitt, J.F., McCormack, G., Reid, D., MacLachlan, L.K. and England, P.J. (1989). Direct evidence for a role of intramitochondrial Ca^{2+} in the regulation of oxidative phosphorylation in the stimulated rat heart. *Biochem.J.* 262:293-301.
- Vercesi, A.E. (1984). Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)^{+} -stimulated Ca^{2+} efflux from mitochondria. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 119:305-310
- Vercesi, A.E. (1987). The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* 252:171-178.
- Vercesi, A.E. (1993). Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. *Brazilian.J.Med.Biol.Res.* 26:441-457.
- Vercesi, A.E., Ferraz, V.L., Macedo, D.V. and Fiskum, G. (1988). Ca^{2+} -dependent NAD(P)^{+} -induced alteration of mitochondrial membrane permeability. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 154:934-941.
- Vercesi, A.E., Reynafarje, B. and Lehninger, A.L. (1978). Stoichiometric of H^{+} ejection and Ca^{2+} uptake coupled to

electron transport in rat heart mitochondria.

J.Biol.Chem. 253:6379-6385.

Vuokila, P.T. and Hassinen, I.E. (1988). *Fifth European Bioenergetics Conference*, Aberystwyth, Wales, EBEC reports, Vol.5, p.66

Weidemann, M.J., Erdelt, H. and Klingenberg, M. (1970). Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Identification of carrier sites. *Eur.J.Biochem.* 16:313-335.

Williams, D.A., Becker, P.L. and Fay, F.S. (1986). Regional changes in calcium underlying contraction of single muscle cells. *Science.* 235:1644-1648.

Wolkowicz, P.E. and McMillin-Wood, J. (1980). Dissociation between mitochondrial calcium ion release and pyridine nucleotide oxidation. *J.Biol.Chem.* 255:10348.

COMUNICACOES EM CONGRESSO

1. Macedo, D.V. and Pereira-da-Silva, L. (1990). "Involvement of adenine nucleotide translocase on permeability of the mitochondrial membrane". 6th European Bioenergetics Conference. The Netherlands, SIII-20.
2. Macedo, D.V., Vercesi, A.E. and Pereira-da-Silva, L. (1991). "Possible involvement of ADP/ATP carrier on the permeability of the mitochondrial membrane. XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu - MG.
3. Nepomuceno, M.F., Macedo, D.V. and Pereira-da-Silva, L. (1991). "Lipoperoxidação como parte do processo de permeabilização da membrana mitocondrial na presença de Ca^{2+} e agentes liberadores deste ion. VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu - MG.
4. Costa, C. and Macedo, D.V. (1992). "Impairment of ADP/ATP carrier activity and loses of ADP protective effect on permeability increase of inner mitochondrial membrane". XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu - MG.
5. Macedo, D.V., Nepomuceno, M.F., Costa, C. and Pereira-da-Silva, L. (1992). "The conformational changes of the ADP/ATP carrier induced by Ca^{2+} and Ca^{2+} releasing agents favours the lipoperoxidation of the inner mitochondrial

membrane". 7th European Bioenergetics Conference.
Helsinki - Finlandia.

6. Costa, C., Macedo, D.V. and Pereira-da-Silva, L. (1993).
"Participation of the ADP/ATP carrier on the permeability transition pore of liver mitochondria". XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu - MG.
7. Macedo, D.V., Costa, C. and Pereira-da-Silva, L. (1993).
"The mitochondrial ADP/ATP carrier is part of the permeability transition pore even in the absence of cyclophilin". Workshop New Perspectives in Mitochondrial Research. Padova, Itália.

PUBLICACOES

Brazilian J Med Biol Res (1991) 24: 833-836

ISSN0100-879X

SHORT COMMUNICATION

LIPOPEROXIDATION ASSOCIATED WITH MITOCHONDRIAL MEMBRANE PERMEABILIZATION IN THE PRESENCE OF Ca^{2+}

M.F. NEPOMUCENO, D.V. MACEDO and L. PEREIRA-DA-SILVA

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, 13081 Campinas, SP, Brasil*

Lipoperoxidation was investigated as a step for membrane protein thiol oxidation of rat liver mitochondria incubated in the presence of Ca^{2+} and t-butylhydroperoxide, by the determination of thiobarbituric acid reactive substances. Lipoperoxidation occurred only when the incubation medium contained 125 μM t-butylhydroperoxide (t-buOOH) in the presence of Ca^{2+} and phosphate (Pi). No lipoperoxidation was observed when acetate replaced Pi as permeant anion, or when the oxidant was omitted, even at high Ca^{2+} and Pi concentrations (up to 120 μM Ca^{2+} and 5 mM Pi), conditions under which the mitochondria are fully permeabilized. In both cases, ADP protected efficiently against permeabilization, indicating the possible involvement of the ADP/ATP carrier in the earlier stages of the process.

Key words: lipoperoxidation, hydroperoxides, membrane permeabilization, mitochondria, ADP/ATP translocase.

Lipoperoxidation in biological membranes is a degradative process (1) initiated by free radicals produced under conditions of oxidative stress (2). In isolated mitochondria, the peroxidation of membrane lipids causes swelling and Ca^{2+} release among other changes in mitochondrial functions (3). A large variety of agents are known to cause alterations in mitochondrial membrane permeability (1,4), and it has been questioned whether or not they share the same mechanism of action. Recently, it was shown that in the presence of Ca^{2+} and an oxidant such as t-butylhydroperoxide or diamide, changes in membrane permeability are associated with membrane protein thiol disulfide bond formation (i.e., covalent crosslinking) (5). Another group has proposed the involvement of oxygen radicals in the damage to the inner mitochondrial membrane under different experimental conditions leading to Ca^{2+} release (6).

The purpose of the present investigation was to study the occurrence of lipoperoxidation in isolated mitochondria incubated under oxidative conditions, in the presence of Ca^{2+} and t-butylhydroperoxide, or in the absence of an oxidant, using Ca^{2+} and inorganic phosphate (Pi), which is also known to be a Ca^{2+} releasing agent (7). The possible involvement of the ADP/ATP carrier in the permeabilization process under these conditions was also investigated.

Presented at the VI Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, August 21-25, 1991.

Research supported by FAEP (UNICAMP) (No. 107/90). Publication supported by FAPESP.

Correspondence: Dr. L. Pereira-da-Silva, Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13081 Campinas, SP, Brasil.

Liver mitochondria were isolated as described by Schneider and Hogeboom (8) from overnight fasted male Wistar rats weighing 200 to 250 g. The final mitochondrial pellet was resuspended in an isosmotic medium containing 250 mM sucrose and 3 mM Hepes, pH 7.2, and the protein content was determined by the biuret method modified by the addition of cholate. The lipoperoxidation experiments were carried out at 30°C in an incubation medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 3 mM Hepes, pH 7.2, 5 mM succinate, 4.0 μ M rotenone, and 1 mg mitochondrial protein per ml. All other additions are indicated in Table 1. When Pi was added it was pre-treated with Chelex as described by Buettner (9) to remove trace metal ions. After 10 min of incubation the mitochondrial suspension was centrifuged in an Eppendorf microcentrifuge. Samples of 0.5 ml of the supernatant were treated with 1.0 ml of a mixture containing 15% (w/v) trichloroacetic acid, 0.375% (w/v) thiobarbituric acid (TBA) and 0.25 N HCl, and mixed thoroughly. This solution was heated for 15 min at 80°C and, after cooling, the precipitate was removed by centrifugation at 1000 g for 10 min. The absorbance of the supernatant was determined at 535 nm and the concentration of TBA reactive substances (TBARS) was calculated using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (10). Mitochondrial swelling was followed spectrophotometrically by the decrease in absorbance at 520 nm. Mitochondria (1 mg protein/ml) were incubated in the same basic medium and all other additions are described in the legend to Figure 1.

The present experiments were performed under two distinct conditions. In the first case, mitochondria were treated with an oxidant, t-buOOH (11), in the presence of variable amounts of Ca^{2+} and Pi. Table 1A shows the TBARS production after 10 min of incubation under each specific condition. The largest amount of TBARS was detected when 30 μ M Ca^{2+} and 5 mM Pi were added under oxidative conditions. The presence of ADP during incubation decreased the TBARS formation by 40% while butylhydroxytoluene (BHT), a free-radical scavenger (12), inhibited almost all the lipoperoxidation. This inhibition provides evidence for mi-

Table 1 - Extent of lipoperoxide formation associated with rat liver mitochondrial membrane permeabilization.

Data are reported as means $\pm$ SD for 5 or more determinations, as nmol thiobarbituric acid reacting substances (TBARS)/mg protein for 10 min at 30°C. t-buOOH, t-Butylhydroperoxide; BHT, butylhydroxytoluene.

Conditions	nmol TBARS/mg protein
A - Basic medium containing 125 μM t-buOOH plus	
30 μ M Ca^{2+} + 5 mM Pi	3.7 $\pm$ 1.0
30 μ M Ca^{2+} + 5 mM Ac^-	0.3 $\pm$ 0.1
30 μ M Ca^{2+} + 5 mM Pi + 200 μ M ADP	2.2 $\pm$ 0.2
30 μ M Ca^{2+} + 5 mM Pi + 50 μ M BHT	0.30 $\pm$ 0.03
5 mM Pi	2.0 $\pm$ 0.2
0.5 mM EGTA + 5 mM Pi	0.25 $\pm$ 0.03
100 μ M Ca^{2+}	0.40 $\pm$ 0.05
100 μ M Ca^{2+} + 0.3 mM Pi	1.4 $\pm$ 0.3
B - Basic medium containing 5 mM Pi plus	
0.5 mM EGTA	0.2 $\pm$ 0.01
20 μ M Ca^{2+}	0.25 $\pm$ 0.06
30 μ M Ca^{2+}	0.25 $\pm$ 0.05
50 μ M Ca^{2+}	0.25 $\pm$ 0.06
70 μ M Ca^{2+}	0.27 $\pm$ 0.03
120 μ M Ca^{2+}	0.35 $\pm$ 0.05

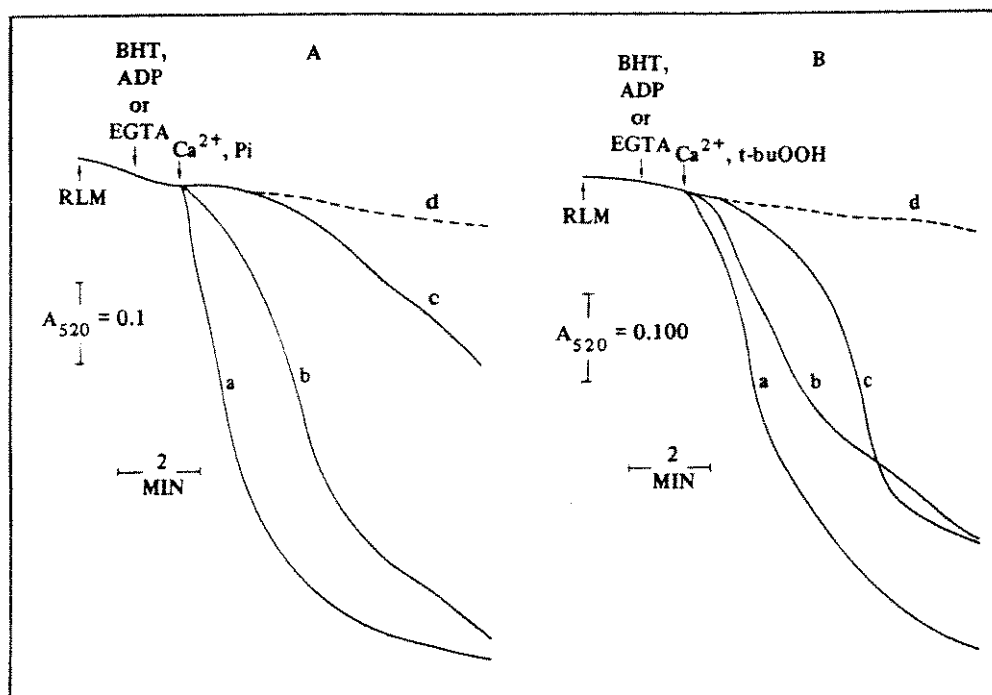


Figure 1 - Effect of ADP and butylhydroxytoluene on the swelling of rat liver mitochondria induced by Ca^{2+} plus phosphate or t-butylhydroperoxide. Mitochondria (1 mg protein/ml) were suspended in basic medium as described in the text and swelling was monitored by the decrease of absorbance at 520 nm. One minute before the addition of $30 \mu\text{M}$ Ca^{2+} plus 5 mM phosphate (Panel A) or $30 \mu\text{M}$ Ca^{2+} plus $50 \mu\text{M}$ t-buOOH (Panel B), the following additions were made (or not): (a) no other addition, (b) $50 \mu\text{M}$ BHT, (c) $200 \mu\text{M}$ ADP and (d) $500 \mu\text{M}$ EGTA. The initial absorbance of the mitochondrial suspension was 0.980 at 520 nm.

tochondrial membrane lipid peroxidation leading to significant alterations in membrane permeability, as shown by Fagian et al. (5). Lipoperoxidation is dependent on Ca^{2+} , as indicated by comparing the results obtained when Ca^{2+} concentrations were as low as that already present in the incubation medium (5 to $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+}) and in the complete absence of the ion (EGTA addition). The dependence on Pi for lipoperoxidation to occur under these conditions is an interesting original observation. When acetate (Ac^-) replaced Pi, almost no TBARS were detected, but a very low Pi concentration was enough to increase the lipoperoxidation. However, in the absence of the oxidant, as shown in Table 1B, 5 mM Pi did not cause a significant lipoperoxidation, even when associated with very high Ca^{2+} concentrations. Our result obtained in the absence of oxidant does not agree with the proposition of Carbonera and Azzone (6) who claim that the membrane permeabilization caused by Ca^{2+} plus Pi is due to an increase in the rate of formation of oxygen radicals via an enhancement of the electron leak in the respiratory chain. Although lipoperoxidation could not be detected in the absence of oxidant, the results in Figure 1 show that the same large extent of swelling was induced either by Ca^{2+} and t-buOOH or by Ca^{2+} and Pi.

Moreover, when the effect of ADP was compared with that of BHT, ADP was found to be more efficient in delaying the swelling process even under conditions where BHT abolished the lipoperoxidation. Since the protective effect of ADP is well known and has been attributed to its capacity to bind to adenine nucleotide translocase, turning the carrier to the matrix side (13), the present results suggest the involvement of the ADP/ATP carrier, at least during the onset of damage to the mitochondrial membrane. The finding that both ADP and BHT reduced the swelling observed when t-buOOH was present to the same extent permits us to propose that lipoperoxidation occurs only as one among other different components of the permeabilization process.

References

1. Bindoli A (1988). *Free Radical Biology & Medicine*, 5: 247-261.
2. Masaki N, Kyle ME & Farber JL (1989). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 269: 390-399.
3. Starke PE & Farber JL (1986). *Journal of Biological Chemistry*, 261: 3006-3012.
4. Gunter TE & Pfeiffer DR (1990). *American Journal of Physiology*, 258: C755-C786.
5. Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS & Vercesi AE (1990). *Journal of Biological Chemistry*, 265: 19955-19960.
6. Carbonera D & Azzone GF (1988). *Biochimica et Biophysica Acta*, 943: 245-255.
7. Beatrice MC, Palmer JW & Pfeiffer DR (1980). *Journal of Biological Chemistry*, 255: 8663-8671.
8. Schneider W & Hogeboom GH (1950). *Journal of Biological Chemistry*, 183: 123-128.
9. Buettner GR (1986). *Free Radical Research Communications*, 1: 349-353.
10. Wills ED (1969). *Biochemical Journal*, 113: 315-324.
11. Lotscher HR, Winterhalter RH, Carafoli E & Richter C (1979). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 76: 4340-4344.
12. Novgorod SA, Kultayeva EV, Yaguzhinsky LS & Lemesliko UV (1987). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 19: 191-202.
13. Lê-Quôc D & Lê-Quôc K (1989). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 273: 466-478.

Received April 4, 1991

Accepted August 7, 1991

Involvement of the ADP/ATP carrier in permeabilization processes of the inner mitochondrial membrane

Denise Vaz de MACEDO¹, Maria de Fátima NEPOMUCENO² and Lucia PEREIRA-DA-SILVA¹

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brazil

² Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, UNIMEP, Piracicaba, Brazil

(Received January 4/April 14, 1993) – EJB 93 0002/5

The effect of different agents on inner-mitochondrial-membrane permeabilization and lipoperoxidation induced by Ca^{2+} and the pyridine-nucleotide oxidant *t*-butylhydroperoxide or inorganic phosphate was investigated. Comparing the protection conferred by ADP, a substrate of the ADP/ATP carrier, dithiothreitol, a disulfide reductant and butylhydroxytoluene, a radical scavenger, it was found that ADP was always the most effective against mitochondrial damage, when present in the incubation medium from the beginning. Moreover, carboxyatractyloside, a specific inhibitor of the ADP/ATP carrier, abolished completely the protective effect of ADP on both the lipoperoxidation and mitochondrial swelling processes. Experiments where deenergized mitochondria were previously incubated with Ca^{2+} showed a decrease in the content of active ADP/ATP carrier, indicating a direct involvement of this protein in the formation of a non-specific Ca^{2+} -dependent pore. Our results also eliminate the possibility of an attack of oxygen radicals on lipids or proteins of the mitochondrial membrane as the primary event triggering the permeability transition of the inner mitochondrial membrane.

During the last two decades there have been several attempts to explain the mechanism of the Ca^{2+} -induced permeabilization of the inner mitochondrial membrane when the organelle is loaded with Ca^{2+} in the presence of so called Ca^{2+} -releasing agents [1–6]. Organic hydroperoxides, diamide or inorganic phosphate (P_i) have been used in most of these experiments, and different hypotheses arose to explain the observed permeabilization of mitochondria [1–6].

More recently, the oxidation of either proteins [6] or phospholipids [5] of the inner mitochondrial membrane has been proposed as the molecular mechanism involved in these permeabilization processes. Supporting this suggestion, it was observed that both dithiothreitol and butylhydroxytoluene are able to protect the mitochondria against the deleterious effects of Ca^{2+} and either prooxidants or P_i [5–8]. In fact, this was only partially corroborated by our previous results, which showed the occurrence of lipoperoxidation when the mitochondria were incubated in the presence of Ca^{2+} and hydroperoxide, but not when the incubation was performed under conditions of high concentrations of Ca^{2+} and P_i [9].

Since the first evidence was presented that the Ca^{2+} -induced permeabilization of mitochondria could be attributed to a reversible Ca^{2+} -activated pore [10], increasing amounts of data have been published supporting this hypothesis [11–13]. It was also shown that the removal of Ca^{2+} by the addition of EGTA was enough to reseal the mitochondrial mem-

brane [10, 11]. The protein or proteins responsible for the pore opening and closure have not yet been identified, and a good candidate for such role is the ADP/ATP carrier. It is already known that both ADP and ATP and also the specific ADP/ATP-carrier inhibitor bongkrekate, are able to protect the mitochondrial membrane against the permeabilization processes [14–16]. However, two other inhibitors of the ADP/ATP-carrier, atractyloside and carboxyatractyloside, amplify the damage [16, 17]. These findings were explained through the conformational changes that the carrier undergoes when its substrates [18] or bongkrekate [19, 20] are bound, turning it to the matrix side [18–20], or to the cytosolic side upon binding of atractyloside or carboxyatractyloside [18–21]. However, there is no agreement regarding a direct [22] or indirect [23] participation of the ADP/ATP carrier in the formation of the Ca^{2+} -dependent pore.

The data presented here compare the efficacy of ADP (ADP/ATP-carrier substrate), butylhydroxytoluene (a radical scavenger) and dithiothreitol (a disulfide reductant), as inhibitors of the mitochondrial permeabilization processes induced by Ca^{2+} and two different Ca^{2+} -releasing agents: the pyridine-nucleotide oxidant, *t*-butylhydroperoxide, [3] and P_i [1]. The occurrence of lipoperoxidation under these conditions was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of mitochondria

Liver mitochondria were isolated from overnight-fasted adult female Wistar rats, according to the procedure described in [24]. The mitochondrial pellet was resuspended in isosmotic buffer to give a final protein concentration of

Correspondence to L. Pereira-da-Silva, Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP, CP 6109, 13084-100, Campinas, SP, Brazil
Fax: +55 19 2393124.

Abbreviations. FCCP, carboxyl cyanide 4-trifluorophenylhydrazide; RLM, rat liver mitochondria; $\Delta\psi$, membrane electrical potential; TBARS, thiobarbituric-acid-reactive substances; GSH, reduced glutathione.

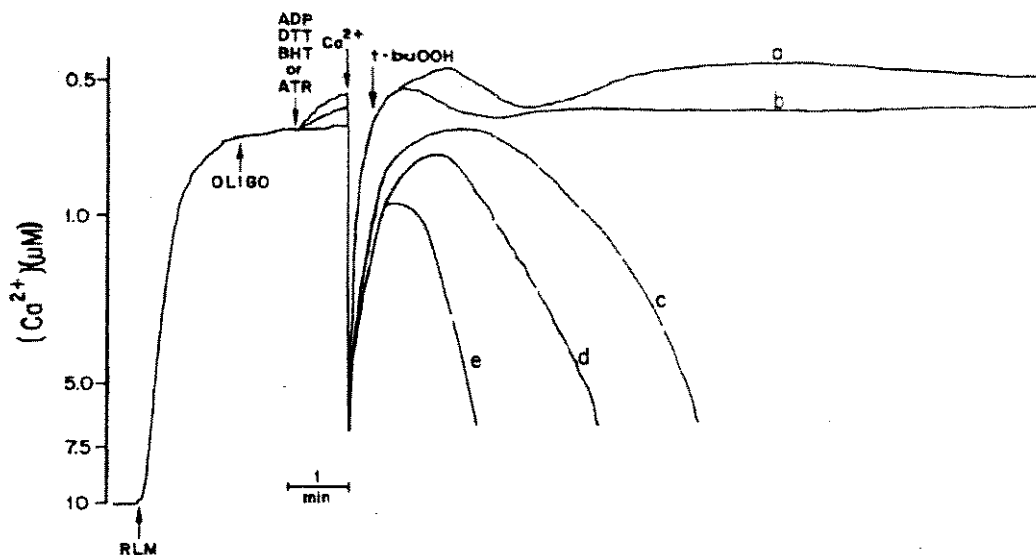


Fig. 1. Effect of ADP, dithiothreitol, butylhydroxytoluene and atractyloside on *t*-butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria (RLM). Mitochondria (1 mg/ml) were incubated under the standard conditions described in Materials and Methods, in the presence of 2.0 mM P_i . 1.0 μg oligomycin (oligo) was added where indicated. 1 min before the addition of 30 nmol Ca^{2+} /mg protein and 50 μM *t*-butylhydroperoxide (*t*-buOOH), 200 μM ADP (a); 1.0 mM dithiothreitol (DTT; b); 50 μM butylhydroxytoluene (BHT; c) or 50 μM atractyloside (ATR; e) was added. Trace (d) represents the control experiment where only Ca^{2+} and *t*-butylhydroperoxide were added after oligomycin.

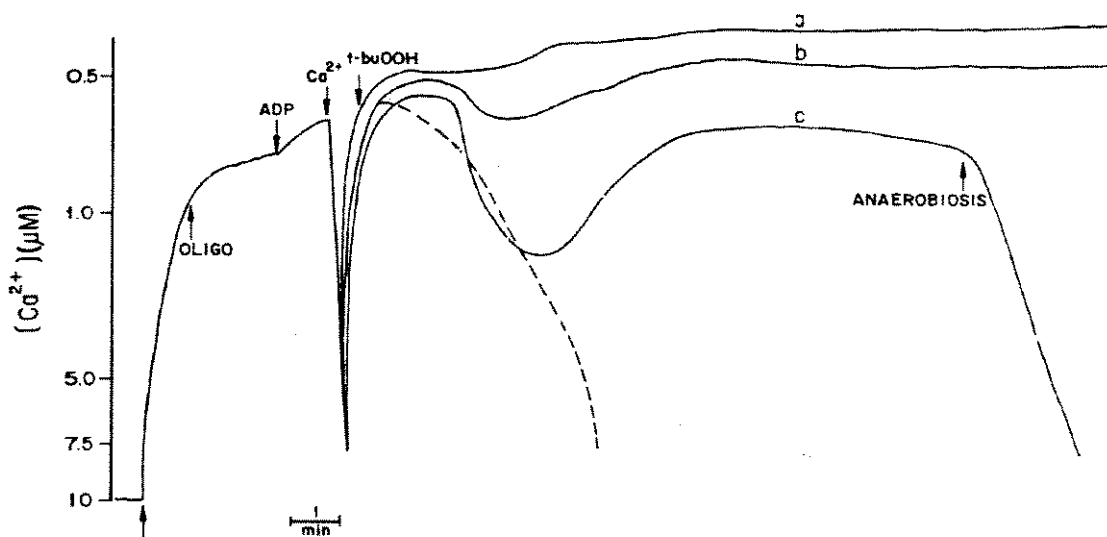


Fig. 2. The effect of ADP on *t*-butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria depends on the Ca^{2+} load. Mitochondria were incubated under the experimental conditions of Fig. 1, in the presence of 200 μM ADP, 50 μM *t*-butylhydroperoxide (*t*-buOOH) and different amounts of Ca^{2+} /mg protein: 30 nmol (a); 50 nmol (b) and 90 nmol (c). (—) The experiment of trace (c) in the absence of ADP.

80–100 mg/ml, determined by the biuret method modified by the addition of cholate [25].

Standard incubation conditions

The experiments were performed at 30°C, for 10–15 min, in basic medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.2, 2 mM succinate and 5 μM rotenone. The final mitochondrial protein concentration was 1 mg/ml. To observe the maximum protective effect of ADP, the mitochondrial content of ATP was increased by prior incubation with 2 mM P_i and addition of 1 μg oligomy-

cin/mg mitochondrial protein. This procedure enables a higher rate of adenine-nucleotide exchange when ADP is added to the external medium, favouring the binding of ADP to the ADP/ATP carrier, and turning it to the matrix side [18]. All other additions are described in the legends of the figures.

Determination of Ca^{2+} fluxes

Ca^{2+} uptake and efflux were followed measuring the free Ca^{2+} concentration in the incubation media using a Ca^{2+} -selective electrode (Radiometer, F2112, Calcium Selectrode). The calibrations were performed according to [26].

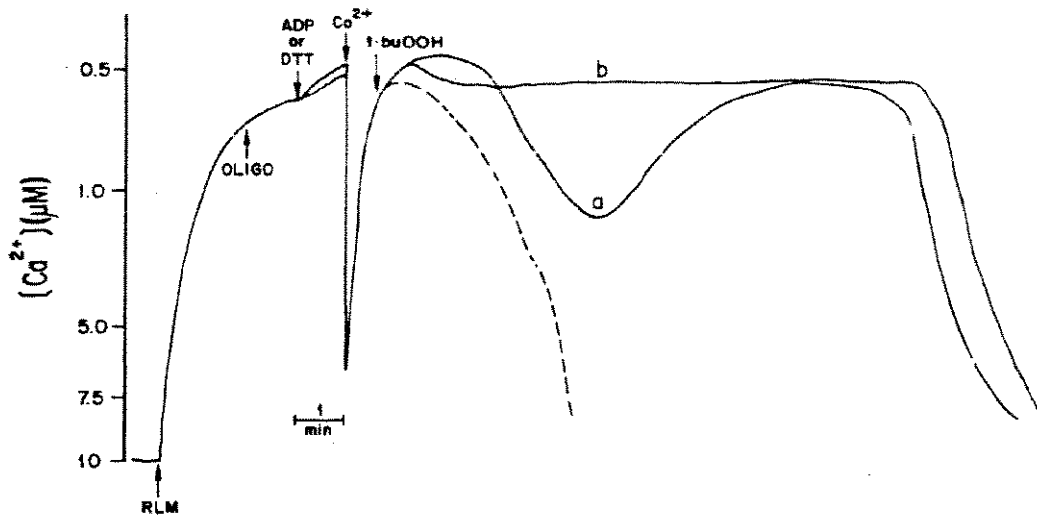


Fig. 3. Dithiothreitol is more effective than ADP in inhibiting the *t*-butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria at high concentrations of the oxidant. Mitochondria were incubated under the experimental conditions of Fig. 1, in the presence of 50 nmol Ca^{2+} /mg protein and 100 μM *t*-butylhydroperoxide (*t*-buOOH) (—), following the addition of 200 μM ADP (a) or 1.0 mM dithiothreitol (DTT) (b).

Estimation of changes in matrix volume

Mitochondrial swelling was followed spectrophotometrically by the decrease in absorbance at 520 nm [27].

Estimation of lipid peroxidation

The mitochondria were incubated under the standard conditions and Ca^{2+} plus P_i or *t*-butylhydroperoxide were added, as described in the figure legends. P_i was treated with Chelex to remove trace metal ions [28] prior to use. After different times of incubation at 30°C, the mitochondrial suspensions were centrifuged 2 min in an Eppendorf microcentrifuge. Samples of 0.5 ml of the supernatant were mixed with 1.0 ml 15% (mass/vol.) trichloroacetic acid, 0.375% (mass/vol.) thiobarbituric acid and 0.25 M HCl, in the presence of 90 μM butylhydroxytoluene [29] and heated for 15 min at 80°C. After cooling, the precipitate was removed by centrifugation and the absorbance of the supernatant was measured at 535 nm [30]. The concentration of thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) was calculated using the absorption coefficient $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [31]. This measurement may include TBARS arising from non-lipid sources [32].

Titration of active ADP/ATP carrier

The content of active ADP/ATP carrier in the inner mitochondrial membrane was estimated measuring the ADP stimulation of O_2 consumption by carboxyatractylsides, determined with a Clark electrode. Deenergized mitochondria were incubated at different Ca^{2+} concentrations for 3 min followed by the addition of 0.5 mM EGTA and 5 mM succinate. Carboxyatractylsides (200 pmol/mg) was used to titrate the state-3_{ADP} respiration. Other additions are specified in Table 1.

Chemicals

All reagents were purchased from Sigma Chemical Co. or were of similar purity.

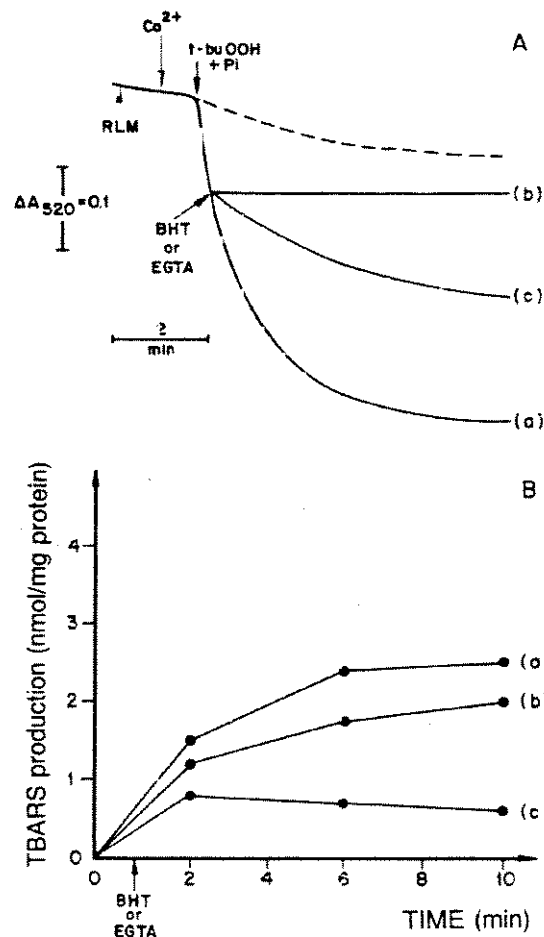


Fig. 4. Effect of EGTA and butylhydroxytoluene (BHT) on mitochondrial swelling (A) and TBARS production (B) in rat liver mitochondria (RLM). Mitochondria were incubated in the presence of 30 nmol Ca^{2+} /mg protein and 200 μM *t*-butylhydroperoxide (*t*-buOOH)/5 mM P_i (a) and 0.5 mM EGTA (b) or 50 μM butylhydroxytoluene (BHT) (c) were added where indicated. The dashed line represents the experiments where only Ca^{2+} and P_i were added, in the absence of the oxidant.

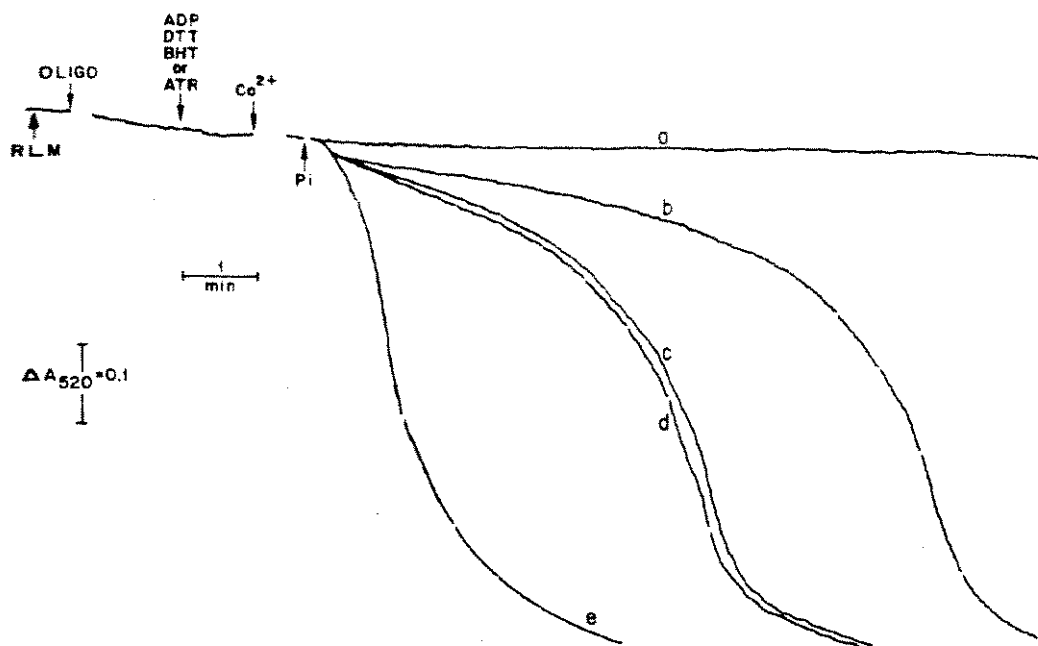


Fig. 5. Effect of ADP, dithiothreitol, butylhydroxytoluene and atractyloside on Ca^{2+} plus P_i -induced swelling in rat liver mitochondria. Mitochondria were incubated under the experimental conditions of Fig. 1. 1 min before the addition of 50 nmol Ca^{2+} /mg protein and 8 mM P_i , 200 μM ADP (a); 1 mM dithiothreitol (DTT; b); 50 μM butylhydroxytoluene (BHT; c) or 50 μM atractyloside (ATR; e) were added. Trace (d) represents the control experiment where only Ca^{2+} and P_i were added after oligomycin (OLIGO).

RESULTS

Ca^{2+} efflux from mitochondria incubated under oxidative conditions

When rat liver mitochondria are loaded with 50 nmol Ca^{2+} /mg protein in the presence of 50 μM *t*-butylhydroperoxide they lose the accumulated Ca^{2+} very fast, as shown in Fig. 1. This efflux is inhibited by both ADP or dithiothreitol, which are able to prevent the Ca^{2+} release from these mitochondria to the same extent. In the presence of these agents, the mitochondria are able to retain the accumulated Ca^{2+} for long periods, up to 30 min (data not shown). However, butylhydroxytoluene causes only a delay of the Ca^{2+} efflux, whereas atractyloside, as expected [18–21], increases the efflux. This protection conferred by ADP is highly dependent on *t*-butylhydroperoxide concentration, and when the amount of oxidant was low enough to cause only a transient oxidation of the pyridine nucleotide and reduced glutathione (GSH) pools [33], ADP was able to prevent Ca^{2+} release even in very high Ca^{2+} concentrations, as shown in Fig. 2. Under these conditions, in the presence of ADP, the combined addition of 50 μM *t*-butylhydroperoxide and up to 90 nmol Ca^{2+} /mg protein causes only a transient Ca^{2+} efflux. However, dithiothreitol is more effective in protecting the mitochondria from damage at higher concentrations of the oxidant, when compared to ADP, as shown in Fig. 3.

Occurrence of lipoperoxidation under oxidative conditions

In these experiments the mitochondria were incubated in the presence of Ca^{2+} and *t*-butylhydroperoxide and the damage to the mitochondrial membrane was also estimated following the mitochondrial swelling (Fig. 4A) and determining the TBARS formation under these experimental conditions (Fig. 4B). It was observed that when butylhydroxytoluene was added after the onset of mitochondrial permeabilization,

although the lipoperoxidation process was completely inhibited (Fig. 4B) the same did not happen regarding the mitochondrial swelling (Fig. 4A). However, the addition of EGTA immediately inhibits the mitochondrial swelling (Fig. 4A) but does not prevent the lipoperoxidation (Fig. 4B). Similar results were obtained when EGTA or butylhydroxytoluene were added to the mitochondria before the addition of Ca^{2+} and *t*-butylhydroperoxide (data not shown).

Swelling of mitochondria incubated in the presence of Ca^{2+} and P_i

When P_i replaced the oxidant as the Ca^{2+} -releasing agent, as shown in Fig. 5, only ADP was able to completely prevent the increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane evaluated by recording the mitochondrial swelling. In these experiments it is also observed that dithiothreitol was only able to delay the first phase of the process whereas butylhydroxytoluene showed no significant effect. Here again, atractyloside, as expected, accelerated the combined effect of Ca^{2+} and P_i .

Carboxyatractyloside abolishes the protective effect of ADP

The protective effect of ADP was specific for adenine nucleotides and indeed it was observed that GDP increased the damage (data not shown). Moreover, atractyloside always amplified the deleterious effect of Ca^{2+} under both conditions studied here, independent of whether an oxidant (Fig. 1) or P_i (Fig. 5) was used. The experiments depicted in Fig. 6 show that the addition of carboxyatractyloside, when ADP was observed to be capable of protecting the mitochondria from swelling (Fig. 6A) and lipoperoxidation (Fig. 6B) induced by Ca^{2+} and *t*-butylhydroperoxide, completely abolishes the ADP effect (Fig. 6A and B).

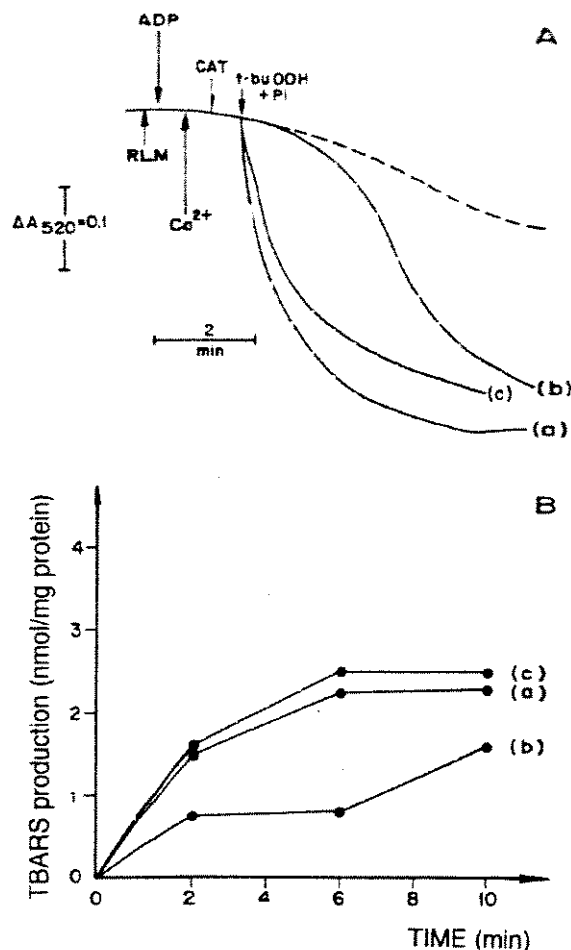


Fig. 6. Carboxyatractyloside abolishes the protective effect of ADP on mitochondrial swelling (A) and lipoperoxidation (B) in rat liver mitochondria (RLM). Mitochondria were incubated in the presence of 30 nmol Ca²⁺/mg protein and 200 μM *t*-butylhydroperoxide (*t*-buOOH) plus 5 mM P_i (a) with the addition of 200 μM ADP (b) or 200 μM ADP and 10 μM carboxyatractyloside (CAT; c) where indicated. The dashed line represents the experiment where only Ca²⁺ and P_i were added.

Titration of active ADP/ATP carrier in mitochondria previously incubated with Ca²⁺ under deenergized conditions

The results summarized in Table 1 show that the activity of ADP/ATP carrier was highly dependent on the amount of Ca²⁺ present in the incubation medium before energization of the mitochondria. The state-3_{ADP} respiration rate was 60% inhibited at 50 μM Ca²⁺ in the prior incubation medium. However, the rate of O₂ consumption was restored to values very close to the control level under three distinct conditions: the addition of either Ruthenium red or cyclosporin A to the prior incubation medium, or the addition of an uncoupler carboxyl cyanide 4-trifluorophenylhydrazone (FCCP) after the ADP-induced stimulation of O₂ consumption. It is interesting to observe that the same carboxyatractyloside concentration sufficient to inhibit only about 25% of the active ADP/ATP carrier, in the presence of EGTA, inhibits almost completely the state-3_{ADP} respiration when the mitochondria were previously incubated in the presence of 50 μM Ca²⁺.

DISCUSSION

Our results clearly dissociate the occurrence of lipoperoxidation from the processes of mitochondrial inner-mem-

Table 1. Estimation of the ADP/ATP carrier activity after incubation of deenergized mitochondria under different Ca²⁺ concentrations. Deenergized mitochondria (1 mg protein) were incubated at 30°C in 1 ml of basic medium without succinate. After 3 min, 0.5 mM EGTA and 5 mM succinate were added and carboxyatractyloside (200 pmol/mg) was used to titrate the state 3_{ADP} respiration. When used, 1 mM dithiothreitol and 5 μM Ruthenium red or 1 μM cyclosporin A were added to the incubation medium. FCCP (0.8 μM) was added after 1 mM ADP.

Experimental conditions	Rate of O ₂ consumption in		
	state 4	state 3 _{ADP}	state 3 _{FCCP}
	ng O ₂ · mg ⁻¹ · min ⁻¹		
0.5 mM EGTA	63.9	336.6	
0.5 mM EGTA/carboxyatractyloside		191.7	
10 μM Ca ²⁺	70.8	340.0	
10 μM Ca ²⁺ /carboxyatractyloside		190.8	
50 μM Ca ²⁺	71.0	142.0	
50 μM Ca ²⁺ /carboxyatractyloside		85.2	
50 μM Ca ²⁺ /dithiothreitol	70.9	128.0	
50 μM Ca ²⁺ /FCCP	71.0	142.0	338.5
50 μM Ca ²⁺ /Ruthenium red	65.8	341.2	
50 μM Ca ²⁺ /cyclosporin A	70.8	344.3	
0.5 mM EGTA/ carboxyatractyloside /cyclosporin A	64.5	345.9	

brane permeabilization, in agreement with our previously reported observations [9]. Although Ca²⁺ is essential to the observation of mitochondrial swelling in the presence of *t*-butylhydroperoxide, in Fig. 4 we show that cation chelation by EGTA inhibits this process completely, without any significant decrease in the production of TBARS, indicating that once the lipoperoxidation starts it cannot be stopped simply by the removal of Ca²⁺. Moreover, the addition of a radical scavenger, butylhydroxytoluene, is enough to block the lipoperoxidation process, without further production of TBARS, as expected, but its effect on mitochondrial swelling is only partial. These results suggest that lipoperoxidation is not the primary event leading to mitochondrial permeabilization, and they do not support the general mechanism proposed by Carbonera et al [5, 34]. Moreover, it seems that the observed production of TBARS under our experimental conditions is not enough to open pores in the mitochondrial membrane.

Other experiments reported here compare the ability of different agents to inhibit the mitochondrial permeability transition, as shown in Figs 1 and 5. In both experimental conditions, inducing the mitochondrial damage using either Ca²⁺ and an oxidant, *t*-butylhydroperoxide, or Ca²⁺ and P_i, ADP was shown to be the more effective with respect to protection against the observed mitochondrial permeabilization. Dithiothreitol, which acts by maintaining sulfhydryl groups in the reduced state, was able to inhibit the damage only under oxidative conditions, supporting once more the conclusion that, although in the presence of Ca²⁺ and P_i there is an increase in oxygen consumption by the mitochondria and this can be followed by an enhancement of the electron leak, this condition does not result in significant oxidation of membrane proteins. Indeed, the explanation of mitochondrial damage through oxygen-radical attack on the lipids and proteins of the membrane can be ruled out by the small effect of butylhydroxytoluene as a protectant in the experiments

described in Figs 1 and 5. These findings suggest that this oxidation occurs as a second step of the permeability transition, leading to a general loss of the membrane integrity.

Our results also strongly suggest the involvement of ADP/ATP carrier in the process of pore opening, and are corroborated by the experiments shown in Fig. 6 where we demonstrate that the addition of carboxyatractyloside to the mitochondria previously incubated in the presence of ADP reverses completely the protective effect of ADP towards not only the mitochondrial swelling, but also to the peroxidation of membrane lipids. This seems to indicate that the binding of Ca^{2+} to inner sites when ADP/ATP carrier is in the c conformational state favours the attack of free radicals on membrane lipids. Further corroboration of the ADP/ATP-carrier participation in the pore formation arises from the data presented in Table 1, showing that under very low membrane electrical potential ($\Delta\psi$) values, the presence of Ca^{2+} is sufficient to decrease the activity of the ADP/ATP carrier. As expected, Ruthenium red prevented the effect of Ca^{2+} and the addition of FCCP restored the rate of O_2 consumption to the control level, indicating that the observed inhibition of the ADP-stimulated respiration rate was indeed due to an inhibition of the ADP/ATP-carrier activity. It was also shown that dithiothreitol was not able to prevent the effect of Ca^{2+} on the ADP/ATP carrier. However, cyclosporin A, an immunosuppressant known to inhibit the pore opening [13, 35, 36], completely prevented the loss of activity of the ADP/ATP carrier under our experimental conditions. Very recently, it was shown that the effect of cyclosporin A can be modulated by the interaction of ADP with a carboxyatractyloside-insensitive, low-affinity site [36]. This favours the original idea of Hunter and Haworth [37] of the existence of two independent although interactive structures in the inner mitochondrial membrane: the Ca^{2+} -dependent pore and the ADP/ATP carrier. However, another group proposes that the ADP/ATP carrier could be this putative pore [22, 35]. Our results show that, in deenergized mitochondria the incubation with Ca^{2+} leads to a decrease in the content of active ADP/ATP carrier and interestingly, recent data from Bernardi [38] suggest that the collapse of $\Delta\psi$ may be the cause of the pore opening. As dithiothreitol does not prevent the effect of Ca^{2+} under these conditions, it seems that although the carrier presents at least two thiol groups [18], they are not involved in this mechanism of pore opening. The finding that cyclosporin prevented the Ca^{2+} -induced inactivation of ADP/ATP carrier, seems good evidence that this protein is part of the non-specific Ca^{2+} -dependent pore.

This work was supported by the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP), grant 91/1278-1.

REFERENCES

1. Beatrice, M. C., Palmer, J. W. & Pfeiffer, D. R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8663–8671.
2. Lehninger, A. L., Vercesi, A. E. & Bababunmi, E. A. (1978) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75, 1690–1694.
3. Lohscher, H. R., Winterhalter, K. H., Carafoli, E. & Richter, C. (1980) *Eur. J. Biochem.* 110, 211–216.
4. Rizzuto, R., Pitton, G. & Azzone, G. F. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 239–249.
5. Carbonera, D. & Azzone, G. F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 943, 245–255.
6. Fagian, M. M., Pereira da Silva, L., Martins, I. S. & Vercesi, A. E. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19955–19960.
7. Macedo, D. V., Ferraz, V. L., Pereira da Silva, L. & Vercesi, A. E. (1988) in *Integration of mitochondrial function* (Lemasters, J. J., ed.) pp. 535–542, Plenum Publishing Corp., New York.
8. Bindoli, A. (1988) *Free Radical Biol. & Med.* 5, 247–287.
9. Nepomuceno, M. F., Macedo, D. V. & Pereira da Silva, L. (1991) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24, 833–836.
10. Al-Nasser, I. & Crompton, M. (1986) *Biochem. J.* 239, 19–29.
11. Crompton, M., Costi, A. & Hayat, L. (1987) *Biochem. J.* 245, 915–918.
12. Crompton, M. & Costi, A. (1988) *Eur. J. Biochem.* 178, 489–501.
13. Crompton, M. & Costi, A. (1990) *Biochem. J.* 266, 33–39.
14. Harris, E. J., Al-Shaikhly, M. & Baum, H. (1979) *Biochem. J.* 182, 455–464.
15. Vercesi, A. E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 305–310.
16. Lê Quôc, K. & Lê Quôc, D. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 249–257.
17. Nicholls, D. G. & Brand, M. (1980) *Biochem. J.* 188, 113–118.
18. Klingenberg, M. (1976) in *The enzymes and biological membranes: membrane transport* (Martonosi, A. N., ed.) vol. 3, pp. 383–438, Plenum Press, New York.
19. Klingenberg, M., Riccio, P. & Aquila, H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 503, 193–210.
20. Aquila, H., Eiermann, W., Babel, W. & Klingenberg, M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 85, 549–560.
21. Vignais, P. V., Block, M. R., Brandolin, G. & Lauquin, G. J. M. (1982) in *Membranes and transport* (Martonosi, A. N., ed.) vol. 1, pp. 408–413, Plenum Press, New York.
22. Halestrap, A. P. & Davidson, A. M. (1990) *Biochem. J.* 268, 152–160.
23. Novgorodov, S. A., Gudiz, T. I., Jung, D. W. & Brierley, G. P. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 33–38.
24. Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H. (1951) *J. Biol. Chem.* 183, 123–128.
25. Gornal, A. G., Barwill, C. I. & David, M. M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751–757.
26. Burgess, G. M., McKinney, J. S., Fabiato, A., Leshie, B. A. & Pitney, S. W. Jr (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 15336–15345.
27. Nicholls, D. C. & Akerman, K. (1982) *Biochem. Biophys. Acta* 49, 105–121.
28. Buettner, G. R. (1986) *Free Radical Res. Commun.* 1, 349–353.
29. Packer, J. E., Slater, T. F. & Wilson, R. F. (1979) *Nature* 278, 737–739.
30. Buege, J. A. & Aust, S. D. (1979) *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
31. Wills, E. D. (1969) *Biochem. J.* 113, 315–324.
32. Janero, D. R. & Burghardt, B. (1988) *Lipids* 23, 452–458.
33. Bernardes, C. F., Pereira da Silva, L. & Vercesi, A. E. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 850, 41–48.
34. Carbonera, D., Angrilli, A. & Azzone, G. F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 936, 139–147.
35. Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. (1991) *Biochem. J.* 274, 611–614.
36. Novgorodov, S. A., Gudiz, T. I., Milgrom, Y. M. & Brierley, G. P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 16274–16282.
37. Hunter, D. R. & Haworth, R. A. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 453–467.
38. Bernardi, P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 8834–8839.

THE MITOCHONDRIAL ADP/ATP CARRIER IS PART OF THE
PERMEABILITY TRANSITION PORE EVEN IN THE ABSENCE OF
CYCLOPHILIN.

Denise Vaz de MACEDO, Caetano da COSTA and Lucia
PEREIRA-DA-SILVA.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia,
UNICAMP, Campinas, S.P. Brazil.

Subdivision: Membranes and Bioenergetics.

Correspondence to: Lucia Pereira-da-Silva, Departamento
de Bioquímica, IB, UNICAMP, CP6109, 13084-100, Campinas, SP,
Brazil. Telephone:55-0192-397886, Fax:55-192-393124 (This
may be published).

Submitted to European Journal of Biochemistry
(27/07/93)

ABBREVIATIONS

(AAC) ADP/ATP carrier; (CAT) carboxyatractyloside;
(CsA) cyclosporin A; (DTT) dithiothreitol; (EGTA) ethylene
glycol (B-aminoethylether) N,N' tetracetic acid; (RR)
ruthenium red; (RLM) rat liver mitochondria; : (SMP)
submitochondrial particles; (TPP⁺) tetraphenylphosphonium;
(TPB⁻) tetraphenylboron.

ABSTRACT

The participation of the ADP/ATP carrier on the permeability transition pore opening in mitochondria and submitochondrial particles was investigated. When incubated with high Ca^{2+} concentrations in the presence of inorganic phosphate, a collapse on the transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$) is observed in rat liver mitochondria. Both ADP and cyclosporin A protect the mitochondria against this collapse of $\Delta\psi$, but we show that whereas ADP loses its protective effect under low $\Delta\psi$, cyclosporin A is still able to revert the decrease in $\Delta\psi$, even in the presence of carboxyatractyloside. Our results show evidences that the carrier can be converted into this pore due to its Ca^{2+} -induced inactivation. Moreover, cyclosporin A was able to revert this effect, under the same conditions where it prevents the pore opening. The existence of such cyclosporin A-sensitive pore in submitochondrial particles was also described, discarding cyclophilin as mediator of the whole process. The present data support also the existence of two binding sites for Ca^{2+} in the mitochondrial inner membrane, with opposite effects on the pore formation.

INTRODUCTION

The inner mitochondrial membrane contains specific transport systems and represents a permeability barrier to most metabolites and small ions [1]. Different groups presented enough evidence that when mitochondria are exposed to high Ca^{2+} concentrations associate with one of a large variety of permeabilization inducing agents, a non selective permeability transition pore is opened [2-7]. This pore Ca^{2+} -dependent presents a diameter of at least 2.8nm [8] and several authors have shown that its opening is inhibited by cyclosporin A [6,9-14] and, more recently, also by spermine [15], or even by simple chelation of the cation [5,16]. All these data support the idea that the permeability transition results of alteration of a membrane specific component that can be regulated [9,14,17-20] and not from a non specific collapse of a permeability barrier in mitochondria [5]. Recent data show that one of the events that trigger the pore opening is the membrane depolarization and suggest the existence of at least two distinct Ca^{2+} binding sites, involved in the regulation of the pore: an external site that upon Ca^{2+} binding favours the closure of the pore, an internal binding site that upon Ca^{2+} binding favours the opening of the pore and also of an independent site, to which cyclosporin A can bind, inhibiting the pore opening [18-20].

Several attempts have been made to correlate this permeability transition pore with specific components of the inner mitochondrial membrane, as the mitochondrial megachannel [6,21,22], or the adenine nucleotide carrier [9,23,24]. The participation of this latter protein on mitochondrial permeabilization processes was already proposed [25,26], based on the finding that when the

nucleotide binding site of the ADP/ATP carrier is turned outside, to the cytosol (c conformation), as in the presence of the inhibitors atractyloside and carboxyatractyloside, there is an increase of the damage caused by Ca^{2+} and permeabilizing agents [25,27]. On the other hand, either in the presence of the substrates ADP and ATP or the inhibitor bongkrekate, the nucleotide binding site is turned to the matrix (m conformation), and under this condition occurs a significant protection against the permeabilization processes [26,28]. Presently, two different proposals try to correlate the ADP/ATP carrier and the permeability transition pore. The pioneer work of Hunter and Haworth suggested the existence of two distinct although interactive structures [3,29]. Supporting this hypothesis, it was recently shown that even when carboxyatractyloside was added to the mitochondria, ADP, providing that cyclosporin A was also presented, was still able to revert the pore opening [10,14]. This suggests a synergistic action between ADP and cyclosporin A, promoting the closure of the permeability transition pore, and the existence of another ADP binding site, which might be the Ca^{2+} -dependent pore [14]. However, other authors proposed that the ADP/ATP carrier itself could be converted into this nonspecific pore [9,30]. According to this hypothesis, the pore would open when the mitochondria matrix protein cyclophilin was bound to the ADP/ATP carrier in the c conformation state, in the presence of Ca^{2+} . These same authors showed that cyclosporin A was able to bind cyclophilin, thus avoiding its interaction with the ADP/ATP carrier and consequently preventing the pore opening [9].

Recently, we have compared the ability of ADP (substrate for the ADP/ATP carrier), dithiothreitol (disulfide reductant), and butyl hydroxytoluene (radical scavenger) in protecting the mitochondria from the Ca^{2+} -

induced permeability transition in the presence of either inorganic phosphate or the pyridine nucleotide oxidant (butylhydroperoxide) and we have shown that under all the different experimental conditions, ADP was the most efficient, supporting the idea of a primary involvement of the ADP/ATP carrier with the pore formation [17,31]. Now, we report the investigation of the ADP/ATP carrier activity in mitochondria incubated at low membrane electrical potential, condition under which ADP loses its ability of protecting against the membrane damage induced by Ca^{2+} [9,17,32]. Part of these results were presented as a poster abstract [33]. The data presented here provide good evidence of a Ca^{2+} -induced inactivation of the ADP/ATP carrier, suggesting its direct involvement in the pore formation. The effect of cyclosporin A on the permeability transition in both mitochondria and submitochondrial particles was also studied, and evidence is provided for the existence of two binding sites for Ca^{2+} in the mitochondrial inner membrane, as very recently proposed [19,20]. Our results also discard cyclophilin as mediator of the pore opening.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of mitochondria

Liver mitochondria were isolated as described in [34], from overnight fasted female Wistar rats weighing approximately 200g. The mitochondrial pellet was resuspended in a medium containing 250mM sucrose and 10mM Hepes, pH 7.4, and the protein concentration was determined by the biuret method modified by the addition of cholate [35], using serum albumin as standard.

Preparation of submitochondrial particles from liver mitochondria

The submitochondrial particles were obtained according to the procedure described in [36], with minor modifications. Frozen liver mitochondria were diluted in 250mM sucrose, 3mM ATP, 3mM $MgCl_2$, pH 7.4 to a final protein concentration of approximately $30mg.ml^{-1}$. This suspension was sonicated three times for 45 sec, with intervals of 1 min in an ice bath. It was then centrifuged at $17.000xg$ for 15 min and the pellet was discarded. The supernatant was centrifuged at $105.000xg$ for 1 h and the pellet was washed twice under the same conditions. The final pellet was resuspended in 250mM sucrose, 10mM Tris-HCl pH 7.4, to give a final protein concentration of approximately $30mg.ml^{-1}$.

Measurements of transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$).

The generation of $\Delta\psi$ was measured in isolated mitochondria from the distribution of the lipophilic cation tetraphenylphosphonium (TPP^+) and in submitochondrial particles from the distribution of the lipophilic anion tetraphenylboron (TPB^-), using respectively a TPP^+ -selective electrode [37] or a TPB^- -selective electrode [38]. In these experiments, isolated mitochondria (1mg) were incubated at $30^\circ C$ in 1ml of medium containing 250mM sucrose, 10mM Hepes pH 7.2, 5mM succinate, 5uM rotenone, 5mM P_i and 3uM TPP^+ followed by the addition of $0.5ug$ oligomycin. mg^{-1} protein. This procedure increases the endogenous content of ATP [39], favouring the exchange with externally added ADP. When submitochondrial particles were used, they (0.5mg) were previously incubated at $30^\circ C$ for 3 min in 1ml of medium containing 250mM sucrose, 10mM Tris-acetate pH 7.4 and 3uM TPB^- , and energized upon addition of 5mM NADH. This procedure prevented a non specific response of the

electrode. In both cases, all other additions are specified in the figure legends.

Oxygen consumption

The mitochondrial respiration was measured by the polarographic determination of the O_2 consumption using a Clark-type electrode.

Determination of active ADP/ATP carrier in the mitochondrial inner membrane

The content of active ADP/ATP carrier was determined using the competitive inhibitor carboxyatractyloside (CAT), known to bind the carrier with a stoichiometry of 1:1 [40]. The titration of the respiratory state 3_{ADP} with carboxyatractyloside gives a good estimation of the content of active ADP/ATP carrier in the mitochondrial inner membrane [17,41]. To simulate a low $\Delta\psi$ condition, the mitochondria (1mg) were pre-incubated at 30°C for 3 min in 1 ml of medium containing 125mM sucrose, 65mM KCl, 10mM Hepes pH 7.2, no added respiratory substrate and three different Ca^{2+} concentrations (10, 30 and 50 nmoles Ca^{2+} .mg⁻¹ protein). After this, Ca^{2+} was chelated by 0.5mM EGTA and then succinate 5mM and ADP 1mM were added, followed by the other additions indicated in the figure legends.

Chemicals

All reagents were purchased from Sigma Chemical Co. or were of similar purity grade. Cyclosporin A was a generous gift from Sandoz do Brasil.

RESULTS

The protective effects of ADP and Cyclosporin A on collapse of $\Delta\psi$ in liver mitochondria are distinct.

The addition of Ca^{2+} and Pi to rat liver mitochondria causes an immediate collapse of $\Delta\psi$, as shown in Figure 1. Complete protection is observed when ADP was added before the addition of Ca^{2+} and Pi , and partial protection is observed if the addition of ADP occurred during the decrease of $\Delta\psi$. However, after complete collapse of $\Delta\psi$, ADP loses its protective effect. These results are in agreement with other literature data reporting that in the absence of a detectable U, ADP not only loses its protective effect, but also stimulates the pore opening [32]. It was proposed that ADP, under these conditions, would promote the interconversion of the m to c conformations of the ADP/ATP carrier, thus favouring the permeability transition in the mitochondria [9].

The same experiment performed replacing ADP for cyclosporin A shows that the later is still able to revert the process even when added after the collapse of $\Delta\psi$, as can be observed in Figure 2. Moreover, carboxyatractyloside, known inhibitor of the ADP/ATP carrier [25] does not prevent the effect of cyclosporin A even when added before this drug. However, when both cyclosporin A and ADP are present in the reaction medium, the addition of carboxyatractyloside induces a partial decrease of $\Delta\psi$, as shown in Figure 3. These results indicate distinct mechanisms for the protection conferred by ADP and cyclosporin A on Ca^{2+} plus Pi induced collapse of $\Delta\psi$ in liver mitochondria.

Cyclosporin A prevents the Ca^{2+} -dependent loss of active ADP/ATP carrier in deenergized mitochondria.

When liver mitochondria are incubated with Ca^{2+} in the absence of any exogenous respiratory substrate, there is a

decrease on the content of active ADP/ATP carrier in the mitochondrial inner membrane as shows the titration of the respiratory state 3_{ADP} with carboxyatractyloside in the experiments depicted in Figure 4. This inactivation is highly dependent on the concentration of Ca^{2+} available during the incubation phase, as the excess of Ca^{2+} is chelated with EGTA immediately before the addition of respiratory substrate to these mitochondria. Recently, we have shown that the effect of Ca^{2+} on the ADP/ATP carrier is the cause of such inactivation and it occurs independently of oxidation of the thiol groups of this protein [17].

The results shown in Figure 5 indicate that this loss of activity is prevented when cyclosporin A was added to the incubation medium. It is clear that the effect of cyclosporin A under these conditions, is not in activating the ADP/ATP carrier, but in abolishing the specific effect of Ca^{2+} . This is a good evidence that cyclosporin A acts as an inhibitor of the pore by preventing the effect of the cation on the carrier.

Cyclophilin is not involved on the protective effect of cyclosporin A

The effect of cyclosporin A either preventing the pore formation or inducing its closure, has been tentatively explained as a direct interaction of the drug with a matrix protein, cyclophilin, involved in the pore opening [9,30,42]. To test this hypothesis we have performed experiments with submitochondrial particles, where cyclophilin is absent, as are the other matrix components. As shown in Figure 6, the submitochondrial particles are able to generate a membrane electrical potential (positive inside) upon addition of respiratory substrates. The response to addition of NADH indicates that they are "inside

out" particles. This means that the Ca^{2+} binding sites originally located inside in the intact mitochondria are now external sites and vice-versa.

When these submitochondrial particles were exposed to high Ca^{2+} concentrations, surprisingly, no collapse of $\Delta\psi$ was observed and the particles behave as in the presence of EGTA, as shown in Figure 7. Moreover, the addition of 100nmoles $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein was followed by an increase in TPB^- uptake, rapidly returning to the steady state level, suggesting migration of the cation inside the particles [43,44].

As the existence of distinct Ca^{2+} binding sites in the mitochondrial membrane have recently been proposed [19,20], we interpreted these results as the binding of Ca^{2+} to internal sites on the particles, originally the external sites in mitochondria. These sites have been considered as inhibitors of the pore opening, provided they were bound to Ca^{2+} [19,20]. This is corroborated by the experiments depicted in Figure 8, performed under very low Ca^{2+} concentrations. Under these conditions, Ca^{2+} is bound only the external sites of the particles, corresponding to the internal sites in mitochondria, known to favour the pore opening [19,20]. Indeed, it is observed that this low Ca^{2+} concentration induces the permeability transition of these submitochondrial particles and they lose the capacity to sustain the membrane potential generated upon NADH addition. If the same experiment is performed in the presence of cyclosporin A, no decrease in $\Delta\psi$ is observed as shown in Figure 8, similarly to what is shown in Figure 7, either in the presence of EGTA or at high Ca^{2+} concentrations.

DISCUSSION

In this study, we have shown that although ADP and cyclosporin A prevent the collapse of $\Delta\psi$ in mitochondria loaded with Ca^{2+} and P_i , they probably act through distinct mechanisms. This is supported by the observation that cyclosporin A was still able to revert the decrease of $\Delta\psi$ under conditions where ADP was already ineffective, as shown in the experiments depicted in Figures 1 and 2. An additional evidence is the fact that carboxyatractyloside was able to abolish the protective effect of ADP, as shown in a previous report [17], but does not interfere with the effect of cyclosporin A, unless both ADP and cyclosporin A were added together, as shown here. These results indicate that the protection conferred by cyclosporin A occurs through a mechanism that does not involve the binding of the drug to the adenine binding sites of ADP/ATP carrier, in agreement with other literature data [9,14,19,21]. Moreover, it does not prevent the binding of ADP to the carrier, when are both present, as can be observed in the results shown in Figure 3, where the addition of carboxyatractyloside causes a partial collapse of $\Delta\psi$.

Another interesting result described here is the modulation of the ADP/ATP carrier activity by Ca^{2+} in mitochondria under low $\Delta\psi$ conditions. It can be observed that as the Ca^{2+} concentration increases, the number of active ADP/ATP carrier decreases, as indicated by titration of the respiratory state 3_{ADP} by carboxyatractyloside. This observation, taken together with the recent proposal that the transmembrane electrical potential plays a key role on the pore opening [20], suggest a direct involvement of the ADP/ATP carrier on this process. It is corroborated by our findings that cyclosporin A, which is known to prevent the pore formation [9-13], presents also a clear protective effect against the Ca^{2+} -induced decrease on the number of

active ADP/ATP carrier without any direct effect on the activity of the carrier itself.

To test the hypothesis that the protective effect of cyclosporin A was due to its binding to the matrix protein cyclophilin, avoiding the interaction of this later with the ADP/ATP carrier [9], we have performed experiments using submitochondrial particles which are deprived of the matrix content. When these particles were energized by NADH, they generate a positive inside electrical potential which surprisingly, was not collapsed by high Ca^{2+} concentrations. As these were inside out submitochondrial particles, under high Ca^{2+} load, the cation probably was bound to internal sites, corresponding to the originally external Me^{2+} binding sites in intact mitochondria. These sites, when occupied by Ca^{2+} , decrease the probability of pore opening [19]. This interpretation was corroborated by the experiments performed under very low Ca^{2+} concentrations, where only the external Me^{2+} binding sites of the particles were occupied. Since in mitochondria these sites correspond to those responsible for facilitating the pore opening [19], we expected that this low Ca^{2+} concentration would promote the decrease of $\Delta\psi$, what indeed happened, as observed in Figure 8. These results support the existence of two distinct Me^{2+} -binding sites in mitochondria, and confirm their opposite effects on the pore opening probability [19]. Moreover, our findings also constitute a good explanation to recently reported results that Ca^{2+} was not able to open the permeability transition pore in submitochondrial particles [7]. Considering that similarly to what happens in intact mitochondria, this permeability transition pore is also sensitive to cyclosporin A, as is also shown in Figure 8, it is clear that cyclophilin is not necessary as mediator of the pore opening, in disagreement with previous proposals [9].

All the data presented here support the existence in the mitochondrial membrane of a binding site for cyclosporin A, distinct from those proposed to bind Ca^{2+} [19,20]. Cyclosporin A, when bound to the membrane, would avoid that the mitochondrial internal Ca^{2+} binding sites were occupied by the cation, thus preventing the pore opening. The interaction of cyclosporin A with this site would also avoid the Ca^{2+} -induced inactivation of the ADP/ATP carrier. It has already been proposed that Ca^{2+} binds to the carrier mainly when it is in the c conformation [9]. Recently, it was proposed that the carrier dimeric functional structure was maintained through electrostatic interactions generated by negative fluctuating residues, present in both sides of the binding center, with positive residues of this center or gate [45]. Thus, our results showing that ADP loses its capacity to revert the permeabilization process when the mitochondria were deenergized due to the Ca^{2+} -induced inactivation of the ADP/ATP carrier, suggest that Ca^{2+} , when bound to the carrier, induces an alteration of these electrostatic interactions, avoiding the dimer formation and this could result in the pore opening. In forthcoming papers the regulation of this permeability transition pore in submitochondrial particles and the direct participation of the ADP/ATP carrier in the process would be reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant 91/1278-1. Caetano da Costa was supported by a FAPESP grant 92/2542-7.

REFERENCES

1. Mitchell, P. (1961). Nature 191:144-148.
2. Hunter, D.R., Haworth, R.A. & Southard, J.H. (1976).
J. Biol. Chem. 251:5069-5077.
3. Hunter, D.R. & Haworth, R.A. (1979). Arch. Biochem. Biophys.
195:453-459.
4. Crompton, M. & Costi, A. (1988). Eur. J. Biochem. 178:489-
501.
5. Gunter, T.E. & Pfeiffer, D.R. (1990). Am. J. Physiol.
258:C755-C786.
6. Szabo, I. & Zoratti, M. (1992). J. Bioenerg. Biomembr.
24:111-117.
7. Crompton, M., McGuinness, O. & Nazareth, W. (1992).
Biochim. Biophys. Acta. 1101:214-217.
8. Massari, S. & Azzone, G.F. (1972). Biochim. Biophys. Acta.
283:23-29.
9. Halestrap, A.P. & Davidson, A.M. (1990). Biochem. J.
268:153-160.
10. Novgorodov, S.A., Gudz, T.I., Jung, D.W. & Brierley, G.P.
(1991). Biochem. Biophys. Res. Commun. 180:33-38.
11. Szabo, I. & Zoratti, M. (1991). J. Biol. Chem. 266:3376-3379.
12. Kass, G.E.N., Juedes, M.J. & Orrenius, S. (1992).
Biochem. Pharmacol. 44:1995-2003.
13. Broekemeier, K.M., Carpenter-Deyo, L., Reed, D.J. &
Pfeiffer, D.R. (1992). FEBS lett. 304:192-194.
14. Novgorodov, S.A., Gudz, T.I., Milgrom, Y.M. & Brierley, G.P.
(1992). J. Biol. Chem. 267:6274-6282.

15. Lapidus, R.G. & Sokolove, P.M. (1992). FEBS lett. 313:314-318.
16. Crompton, M., Ellinger, H. & Costi, A. (1988). Biochem.J. 255:357-360.
17. Macedo, D.V., Nepomuceno, M.F. and Pereira da Silva, L. (1993). Eur.J.Biochem. (in press).
18. Bernardi, P. (1992). J.Biol.Chem. 267:8834-8839.
19. Bernardi, P., Veronese, P. & Petronilli, V. (1993). J.Biol.Chem. 268:1005-1010.
20. Petronilli, V., Cola, C. & Bernardi, P. (1993). J.Biol.Chem. 268:1011-1016.
21. Szabo, I., Bernardi, P. & Zoratti, M. (1992). J.Biol.Chem. 267:2940-2946.
22. Kinnally, K.W., Antonenko, Y.N. & Zorov, D.B. (1992). J.Bioenerg.Biomembr. 24:99-110.
23. Davidson, A.M. & Halestrap, A.P. (1990). Biochem.J. 268:147-152.
24. Novgorodov, S.A., Gudz, T.I., Kushnareva, Y.E., Zorov, D.B. and Kudrjashov, Y.B. (1990). FEBS lett. 277:123-126.
25. Lê Quốc, D. & Lê Quốc, K. (1988). Arch.Biochem.Biophys. 265:249-257.
26. Lê Quốc, K. & Lê Quốc, D. (1989). Arch.Biochem.Biophys. 273:466-478.
27. Nicholls, D.G. & Brand, M. (1980). Biochem.J. 188:113-118.
28. Harris, E.J., Al-Shaikhaly, M. & Baum, H. (1979). Biochem.J. 182:455-464.

29. Haworth, R.A. & Hunter, D.R. (1979). Arch. Biochem. Biophys. 195:460-467.
30. Griffiths, E.J. & Halestrap, A.P. (1991). Biochem. J. 274:611-614.
31. Nepomuceno, M.F., Macedo, D.V. & Pereira-da-Silva, L. (1991). Brazilian J. Med. Biol. Res. 24:833-836.
32. Crompton, M. & Costi, A. (1990). Biochem. J. 266:33-39.
33. Macedo, D.V., Nepomuceno, M.F., Costa, C. & Pereira-da-Silva, L. (1992). 7th European Bioenergetics Conference, Helsinki, Finland. EBEC Short Reports 7, 126.
34. Schneider, W.C. & Hogeboom, G.H. (1950). J. Biol. Chem. 183:123-128.
35. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & Daid, M.M. (1949). J. Biol. Chem. 177:751-766.
36. Lee, C.P. & Ernester, L. (1967). Meth. in Enzymol. 10:543-548.
37. Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. & Kobatake, J. (1979). J. Membr. Biol. 49:105-121.
38. Vuokila, P.T. & Hassinen, I.E. (1988). 5th European Bioenergetics Conference, Aberystwyth, Wales, EBEC Short Reports 15, 66.
39. Klingenberg, M. (1976). In: The enzymes of biological Membranes. (Martonosi, A. ed.) pp.383-483. Plenum Press, New York and London.
40. Klingenberg, M. (1989). Arch. Biochem. Biophys. 270:1-14.

41. Henke, W. and Jung, K. (1991). Biochim. Biophys. Acta 1056:71-75.
42. McGuinness, O., Yafei, N., Costi, A. and Crompton, M. (1990). Eur. J. Biochem. 194:671-679.
43. Loyter, A., Christiansen, R.O., Steensland, H., Saltzgaber, J. and Racker, E. (1969). J. Biol. Chem. 244:4422-4427.
44. Gunter, T.E., Rosier, R.N., Tucker, D.A. and Gunter, K.K. (1978). Ann. NY. Acad. Sci. 307:246-247.
45. Klingenberg, M. (1992). Biochem. Soc. Trans. 20:547-550.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1. Effect of ADP on Ca^{2+} plus Pi-induced decrease of transmembrane electrical potential. Mitochondria (1mg/ml) were incubated as described in Materials and Methods and 50nmoles Ca^{2+} were added in all experiments where indicated. (a) no other addition; (b) 200 μM ADP, added before the addition of Ca^{2+} ; (c) 200 μM ADP, added during the decrease of U; (d) 200 μM ADP, added after the collapse of $\Delta\psi$.

Figure 2. Effect of cyclosporin A (CsA) on Ca^{2+} plus Pi-induced decrease of $\Delta\psi$. Same conditions of Figure 1, replacing ADP for 0.5 μM CsA. The dashed line represents the same experiment of trace d, with the addition of 2.5 μM carboxyatractyloside (CAT) where indicated.

Figure 3. Carboxyatractyloside (CAT) reverts partially the combined effect of cyclosporin A (CsA) and ADP on Ca^{2+} plus Pi-induced decrease of $\Delta\psi$. Same conditions of Figure 2, with the addition of 0.5 μM CsA followed by the addition of 2.5 μM CAT where indicated in the absence (a) or in the presence (b) of 200 μM ADP.

Figure 4. Incubation of non-energized mitochondria with Ca^{2+} decreases the content of active ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane. Mitochondria (1mg/ml) were incubated as described in Materials and Methods at three different Ca^{2+} concentrations: (A) 10 μM ; (B) 30 μM and (C) 60 μM . After 3 min. of incubation, EGTA (0.5mM) was added prior to 5mM succinate. Other additions were: (a) 1mM ADP; (b) no addition and (c) 200pmoles CAT, added before 1mM ADP. The dashed lines represent experiments performed in the presence of 5 μM ruthenium red (RR) in the incubation media.

Figure 5. Titration of active ADP/ATP carrier by carboxyatractyloside (CAT) in mitochondria pre-incubated with 30uM Ca^{2+} before energization. Mitochondria (1mg/ml) were incubated as described in Materials and Methods in the absence (continuous traces) or in the presence (dashed traces) of 0.5uM CsA. After 3 min. of incubation EGTA (0.5mM) was added prior to 5mM succinate.

(a) and (d) no other addition

(b) and (e) 1mM ADP, added where indicated

(c) and (f) 200 pmoles CAT, added before 1mM ADP

Figure 6. Isolated submitochondrial particles (SMP) are "inside out" and able to generate a transmembrane electrical potential. SMP (0.5mg/ml) were incubated as described in Materials and Methods and 5mM NADH, 5uM rotenone (ROT), 5mM succinate (SUC) and 1uM antimycin A (AA) were added where indicated by the arrows.

Figure 7. High Ca^{2+} load prevents pore opening in submitochondrial particles (SMP). SMP (0.5mg/ml) were incubated as in Figure 6 in the presence of 500uM Ca^{2+} (a) or 1mM EGTA (b). 100uM Ca^{2+} was added where indicated in (a).

Figure 8. Low Ca^{2+} load induces pore opening in submitochondrial particles (SMP). SMP (0.5mg/ml) were incubated as in Figure 6.

(a) 5uM Ca^{2+} in the incubation medium

(b) as in (a) plus 0.5uM CsA

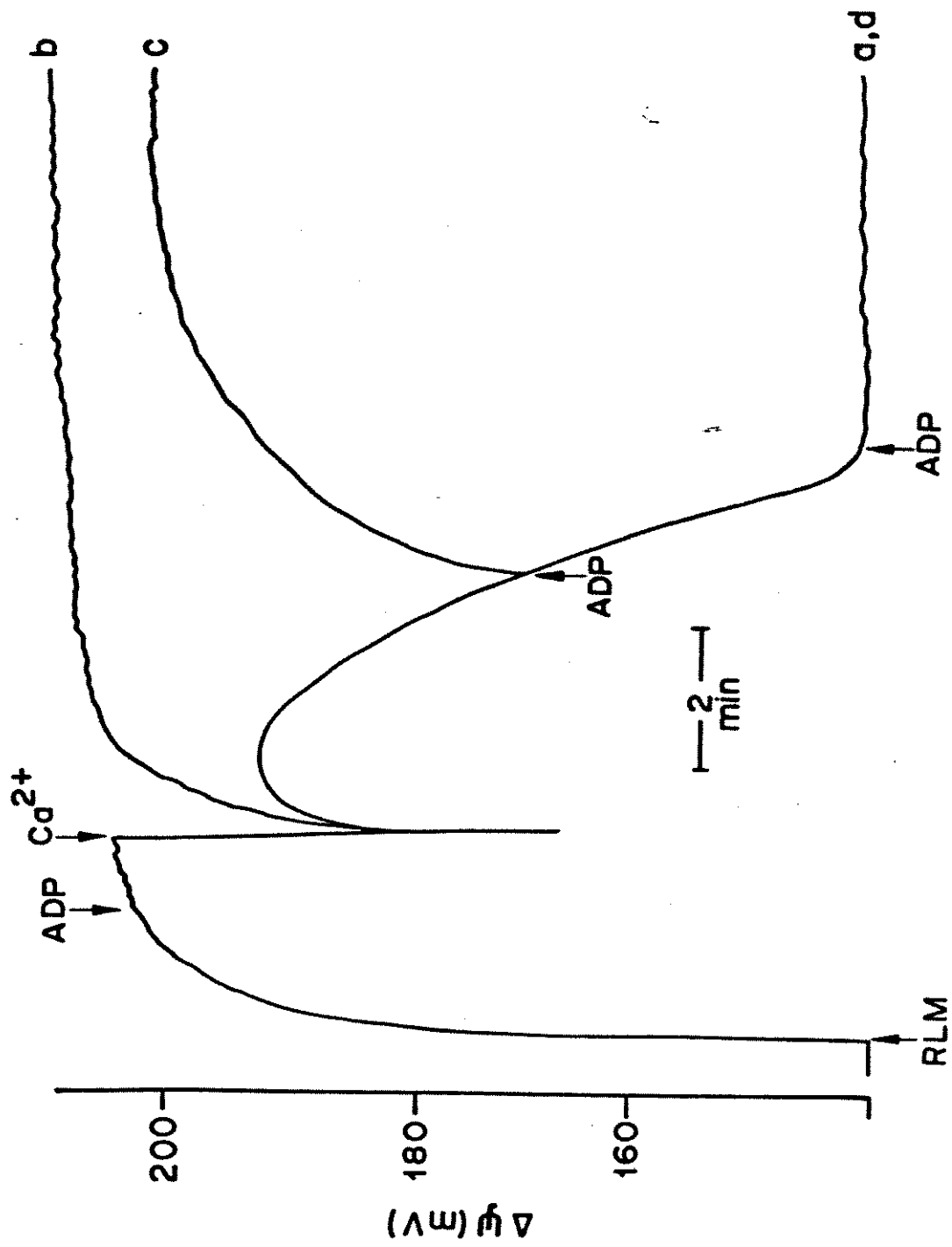


Figura 1. Macedo et al

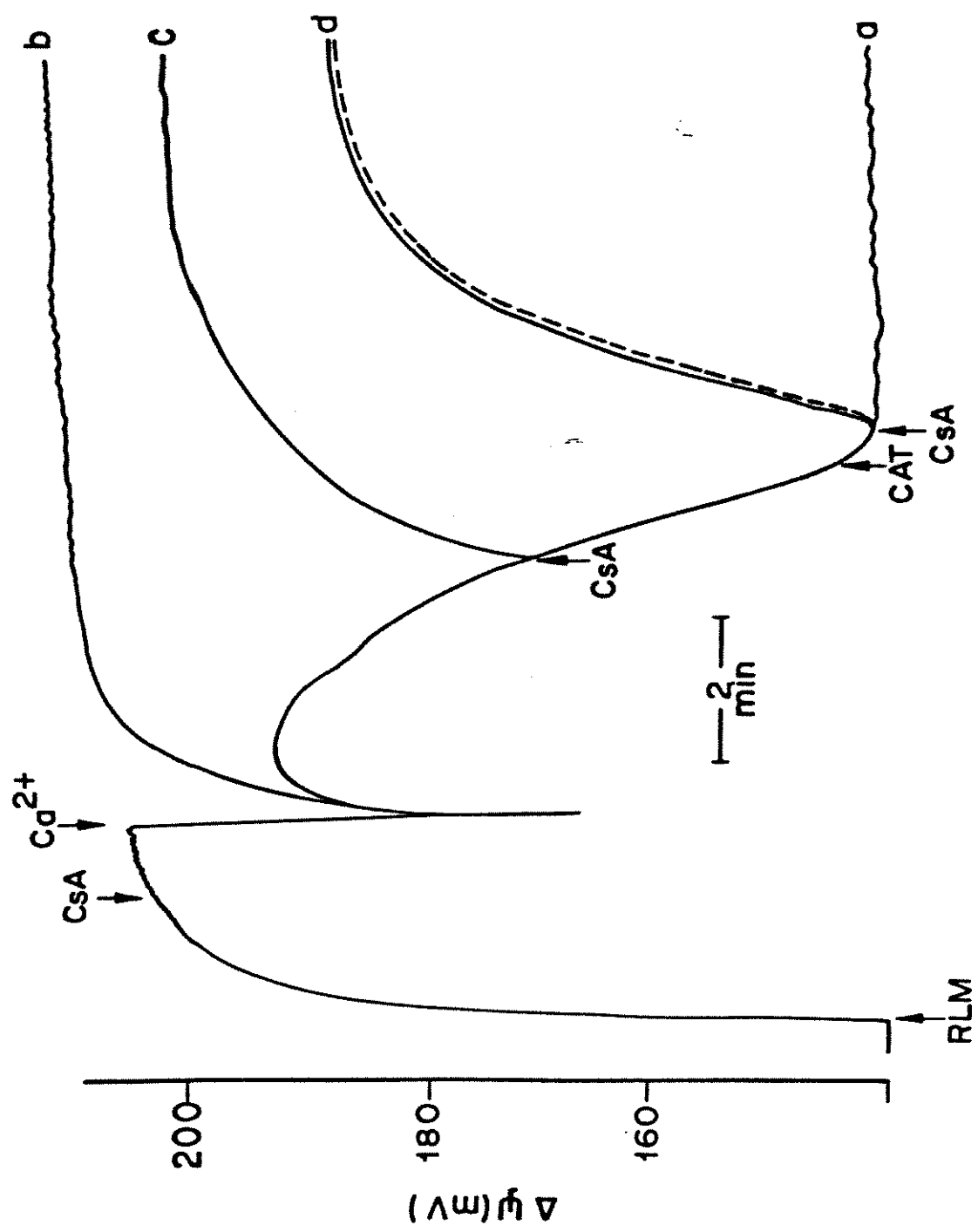


Figura 2. Macêdo et al

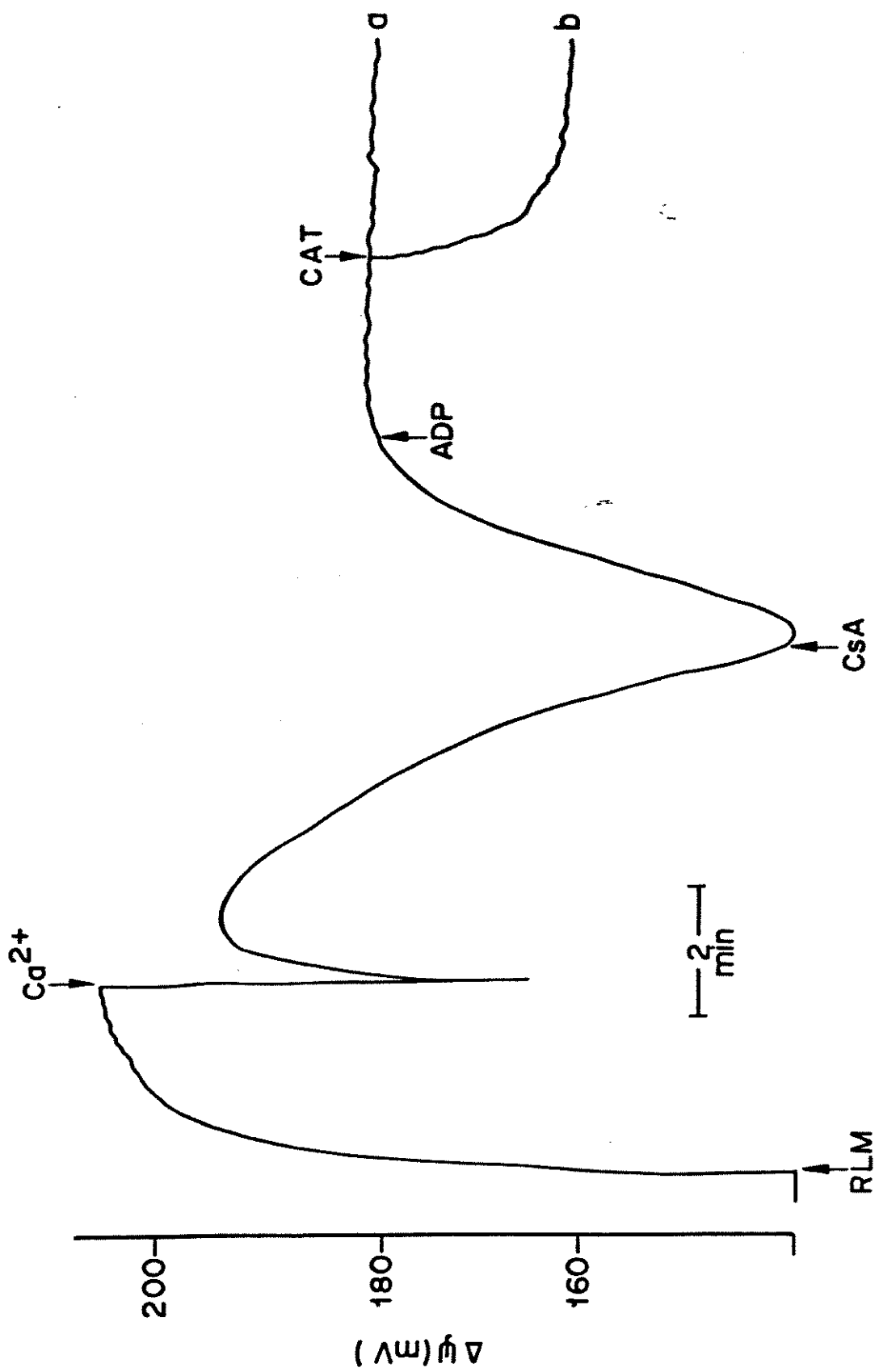


Figura 3. Macedo et al.

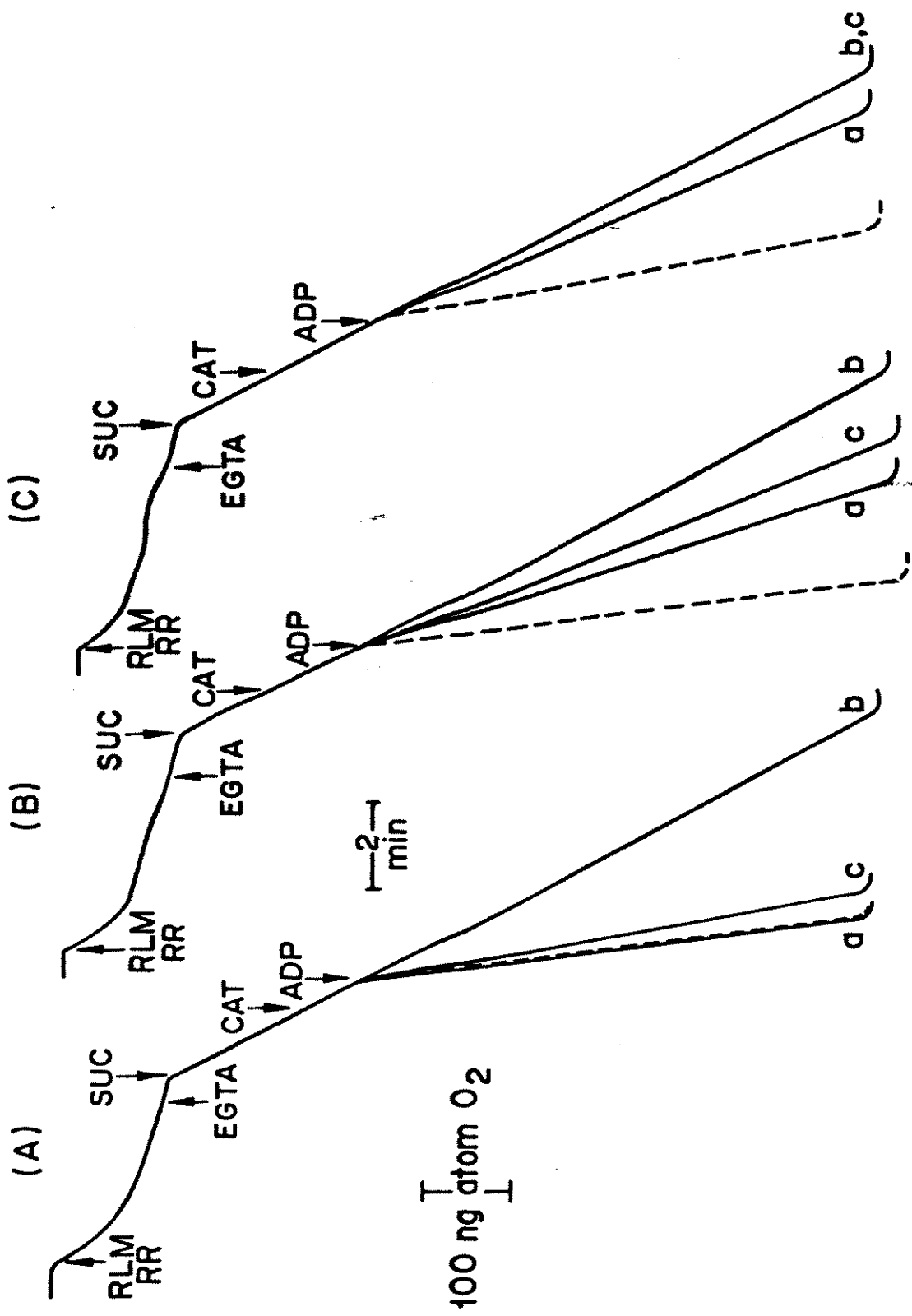


Figura 4. Macado et al.

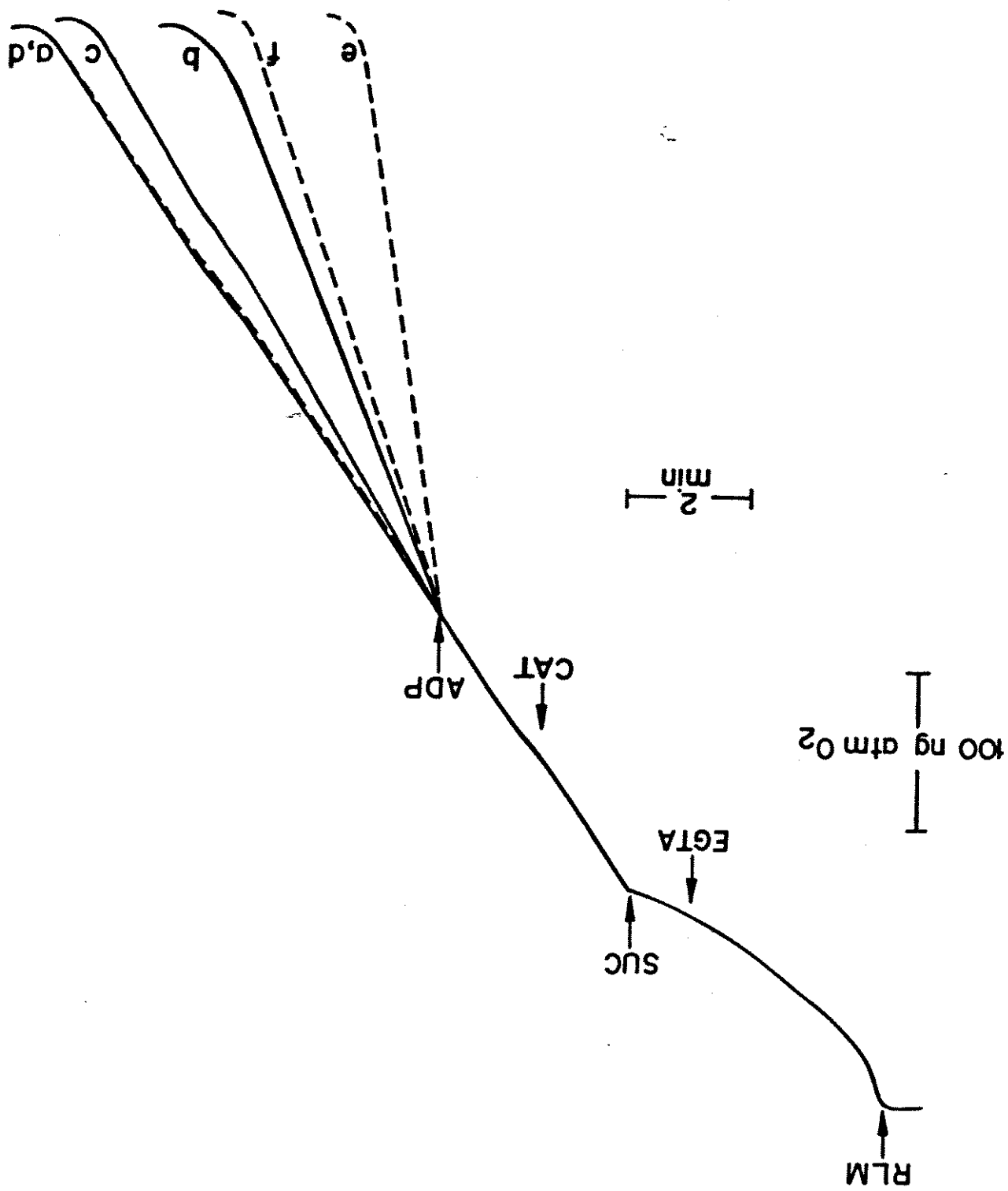


Figura 5. Macêdo et al

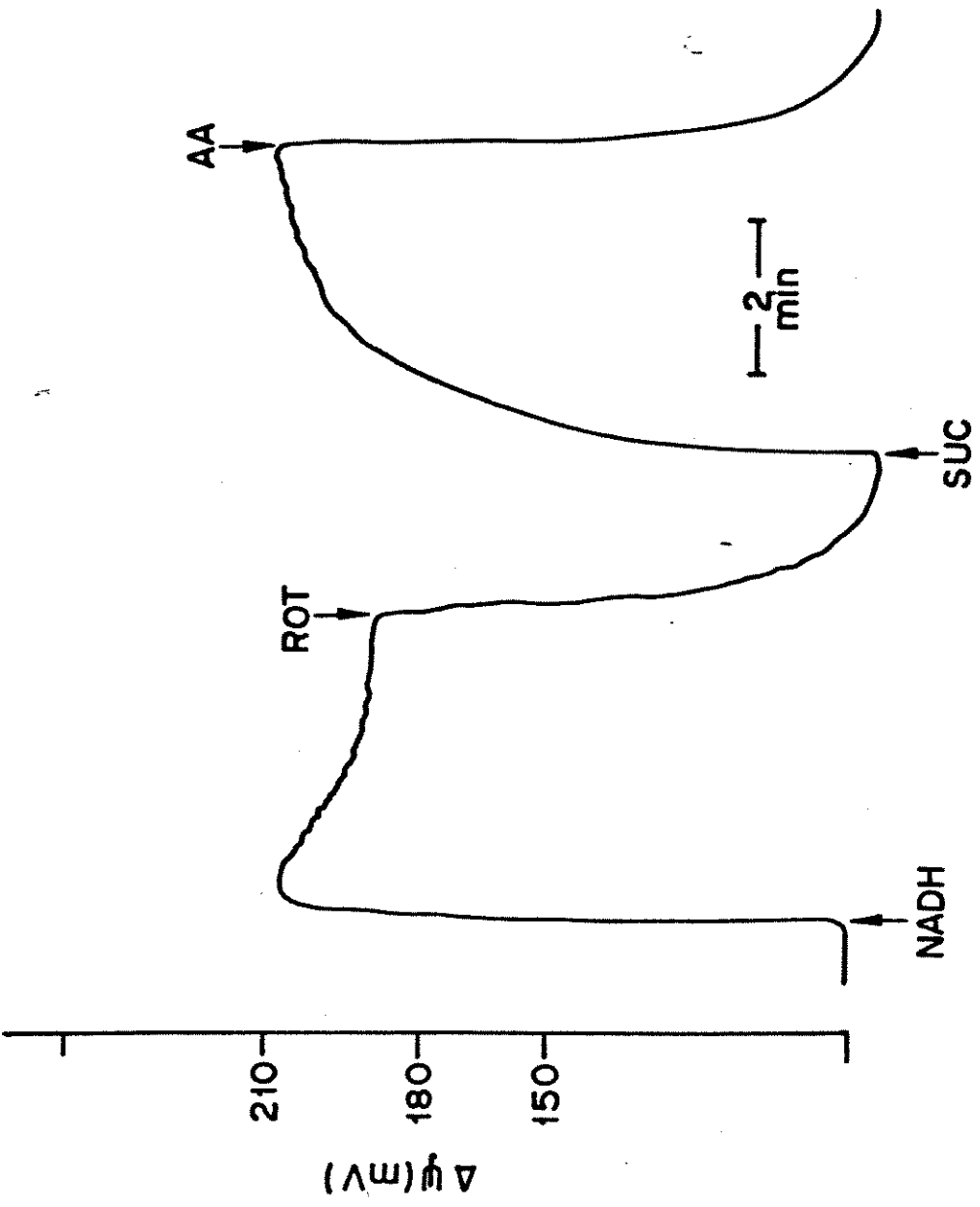


Figura 6. Macado et al

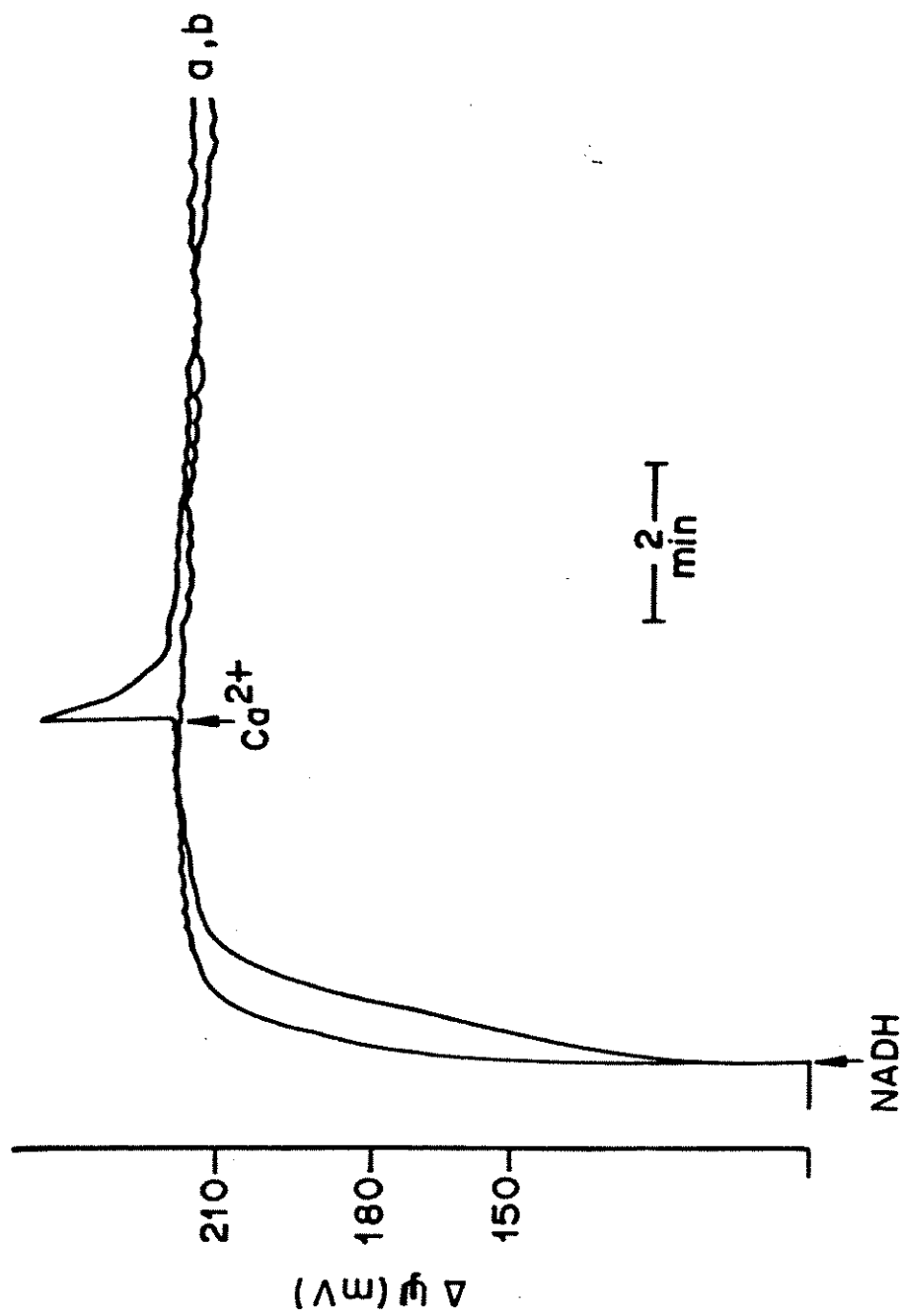


Figura 7. Macêdo et al

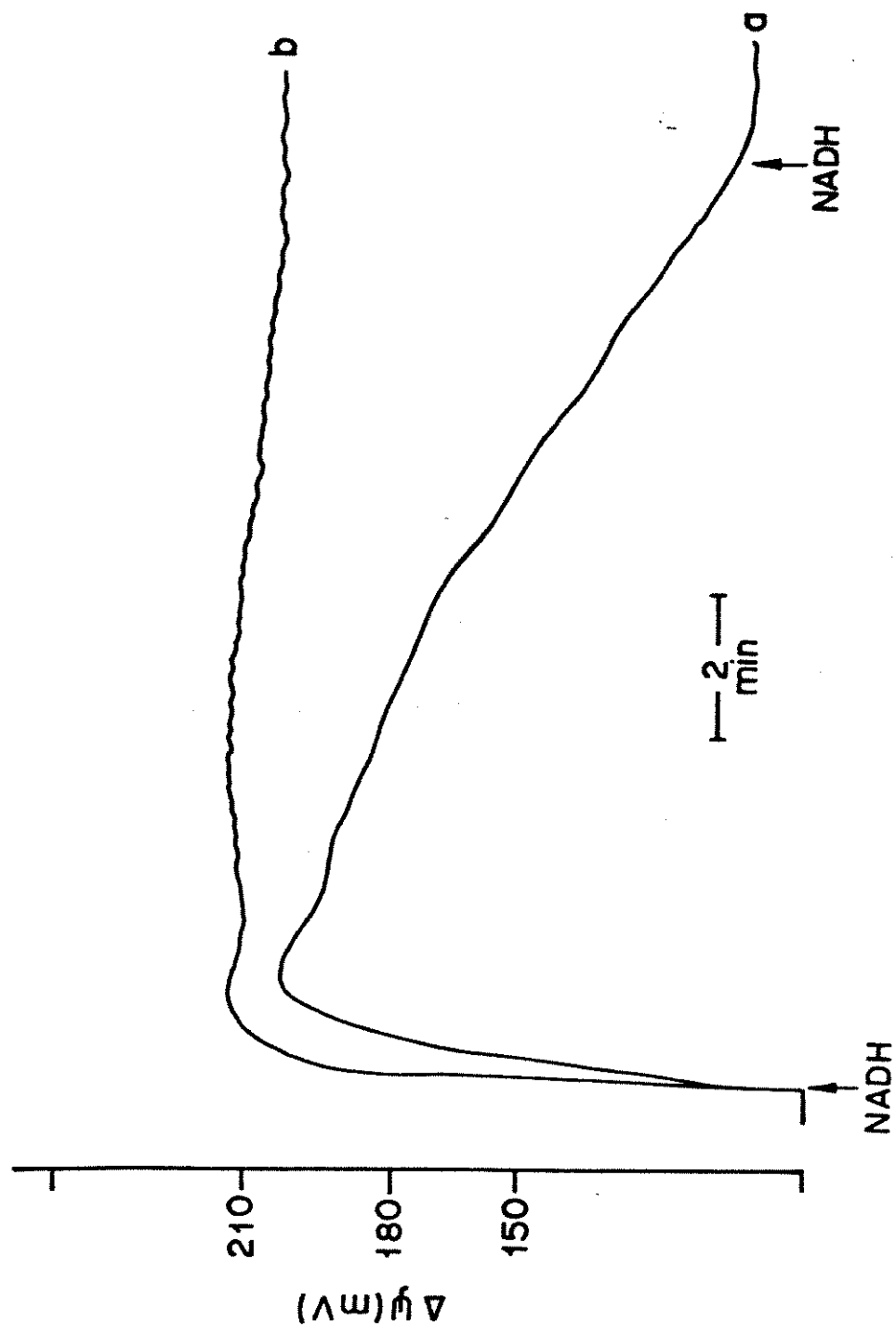


Figura 8. Macedo et al.