


Este exemplar corresponde à redacção final da tese defendida pela aluna Celene Fernandes Bernardes e aprovada pela comissão julgadora.


28-11-86

CELENE FERNANDES BERNARDES

**ALTERAÇÕES NO FLUXO DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL
CAUSADAS POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDO E
PELO ANTIBIÓTICO X-537A.**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de
Mestre em Biologia, área de Bioquímica,
sob orientação da
Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva.

Campinas - São Paulo

1986

U N I C A M P
BIBLIOTECA CENTRAL

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Dedicatória

Ao Paulo e ao Arthur

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva por ter orientado e colaborado na execução deste trabalho e na elaboração do manuscrito.

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi por ter me dado a oportunidade de participar de um grupo de pesquisa científica, valorizando-me e incentivando-me e por ter colaborado no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica pelo incentivo e carinho durante estes anos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial à Regina Célia Rosseto pela amizade e colaboração técnica.

Aos professores e alunos do Curso de Pós-graduação em Bioquímica pelo companheirismo durante o transcorrer do meu curso.

Aos Profs. Drs. Quivo S. Tahin e Maria Edwiges Hoffmann pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

Ao Prof. Dr. W. C. Sgarbieri da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pelo uso do espectrofotômetro de duplo feixe e duplo comprimento de onda.

A minha família, em especial à minha mãe pela compreensão e pelo carinho dedicado ao Arthur.

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

A todos que colaboraram com o meu desenvolvimento profissional e com a elaboração deste trabalho.

ABREVIATURAS

Ac	- Acetato
AcAc	- Acetoacetato
ADP	- Adenosina difosfato
ATP	- Adenosina trifosfato
BSA	- Soro albumina bovina
BOH	- β -Hidroxibutirato
DNF	- 2,4-Dinitrofenol
EGTA	- Ácido etileno glicol Bis (β -aminoetil eter) NN'-tetraacético
FCCP	- p-Trifluoro-metoxicarbonil cianeto fenil hidrazina
GSH	- Glutaciona reduzida
GSSG	- Glutaciona oxidada
HEPES	- Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico
MAI.	- Malato
MIT	- Mitocôndrias de fígado de rato
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OAA	- Oxaloacetato
OLIGO	- Oligomicina
PI	- Fosfato
PVC	- cloreto de polivinila
ROT	- Rotenona
SUC	- Succinato
THF	- Tetrahidrofurano
TPB ⁻	- Tetrafenilborato
TPP ⁺	- Tetrafenilfosfônio

T-BUT.OH - t-butil hidroperóxido reduzido
T-BUT.OOH - t-butil hidroperóxido oxidado
VR - Vermelho de rutênio
 $\Delta\bar{\mu}H^+$ - Potencial eletroquímico de prótons
 $\Delta\psi$ - Potencial elétrico transmembrana

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	01
Transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias.....	01
Alterações no fluxo de Ca^{2+} mitocondrial induzidas pelo estado de óxido redução dos nucleotídeos de piridina...	04
Alterações em funções mitocondriais induzidas pelo anti- biótico X-537A.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
Isolamento de mitocôndrias hepáticas.....	16
Dosagem de proteína mitocondrial.....	17
Determinação do consumo de oxigênio.....	17
Determinação do movimento de Ca^{2+} através da membrana mi- tocondrial interna.....	18
Determinação do potencial elétrico de membrana.....	18
Determinação do estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais.....	22
Medida da variação do volume mitocondrial.....	23
Reagentes.....	23
RESULTADOS.....	24
Fluxo de Ca^{2+} na presença de t-butil hidroperóxido ou a- cetoacetato.....	24
Conteúdo de nucleotídeos de piridina reduzidos em mito- côndrias de fígado de rato, na presença de t-butil hi- droperóxido ou acetoacetato.....	26

Consumo de oxigênio, fluxo de Ca^{2+} e inchamento mitocondrial durante o metabolismo de hidroperóxido em mitocôndrias de fígado, após acumularem diferentes concentrações de Ca^{2+} . Efeito de ATP e Mg^{2+}	28
Fluxo de Ca^{2+} durante o metabolismo do hidroperóxido em mitocôndrias energizadas por ATP e pela respiração endógena.....	31
Mudanças no potencial de membrana e no volume mitocondrial durante o efluxo de Ca^{2+} induzido por hidroperóxido.....	33
Correlação entre a velocidade de consumo de oxigênio e fluorescência de NAD(P)H induzida por hidroperóxido..	35
Fluxo de Ca^{2+} e consumo de oxigênio durante o metabolismo de hidroperóxido. Comparação entre o uso de acetato ou fosfato como ânion permeante.....	37
Efeito do ânion permeante no efluxo de Ca^{2+} e no consumo de oxigênio induzido por t-butil hidroperóxido, em mitocôndrias carregadas com altas concentrações de Ca^{2+} ..	39
Efeito do antibiótico X-537A e vermelho de rutênio no fluxo de Ca^{2+} mitocondrial.....	41
Relação entre a oxidação de glutamato ou efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio e diferentes concentrações de X-537A.....	43
Efeito do antibiótico X-537A no potencial de membrana mitocondrial.....	45
Efeito do antibiótico X-537A no fluxo de Ca^{2+} através da via eletroforética de captação.....	47

Influência do antibiótico X-537A no efluxo de Ca^{2+} induzido por t-butil hidroperóxido e na extensão do volume mitocondrial.....	47
Alterações no volume mitocondrial induzidas por X-537A em mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas.....	50
DISCUSSÃO.....	52
SUMÁRIO.....	63
SUMMARY.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

INTRODUÇÃO

Transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias

Nos últimos anos tem ocorrido um grande avanço no estudo do transporte do íon cálcio em membranas de mitocôndrias. Numerosos trabalhos têm indicado que a membrana mitocondrial interna possui vias independentes para captação e efluxo de Ca^{2+} (BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et alii, 1978a; SARIS & AKERMAN, 1980; TEDESCHI, 1981; WILLIAMSON et alii, 1981; NICHOLLS & AKERMAN, 1982; AKERMAN & NICHOLLS, 1983; CARAFOLI & SOTTOCASA, 1984; VERCESI, 1984c; MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS et alii, 1986).

Mitocôndrias isoladas de tecidos animais e de alguns tecidos vegetais captam Ca^{2+} do meio de suspensão, através de um mecanismo eletroforético, por um transportador específico, sensível a vermelho de rutênio e lantanídeos (MOORE, 1971; VASINGTON et alii, 1972; REED & BYGRAVE, 1974; HEATON & NICHOLLS, 1976; MARTINS & VERCESI, 1985). Esta captação ocorre em resposta ao potencial elétrico de membrana, gerado pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória ou pela hidrólise de ATP (VASINGTON & MURPHY, 1962; DRAHOTA et alii, 1965; SELWYN et alii, 1970; LEHNINGER, 1970; ROTTENBERG & SCARPA, 1974; LANDRY & LEHNINGER, 1976; BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; NICHOLLS & AKERMAN, 1982; AKERMAN & NICHOLLS, 1983; CARAFOLI & SOTTOCASA, 1984).

Tanto a respiração quanto a hidrólise de ATP, segundo a hipótese quimiosmótica da fosforilação oxidativa, geram um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna, devido ao transpor-

te vetorial de prótons para o exterior da mitocôndria (MITCHELL, 1961). O potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\tilde{\mu}H^+$) é constituído por um componente químico (ΔpH) e pelo potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) que se relacionam de acordo com a equação $\Delta\tilde{\mu}H^+ = \Delta\Psi - 60 \Delta pH$. Com a entrada de Ca^{2+} na mitocôndria, o valor do potencial elétrico de membrana diminui, induzindo o estímulo da respiração e ejeção de prótons para compensar o valor de $\Delta\tilde{\mu}H^+$ às custas do aumento de ΔpH . Portanto, a entrada de Ca^{2+} converte $\Delta\Psi$ em gradiente de pH, que passa a inibir a respiração e limitar sua captação (NICHOLLS, 1978b). Se ΔpH for neutralizado, cessa a inibição da respiração, restaurando-se $\Delta\Psi$ e conseqüentemente maior quantidade de Ca^{2+} passa a ser captada (CARAFOLI et alii, 1965). A neutralização de ΔpH pode ocorrer com a adição de ânions que migram para o interior da mitocôndria na forma protonada (CARAFOLI et alii, 1965; LEHNINGER, 1974; LEHNINGER et alii, 1978a).

A distribuição termodinâmica das concentrações de Ca^{2+} entre a matriz mitocondrial e o citoplasma, calculada através da equação de Nernst, difere amplamente dos resultados experimentais encontrados (DRAHOTA et alii, 1965; POZZAN et alii, 1977), indicando que em condições de estado de fluxo constante ("steady state") essa distribuição é regulada cineticamente pela operação simultânea de duas vias de transporte independentes (DRAHOTA et alii, 1965; POZZAN et alii, 1977; LEHNINGER et alii, 1978a; NICHOLLS, 1978b; NICHOLLS & AKERMAN, 1982; AKERMAN & NICHOLLS, 1983; JOSEPH et alii, 1983). Estas vias operam concomitantemente, resultando em um movimento cíclico de Ca^{2+} , contínuo, através da membrana interna. A distribuição de Ca^{2+} entre o citosol e a matriz mitocondrial, em condições de equilíbrio, depende das velocidades relativas de influxo e efluxo, e pode ser alterada pe-

la inibição ou ativação de uma ou ambas as vias. Assim, com a adição de quelantes de Ca^{2+} como EGTA, ou de vermelho de rutênio, inibidor da via de captação, ocorre a liberação de Ca^{2+} da mitocôndria (MOORE, 1971; VASINGTON et alii, 1972; REED & BYGRAVE, 1974; HEATON & NICHOLLS, 1976).

Mitocôndrias hepáticas, isoladas, energizadas, na presença de estabilizadores de membrana, como ATP e Mg^{2+} , podem tamponar o Ca^{2+} externo em concentrações na faixa de 0,25 a 1,0 μM (NICHOLLS, 1978b; BECKER, 1980; BECKER et alii, 1980; NICHITTA & WILLIAMSON, 1984). Esta concentração pode ser alterada por diversos fatores que provocam o estímulo da via de efluxo. Assim, em mitocôndrias de tecidos excitáveis, foi verificado que este estímulo era causado por Na^+ adicionado ao meio externo, através da troca $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$ (CARAFOLI et alii, 1974; CROMPTON et alii, 1976; CROMPTON et alii, 1978; NICHOLLS, 1978a; BRAND, 1985b), sendo que recentemente foi descrito que, em determinadas condições experimentais, mitocôndrias de fígado e de outros tecidos não excitáveis, também apresentam efluxo de Ca^{2+} estimulado por Na^+ (HAWORTH et alii, 1980; HEFFRON & HARRIS, 1981; HARRIS & HEFFRON, 1982; GOLDSTONE & CROMPTON, 1982; NEDERGAARD, 1984).

Em mitocôndrias de tecidos não excitáveis, o efluxo eletro-neutro de Ca^{2+} ocorre preferencialmente através da troca de um íon cálcio interno por dois prótons externos (AKERMAN, 1978a; FISKUM & COCKRELL, 1978; NICHOLLS, 1978b; FISKUM & LEHNINGER, 1979; GUNTER et alii, 1983; JOSEPH et alii, 1983; BRAND, 1985a).

Outro fator que pode alterar o conteúdo de Ca^{2+} mitocondrial é o potencial protônico, estando o decréscimo de $\Delta\Psi$ diretamente relacionado com o efluxo de Ca^{2+} pelo reverso da via eletroforética de

captação (NICHOLLS & BRAND, 1980; BERNARDI & AZZONE, 1982; 1983; BARDSLEY & BRAND, 1982; JURKOWITZ et alii, 1983; BERNARDI et alii, 1984; BROEKEMEIER et alii, 1985).

A possibilidade de regulação independente dessas vias de influxo e efluxo levou alguns autores a propor que as mitocôndrias participem no controle da concentração citoplasmática de Ca^{2+} (DRAHOTA et alii, 1965; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et alii, 1978a; NICHOLLS, 1978b; BECKER, 1980; BECKER et alii, 1980; WILLIANSOON et alii, 1981; JOSEPH et alii, 1983; BELLOMO et alii, 1984b; SOMLYO et alii, 1985), ou na regulação dos níveis intramitocondriais do íon (DENTON et alii, 1980; McCORMACK & DENTON, 1980; KLEINEKE & SOLING, 1985).

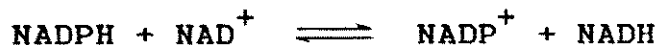
Alterações no fluxo de Ca^{2+} mitocondrial induzidas pelo estado de óxido redução dos nucleotídeos de piridina.

A indução do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial pelo estado de óxido redução dos nucleotídeos de piridina tem sido objeto de estudo em vários laboratórios principalmente devido a seu possível significado fisiológico como mecanismo de regulação do fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias. Os inúmeros trabalhos que têm sido publicados abordando esse assunto foram realizados nas mais diversas condições experimentais, o que contribuiu para propostas discordantes tanto quanto ao mecanismo envolvido na indução desse efluxo quanto à sua relevância fisiológica (VERCESI & PEREIRA DA SILVA, 1984).

Os primeiros trabalhos que mostraram uma correlação entre o fluxo de Ca^{2+} mitocondrial e o estado redox dos nucleotídeos de piri-

dina foram os de VERCESI et alii (1978) e LEHNINGER et alii (1978a,b). A influência do estado redox dos nucleotídeos de piridina sobre o transporte de Ca^{2+} tem sido estudada mais frequentemente em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Nestas mitocôndrias, energizadas com diferentes substratos, a razão NAD(P)H/NAD(P)^+ era alterada por adições alternadas de oxidantes, como oxaloacetato ou acetoacetato, e redutores, como β -hidroxibutirato, isocitrato ou glutamato. Foi observado que a retenção de Ca^{2+} na matriz era favorecida pelo estado reduzido dos nucleotídeos de piridina, enquanto que a oxidação dos mesmos induzia o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial (LEHNINGER et alii, 1978b).

O estado de óxido redução dos nucleotídeos de piridina também pode ser alterado por ação da enzima transidrogenase de nucleotídeos de piridina, conforme reação esquematizada abaixo:



Esta enzima NAD(P) -transidrogenase está localizada na membrana mitocondrial interna (RYDSTROM, 1977), e a constante de equilíbrio da reação, que é igual a 1 em mitocôndria não energizada, é deslocada cerca de 500 vezes para a esquerda em mitocôndria energizada (LEE & ERNSTER, 1964). VERCESI (1986) verificou que a oxidação de NADPH pelo NAD^+ via transidrogenase, praticamente não ocorria em mitocôndria energizada. Este mesmo autor verificou que o efluxo de Ca^{2+} era maior quando o NADP mitocondrial apresentava-se num estado mais oxidado, o que foi observado com a mitocôndria desenergizada, incubada na ausência de substratos respiratórios e na presença de acetoacetato.

O efluxo de Ca^{2+} estimulado por NAD(P)^+ mostrou ser insensível a vermelho de rutênio, sugerindo que este ocorresse através de uma via diferente da via eletroforética de captação, sob regulação do estado redox do NAD(P) mitocondrial (FISKUM & LEHNINGER, 1979).

Outros estudos com mitocôndrias isoladas (LEHNINGER et alii, 1978b; DAWSON et alii, 1979; FISKUM & LEHNINGER, 1979; LOTSCHER et alii, 1979; 1980; ARSHAD & HOLDWORTH, 1980; BEATRICE et alii, 1980; COELHO & VERCESI, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; PANFILI et alii, 1980; PRPIC & BYGRAVE, 1980; WOLKOWICZ & McWILLIN-WOOD, 1980; HOFSTETTER et alii, 1981; PALMER & PFEIFFER, 1981; BARDSLEY & BRAND, 1982; BAUMHUTER & RICHTER, 1982, BEATRICE et alii, 1982; JURKOWITZ & BRIERLEY, 1982; ROTH & DIKSTAN, 1982; VERCESI & LEHNINGER, 1982; MOORE et alii, 1983; SILIPRANDI et alii, 1983; BEATRICE et alii, 1984; BELLOMO et alii, 1984a; VERCESI, 1984a, 1984b, 1985, 1986), com células intactas (CHARLTON & WENNER, 1978; KRELL et alii, 1979; BELLOMO et alii, 1982; ORRENIUS et alii, 1983; BELLOMO et alii, 1984b; BELLOMO et alii, 1984c), e com fígado perfundido (SIES et alii, 1981), têm confirmado a influência do estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais no efluxo de Ca^{2+} . Entretanto, há grande controvérsia com relação a qual dos nucleotídeos de piridina seria o responsável por este processo e quanto ao mecanismo molecular envolvido.

Alguns resultados indicam que o NADP^+ e não o NAD^+ estaria relacionado mais diretamente com o estímulo do efluxo de Ca^{2+} da mitocôndria (PRPIC & BYGRAVE, 1980; SIES et alii, 1981; ROTH & DIKSTEIN, 1982; VERCESI & LEHNINGER, 1982; ORRENIUS et alii, 1983; VERCESI, 1986). ROTH & DIKSTEIN (1982) sugeriram que a relação $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ regularia o efluxo e a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria, baseando-se em resultados que demonstraram que o efluxo induzido por vermelho de rutênio era inibido por isocitrato mas não por β -hidroxibutirato. Considerando que a β -hidroxibutirato desidrogenase é NAD^+ -dependente e a isocitrato desidrogenase utiliza preferencialmente NADP^+ , sugeriram

ainda que a redução de NADP^+ e não de NAD^+ estaria relacionada com a inibição do efluxo de Ca^{2+} nessas condições.

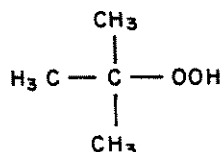
Com relação ao mecanismo molecular envolvido na indução do efluxo de Ca^{2+} pelo estado redox dos nucleotídeos de piridina, existem atualmente pelo menos três propostas principais defendidas por diferentes grupos de pesquisa.

1 - Alguns trabalhos propõem que os oxidantes de NAD(P)H induziriam liberação espontânea de Ca^{2+} da mitocôndria, devido a um aumento da permeabilidade da membrana, com diminuição do potencial elétrico e inchamento mitocondrial ("swelling") (BEATRICE et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1981; BARDSLEY & BRAND, 1982; BEATRICE et alii, 1982) causados pela ativação da fosfolipase A2 e inibição da posterior reacilação dos lisofosfolipídeos então liberados (PFEIFFER et alii, 1979; BEATRICE et alii, 1984; RILEY & PFEIFFER, 1985). As enzimas envolvidas nesse processo de reacilação são -SH dependentes e têm sua atividade diminuída quando diminui a disponibilidade de glutathiona reduzida (BEATRICE et alii, 1984).

O aumento da permeabilidade da membrana variava de acordo com a temperatura e a composição do meio de suspensão mitocondrial (VERCESI, 1984a) e com a presença de alguns anestésicos locais. Assim, nupercaína e tetracaína inibem o aumento inespecífico da permeabilidade da membrana (DAWSON et alii, 1979, PALMER & PFEIFFER, 1981) devido à ação protetora desses compostos na estrutura da membrana mitocondrial, possivelmente relacionada com inibição da fosfolipase A2 (SEPPALA et alii, 1971; SCHERPHOF et alii, 1972).

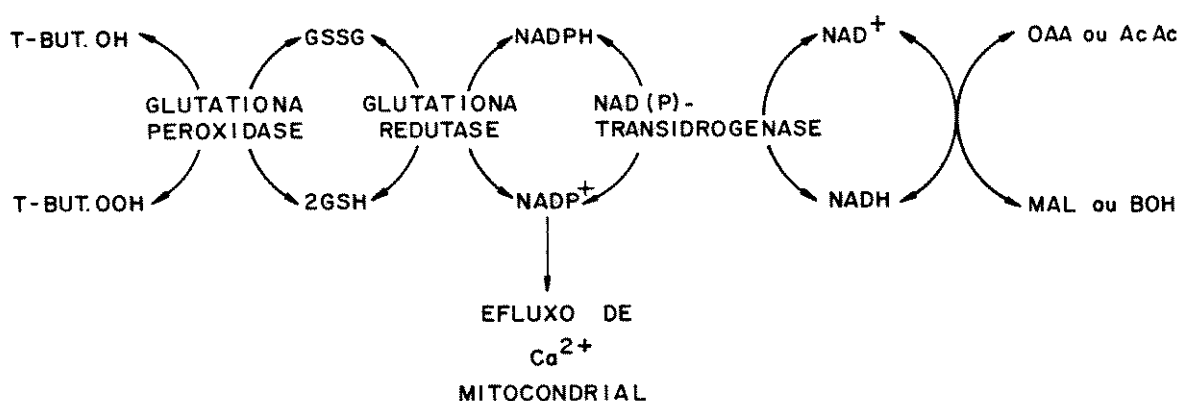
Dentre os vários oxidantes de nucleotídeos de piridina também tem sido utilizado o t-butil hidroperóxido. Este hidroperóxido apre-

sentada uma alta solubilidade em água e possui um resíduo orgânico suficientemente volumoso para excluir sua reatividade com catalase (SIES, 1985).



ESTRUTURA QUÍMICA DO T-BUTIL HIDROPERÓXIDO

Os hidroperóxidos atuam por processo que envolve a ação das enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase, usando NAD(P)H como redutor, de acordo com o esquema abaixo:



Durante o metabolismo do hidroperóxido pelo sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase ocorre a formação de glutatona dissulfeto (GSSG) que sofre subsequente redução pela glutatona redutase,

e diminui a razão NAD(P)H/NAD(P)^+ (LOTSCHER et alii, 1979; ORRENIUS et alii, 1983; BELLOMO et alii, 1984a).

BEATRICE et alii (1984), trabalhando com reína e nitrofurantoina, ambos compostos que induzem efluxo de Ca^{2+} e aumento da permeabilidade da membrana em mitocôndrias de fígado, verificaram que devido à inibição da glutatona redutase mitocondrial por esses compostos, havia depleção de GSH e acúmulo de GSSG em mitocôndrias energizadas. A razão GSSG/GSH está relacionada com o estado de óxido redução dos nucleotídeos de piridina e com a direção do fluxo de Ca^{2+} . Portanto, a mitocôndria é mais permeável a Ca^{2+} quando GSSG está alto. Esta mesma relação também pode controlar o estado de redução dos grupos -SH de proteínas de membrana, regulando a atividade da lisofosfolípídeo-aciltransferase, causando efluxo de Ca^{2+} por alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial.

A reaciliação de lisofosfolípídeos liberados por ação da fosfolipase A2 mitocondrial depende da ação de enzimas que possuem grupos -SH ativos e que têm portanto, sua atividade diminuída quando decresce a disponibilidade de glutatona reduzida. Como consequência ocorre uma diminuição de NADPH devido a ação da enzima glutatona redutase (BEATRICE et alii, 1984).

LOTSCHER et alii (1979) trabalhando com mitocôndrias isoladas de animais com dieta deficiente em selênio ou complementada com esse metal, verificaram sua necessidade para a ativação da glutatona peroxidase. Estes autores observaram ainda que a oxidação de NAD(P)H e efluxo de Ca^{2+} após adição de hidroperóxido ocorria somente em mitocôndrias isoladas de animais suplementados com o metal, o que provavelmente levava a um nível normal da atividade dessa enzima. Esses resultados sugerem que o efeito de hidroperóxidos sobre o efluxo de Ca^{2+}

esteja ligado à diminuição da disponibilidade de NAD(P)H.

Outros trabalhos discutem a participação de grupamentos -SH de membrana, em equilíbrio com o estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais na capacidade de retenção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias (HARRIS et alii, 1979; LEHNINGER et alii, 1981; JUNG & BRIERLEY, 1982; MOORE et alii, 1983; SILIPRANDI et alii, 1983; BEATRICE et alii, 1984; VERCESI, 1984b). HARRIS et alii (1979) consideram que NAD(P)H mantém grupos -SH de membrana reduzidos, capazes de ligar Mg^{2+} e ADP, mantendo a permeabilidade específica da membrana. Nucleotídeos de adenina, Mg^{2+} e grupos -SH são fundamentais para manter a barreira de permeabilidade da mitocôndria (COELHO & VERCESI, 1980; SILIPRANDI et alii, 1983).

Efeitos citotóxicos relacionados com o metabolismo de quinonas parecem estar relacionados com a diminuição dos níveis de GSH durante sua oxidação reversível em hepatócitos isolados. Isto levaria a oxidação de grupos -SH de proteínas mitocondriais levando a uma condição de "stress" oxidativo, via oxidação e redução dos nucleotídeos de piridina, com formação de espécies ativadas de oxigênio, capazes de causar danos na membrana (THOR et alii, 1982). O efluxo de Ca^{2+} induzido pelo NAD(P)⁺ está envolvido na perturbação da homeostase do Ca^{2+} e diminui a viabilidade da célula durante o "stress" oxidativo (THOR et alii, 1982; JONES et alii, 1983).

Em trabalhos recentes considera-se que a oxidação não enzimática de nucleotídeos de piridina também pode levar ao efluxo de Ca^{2+} (FREI et alii, 1985b; GRAF et alii, 1985). Os primeiros autores verificaram que aloxana causa efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de rato, acompanhado pela oxidação e hidrólise dos nucleotídeos de piri-

dina, podendo a toxicidade da droga estar relacionada com modificações no estado redox de grupos -SH de proteínas da membrana mitocondrial.

Alguns autores propõem que o aumento da permeabilidade mitocondrial não esteja diretamente envolvido nesse processo de efluxo de Ca^{2+} ou que, quando ocorrem alterações na permeabilidade da membrana, estas não seriam causa mas sim consequência do movimento cíclico de Ca^{2+} . Assim, sob determinadas condições experimentais a liberação de Ca^{2+} da mitocôndria, decorrente do estado redox do NAD(P) parece ocorrer por mecanismo com características e propriedades compatíveis às de um processo fisiológico de regulação (FREI et alii, 1985a), independente de alterações irreversíveis da membrana mitocondrial (LOTSCHER et alii, 1980; VERCESI & LEHNINGER, 1982).

Outros estudos, utilizando oxidantes como oxaloacetato ou hidropéroxido demonstraram que o efluxo de Ca^{2+} estimulado pelo NAD(P)^+ mitocondrial pode ocorrer pelo mecanismo de troca de um íon Ca^{2+} por dois prótons, de forma eletroneutra (FISKUM & LEHNINGER, 1979). Assim, após a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria, a adição de hidropéroxido induz efluxo de Ca^{2+} (LOTSCHER et alii, 1980; BAUMHUTER & RICHTER, 1982; MOORE et alii, 1983; BELLOMO et alii, 1984a; FREI et alii, 1985a). Segundo estes autores, este efluxo ocorre por uma via específica, não associada a danos de membrana, e mudanças na permeabilidade desta seriam decorrentes do movimento cíclico de Ca^{2+} .

2 - Outra hipótese relativa ao mecanismo do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial induzido pela oxidação de NAD(P)H baseia-se na existência de uma proteína isolada por SOTTOCASA et alii (1972) que seria responsável pela distribuição de Ca^{2+} através da membrana. Esses autores isolaram uma glicoproteína da membrana mitocondrial interna e propuse-

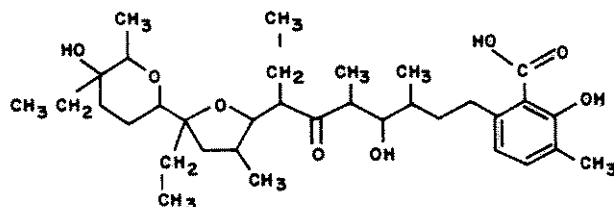
ram que esta seria responsável pelo transporte de Ca^{2+} na mitocôndria. Esta glicoproteína liga Ca^{2+} com alta afinidade, possuindo quatro sítios de ligação de NAD^+ com cooperatividade positiva (SANDRI et alii, 1979; PANFILI et alii, 1980). A ligação de NAD^+ a essa proteína promoveria a regulação metabólica do fluxo de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial, induzindo uma alteração alostérica, com consequente diminuição da afinidade da proteína pelo cátion. PANFILI et alii (1980) verificaram que o efluxo de Ca^{2+} induzido pela adição de oxidantes de NAD(P)H como oxaloacetato ou acetoacetato era inibido por anticorpos obtidos contra essa glicoproteína, o que comprovaria sua participação na regulação da distribuição de Ca^{2+} mitocondrial em condições em que houvesse alteração da relação $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$.

3 - A terceira proposta com relação a esse mecanismo de efluxo de Ca^{2+} está relacionada com os resultados apresentados por LOTSCHER et alii (1980), que observaram que durante o efluxo de Ca^{2+} induzido por hidroperóxido, ocorria um decréscimo do conteúdo de nucleotídeos de piridina mitocondriais, com o aparecimento de nicotinamida no meio externo, sugerindo que durante esse processo teria havido hidrólise do NAD(P)^+ . Esta hidrólise, catalisada possivelmente por uma NADase da membrana mitocondrial interna, e a liberação de nicotinamida, foram verificadas por outros autores, tanto em mitocôndrias de fígado quanto de cérebro (RICHTER et alii, 1983; SATRUSTEGUI & RICHTER, 1984; FREI et alii, 1985a). Nessas condições o efluxo de Ca^{2+} era inibido por ATP, que inibia também a hidrólise dos nucleotídeos de piridina (HOFSTETTER et alii, 1981). Com base nesses resultados, RICHTER et alii (1983) propuseram que a formação de ADP-ribose, produto hidrolítico de NAD^+ , causaria modificação covalente de uma proteína da

membrana interna mitocondrial, que estaria envolvida no mecanismo molecular do efluxo de Ca^{2+} .

A NADase (NAD^+ -glicohidrolase) responsável pela hidrólise dos nucleotídeos de piridina, catalisa também sua síntese (MOSER et alii, 1983), o que pode explicar a reversibilidade da hidrólise de NAD(P)^+ encontrada por LOTSCHER et alii (1980) na presença de nicotinamida. Assim, uma perda líquida dos nucleotídeos de piridina somente era observada após a mitocôndria ter captado quantidades relativamente altas de Ca^{2+} (aproximadamente $120 \text{ nmoles.mg}^{-1}$), e não quando o movimento cíclico de Ca^{2+} era limitado (FREI et alii, 1985a).

Alterações em funções mitocondriais induzidas pelo antibiótico X-537A.



ESTRUTURA QUÍMICA DO ANTIBIÓTICO X-537A

O estudo do mecanismo de ação do antibiótico X-537A tem demonstrado que em concentrações abaixo daquelas requeridas para sua ação como ionóforo de Ca^{2+} e Mg^{2+} , este atua especificamente em

processos mitocondriais ligados à energia (LIN & KUN, 1973b). Estes autores verificaram que em concentrações da ordem de 0,05 a 0,1 μM o antibiótico X-537A inibe a respiração estimulada por ADP ou por DNF na presença do substrato glutamato, mas não afeta o estado respiratório 4. Nessas condições, também ocorre inibição da ATP sintetase.

A ação do X-537A nesses processos mitocondriais pode ser explicada pela formação de um complexo hidrofóbico do X-537A com cátions bivalentes ligados à membrana, mais provavelmente Mg^{2+} (LIN & KUN, 1973b).

LIN & KUN (1973a) verificaram que o sítio de inibição sensível ao antibiótico está relacionado com a redução do NADP^+ pelos substratos glutamato ou isocitrato. Uma vez que nem a isocitrato nem a glutamato desidrogenase são inibidas por X-537A, seu efeito deve ser em um sítio entre a desidrogenase e o sistema de transferência de elétrons da membrana interna, inibindo a redução de NADP^+ . A oxidação de succinato ou citocromo c não é afetada pelo antibiótico (LIN & KUN, 1973a).

Este trabalho tem como objetivo estudar o fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de rato utilizando compostos que alteram a velocidade de efluxo do íon. Foi utilizado o composto t-butil hidroperóxido, que conforme já descrevemos, oxida o NAD(P)H através da ação do sistema enzimático glutatona peroxidase/glutatona redutase, induzindo o efluxo mitocondrial de Ca^{2+} . Este estudo foi feito em condições em que a membrana mitocondrial se encontrava protegida e as mitocôndrias estavam carregadas com concentrações de Ca^{2+} próximas às

fisiológicas. Um outro composto utilizado foi o antibiótico X-537A que também altera o fluxo de Ca^{2+} , induzindo uma maior captação do íon e inibindo o efluxo estimulado por vermelho de rutênio ou hidroperóxido, quando utilizado em concentrações bastante inferiores às que age como ionóforo.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS:

Mitocôndrias de fígado eram isoladas de ratas de quatro a seis meses de idade, mantidas em jejum por 12 horas, de acordo com o método de SCHNEIDER & HOGEBOOM (1950), com algumas modificações.

O animal era sacrificado por decapitação e o fígado, retirado imediatamente, era lavado e mantido em solução de sacarose 250mM, em banho de gelo. A seguir era homogeneizado em meio contendo 250mM de sacarose e 0,5mM de EGTA, utilizando um homogeneizador Potter-Elvehjem. O homogeneizado era centrifugado a 800xg por 5 minutos, a 0°C. O sobrenadante era mantido em banho de gelo e o sedimento era novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. O sedimento resultante era descartado e os sobrenadantes eram combinados e centrifugados a 10.000xg por 10 minutos. O sobrenadante resultante era descartado e o sedimento era lavado em solução de sacarose 250mM, sem EGTA. Após nova centrifugação a 11.500xg por 10 minutos, era ressuspenso no mesmo meio, numa concentração de aproximadamente 100mg de proteína por ml de meio. A suspensão mitocondrial era utilizada até 6 horas após o isolamento.

DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL:

A concentração de proteína da suspensão mitocondrial era feita de acordo com o método de MURPHY & KIES (1960). O princípio do método é a determinação da concentração de ligações peptídicas, através da medida de diferença de absorbância da solução proteica em NaOH 5mM, nos comprimentos de onda 215 e 225 nm. Esta diferença de absorbância é diretamente proporcional à concentração de proteína na solução. Albumina de soro bovino era utilizada como padrão.

DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO:

O consumo de oxigênio era determinado polarograficamente, através de um eletrodo de Clark (Yellow Springs Instruments Co.), acoplado a um oxígrafo. A incubação se processava em uma câmara de vidro fechada, termostatzada, com agitação magnética.

A qualidade das mitocôndrias era testada em função da atividade de fosforilação oxidativa, com a adição de ADP e determinação da relação entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados respiratórios 3 e 4 (CHANCE, 1959). A suspensão mitocondrial era considerada viável para uso, contendo grande proporção de mitocôndrias intactas acopladas, quando esta relação era igual ou maior que 5,0.

A viabilidade da preparação mitocondrial também era verificada relacionando-se a velocidade de consumo de oxigênio no estado respiratório 4 com a velocidade de respiração desacoplada, após adição de FCCP.

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

Captação e efluxo de Ca^{2+} eram verificados usando-se eletrodo específico (Radiometer, F2112 Calcium selectrode), que registra variações na concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação. O eletrodo era ligado a um amplificador de sinais e a um registrador potenciométrico. A resposta do eletrodo era calibrada pela adição de uma mistura tampicante de Ca^{2+} -EGTA ao meio de reação (BECKER, 1980; BURGESS et alii, 1983). A incubação se processava em câmara de vidro termostaticada, com agitação magnética.

O conteúdo total de Ca^{2+} das mitocôndrias e do meio de reação era determinado através de espectrofotometria de absorção atômica (Perkin Elmer modelo 305). Amostras da suspensão mitocondrial, contendo 3mg de proteína, eram dissolvidas em 4,0ml de água deionizada, e adicionadas em 2,0ml de solução de óxido de lantânio (GOCHMAN & GIVELBER, 1970), procedendo-se a dosagem no espectrofotômetro, utilizando-se curvas padrões de Ca^{2+} na mesma faixa de concentração.

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA

O potencial elétrico através da membrana mitocondrial interna era medido por dois métodos diferentes: (a) Através de eletrodo sensível à TPP^+ e (b) através da utilização do corante safranina.

(a) O potencial de membrana mitocondrial era verificado através do uso de eletrodo sensível à TPP^+ , considerando que cátions li-possolúveis são transportados eletroforéticamente para o interior de células ou organelas, quando estas estão energizadas.

As mitocôndrias eram incubadas nas condições experimentais descritas, em meio de reação contendo $3,0\mu M$ de tetrafenilfosfônio (TPP^+). A concentração de TPP^+ no meio extramitocondrial era monitorada com um eletrodo seletivo, preparado em nosso laboratório, de acordo com KAMO et alii (1979). Este eletrodo era construído usando membrana de cloreto de polivinila (PVC) contendo tetrafenilborato (TPB^-) como trocador de íons. Uma solução de $3,0ml$ de tetrafenilborato de sódio $10^{-2}M$ diluída em tetrahidrofurano (THF) era adicionada a $10ml$ de solução de THF contendo $0,5g$ de PVC e $1,5ml$ de dioctilftalato. A solução final era colocada em uma placa de Petri de $60mm$ de diâmetro e o solvente evaporado à temperatura ambiente. A membrana obtida era transparente e possuía $0,15$ a $0,2mm$ de espessura. Um pedaço da membrana era colado com THF em um tubo de PVC. Solução de TPP^+ $0,2M$ era colocada dentro do tubo, como solução de referência interna. Esta solução era ligada a um eletrodo de Ag-AgCl através de um tubo fino contendo ágar em solução saturada de KCl. Antes do uso era necessário que a membrana fosse ativada, mantendo-se o eletrodo por 12 horas em solução de TPP^+ $10^{-2}M$.

O potencial de membrana mitocondrial era avaliado de acordo com a seguinte equação:

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

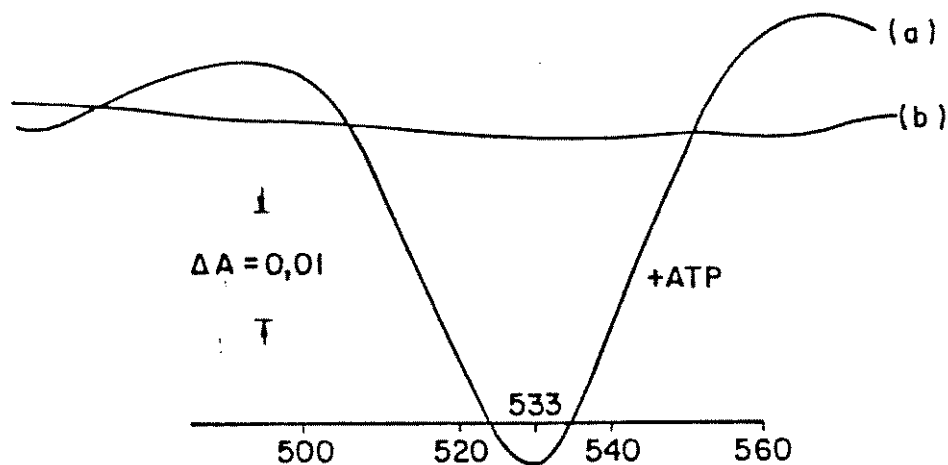
onde v representa o volume mitocondrial, considerado $1,4\mu\text{l}$ (KAMO et alii, 1979); V , o volume do meio de incubação; e ΔE , a deflexão do eletrodo de TPP^+ a partir da linha de base, até a estabilização após a adição de mitocôndria. Esta equação foi derivada assumindo-se que a distribuição do TPP^+ entre as mitocôndrias e o meio segue a equação de Nernst (MURATSUGU et alii, 1977).

O eletrodo era calibrado com adições sucessivas de solução de TPP^+ $10\mu\text{M}$ ao meio de reação, e as variações obtidas correspondiam às diferenças de potencial do eletrodo.

A reação era realizada em câmara de vidro termostaticada, com agitação magnética, e o eletrodo era acoplado a um registrador potenciométrico.

(b) O potencial de membrana mitocondrial era monitorado em um espectrofotômetro de duplo feixe e duplo comprimento de onda (Perkin-Elmer modelo 356), empregando-se safranina como indicador (AKERMAN & WIKSTROM, 1976).

As mitocôndrias eram incubadas na presença de safranina $10\mu\text{M}$ e a variação da absorbância, na faixa do espectro visível de 511-533nm era verificada com o espectrofotômetro acoplado a um registrador potenciométrico. O espectro da safranina apresenta mudanças quando esta se encontra ligada à membrana mitocondrial, o que está associado à variações no potencial elétrico transmembrana.



Espectro de Absorção de safranina em mitocôndrias energizadas (a) e desenergizadas (b). (AKERMAN & WIKSTROM, 1976).

A diferença de absorbância 511-533nm varia linearmente em função dos valores de $\Delta\Psi$, numa faixa compreendida entre 50 e 170mV, obtidos a partir de uma curva de calibração que relaciona $A_{511-533nm}$ com valores de potencial de membrana (AKERMAN & WIKSTROM, 1976).

A curva de calibração era obtida utilizando-se quantidades conhecidas de KCl, na presença do ionóforo valinomicina e calculando-se o $\Delta\Psi$ através da relação:

$$\Delta\Psi = 60 \log \frac{[K^+]_{in}}{[K^+]_{ex}}$$

onde $[K^+]_{in}$ é a concentração do íon no interior da mitocôndria, assumida como 120mM, e $[K^+]_{ex}$ é a concentração do íon adicionado no meio de incubação. Esta relação é possível, uma vez que mudanças espectrais na safranina são dependentes do potencial de difusão do potássio e este, na presença de valinomicina, é captado por mecanismo eletroforético (AKERMAN & WIKSTROM, 1976).

DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA MITOCONDRIAIS:

O estado redox do NAD(P) era determinado fluorimetricamente excitando-se a suspensão mitocondrial em 366nm e medindo-se a emissão em 450nm, em um espectrofluorímetro Aminco Bowman. Somente a forma reduzida dos nucleotídeos de piridina apresenta fluorescência (WILLIAMSON & CORKEY, 1969). A sua oxidação ou redução, na suspensão mitocondrial era registrada durante as incubações, nas diferentes condições experimentais.

Alternativamente, os nucleotídeos de piridina reduzidos eram determinados através do método descrito por BEATRICE et alii (1984). Amostras de 1,5ml de meio de reação contendo 2mg de proteína por ml, eram adicionadas em 0,3ml de KOH 1N em etanol. A mistura era mantida 30 minutos a temperatura ambiente, com agitação, e em seguida colocada em banho de gelo durante 10 minutos. Após o tempo de incubação era adicionado 0,5ml de tampão trietanolamina 0,5M, KH_2PO_4 0,4M e K_2HPO_4 0,1M e a solução final era mantida 10 minutos a temperatura ambiente. Após o ajuste do pH em 7,5, a solução era centrifugada 10 minutos a 5.000 rpm, em centrífuga clínica. Os nucleotídeos de piridina reduzidos eram determinados fluorimetricamente em alíquotas de 1,0ml do sobrenadante, pela adição sequencial de piruvato 5mM e 20 unidades de desidrogenase láctica (NADH), seguido por glutatona oxidada 0,5mM e 5 unidades de glutatona redutase (NADPH). A fluorescência era comparada com a obtida, nas mesmas condições experimentais, utilizando-se padrões conhecidos de NADH e NADPH.

MEDIDA DA VARIAÇÃO DO VOLUME MITOCONDRIAL:

A variação do volume mitocondrial (inchamento) era verificada pela medida do espalhamento de luz num ângulo de 90' em 520nm, em um espectrofluorímetro Aminco Bowman (PACKER, 1967; BEAVIS et alii, 1985; GARLID & BEAVIS, 1985).

REAGENTES:

O t-butil hidroperóxido era obtido da SIGMA e o antibiótico X-537A era sal de sódio, proveniente da Hoffmann-La Roche.

Os demais reagentes eram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente (SIGMA, ALDRICH, MERCK ou equivalentes) e os sais utilizados eram de potássio.

RESULTADOS

FLUXO DE Ca^{2+} NA PRESENÇA DE T-BUTIL HIDROPERÓXIDO OU ACETOACETATO.

O fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de rato foi estudado na presença de $50\mu\text{M}$ de t-butil hidropéroxido ou $1,0\text{mM}$ de acetoacetato, que são oxidantes de NAD(P)H mitocondriais. A FIGURA 01 mostra um experimento realizado na presença de acetato como ânion permeante, concentrações fisiológicas de ATP e Mg^{2+} (BECKER et alii, 1980) e 20 nmoles de Ca^{2+} adicionado por mg de proteína mitocondrial.

Nestas condições, quando a suspensão mitocondrial era incubada na ausência de oxidantes de NAD(P)H (linha pontilhada), a adição de mitocôndrias decrescia a concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação até atingir a faixa de $0,75\mu\text{M}$, que então se mantinha constante. Na presença do hidropéroxido (linha cheia), a adição de mitocôndrias resultava em uma velocidade inicial de captação de Ca^{2+} idêntica à do controle, ocorrendo porém um aumento transitório na concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial, antes que o estado de equilíbrio fosse alcançado. Após o efluxo de Ca^{2+} induzido por t-butil hidropéroxido, verificava-se recaptação do íon e as mitocôndrias apresentavam capacidade de manter a concentração do Ca^{2+} livre externo nos mesmos níveis observados na condição controle.

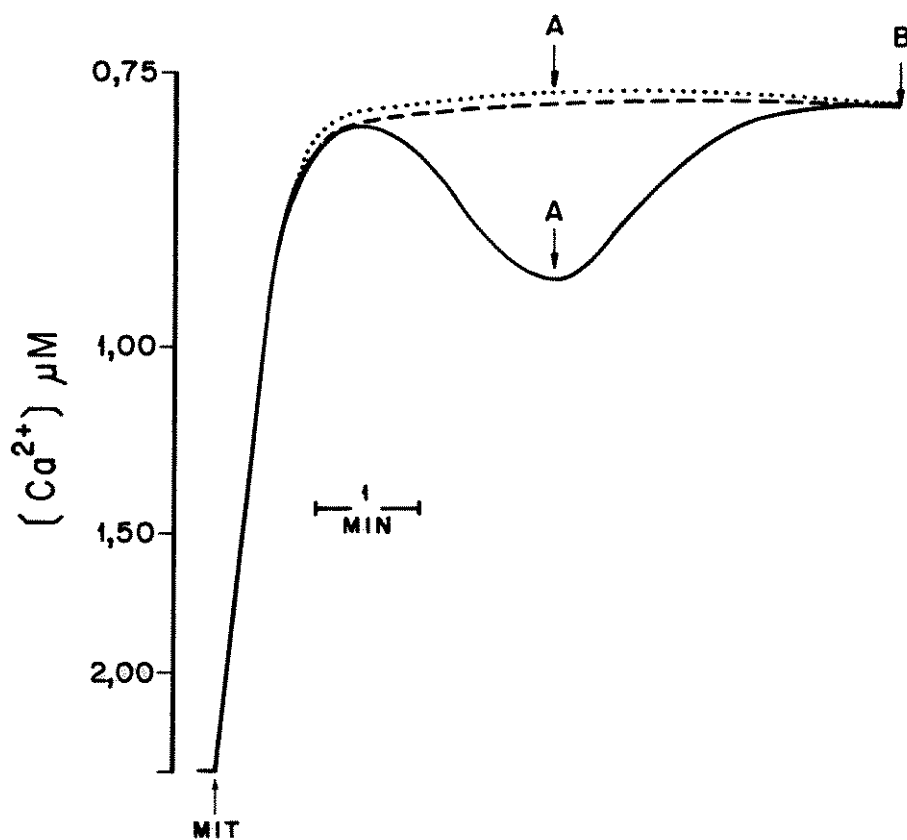


FIGURA 01: Fluxo de Ca^{2+} na presença de t-butil hidropéroxido ou acetatoacetato. Mitocôndrias de fígado (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (32°C) contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 3,0mM pH7,2, Mg^{2+} 4,0mM, ATP 3,0mM, BSA 0,05%, rotenona 4,0 μM , oligomicina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$, acetato 10mM e succinato 2,0mM, na presença de 20nmoles de Ca^{2+} adicionado por mg de proteína. 1,0mM de acetatoacetato (linha tracejada) ou 50 μM de t-butil hidropéroxido (linha cheia) estavam presentes no meio de reação antes da adição de mitocôndrias. Nos locais indicados por setas eram retiradas amostras do meio de suspensão para dosagem enzimática de nucleotídeos de piridina reduzidos.

Adicionando as mitocôndrias em meio de reação contendo acetoacetato (linha tracejada), ocorria captação do íon e tamponamento do Ca^{2+} livre extramitocondrial na mesma faixa de concentração que no controle, não se observando o efluxo transiente de Ca^{2+} obtido na presença de hidroperóxido.

CONTEÚDO DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA REDUZIDOS EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO, NA PRESENÇA DE T-BUTIL HIDROPERÓXIDO OU ACETOACETATO.

Considerando que o estado oxidado dos nucleotídeos de piridina intramitocondriais estimulam o efluxo de Ca^{2+} , foi verificada a extensão desta oxidação nas condições utilizadas nos experimentos da FIGURA 01. Amostras do meio de suspensão foram retiradas nos locais indicados por setas na FIGURA 01, para análise do conteúdo de nucleotídeos de piridina reduzidos, de acordo com o procedimento descrito em "materiais e métodos". Registros do fluxo de Ca^{2+} eram mantidos durante a coleta das amostras.

A TABELA 01 mostra que nas amostras retiradas durante a liberação de Ca^{2+} induzida por hidroperóxido, ocorria uma diminuição no conteúdo tanto de NADH como de NADPH (A), sendo que níveis próximos aos do controle experimental eram obtidos nas amostras retiradas após a recaptção de Ca^{2+} (B). Na presença de acetoacetato, foi verificado que ocorria diminuição somente da concentração de NADH. Esses resultados são representativos de uma série de quinze experimentos.

CONDIÇÕES	NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA REDUZIDOS	
	(nmol.mg ⁻¹ proteína)	
	NADH	NADPH
CONTROLE	3,52	4,75
T-BUT.OOH (A)	1,66	1,99
T-BUT.OOH (B)	3,37	4,08
AcAc	1,59	4,73

TABELA 01: Conteúdo de nucleotídeos de piridina reduzidos em mitocôndrias de fígado de rato, na presença de t-butil hidroperóxido ou acetoacetato. Mitocôndrias (8,0mg de proteína) eram incubadas em 4,0ml de meio (32°C) com a mesma composição do experimento da FIGURA 01. Amostras de 1,5ml do meio de suspensão eram retiradas nos locais indicados por setas na FIGURA 01, e o conteúdo de NAD(P)H era determinado enzimaticamente.

CONSUMO DE OXIGÊNIO, FLUXO DE Ca^{2+} E INCHAMENTO MITOCONDRIAL DURANTE O METABOLISMO DE HIDROPERÓXIDO EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO, APÓS ACUMULAREM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Ca^{2+} . EFEITO DE ATP E Mg^{2+} .

Os experimentos mostrados na FIGURA 02 foram realizados com diferentes concentrações de Ca^{2+} , mantendo-se as demais condições descritas para o experimento da FIGURA 01, onde o hidroperóxido induzia um efluxo de Ca^{2+} completamente reversível. Procurou-se verificar se nessas condições o acoplamento mitocondrial era mantido e qual o efeito da presença de ATP e Mg^{2+} no consumo de oxigênio (traçado A), no fluxo de Ca^{2+} (traçado B) e no inchamento mitocondrial (traçado C).

Essas determinações experimentais eram iniciadas pela adição de mitocôndrias ao meio de suspensão, na ausência (linha tracejada) ou presença (linha cheia) de $50\mu\text{M}$ de hidroperóxido e concentrações de Ca^{2+} que variavam de 20 a 40nmol por mg de proteína mitocondrial (traçados I, II e III sucessivamente). Essas concentrações de Ca^{2+} correspondem à soma do Ca^{2+} adicionado com o Ca^{2+} contaminante do meio ($10\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$), determinado através de absorção atômica. As linhas pontilhadas referem-se aos experimentos realizados na presença de $50\mu\text{M}$ de hidroperóxido e na ausência de ATP e Mg^{2+} .

Durante o metabolismo do hidroperóxido, enquanto NAD(P)^+ permanecia oxidado, observou-se efluxo de Ca^{2+} , com aumento paralelo na

velocidade de consumo de oxigênio e inchamento mitocondrial. Com o retorno do NAD(P)^+ ao estado reduzido, observou-se recaptação de Ca^{2+} e diminuição na velocidade de consumo de oxigênio, voltando a valores semelhantes aos do controle. Após este processo, as mitocôndrias permaneciam altamente acopladas, o que foi verificado com a adição de FCCP $0,5\mu\text{M}$, observando-se um aumento imediato na velocidade de consumo de oxigênio.

Os valores de controle respiratório encontrados eram na faixa de 9,5, tanto nos experimentos controles como naqueles onde o efluxo transitório de Ca^{2+} era induzido pelo hidroperóxido.

Observou-se um aumento nos efeitos induzidos por hidroperóxido com o aumento na concentração de Ca^{2+} ; entretanto, mesmo na presença da maior quantidade de Ca^{2+} testada (40nmoles. mg^{-1}), ocorria completa recaptação do íon após o efluxo induzido pelo hidroperóxido, paralelamente ao retorno da velocidade de consumo de oxigênio para os valores originais.

Ao contrário dos demais efeitos causados pelo hidroperóxido, o inchamento mitocondrial não se mostrou reversível. Tanto a velocidade inicial quanto a extensão do inchamento mostraram uma dependência direta da concentração de Ca^{2+} no meio.

Na ausência de ATP e Mg^{2+} tanto o efluxo de Ca^{2+} quanto o aumento na velocidade de consumo de oxigênio eram irreversíveis, além de serem observados uma larga amplitude de inchamento e desacoplamento mitocondrial.

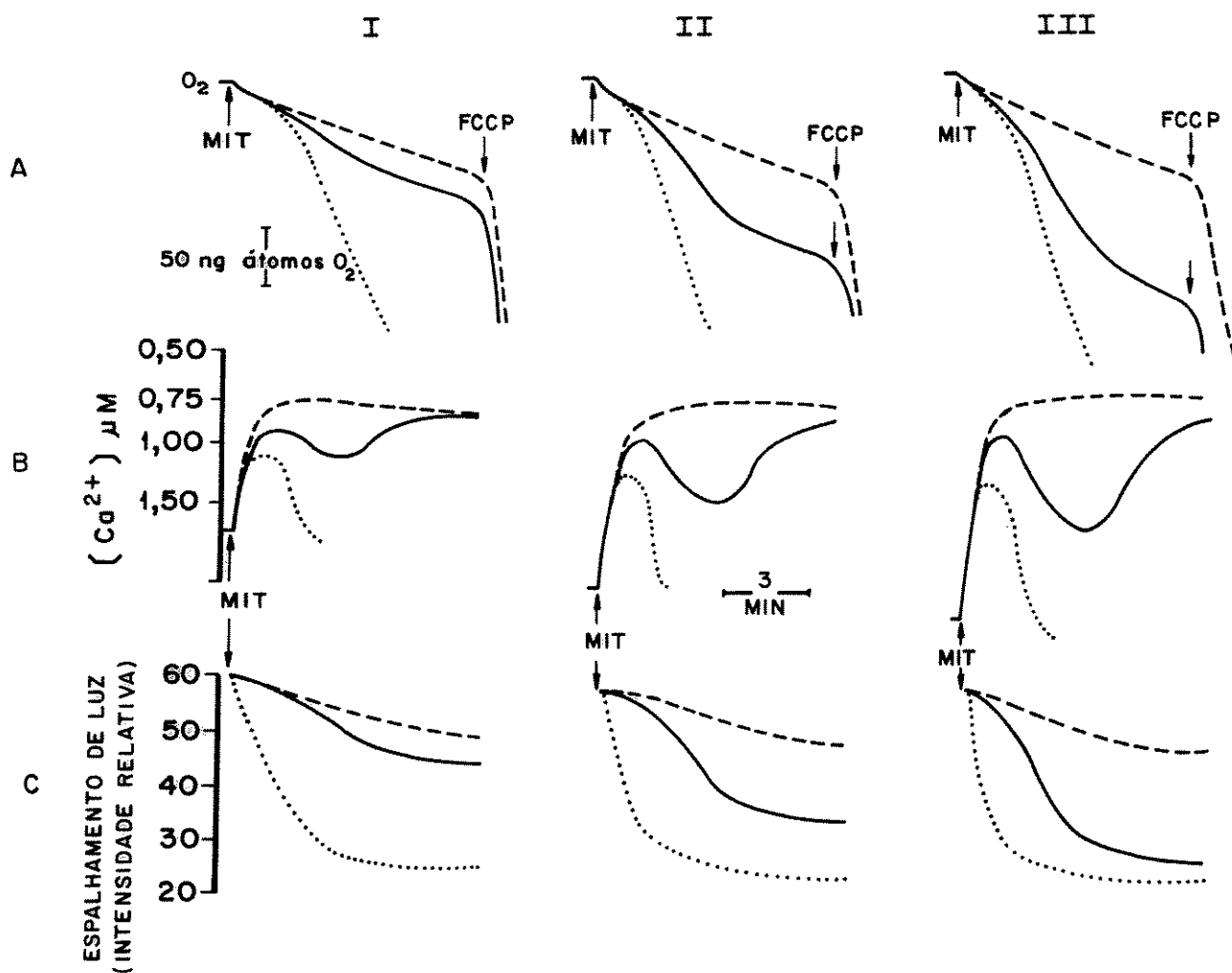


FIGURA 02: Consumo de oxigênio, fluxo de Ca^{2+} e inchamento mitocondrial durante o metabolismo do t-butil hidroperóxido em mitocôndrias de fígado, após acumularem diferentes concentrações de Ca^{2+} . Efeito de ATP e Mg^{2+} . Mitocôndrias (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (32°C) idêntico ao da FIGURA 01, na presença (linha cheia) ou ausência (linha tracejada) de 50μM de t-butil hidroperóxido, variando-se a concentração de Ca^{2+} de 20 (I), 30 (II) ou 40 (III) nmoles por mg de proteína. As linhas pontilhadas representam o efeito do hidroperóxido na ausência de ATP e Mg^{2+} . FCCP (0,5μM) era adicionado nos locais indicados por setas. Em A, representa-se a velocidade de consumo de oxigênio; em B, o fluxo de Ca^{2+} e em C, o espalhamento de luz.

**FLUXO DE Ca^{2+} DURANTE O METABOLISMO DO HIDROPERÓXIDO
EM MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS POR ATP E PELA RESPIRAÇÃO
ENDÓGENA.**

O experimento descrito na FIGURA 03 mostra a reversibilidade do efluxo de Ca^{2+} induzido por NAD(P)^+ em mitocôndrias incubadas na ausência de inibidores respiratórios ou de redutores de NAD(P)^+ , utilizando-se hidróperóxido como oxidante.

A suspensão mitocondrial era adicionada ao meio de reação na ausência (linha tracejada) ou na presença (linha cheia) do hidróperóxido. A oxidação de NAD(P)H ocorria em paralelo com o efluxo transitório de Ca^{2+} das mitocôndrias. Os números entre parênteses representam os valores de NAD(P)H em nmoles por mg de proteína, obtidos em amostras retiradas onde indicado por setas, determinados conforme descrito em "materiais e métodos". Com a recaptação do íon, o NAD(P)H voltava a concentrações similares às do controle experimental, indicando uma relação entre o estado redox dos nucleotídeos de piridina e o efluxo de Ca^{2+} induzido por hidróperóxido (traçado A).

O traçado B mostra o grau de acoplamento da mesma suspensão mitocondrial analisada em A. Após um ciclo de efluxo e recaptação de Ca^{2+} , era feita a adição de rotenona, oligomicina e succinato, ocorrendo um consumo de oxigênio semelhante ao do controle experimental. Esse consumo correspondia ao estado respiratório 4 e foi verificado o acoplamento mitocondrial pela adição de FCCP que causava, em ambos os casos, igual estímulo da respiração. O controle respiratório, tanto no

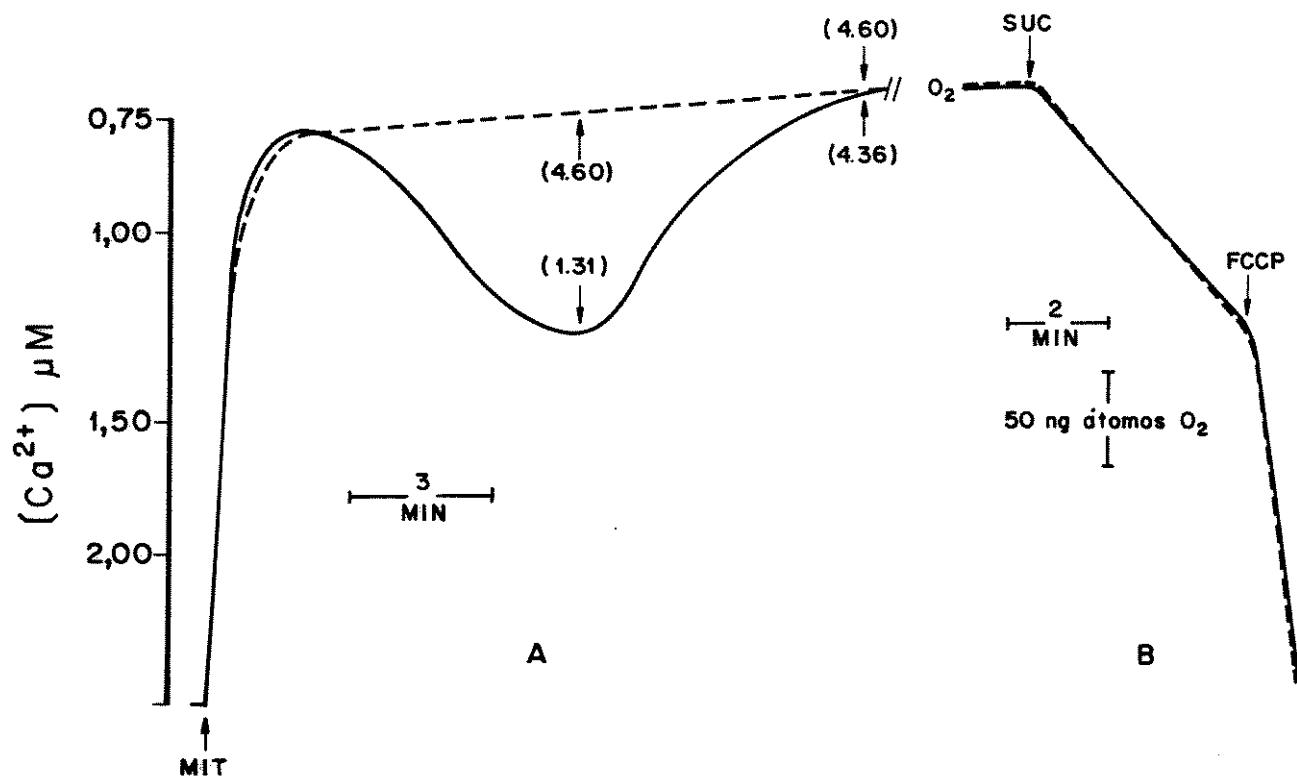


FIGURA 03: Fluxo de Ca^{2+} durante o metabolismo do hidróperóxido em mitocôndrias energizadas por ATP e pela respiração endógena. Mitocôndrias (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0 ml de meio (32°C) contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 3,0mM pH 7,2, Mg^{2+} 4,0mM, ATP 3,0mM, BSA 0,05% e acetato 10,0mM, na presença (linha cheia) ou ausência (linha tracejada) de 50 μM de t-butil hidróperóxido e com 20 nmoles de Ca^{2+} adicionado. O traçado A representa o fluxo de Ca^{2+} , indicando-se a concentração de nucleotídeos de piridina reduzidos (nmoles.mg^{-1}) determinada em amostras colhidas nos locais indicados por setas. O traçado B representa a velocidade de consumo de oxigênio após adição de rotenona 4,0 μM , oligomicina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e succinato 2,0mM como substrato respiratório. FCCP (0,5 μM) era adicionado onde indicado.

sistema contendo hidróperóxido (linha cheia) quanto naquele sem oxidante (linha tracejada) era de aproximadamente 7,5.

MUDANÇAS NO POTENCIAL DE MEMBRANA E NO VOLUME MITOCONDRIAL DURANTE O EFLUXO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR HIDRÓPERÓXIDO.

A participação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) no mecanismo de efluxo de Ca^{2+} induzido pelo estado oxidado do NAD(P) mitocondrial é controvertida. Esta questão foi estudada nas nossas condições experimentais onde as mitocôndrias permaneciam acopladas após efluxo e recaptação de Ca^{2+} na presença de hidróperóxido.

A FIGURA 04 mostra que ocorria diminuição do valor de $\Delta\Psi$ (traçado B) que acompanhava o aumento transitório da concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial (traçado A) induzido pelo hidróperóxido. Esse efeito sobre $\Delta\Psi$ também mostrou ser reversível.

Com a finalidade de verificar até que ponto o decréscimo em $\Delta\Psi$ era devido a um aumento do movimento cíclico de Ca^{2+} , vermelho de rutênio ($0,7\mu\text{M}$) foi adicionado onde indicado pelas setas. Esta adição resultou em um decréscimo menor no $\Delta\Psi$, embora não tivesse sido registrado um retorno imediato aos valores controles (linha tracejada). Houve, como esperado, um estímulo na velocidade de efluxo líquido de Ca^{2+} no sistema contendo hidróperóxido em relação ao sistema controle (linhas tracejadas). A velocidade de efluxo líquido de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio era 8,0nmoles por minuto por mg de proteína mitocondrial, na presença de hidróperóxido e somente 1,0nmol por minu-

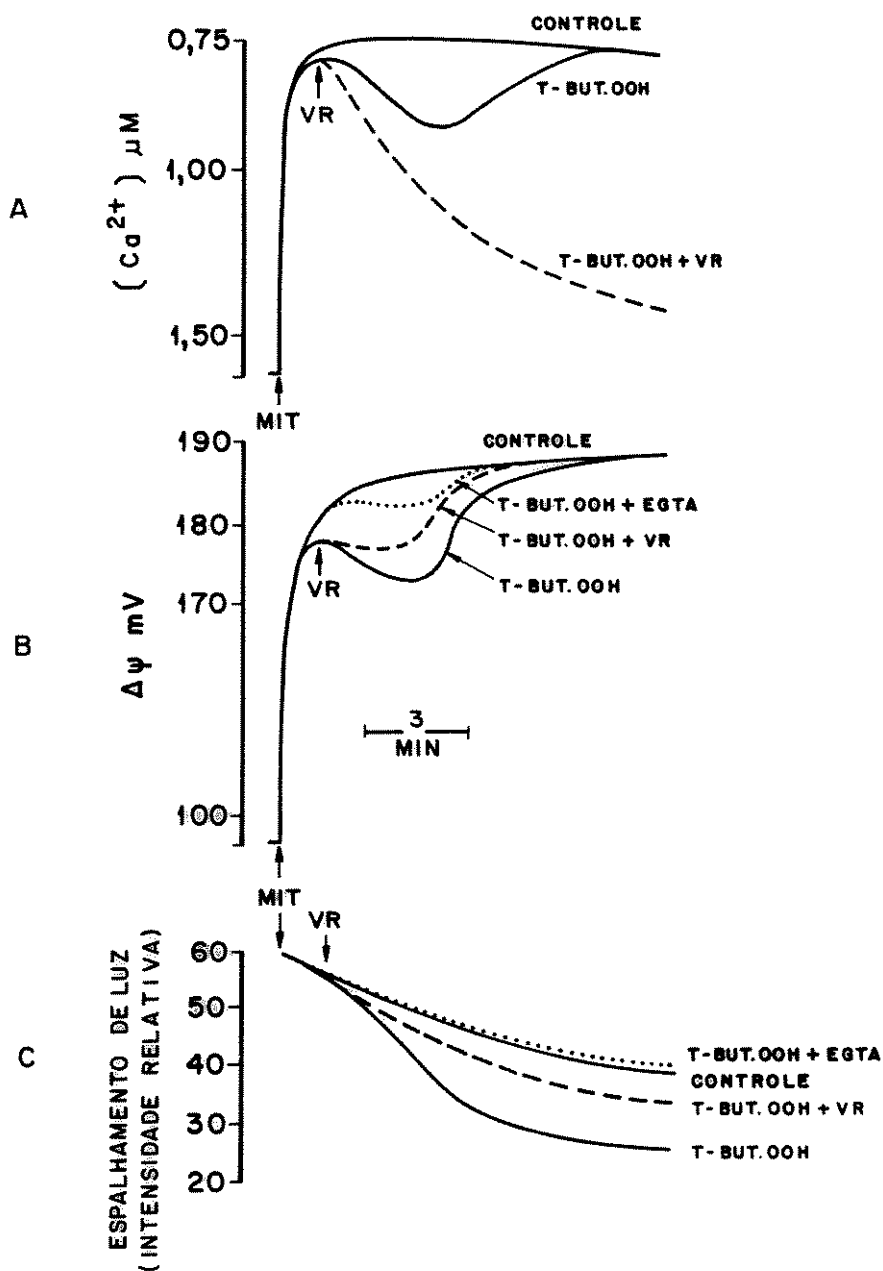


FIGURA 04: Mudanças no potencial de membrana e no volume mitocondrial durante o efluxo de Ca^{2+} induzido por hidroperóxido. Mitocôndrias (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (32°C) em condições similares às da FIGURA 01, na presença ou ausência de $50\mu M$ de t-butil hidroperóxido, e acrescido de $30\mu M$ de TPP^+ quando era verificado o potencial de membrana. O traçado A representa fluxo de Ca^{2+} ; o B, o potencial de membrana; e o C, a medida de espalhamento de luz. Vermelho de rutênio ($0,7\mu M$) era adicionado no local indicado (linha tracejada), e EGTA ($0,5mM$), quando presente, era adicionado antes das mitocôndrias (linha pontilhada). O meio continha $20nmoles$ de Ca^{2+} adicionado.

to por mg de proteína mitocondrial, na ausência do oxidante de NAD(P)H. A extensão do inchamento mitocondrial (traçado C) que era maior no sistema contendo hidróperóxido, também diminuiu com a adição de vermelho de rutênio (linha tracejada).

As linhas pontilhadas (traçados B e C) mostram resultados experimentais onde as mitocôndrias eram adicionadas em meio livre de Ca^{2+} , com EGTA presente desde o início, e contendo hidróperóxido como oxidante de NAD(P)H. Embora o inchamento mitocondrial tenha sido completamente abolido nessas condições, verificou-se que EGTA não previnha totalmente o decréscimo de $\Delta\Psi$.

CORRELAÇÃO ENTRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO E FLUORESCÊNCIA DE NAD(P)H INDUZIDA POR HIDRÓPERÓXIDO.

Os experimentos mostrados na FIGURA 05 comparam o tempo transcorrido durante o estímulo do consumo de oxigênio (traçado A) e a oxidação de NAD(P)H (traçado B) pelo hidróperóxido, em mitocôndrias após captarem 20nmoles de Ca^{2+} .

Com a adição de vermelho de rutênio (linha tracejada), que previne o movimento cíclico de Ca^{2+} , ocorreu uma diminuição na velocidade de consumo de oxigênio induzida por hidróperóxido, porém permaneceu um pequeno estímulo em relação ao controle. Adicionando as mitocôndrias em meio de reação sem Ca^{2+} livre, com EGTA presente, o hidróperóxido ainda induziu um pequeno aumento na velocidade de respiração (linha pontilhada). As diferentes velocidades de consumo de oxigênio, observadas neste experimento, refletem os diferentes valores de

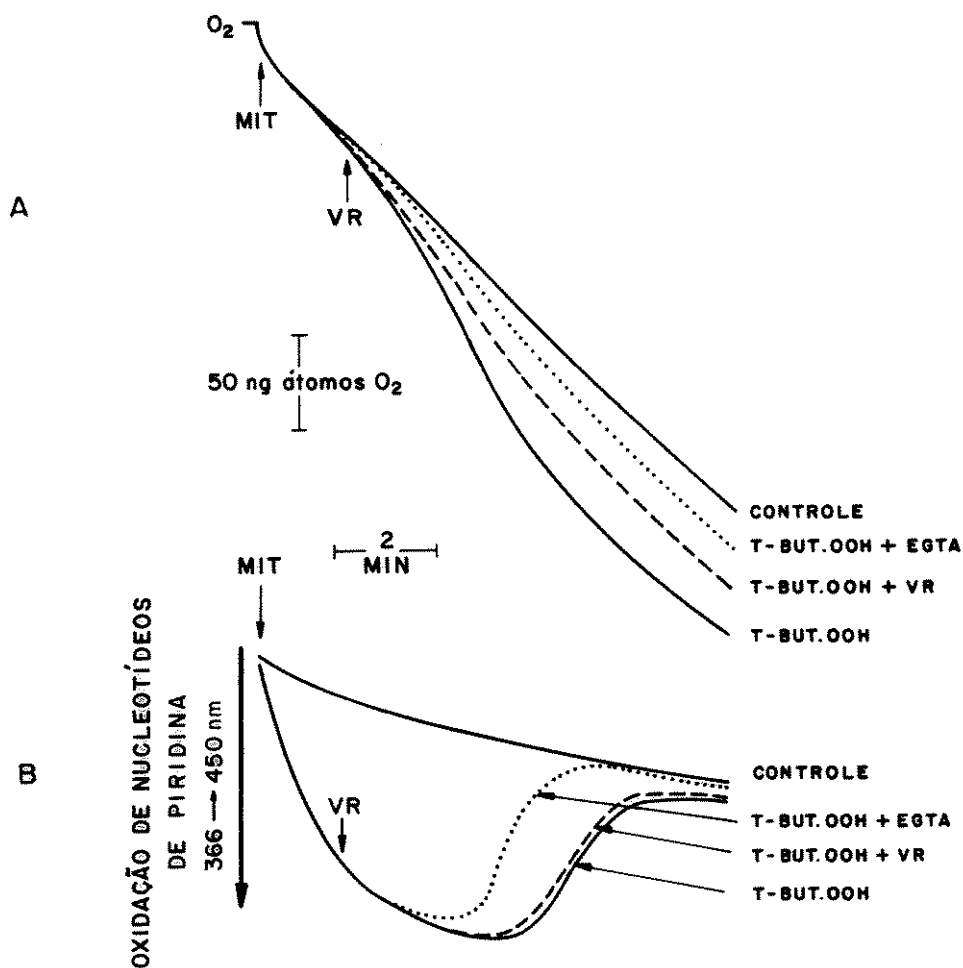


FIGURA 05: Correlação entre a velocidade de consumo de oxigênio e fluorescência de NAD(P)H induzida por hidroperóxido. Mitocôndrias (1,0mg de proteína) eram incubadas nas mesmas condições da FIGURA 04. O traçado A representa a velocidade de consumo de oxigênio e o B, a oxidação dos nucleotídeos de piridina.

potencial elétrico de membrana observados nas mesmas condições experimentais da figura anterior.

O estado de óxido redução de NAD(P)H era determinado pela emissão de fluorescência em 450nm, quando o sistema era excitado em 366nm. Na presença do hidroperóxido verificou-se diminuição da fluorescência, indicando que os nucleotídeos de piridina mitocondriais estavam sendo oxidados durante a metabolização do hidroperóxido. Essa oxidação também mostrou ser transitória, voltando os nucleotídeos de piridina ao estado reduzido, conforme verificado pelo aumento da fluorescência. Essas mudanças na fluorescência, em decorrência do estado redox do NAD(P)H, acompanhavam o estímulo da velocidade de consumo de oxigênio, voltando a valores iguais aos controles.

A adição de vermelho de rutênio não modificou a extensão da oxidação dos nucleotídeos de piridina, entretanto, com EGTA o retorno ao estado reduzido ocorreu mais rapidamente.

FLUXO DE Ca^{2+} E CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O METABOLISMO DE HIDROPERÓXIDO. COMPARAÇÃO ENTRE O USO DE ACETATO OU FOSFATO COMO ANION PERMEANTE.

Nos experimentos descritos na FIGURA 06 estudamos a influência de diferentes ânions permeantes na velocidade de consumo de oxigênio (traçado A) e no fluxo de Ca^{2+} (traçado B) induzido por hidroperóxido. Este fluxo foi verificado na presença de 20nmoles de Ca^{2+} adicionado por mg de proteína mitocondrial, juntamente com 10mM de acetato (traçados I) ou 2mM de fosfato (traçados II).

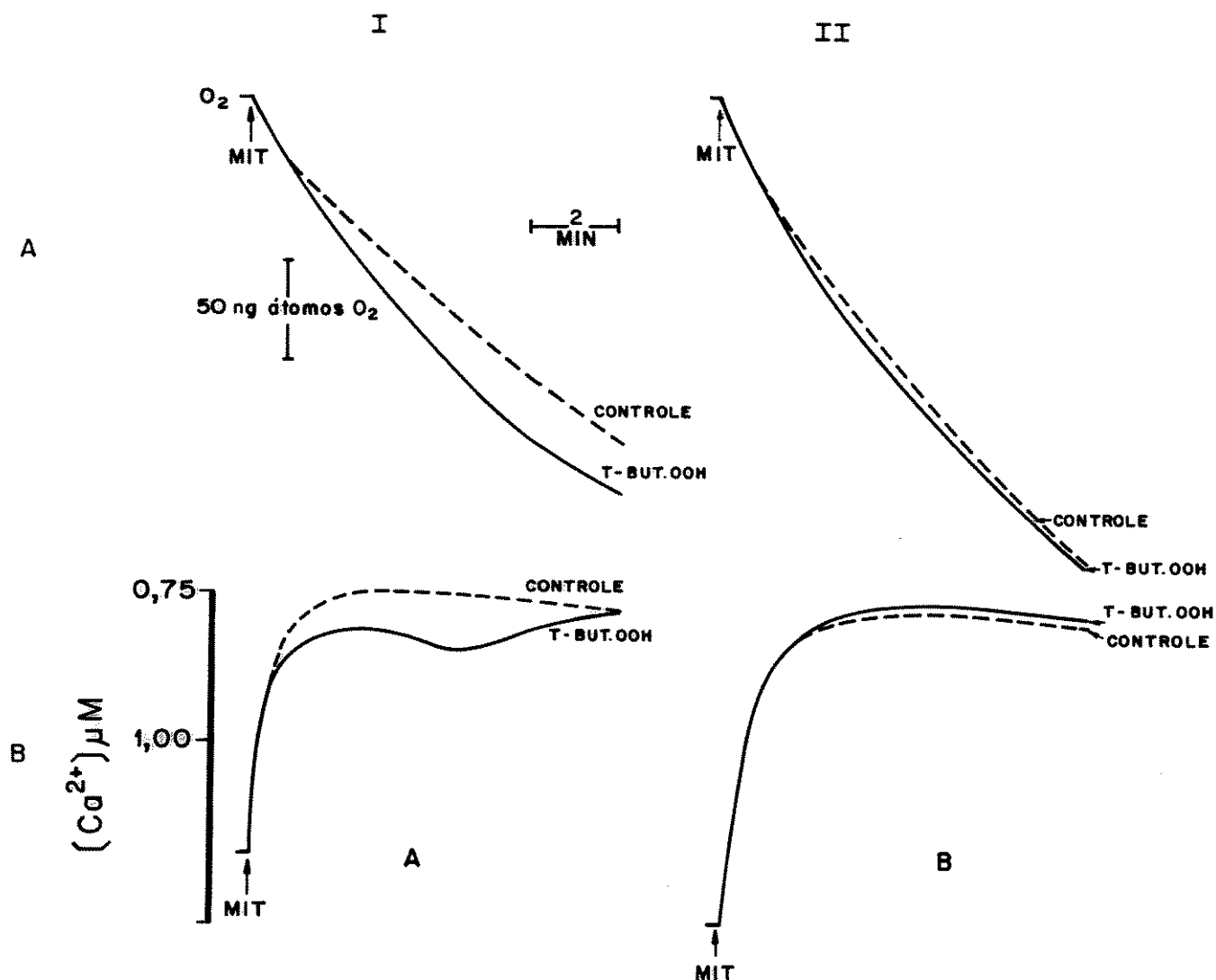


FIGURA 06: Fluxo de Ca^{2+} e consumo de oxigênio durante o metabolismo de hidroperóxido. Comparação entre o uso de acetato ou fosfato como ânion permeante. Mitocôndrias de fígado (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (32°C) semelhante ao descrito na FIGURA 01, exceto que 2,0mM de fosfato (traçados II) também era usado como ânion permeante no lugar de 10,0mM de acetato (traçados I). 20nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína mitocondrial era adicionado ao meio de incubação. Em A representa-se a velocidade de consumo de oxigênio e em B, o fluxo de Ca^{2+} .

Nestas condições, quando acetato era usado como ânion permeante, ocorreu efluxo de Ca^{2+} induzido por hidroperóxido e subsequente recaptção (linha cheia) até a concentração extramitocondrial do íon atingir níveis semelhantes aos do controle (linha tracejada). Durante este efluxo verificou-se estímulo do consumo de oxigênio, conforme resultados descritos na FIGURA 02. Quando fosfato estava presente no lugar de acetato, não foi observado estímulo no efluxo de Ca^{2+} nem aumento na velocidade de consumo de oxigênio, induzido por hidroperóxido.

EFEITO DO ANION PERMEANTE NO EFLUXO DE Ca^{2+} E NO CONSUMO DE OXIGÊNIO INDUZIDOS POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDO, EM MITOCÔNDRIAS CARREGADAS COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE Ca^{2+} .

O efluxo de Ca^{2+} (traçado B) e o aumento na velocidade do consumo de oxigênio (traçado A) foram verificados na presença de 10mM de acetato (linha tracejada) ou 2mM de fosfato (linha cheia), após as mitocôndrias terem captado uma quantidade de Ca^{2+} bem acima das concentrações utilizadas nos experimentos anteriores.

Nestas condições experimentais, quando as mitocôndrias eram incubadas em meio de reação contendo Ca^{2+} na concentração de 70nmoles por mg de proteína, foi verificado efluxo transitório do íon, induzido pelo hidroperóxido, que era acompanhado pelo aumento transitório na velocidade de consumo de oxigênio, se acetato era utilizado como ânion permeante (linha tracejada). Quando fosfato estava presente no lugar

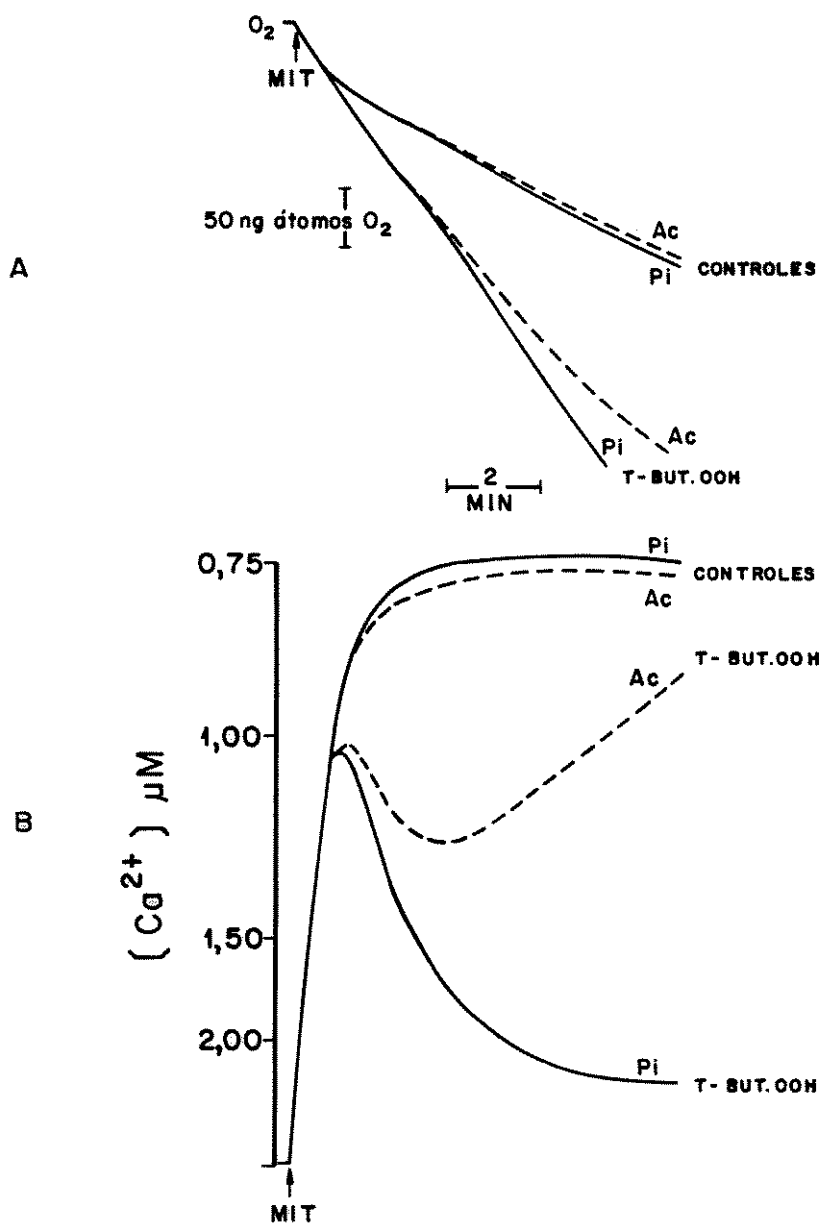


FIGURA 07: Efeito do ânion permeante no efluxo de Ca²⁺ e no consumo de oxigênio induzidos por t-butil hidroperóxido, em mitocôndrias carregadas com altas concentrações de Ca²⁺. Mitocôndrias de fígado (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (32°C) semelhante ao descrito na FIGURA 01, na presença de 2,0mM de fosfato (linha cheia) ou 10,0mM de acetato (linha tracejada). O meio continha 70nmoles de Ca²⁺ adicionado. O traçado A representa a velocidade de consumo de oxigênio e o B, o fluxo de Ca²⁺.

de acetato (linha cheia), ocorreu efluxo de Ca^{2+} e aumento na velocidade de consumo de oxigênio, tendo as mitocôndrias entrado em processo de anaerobiose, sem ter sido observada recaptação do íon.

EFEITO DO ANTIBIÓTICO X-537A E VERMELHO DE RUTÊNIO NO FLUXO DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL.

O experimento da FIGURA 08 foi planejado no sentido de estudarmos o efeito da presença de X-537A sobre o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial.

Este experimento mostra que mitocôndrias de fígado energizadas com succinato como substrato respiratório, captam Ca^{2+} causando um decréscimo na concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial até aproximadamente $0,5\mu\text{M}$, mantendo esse valor durante o transcurso do experimento (traçado A). Entretanto, a adição de 125pmoles do antibiótico X-537A por mg de proteína mitocondrial, após a concentração de Ca^{2+} extramitocondrial ter atingido o estado de fluxo constante, causou um decréscimo na concentração do íon para aproximadamente $0,25\mu\text{M}$ (traçado B). Com a adição de vermelho de rutênio, no lugar de X-537A, ocorreu efluxo de Ca^{2+} das mitocôndrias a uma velocidade de aproximadamente $0,85$ nmoles por mg de proteína por minuto (traçado C). Esse efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio foi inibido por adições de X-537A (traçado E). O traçado D mostra que, se as mitocôndrias eram adicionadas ao meio de reação após a adição do antibiótico, ocorria

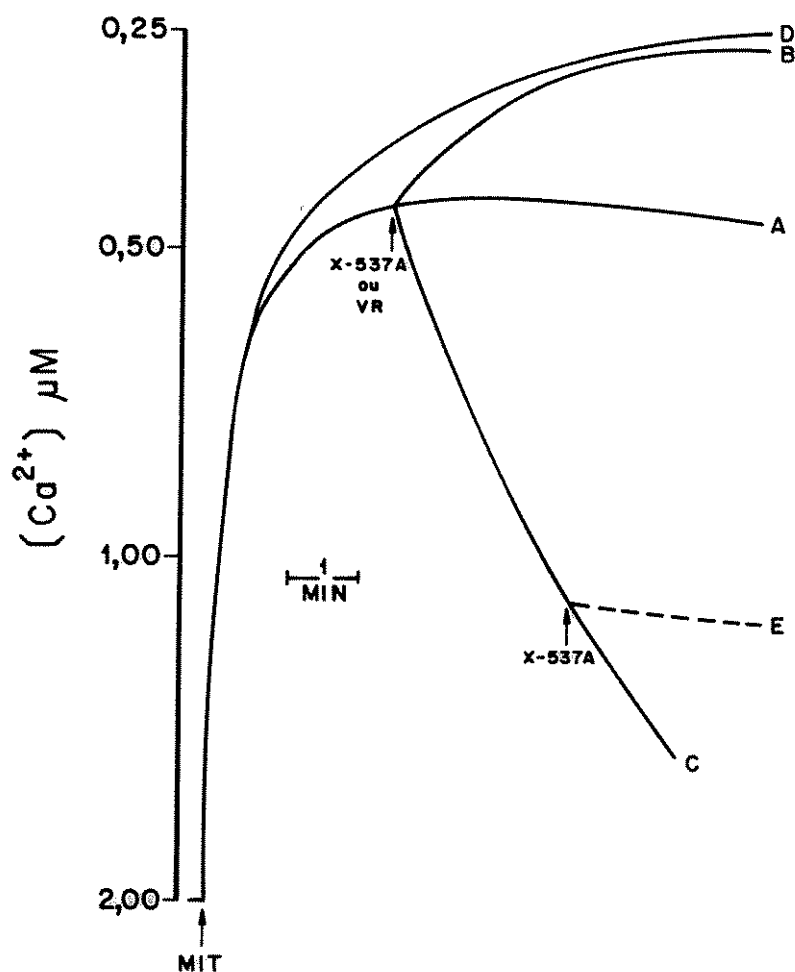


FIGURA 08: Efeito do antibiótico X-537A e vermelho de rutênio no fluxo de Ca^{2+} mitocondrial. Mitocôndrias de fígado (2,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (25°C) contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 3,0mM pH 7.2, fosfato 0,25mM, BSA 0,05%, ATP 3,0mM, Mg^{2+} 4,0mM, rotenona $5,0\mu\text{M}$, oligomicina $1,0\mu\text{g}/\text{mg}$ e succinato 2,0mM. O fluxo de Ca^{2+} era verificado na ausência (traçado A) ou na presença (traçado D) de 125pmoles de X-537A por mg de proteína. $0,7\mu\text{M}$ de vermelho de rutênio (traçado C) ou 125pmoles de X-537A por mg (traçado B) eram adicionados nos locais indicados por setas. O traçado E representa o fluxo de Ca^{2+} verificado na presença de vermelho de rutênio e X-537A.

captção do Ca^{2+} do meio, com tamponamento na mesma faixa de concentrao observada no traado B.

RELAÇO ENTRE A OXIDAÇO DE GLUTAMATO OU EFLUXO DE Ca^{2+} INDUZIDO POR VERMELHO DE RUTÊNIO E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE X-537A.

No experimento mostrado na FIGURA 09 verificamos a relao entre a inibio do efluxo de Ca^{2+} e da oxidao do glutamato pelo antibiico X-537A. Mitocndrias de fgado de rato oxidando substratos respiratrios como glutamato ou como succinato na presena de rotenona, apresentaram a mesma relao dose-resposta tanto para a inibio da oxidao do glutamato (linha cheia), como para a inibio do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial induzido por vermelho de rutnio (linha tracejada), tendo sido obtida metade da inibio mxima com aproximadamente 25nM de X-537A.

Inibio de 70% era observada com uma concentrao de 125nM de X-537A (125pmoles.mg^{-1}) em ambos os casos.

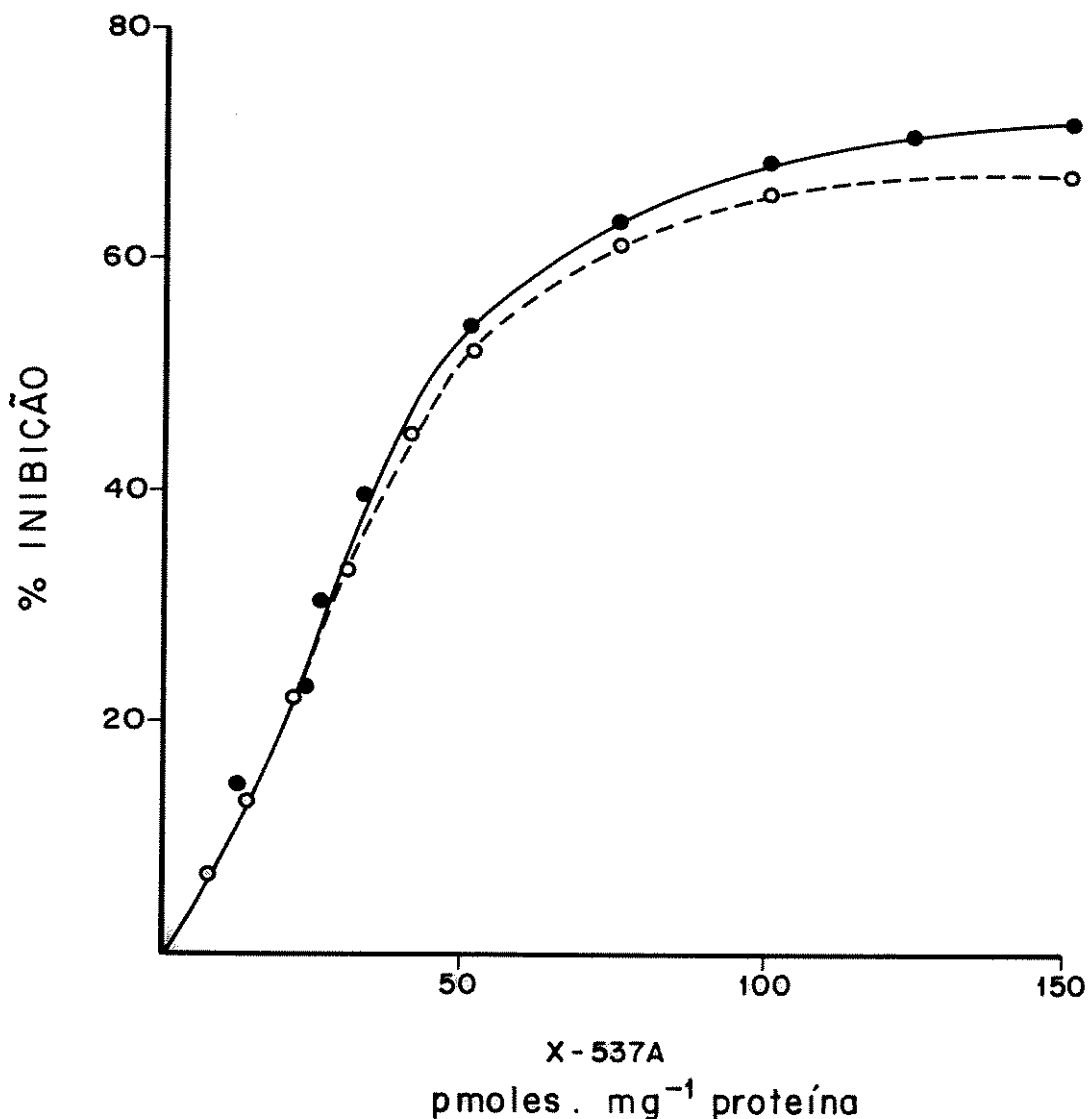


FIGURA 09: Relação entre a oxidação de glutamato ou efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio e diferentes concentrações de X-537A. Mitocôndrias hepáticas (2,0mg de proteína) eram incubadas em 2,0ml de meio, nas mesmas condições experimentais que na FIGURA 07. A influência do antibiótico X-537A no efluxo de Ca^{2+} induzido por $0,7\mu\text{M}$ de vermelho de rutênio (linha tracejada) foi verificada na presença de 30nmoles de Ca^{2+} . O traçado de linha cheia representa a influência das diferentes concentrações de X-537A na oxidação do glutamato, verificada pela velocidade de consumo de oxigênio induzido por $50\mu\text{M}$ de DNF, em mitocôndrias incubadas nas mesmas condições experimentais, exceto que $5,0\text{mM}$ de glutamato estava presente no lugar de succinato e rotenona, e o meio de reação era complementado com $0,5\text{mM}$ de EGTA.

EFEITO DO ANTIBIÓTICO X-537A NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.

Os experimentos da FIGURA 10 foram realizados para se estudar o efeito do X-537A em $\Delta\Psi$. O antibiótico induz ao aumento de $\Delta\Psi$, verificado quando este era adicionado após as mitocôndrias de fígado alcançarem e manterem um potencial de membrana na faixa de 180mV (traçados A e B).

Considerando que em certas condições experimentais a safranina, corante utilizado para determinar $\Delta\Psi$ em 533-511nm, pode causar efeitos indesejáveis no transporte de Ca^{2+} pela mitocôndria (VALLE et alii, 1986), o potencial elétrico de membrana foi verificado tanto pela técnica do uso de safranina (traçado A), como pelo uso de eletrodo de TPP^+ , específico para determinação de $\Delta\Psi$ (traçado B). Através dos dois métodos verificou-se que o antibiótico X-537A em concentrações de 125nM, aumenta o $\Delta\Psi$ em aproximadamente 10mV (linhas contínuas, traçados b). Um aumento máximo de 15mV foi verificado em concentrações de X-537A 250nM (traçado A-c-). Concentrações do antibiótico acima desse valor não causa posterior aumento em $\Delta\Psi$, sendo que em concentrações acima de 50 μM causa um decréscimo em $\Delta\Psi$, devido a seu efeito de ionóforo.

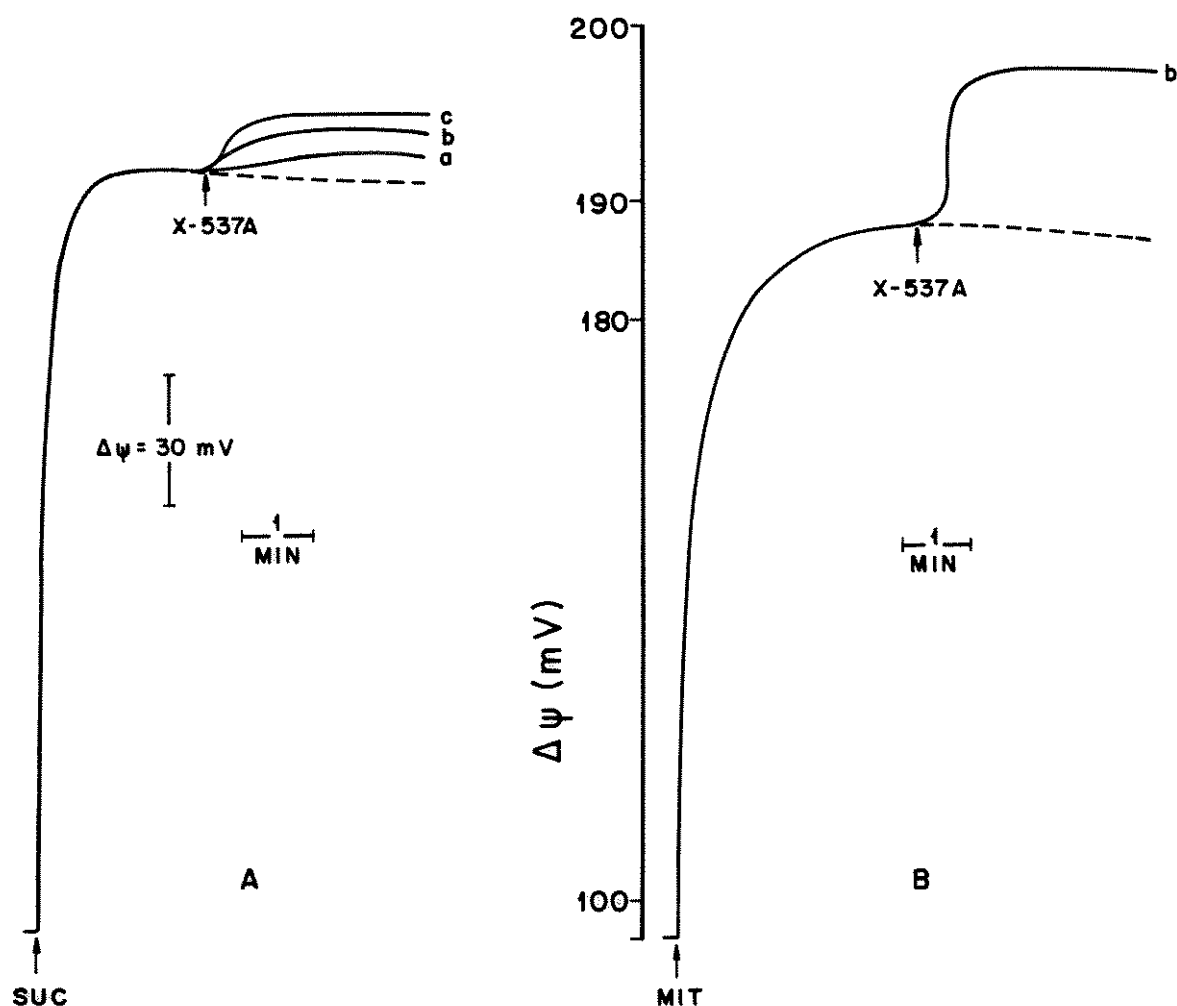


FIGURA 10: Efeito do antibiótico X-537A no potencial de membrana mitocondrial. Mitocôndrias de fígado (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 3,0mM pH 7.2, Mg^{2+} 4,0mM, ATP 3,0mM, BSA 0,05%, succinato 2,0mM e rotenona 5,0 μ M. No experimento representado pelo traçado A, o meio de incubação (25°C) era complementado com 0,25mM de fosfato e 10,0 μ M de safranina, sendo o $\Delta\psi$ verificado pelo uso de espectrofotômetro de duplo comprimento de onda. No experimento representado pelo traçado B, o $\Delta\psi$ era verificado pelo uso de eletrodo específico após o meio de incubação (32°C) ter sido complementado com 10mM de acetato, 20nmoles de Ca^{2+} , 0,5 μ g de oligomicina e 30 μ M de TPP⁺. X-537A era adicionado nos locais indicados por setas, nas concentrações de 62,5nM (a), 125nM (b) e 250nM (c).

**EFEITO DO ANTIBIÓTICO X-537A NO FLUXO DE Ca^{2+}
 ATRAVÉS DA VIA ELETROFORÉTICA DE CAPTAÇÃO.**

O experimento da FIGURA 11 foi realizado para verificar o efeito do antibiótico X-537A no movimento de Ca^{2+} através da via eletroforética de captação.

Mitocôndrias energizadas eram pré-incubadas na presença de 30nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína mitocondrial e a captação era iniciada após adição do substrato succinato, até a concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial atingir uma faixa de 0,75 μ M. Neste ponto, o desacoplador DNF era adicionado causando colapso de $\Delta\Psi$ e induzindo o efluxo de Ca^{2+} pelo reverso da via eletroforética de captação.

Na presença de 125pmoles de X-537A por mg de proteína mitocondrial (linha tracejada) e na ausência do antibiótico (linha cheia), tanto o influxo como o efluxo de Ca^{2+} através da via eletroforética de captação não eram alterados.

**INFLUÊNCIA DO ANTIBIÓTICO X-537A NO EFLUXO DE Ca^{2+}
 INDUZIDO POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDO E NA EXTENSÃO DO
 VOLUME MITOCONDRIAL.**

Os resultados da FIGURA 12 (traçado A) representam o fluxo de Ca^{2+} mitocondrial. Na presença de t-butil hidroperóxido observou-se o aumento transitório na concentração de Ca^{2+} extramitocondrial, de acordo com os resultados anteriores. Na presença de X-537A não se verificou este efeito do hidroperóxido.

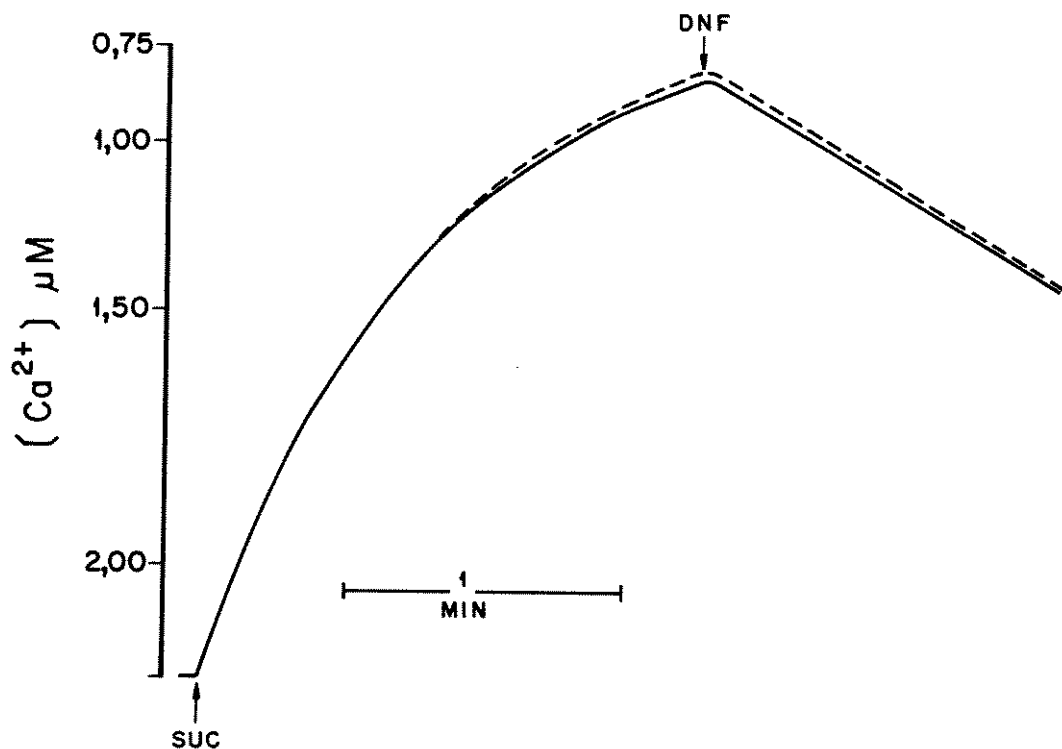


FIGURA 11: Efeito do antibiótico X-537A no fluxo de Ca^{2+} através da via eletroforética de captação. Mitocôndrias (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (25°C) contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 3,0mM pH 7.2, fosfato 0,2mM, Mg^{2+} 1,0mM, rotenona 5 μM e Ca^{2+} 30nmoles. A captação de Ca^{2+} era iniciada após adição de 2,0mM de succinato. DNF (50 μM) era adicionado onde indicado por seta, na ausência (linha cheia) ou na presença (linha tracejada) de 125 pmoles de X-537A por mg de proteína mitocondrial.

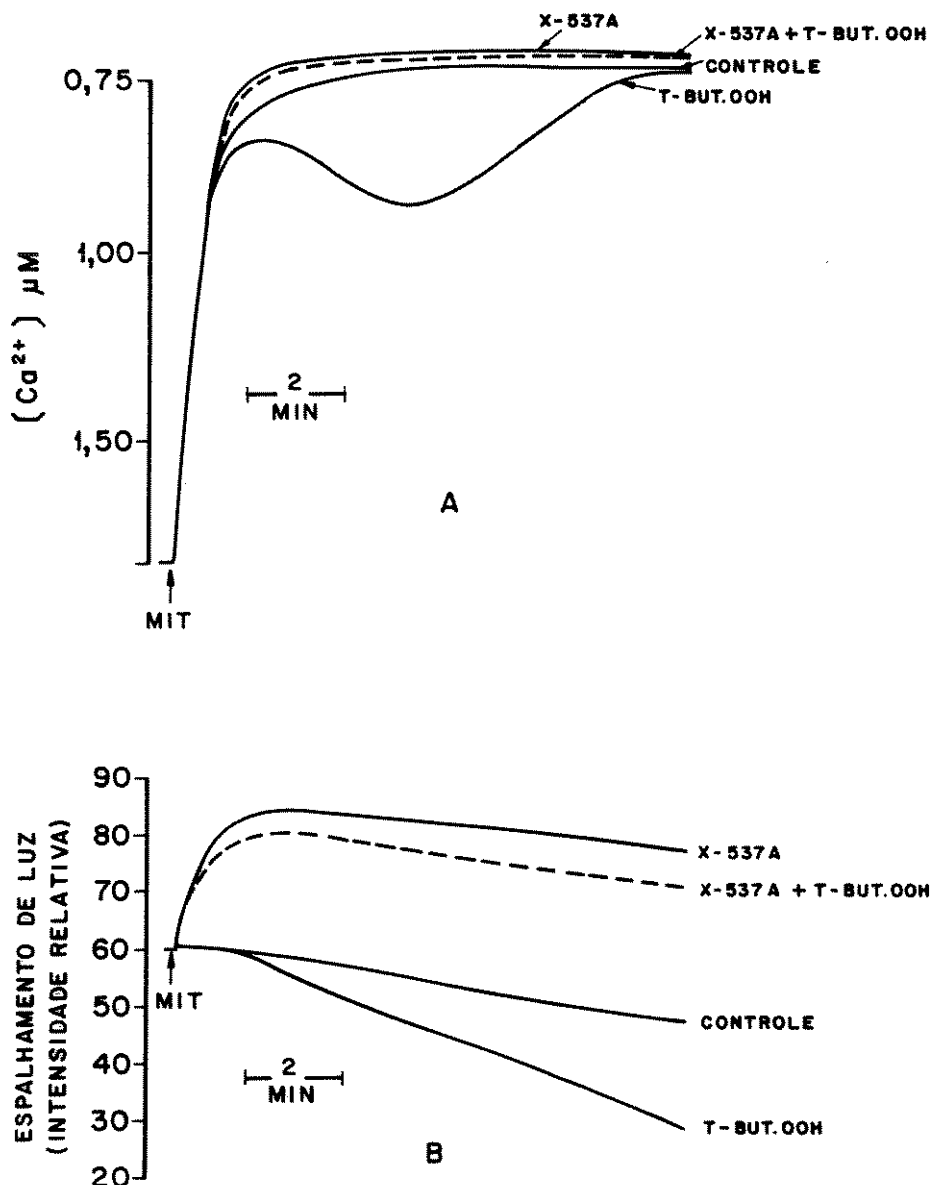


FIGURA 12: Influência do antibiótico X-537A no efluxo de Ca^{2+} induzido por t-butil hidroperóxido e na extensão do volume mitocondrial. Mitocôndrias hepáticas (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (32°C) contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 3,0mM pH 7.2, Mg^{2+} 4,0mM, ATP 3,0mM, rotenona 4,0 μ M, oligomicina 0,5 μ g, acetato 10mM e succinato 2,0mM, na presença de 30nmoles de Ca^{2+} adicionado. 40 μ M de t-butil hidroperóxido ou 125nM de X-537A estavam presentes no meio de reação antes da adição de mitocôndrias. As linhas pontilhadas representam os experimentos realizados na presença de hidroperóxido e X-537A. O traçado A representa o fluxo de Ca^{2+} , e o B, a medida de espalhamento de luz.

O traçado B representa o volume mitocondrial verificado pela medida de espalhamento de luz em 520nm, em um espectrofluorímetro. As mitocôndrias incubadas em meio de reação sem oxidantes de NAD(P)H apresentaram discreto aumento na extensão do inchamento mitocondrial. Na presença de t-butil hidroperóxido a extensão do inchamento era maior; no entanto, na presença apenas do antibiótico ou na presença deste mais o hidroperóxido ocorria contração mitocondrial, verificada pela diminuição na medida de espalhamento de luz.

Estes resultados eram observados após as mitocôndrias terem captado 40nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína.

ALTERAÇÕES NO VOLUME MITOCONDRIAL INDUZIDAS POR X-537A EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO DESENERGIZADAS.

Os resultados do experimento descrito na FIGURA 13 representam as variações do volume de mitocôndrias desenergizadas, verificadas pela medida de espalhamento de luz em 520nm.

As mitocôndrias hepáticas eram incubadas em meio de reação contendo rotenona e oligomicina, e na ausência de Ca^{2+} livre, com EGTA presente no meio de reação antes da adição de mitocôndrias. Na presença de 125pmoles de X-537A por mg de proteína mitocondrial verificou-se contração mitocondrial, quando comparado com o controle, na ausência do antibiótico.

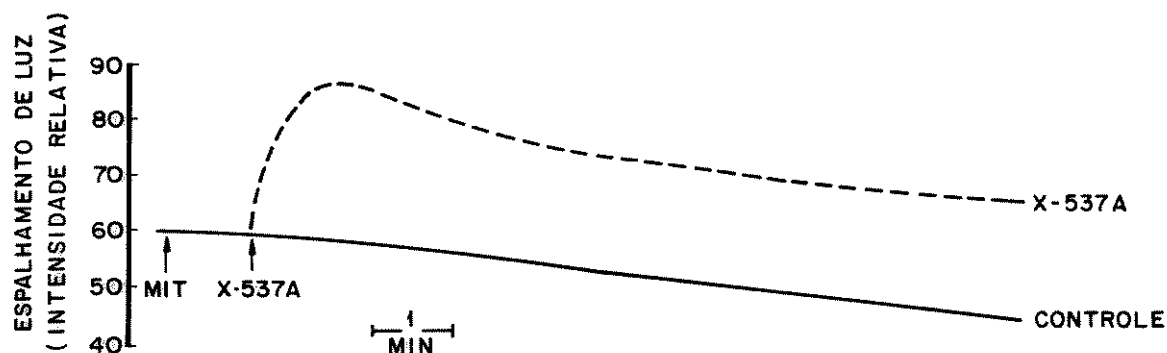


FIGURA 13: Alterações no volume mitocondrial induzidas por X-537A em mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas: Mitocôndrias hepáticas (1,0mg de proteína) eram incubadas em 1,0ml de meio (32°C) contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 3,0mM pH7,2, EGTA 0,4mM, acetato 10mM, rotenona 4,0 μ M e oligomicina 1,0 μ g. 125nM de X-537A era adicionado no local indicado por seta.

DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste trabalho demonstram uma correlação entre a oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais e o estímulo do efluxo de Ca^{2+} dessa organela. Nossos resultados estão em concordância com os de alguns autores que propõem que o estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais possa ter influência sobre o efluxo de Ca^{2+} (LANDRY & LEHNINGER, 1976; CHARLTON & WENNWE, 1978; LEHNINGER et alii, 1978b; VERCESI et alii, 1978; DAWSON et alii, 1979; FISKUM & LEHNINGER, 1979; KRELL et alii, 1979; LOTSCHER et alii, 1979; ARSHAD & HOLDWORTH, 1980; COELHO & VERCESI, 1980; LOTSCHER et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; PANFILI et alii, 1980; PRPIC & BYGRAVE, 1980; HOFSTETTER et alii, 1981; SIES et alii, 1981; BAUMHUTER & RICHTER, 1982; BEATRICE et alii, 1982; BELLOMO et alii, 1982; JURKOWITZ & BRIERLEY, 1982; ROTH & DIKSTEIN, 1982; VERCESI & LEHNINGER, 1982; MOORE et alii, 1983; ORRENIUS et alii, 1983; BEATRICE et alii, 1984; BELLOMO et alii, 1984a; BELLOMO et alii, 1984b; BELLOMO et alii, 1984c; VERCESI, 1984a, b, c; VERCESI, 1985; VERCESI, 1986). Entretanto, o mecanismo deste efluxo não está perfeitamente esclarecido. A concentração de Ca^{2+} , a composição do meio de incubação, o estado de acoplamento mitocondrial, a influência do potencial elétrico de membrana e mesmo a presença de inibidores de respiração e os próprios agentes oxidantes e redutores de NAD(P)H adicionados ao meio, têm levado a resultados controversos.

Alguns autores propõem que na presença de ATP e Mg^{2+} o efluxo de Ca^{2+} não é estimulado pela oxidação de NAD(P)H. Tem sido proposto

que o ATP e Mg^{2+} protegem a membrana de efeitos deletérios causados pelos oxidantes (NICHOLLS & BRAND, 1980; BARDSLEY & BRAND, 1982; AKERMAN & NICHOLLS, 1983) ou que o ATP possa agir como inibidor da atividade da NADase mitocondrial (HOFSTETTER et alii, 1981). Nossos resultados demonstram que podemos observar um efluxo transitório de Ca^{2+} estimulado por t-butil hidroperóxido, um oxidante de NAD(P)H, mesmo com as mitocôndrias incubadas em meio contendo ATP e Mg^{2+} (FIGURA 01). No entanto, quando o oxidante de NAD(P)H era o acetoacetato, não se verificava o efluxo líquido de Ca^{2+} nas mesmas condições experimentais. NICHOLLS & BRAND (1980) consideram que o efluxo induzido por acetoacetato, após as mitocôndrias terem captado alta concentração de Ca^{2+} (54nmoles. mg^{-1}) é prevenido por ATP e oligomicina, podendo estar relacionado com o efeito protetor destes sobre a membrana mitocondrial.

A extensão da oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais nas diferentes etapas do efluxo de Ca^{2+} , verificada através de análise enzimática dos nucleotídeos de piridina reduzidos, encontra-se descrita na TABELA 01. Nas condições em que o efluxo de Ca^{2+} era induzido por hidroperóxido ocorria uma diminuição no conteúdo de NADH para $1,66\text{nmoles por mg de proteína}$, em relação ao controle experimental onde foram encontrados $3,52\text{nmoles por mg de proteína}$. O mesmo ocorria com o conteúdo de NADPH, que de $4,75\text{nmoles por mg de proteína}$, verificado em condições controle, decrescia para $1,99\text{nmoles por mg de proteína}$. Já, nas amostras analisadas na presença de acetoacetato, não foi verificada uma grande diminuição no conteúdo de NADPH, e somente NADH decresceu de $3,52$ para $1,59\text{nmoles por mg de proteína}$.

Outros resultados de nosso laboratório (VERCESI, 1986) também demonstram que acetoacetato não oxida NADPH quando as mitocôndrias se encontram energizadas, apresentando alto valor de $\Delta\Psi$. Nessas condições não há estímulo do efluxo de Ca^{2+} . Isto pode ser explicado pelo fato de que, em mitocôndrias energizadas, a enzima NAD(P)-transidrogenase, que catalisa a reação $\text{NADPH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{NADP}^+ + \text{NADH}$, apresenta uma constante de equilíbrio 500 vezes deslocada no sentido da manutenção do NADP na forma reduzida (LEE & ERNSTER, 1964). Já, na presença de t-butil hidroperóxido ocorre oxidação tanto de NADH quanto de NADPH devido à ação do sistema enzimático glutathiona peroxidase/glutathiona redutase (vide esquema na Introdução).

Nossos resultados indicam que o efluxo de Ca^{2+} estimulado pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina ocorre quando o NADPH está oxidado e não quando ocorre oxidação apenas do NADH.

O completo retorno do NAD(P)^+ para o estado reduzido, observado quando ocorre recaptção do Ca^{2+} , indica que na presença de ATP e Mg^{2+} o efluxo de Ca^{2+} estimulado pelo estado oxidado do NAD(P)H pode ocorrer sem perda líquida significativa de nucleotídeos de piridina endógenos, o que está em concordância com resultados apresentados por FREI et alii (1985a). Entretanto, segundo a interpretação de outros autores, durante este efluxo estimulado pelo estado oxidado do NAD(P)H , também ocorre hidrólise do NAD(P)^+ , catalisada por uma NADase de membrana mitocondrial interna (LOTSCHER et alii, 1980; RICHTER et alii, 1983; SATRUSTEGUI & RICHTER, 1984; FREI et alii, 1985a). O fato de não observarmos hidrólise significativa de NAD(P)^+ pode estar relacionado com o efeito inibidor do ATP nessa hidrólise (HOFSTETTER et alii, 1981) ou ainda ser devido à reação catalisada pela NADase no

sentido da re-síntese dos nucleotídeos de piridina (MOSER et alii, 1983).

Alguns autores estudando o mecanismo de efluxo de Ca^{2+} induzido por NAD(P)^+ , após as mitocôndrias terem acumulado quantidades massivas de Ca^{2+} , relataram que este efluxo era precedido por um inchamento mitocondrial de larga amplitude e desacoplamento (BEATRICE et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1981; BARDSLEY & BRAND, 1982; BEATRICE et alii, 1982). Nas nossas condições experimentais, as mitocôndrias permanecem altamente acopladas mesmo após o efluxo e recaptação do Ca^{2+} (FIGURA 02). Este resultado foi verificado em mitocôndrias incubadas em meio contendo ATP e Mg^{2+} na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} , desde 20 a 40nmoles por mg de proteína. Mesmo nas condições em que se utilizou a menor concentração de Ca^{2+} (20nmoles. mg^{-1}), na ausência de ATP e Mg^{2+} o efluxo mostrou-se irreversível, ocorrendo concomitantemente desacoplamento mitocondrial. A extensão do inchamento mitocondrial também é maior na ausência de ATP e Mg^{2+} . Este efeito inibidor do ATP e Mg^{2+} observado nas nossas condições experimentais, segundo a interpretação de alguns autores pode estar relacionado com efeitos estabilizadores na membrana mitocondrial (COELHO & VERCESI, 1980; ZOCCARATO et alii, 1981). A composição do meio de reação (VERCESI, 1984a; 1985) e a concentração de Ca^{2+} são fatores fundamentais para que o efluxo induzido por NAD(P)^+ ocorra e as mitocôndrias permaneçam acopladas.

A maioria dos trabalhos que relacionam estado redox dos nucleotídeos de piridina com o mecanismo do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial foram obtidos em experimentos que continham inibidores respiratórios e

a reversibilidade da oxidação dos nucleotídeos de piridina e do efluxo de Ca^{2+} era mostrada pela subsequente adição de redutores de NAD(P)^+ (LEHNINGER et alii, 1978b; LOTSCHER et alii, 1979; BEATRICE et alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; PRPIC & BYGRAVE, 1980; LOTSCHER et alii, 1980; WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD, 1980; HOFSTETTER et alii, 1981; PALMER & PFEIFFER, 1981; SIES et alii, 1981; BARDSLEY & BRAND, 1982; BEATRICE et alii, 1982; BELLOMO et al, 1982; VERCESI & LEHNINGER, 1982; RICHTER et alii, 1983; BEATRICE et alii, 1984; BELLOMO et alii, 1984a; VERCESI, 1984a; 1985; 1986). BEATRICE et alii (1980) propuseram que o oxidante poderia ter efeitos diretos na membrana mitocondrial, e o redutor reverteria o efluxo de Ca^{2+} pelo deslocamento do oxidante de seus sítios de ligação na membrana, sem que o processo estivesse diretamente relacionado à oxidação do NAD(P)H .

Nossos resultados experimentais mostram que o efluxo transitório de Ca^{2+} estimulado pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina mitocondriais ocorre mesmo na ausência de inibidores da cadeia respiratória (FIGURA 03). Analisando a concentração de NADPH , tanto em condições de efluxo ($1,31\text{nmoles. mg}^{-1}$) como após a recaptação do Ca^{2+} ($4,36\text{nmoles. mg}^{-1}$), em relação ao experimento controle, na ausência do oxidante de NAD(P)H ($4,60\text{nmoles. mg}^{-1}$) verificamos que o efluxo do fofos das mitocôndrias de fígado de rato está relacionado com o estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais. Também nessas condições as mitocôndrias ainda apresentam-se acopladas, o que foi verificado após adição de substrato respiratório e em seguida o desacoplador FCCP.

A influência de $\Delta\Psi$ no mecanismo do efluxo de Ca^{2+} estimulado pelo NAD(P)^+ tem sido considerada um fator relevante. Alguns autores consideram que este efluxo é precedido pelo colapso de $\Delta\Psi$ (BEATRICE et

alii, 1980; NICHOLLS & BRAND, 1980; PALMER & PFEIFFER, 1981; BARDSLEY & BRAND, 1982; BEATRICE et alii, 1982), enquanto outros têm mostrado que o decréscimo de $\Delta\Psi$ durante o efluxo de Ca^{2+} é resultado da dissipação de energia estimulada pelo movimento cíclico entre captação e efluxo do íon através da membrana mitocondrial (LOTSCHER et alii, 1979; 1980; BAUMHUTER & RICHTER, 1982).

Os resultados apresentados na FIGURA 04 mostram que o aumento transitório na concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial, induzido por hidroperóxido, ocorre em paralelo com decréscimo de $\Delta\Psi$. Este decréscimo transitório de $\Delta\Psi$ poderia ser devido a dissipação de energia causada pelo estímulo do movimento cíclico entre captação e efluxo de Ca^{2+} . Com a adição de vermelho de rutênio, um inibidor da via eletroforética de captação de Ca^{2+} , não ocorreu retorno imediato de $\Delta\Psi$ para valores controles; portanto, o decréscimo de $\Delta\Psi$ não pode ser exclusivamente atribuído ao movimento cíclico de Ca^{2+} .

O decréscimo de $\Delta\Psi$ também poderia estar relacionado com aumento na permeabilidade inespecífica da membrana mitocondrial, o que seria verificado com o aumento na extensão do inchamento mitocondrial. Com a adição de vermelho de rutênio a extensão deste inchamento diminuiu, o que está em concordância com alguns trabalhos anteriores (COELHO & VERCESI, 1980; MOORE et alii, 1983; BELLOMO et alii, 1984a) e confirma a idéia que inchamento mitocondrial aumenta com o rápido movimento cíclico de Ca^{2+} (COELHO & VERCESI, 1980; MOORE et alii, 1983; BELLOMO et alii, 1984a). Entretanto, apesar do inchamento mitocondrial ter sido completamente abolido na ausência de Ca^{2+} , com EGTA presente, um pequeno decréscimo de $\Delta\Psi$ permaneceu, mesmo nessas condições; portanto a diminuição de $\Delta\Psi$ durante o efluxo de Ca^{2+} não seria somente devido ao aumento na permeabilidade inespecífica da membrana.

A natureza desse decréscimo de $\Delta\Psi$ está sendo estudada em nosso laboratório e parece ser devido à atividade da transidrogenase ligada a energia, que utiliza equivalentes redutores do NADH para reduzir NADP^+ em mitocôndrias energizadas (VERCESI, 1986).

O decréscimo de $\Delta\Psi$ observado na presença do hidroperóxido provavelmente seria devido a três processos que dissipam energia: o movimento cíclico de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial, a reação da transidrogenase que transfere equivalentes redutores do NADH para NADP^+ e um aumento da permeabilidade da membrana para H^+ .

A velocidade do consumo de oxigênio aumenta conforme ocorre oxidação de NAD(P)H pelo hidroperóxido (FIGURA 05). Este estímulo do consumo de oxigênio também poderia estar relacionado com o aumento do movimento cíclico de Ca^{2+} . Entretanto, se o movimento cíclico era prevenido, o aumento na velocidade de consumo de oxigênio não era totalmente abolido. As diferentes velocidades de consumo de oxigênio estão perfeitamente de acordo com os diferentes valores de $\Delta\Psi$ observados nas mesmas condições experimentais.

A redução dos nucleotídeos de piridina previamente oxidados pelo hidroperóxido ocorre provavelmente às expensas de substratos endógenos. A redução mais rápida observada na presença de EGTA pode refletir um efeito inibidor do Ca^{2+} sobre a transidrogenase (RYDSTROM, 1977).

WOLKOWICZ & McMILLIN-WOOD (1980) verificaram que o ânion permeante que compõe o meio de incubação é fundamental para ativar o mecanismo do efluxo de Ca^{2+} , além do estado redox dos nucleotídeos de piridina e das alterações na permeabilidade da membrana. Alguns autores têm estudado como diferentes ânions de ácido fraco, após terem si-

do adicionados ao meio de incubação, podem migrar para o interior das mitocôndrias (LEHNINGER, 1974; LEHNINGER et alii, 1978b).

Nas nossas condições experimentais (FIGURA 06) verificamos que o efluxo de Ca^{2+} induzido por hidroperóxido, após as mitocôndrias terem captado concentrações fisiológicas de Ca^{2+} , ocorria apenas quando acetato era usado como ânion permeante, e não com fosfato. A função do acetato neste processo não está bem esclarecida e pode estar relacionada com os resultados de ZOCCARATO e NICHOLLS (1982) que mostraram que na presença de fosfato o efluxo de Ca^{2+} das mitocôndrias era menor que na presença de acetato, devido à complexação do Ca^{2+} intramitocondrial pelo fosfato.

Em condições experimentais diferentes das anteriores, com as mitocôndrias carregadas com um total de 80nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína, o efluxo induzido por hidroperóxido ocorria mesmo na presença de fosfato como ânion permeante (FIGURA 07). Nestas condições, a velocidade do consumo de oxigênio também era bastante estimulada, o que pode estar relacionado com os efeitos desacopladores do fosfato sobre as mitocôndrias hepáticas, quando adicionado após a captação de Ca^{2+} (ROSSI & LEHNINGER, 1964; DARGEL, 1974). O aumento inespecífico da permeabilidade da membrana interna, causado pela liberação de Mg^{2+} induzido por Ca^{2+} e fosfato, é o fator preponderante do desacoplamento dessas mitocôndrias (SILIPRANDI et alii, 1977; COELHO & VERCESI, 1980).

LIN e KUN (1973a) observaram que o antibiótico X-537A, em concentrações abaixo daquelas requeridas para sua atividade como ionóforo, inibe a redução de NADP^+ em mitocôndrias oxidando os substratos glutamato ou isocitrato. Estes mesmos autores (1973b) propuseram

que a ação do X-537A nos processos mitocondriais ligados a energia está relacionada com a formação de um complexo hidrofóbico com um cátion bivalente ligado à membrana.

Estudando o fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado incubadas em meio contendo o antibiótico X-537A, verificamos que ocorria não só uma maior captação do íon, como também uma inibição do efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio (FIGURA 08). Portanto este antibiótico modifica o estado de fluxo constante da distribuição de Ca^{2+} entre os espaços intra e extra mitocondriais. Este efeito não parece estar relacionado com aumento na estabilidade mitocondrial, desde que os experimentos ocorreram em meio contendo BSA, baixa concentração de Ca^{2+} e fosfato, e concentrações fisiológicas de estabilizadores de membrana como Mg^{2+} e ATP (BECKER et alii, 1980). Entretanto, o pequeno aumento de $\Delta\Psi$ observado na FIGURA 10 pode refletir um decréscimo na permeabilidade mitocondrial interna para H^+ . Um relacionamento direto entre o efeito do X-537A no efluxo de Ca^{2+} e no potencial transmembrana não está de acordo com os resultados de BERNARDI e AZZONE (1983) que indicam que um pequeno aumento de $\Delta\Psi$ pode causar um aumento na velocidade de efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio. Outros resultados indicam que a velocidade de efluxo de Ca^{2+} induzido por vermelho de rutênio não é afetada por mudanças de $\Delta\Psi$ (FISKUM & LEHNINGER, 1979; GUNTER et alii, 1983).

LIN e KUN (1973b) também mostraram uma interação entre baixas concentrações do antibiótico X-537A e sítios de ligação na membrana para cátions divalentes. Nossos resultados (FIGURA 09) mostraram uma estreita relação entre esses sítios de ligação e a via de efluxo de Ca^{2+} estimulada por vermelho de rutênio. Esta via pode ser a troca

passiva $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ (GUNTER et alii, 1983), ou o antibiótico pode ser um inibidor específico do fluxo independente de H^{+} ou Ca^{2+} através da membrana. Este antibiótico, como mostram os resultados da FIGURA 11, não afeta a velocidade do influxo de Ca^{2+} , nem do seu efluxo através do reverso da via eletroforética de captação, na presença de um desacoplador.

Nossos resultados demonstram que o efluxo de Ca^{2+} estimulado pelo estado oxidado do NAD(P)H induzido por hidroperóxido é inibido pelo antibiótico X-537A (FIGURA 12A). Este efeito pode estar relacionado com mudanças no estado conformacional das mitocôndrias, conforme resultados apresentados na FIGURA 12B, onde, na presença do antibiótico ocorre contração das mitocôndrias, verificada por um aumento na medida de espalhamento de luz. Evidências adicionais de que a ação do antibiótico X-537A se processa através de mudanças conformacionais na membrana mitocondrial estão descritas na FIGURA 13, onde, em condições em que a mitocôndria se encontra totalmente desenergizada e na ausência de íons Ca^{2+} , a adição de X-537A causa contração mitocondrial.

Resultados de outros autores também indicam que alterações na estrutura da membrana mitocondrial, passando da conformação agregada para a ortodoxa aumentam a permeabilidade da membrana para o Ca^{2+} (HAWORTH & HUNTER, 1979; HUNTER & HAWORTH, 1979a, 1979b). O aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} e as alterações conformacionais das mitocôndrias também têm sido relacionadas com as variações do estado redox de grupamentos -SH da membrana mitocondrial (HATASE et alii, 1977; HARRIS et alii, 1979; VERCESI, 1984b).

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que tanto o estímulo do efluxo de Ca^{2+} induzido por t-butil hidroperóxido, quanto

sua inibição pelo antibiótico X-537A podem ser explicados por alterações da conformação mitocondrial.

O estímulo do efluxo de Ca^{2+} induzido por t-butil hidroperóxido pode ser atribuído ao aumento da permeabilidade da membrana ao cátion, devido a transição conformacional da mitocôndria para um estado menos agregado. Entretanto, também podemos considerar que estas alterações não acarretam danos irreparáveis à membrana mitocondrial, visto que em nossas condições experimentais o efluxo de Ca^{2+} induzido por NAD(P)^+ era completamente reversível.

Nossos resultados também indicam que este efluxo de Ca^{2+} induzido por NAD(P)^+ não ocorre através da troca $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, pois esta hipótese não suporta o inchamento mitocondrial nem o pequeno decréscimo de $\Delta\Psi$ insensível a vermelho de rutênio observado durante o estímulo do efluxo do íon.

O efeito do antibiótico X-537A no mecanismo do efluxo de Ca^{2+} mitocondrial também pode estar relacionado com a mudança na conformação mitocondrial para um estado mais agregado, explicando desta forma inclusive, o aumento no valor de $\Delta\Psi$ verificado quando na presença de X-537A. Tanto a modificação do estado de fluxo constante da distribuição de Ca^{2+} entre os espaços intra e extra mitocondriais, quanto a inibição do efluxo do íon induzida por vermelho de rutênio e por hidroperóxido, corroboram a hipótese de alterações na membrana mitocondrial na presença do antibiótico X-537A.

SUMÁRIO

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas pela oxidação de succinato ou pela hidrólise de ATP apresentam um aumento transitório na velocidade de efluxo de Ca^{2+} concomitante com a oxidação do NAD(P)H pelo hidroperóxido, quando suspensas em um meio contendo ATP 3mM, Mg^{2+} 4mM, acetato como ânion permeante e moderada concentração de Ca^{2+} . Isto ocorre paralelamente a um aumento no estado de fluxo constante da concentração de Ca^{2+} extramitocondrial, decréscimo de $\Delta\Psi$, aumento na velocidade de respiração e inchamento mitocondrial. Com exceção do inchamento todos os outros eventos eram reversíveis. Se o movimento cíclico de Ca^{2+} era prevenido por vermelho de rutênio, o decréscimo de $\Delta\Psi$, a velocidade de respiração e a extensão do inchamento mitocondrial eram significativamente diminuídos. Nessas condições, não houve decréscimo significativo no conteúdo de nucleotídeos de piridina mitocondriais e o acoplamento mitocondrial era preservado após um ciclo de efluxo e recaptação de Ca^{2+} .

Por outro lado, mitocôndrias de fígado de rato incubadas na presença do antibiótico X-537A, apresentam uma maior captação de Ca^{2+} , baixando o estado de fluxo constante da concentração extramitocondrial do íon; um aumento de $\Delta\Psi$ e inibição do efluxo de Ca^{2+} induzido por hidroperóxido ou vermelho de rutênio.

Nossos resultados sugerem que as alterações no fluxo de Ca^{2+} induzidas por t-butil hidroperóxido e por X-537A estão relacionadas com mudanças estruturais da mitocôndria, alterando a permeabilidade da membrana para o cátion.

SUMMARY

Isolated rat liver mitochondria, energized either by succinate oxidation or ATP hydrolysis present a transient increase in the rate of Ca^{2+} efflux concomitant to NAD(P)H oxidation by hydroperoxides when suspended in a medium containing 3mM ATP, 4mM Mg^{2+} , acetate as permeant anion and moderate Ca^{2+} concentrations. This is paralleled by an increase in the steady state concentration of extramitochondrial Ca^{2+} , a decrease in $\Delta\Psi$, an increase in the rate of respiration and mitochondrial swelling. With the exception of mitochondrial swelling all other events were found to be reversible. If Ca^{2+} cycling was prevented by ruthenium red, the decrease in $\Delta\Psi$, the rate of respiration and the extent of mitochondrial swelling were significantly diminished. In addition, there was no significant decrease in the content of mitochondrial pyridine nucleotides. Mitochondrial coupling was preserved after a cycling of Ca^{2+} release and reuptake under these experimental conditions.

On the other hand, rat liver mitochondria incubated in the presence of antibiotic X-537A present a decrease in the steady state concentration of extramitochondrial Ca^{2+} , an increase in $\Delta\Psi$ and inhibition of ruthenium red or hydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux.

The results indicate that alterations in the t-butyl hydroperoxide and X-537A induced Ca^{2+} flux are related with structural changes of mitochondria, changing the membrane permeability to the cation.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AKERMAN, K.E.O. Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. Biochim. Biophys. Acta., 502: 359-66, 1978.
- AKERMAN, K.E.O. & NICHOLLS, D.G. Physiological and Bioenergetic Aspects of mitochondrial calcium transport. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 95: 149-201, 1983.
- AKERMAN, K.E.O. & WIKSTROM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett., 68: 191-7, 1976.
- ARSHAD, J.H. & HOLDSWORTH, E.S. Stimulation of calcium efflux from rat liver mitochondria by adenosine 3'5' cyclic monophosphate. J. Membrane Biol., 57: 207-12, 1980.
- BARDSLEY, M.E. & BRAND, M.D. Oxaloacetate and acetoacetate-induced calcium efflux from mitochondria occurs by reversal of the uptake pathway. Biochem. J., 202: 197-201, 1982.
- BAUMHUTER, S. & RICHTER, C. The hydroperoxide-induced release of mitochondrial calcium occurs via a distinct pathway and leaves mitochondria intact. FEBS Lett., 148(2): 271-5, 1982.

- BEATRICE, M.C., PALMER, J.W. & PFEIFFER, D.R. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca^{2+} by mitochondria. J. Biol. Chem., 255(18): 8663-71, 1980.
- BEATRICE, M.C., STIERS, D.L. & PFEIFFER, D.R. Increased permeability of mitochondria during Ca^{2+} release induced by t-butyl hydroperoxide or oxalacetate. J. Biol. Chem., 257(12): 7161-71, 1982.
- BEATRICE, M.C., STIERS, D.L. & PFEIFFER, D.R. The role of glutathione in the retention of Ca^{2+} by liver mitochondria. J. Biol. Chem., 259(2): 1279-87, 1984.
- BEAVIS, A.D., BRANNAN, R.D. & GARLID, K.D. Swelling contraction of the mitochondrial matrix. I- A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. J. Biol. Chem., 260(25): 13424-33, 1985.
- BECKER, G.L. Steady state regulation of extramitochondrial Ca^{2+} by rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 591: 234-9, 1980.
- BECKER, G.L., FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. Regulation of free Ca^{2+} by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 255(19): 9009-12, 1980.

BELLOMO, G., JEWELL, S.A., THOR, H. & ORRENIUS, S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6842-6, 1982.

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

BELLOMO, G., NICOTERA, P. & ORRENIUS, S. Alterations in intracellular calcium compartmentation following inhibition of calcium efflux from isolated hepatocytes. Eur. J. Biochem., 144: 19-23, 1984b.

BELLOMO, G., THOR, H. & ORRENIUS, S. Increase in cytosolic Ca^{2+} concentration during t-butyl hydroperoxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca^{2+} stores. FEBS Lett., 168(1): 38-42, 1984c.

BERNARDI, P. & AZZONE, G.F. A membrane potential-modulated pathway for Ca^{2+} efflux in rat liver mitochondria. FEBS Lett., 139: 13-16, 1982

BERNARDI, P. & AZZONE, G.F. Regulation of Ca^{2+} efflux in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 134: 377-83, 1983.

- BERNARDI, P., PARADISI, V., POZZAN, T. & AZZONE, G.F. Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: Inhibition by ruthenium red. Biochemistry, 23: 1645-51, 1984.
- BRAND, M.D. Electroneutral efflux of Ca^{2+} from liver mitochondria. Biochem. J., 225: 413-9, 1985a.
- BRAND, M.D. The stoichiometry of the exchange catalysed by the mitochondrial calcium/sodium antiporter. Biochem. J., 222: 161-6, 1985b.
- BROEKEMEIER, K.M., SCHMID, P.C., SCHMID, H.H.O. & PFEIFFER, D.R. Effects of phospholipase A2 inhibitors on ruthenium red-induced Ca^{2+} release from mitochondria. J. Biol. Chem., 260: 105-13, 1985.
- BURGESS, G.M., MCKINNEY, J.S., FABIATO, A., LESHIE, B.A. & PUTNEY JR, J.W. Calcium pools in Saponin-permeabilized Guinea pig hepatocytes. J. Biol. Chem., 258: 15336-45, 1983.
- BYGRAVE, F.L. Mitochondrial calcium transport. Curr. Top. Bioenerg., 6: 259-318 1977.
- CARAFOLI, E. & CROMPTON, M. The regulation of intracellular calcium. Curr. Top. Membr. Transp., 10: 151-216, 1978.
- CARAFOLI, E., ROSSI, C.S. & LEHNINGER, A.L. Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria during active accumulation of Ca^{2+} and phosphate. J. Biol. Chem., 240: 2254-61, 1965.

CARAFOLI, E. & SOTTOCASA, G. The uptake and the release of calcium by mitochondria. IN: NEUBERGER, A. & VAN DEENEN, L.L.M., ed. New Comprehensive Biochemistry. Elsevier Science Publishers B.V., p.269-89, 1984.

CARAFOLI, E., TIOZZO, R., LUGLI, G., CROVETTI, F. & KRATZING, C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J. Molec. Cell. Cardiol., 6: 361-71, 1974.

CHANCE, B. Quantitative aspects of the control of oxygen utilization. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. & O'CONNOR, C.M. Regulation of cell metabolism. Ciba Foundation Symposium, Boston, Little Brown and Company, 1959.

CHARLTON, R.R. & WENNER, C.E. Calcium-ion transport by intact Ehrlich Ascites-tumour cells. Biochem. J., 170: 537-44, 1978.

COELHO, J.L.C. & VERCESI, A.E. Retention of Ca^{2+} by rat liver and rat heart mitochondria: effect of phosphate, Mg^{2+} , and $NAD(P)^+$ redox state. Archs. Biochem. Biophys., 204(1): 141-7, 1980.

CROMPTON, M., CAPANO, M. & CARAFOLI, E. The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria; a possible mechanism from the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J. Biochem., 69: 453-62, 1976.

- CROMPTON, M., MOSER, R., LUDI, H. & CARAFOLI, E. The interrelation between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. Eur. J. Biochem., 82: 25-31, 1978.
- DARGEL, R. Effect of Ca^{2+} on coupling of rat liver mitochondria. FEBS Lett., 42(1): 57-60, 1974.
- DAWSON, A.P., SELWYN, M.J. & FULTON, D.V. Inhibition of Ca^{2+} efflux from mitochondria by nupercaine and tetracaine. Nature, 277: 484-6, 1979.
- DENTON, R.M., McCORMACK, J.G. & EDGELL, N.J. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism: effects of Na^+ , Mg^{2+} and ruthenium red on the Ca^{2+} stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. Biochem. J., 190: 107-17, 1980.
- DRAHOTA, Z., CARAFOLI, E., ROSSI, C.S., GAMBLE, R.L. & LEHNINGER, A.L. The steady state maintenance of accumulated Ca^{2+} in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 240: 2712-20, 1965.
- FISKUM, G. & COCKRELL, R.S. Ruthenium red sensitive and insensitive calcium transport in rat liver and Ehrlich ascites tumor cell mitochondria. FEBS Lett., 92: 125-8, 1978.
- FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ antiport. J. Biol. Chem., 254(14): 6236-9, 1979.

- FREI, B., WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. Quantitative and mechanistic aspects of the hydroperoxide-induced release of Ca^{2+} from rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 149: 633-9, 1985a.
- FREI, B., WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. Mechanism of alloxan-induced calcium release from rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 260(12): 7394-401, 1985b.
- GARLID, K.D. & BEAVIS, A.D. Swelling and Contraction of the mitochondrial matrix. II- Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. J. Biol. Chem., 260(25): 13434-41, 1985.
- GOCHMAN, N. & GIVELBER, H. Automated, simultaneous microdetermination of calcium and magnesium by atomic absorption. Clinical Chemistry, 16(3): 229, 1970.
- GOLDSTONE, T.P. & CROMPTON, M. Evidence for β -adrenergic activation of Na^+ -dependent efflux of Ca^{2+} from isolated liver mitochondria. Biochem. J., 204: 369-71, 1982.
- GRAF, M., FREI, B., WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. Divicine induces calcium release from rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 129(1): 18-25, 1985.

- GUNTER, T.E., CHACE, J.H., PUSKIN, J.S. & GUNTER, K.K. Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. Biochemistry, 22: 6341-51, 1983.
- HARRIS, E.J., AL-SHAIKHLY, M & BAUM, H. Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol-specific reagents and by thyroxine. Biochem. J., 182: 455-64, 1979.
- HARRIS, E.J. & HEFFRON, J.J.A. The stimulation of the release of Ca^{2+} from mitochondria by sodium ions and its inhibition. Arch. Biochem. Biophys., 218: 531-9, 1982.
- HATASE, O., TSUTSUI, K. & ODA, T. Mitochondrial sulfhydryl groups. A possible endogenous probe of conformational changes in the mitochondrial membrane. J. Biochem., 82: 359-63, 1977.
- HAWORTH, R.A. & HUNTER, D.R. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. Arch. Biochem. Biophys., 195: 460-7, 1979.
- HAWORTH, R.A., HUNTER, D.R. & BERKOFF, H.A. Na^+ release Ca^{2+} from liver kidney and lung mitochondria. FEBS Lett., 110: 216-8, 1980.
- HEATON, G.M. & NICHOLLS, D.G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. Biochem. J., 156: 635-46, 1976.

- HEFFRON, J.J.A. & HARRIS, E.J. Stimulation of calcium-ion efflux from liver mitochondria by sodium ions and its response to ADP and energy state. Biochem. J., 194: 925-9, 1981.
- HOFSTETTER, W., MUHLEBACH, T., LOTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. ATP prevents both hydroperoxide-induced hydrolysis of pyridine nucleotides and release of calcium in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 117: 361-7, 1981.
- HUNTER, D.R. & HAWORTH, R.A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. Arch. Biochem. Biophys., 195: 453-9, 1979a.
- HUNTER, D.R. & HAWORTH, R.A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca^{2+} release. Arch. Biochem. Biophys., 195: 468-77, 1979b.
- JONES, D.P., THOR, H., SMITH, M.T., JEWELL, S.A. & ORRENIUS, S. Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca^{2+} sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. J. Biol. Chem., 258 (10): 6390-3, 1983.
- JOSEPH, S.K., COLL, K.E., COOPER, R.H., MARKS, J.S. & WILLIAMSON, J.R. Mechanisms underlying calcium homeostasis in isolated hepatocytes. J. Biol. Chem., 258(2): 731-41, 1983.

- JUNG, D.W. & BRIERLEY, G.P. The redox state of pyridine nucleotides controls permeability of uncoupled mitochondria to K^+ . Biochem. Biophys. Res. Commun., 106(4): 1372-77, 1982.
- JURKOWITZ, M.S. & BRIERLEY, G.P. H^+ -dependent efflux of Ca^{2+} from heart mitochondria. J. Bioenergetics and Biomembranes, 14(5/6): 435-49, 1982.
- JURKOWITZ, M.S., GEISBUHLER, T., JUNG, D.W. & BRIERLEY, G.P. Ruthenium red sensitive and insensitive release of calcium from uncoupled heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 223: 120-8, 1983.
- KAMO, N., MURATSUGU, M., HOUGOH, R. & KOBATAKE, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. J. Membrane Biology, 49: 101-21, 1979.
- KLEINEKE, J. & SOLING, H.D. Mitochondrial and extramitochondrial Ca^{2+} pools in the perfused rat liver. J. Biol. Chem., 260(2): 1040-5, 1985.
- KRELL, H., BAUR, H. & PFAFF, E. Transient Ca^{2+} uptake and release in isolated rat liver cells during recovery from deenergized states. Eur. J. Biochem., 101: 349-64, 1979.
- LANDRY, Y. & LEHNINGER, A.L. Transport of calcium ions by Ehrlich ascites tumour cells. Biochem. J., 158: 427-38, 1976.

LEE, C.P. & ERNSTER, L. Equilibrium studies of the energy-dependent and non-energy-dependent nucleotide transhydrogenase reactions. Biochim. Biophys. Acta., 81: 187-90, 1964.

LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport. Biochem. J., 119: 129-38, 1970.

LEHNINGER, A.L. Role of phosphate and other proton donating anions in respiration coupled transport of Ca^{2+} by mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71(4): 1520-4, 1974.

LEHNINGER, A.L., FISKUM, G., VERCESI, A.E. & TEW, W.P. Ca^{2+} transport by mitochondria: A Survey. IN: BRONNER, F. & PETERLIK, M., ed. Calcium and Phosphate transport across biomembranes. New York, Academic Press, p.73-8, 1981.

LEHNINGER, A.L., REYNAFARJE, B., VERCESI, A. & TEW, W. Transport and accumulation of calcium in mitochondria. Ann. N.Y. Acad. Sci., 307: 160-76, 1978a.

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

- LIN, D.C. & KUN, E. Inhibition of the oxidation of glutamate and isocitrate in liver mitochondria at a specific NADP^+ -reducing site. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70(12): 3450-3, 1973a.
- LIN, D.C. & KUN, E. Mode of action of the antibiotic X-537A on mitochondrial glutamate oxidation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 50(3): 820-5, 1973b.
- LOTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E. & RICHTER, C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76(9): 4340-4, 1979.
- LOTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E. & RICHTER, C. Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 255(19): 9325-30, 1980.
- MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 129(3): 943-8, 1985.
- MARTINS, I.S., CARNIERI, E.G.S. & VERCESI, A.E. Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 850: 49-56, 1986.

- MCCORMACK, J.G. & DENTON, R.M. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism: properties of the Ca^{2+} -sensitive dehydrogenase within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat. Biochem. J., 190: 95-105, 1980.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191: 144-8 1961.
- MOORE, C.L. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42: 298-305, 1971.
- MOORE, G.A., JEWELL, S.A., BELLOMO, G. & ORRENIUS, S. On the relationship between Ca^{2+} efflux and membrane damage during t-butyl hydroperoxide metabolism by liver mitochondria. FEBS Lett., 153(2): 289-92, 1983.
- MOSER, B., WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. Purification and properties of a mitochondrial NAD glycohydrolase. Arch. Biochem. Biophys., 224(1): 358-64, 1983.
- MURATSUGU, M., KAMO, N., KURIKARA, K. & KOBATAKE, Y. Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. Biochim. Biophys. Acta., 484: 613-9, 1977.

- MURPHY, J.B. & KIES, M.W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. Biochim. Biophys. Acta., 45: 382-4, 1960.
- NEDERGAARD, J. Na^+ -dependent regulation of extramitochondrial Ca^{2+} by rat-liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 144: 159-68, 1984.
- NICHITA, C.V. & WILLIAMSON, J.R. Spermine. A regulation of mitochondrial calcium cycling. J. Biol. Chem., 259(21): 12978-83, 1984.
- NICHOLLS, D.G. Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. Biochemistry, 170: 511-22, 1978a.
- NICHOLLS, D.G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. Biochemistry, 176: 463-74, 1978b.
- NICHOLLS, D.G. & AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. Biochim. Biophys. Acta., 683: 57-88, 1982.
- NICHOLLS, D.G. & BRAND, M.D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. Biochem. J., 188: 113-8, 1980.

- ORRENIUS, S., JEWELL, S.A., BELLOMO, G., THOR, H., JONES, D.P. & SMITH, M.T. Regulation of calcium compartmentation in the hepatocyte. A critical role of glutathione. LARSSON, A. et al (Eds.), Funcions__of glutathione biochemical. physiological. toxicological. and clinical aspects Raven Press, New York, p.2261-71, 1983.
- PACKER, L. Energy-linked low amplitude mitochondrial swelling. In: ESTABROOK, R.W. and PULLMAN, M.E. (Eds.), Methods__in__Enzymology, Academic Press, New York, p.685-9, 1967.
- PALMER, J.W. & PFEIFFER, D.R. The control of Ca^{2+} release from heart mitochondria. J. Biol. Chem., 256(13): 6742-50, 1981.
- PANFILI, E., SOTTOCASA, G.L., SANDRI, G. & LIUT, G. The Ca^{2+} -binding glycoprotein as the site of metabolic regulation of mitochondrial Ca^{2+} movements. Eur. J. Biochem., 105: 205-10, 1980.
- PFEIFFER, D.R., SCHMID, P.C., BEATRICE, M.C. & SCHMID, H.H.O. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca^{2+} plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. J. Biol. Chem., 254:(22): 11485-94, 1979.
- POZZAN, T., BRAGADIN, M. & AZZONE, G.F. Desequilibrium between steady state Ca^{2+} accumulation ratio and membrane potential in mitochondria: Pathway and role of Ca^{2+} efflux. Biochemistry, 16: 5618-25, 1977.

- PRPIC, V. & BYGRAVE, F.L. On the inter-relationship between glucagon action, the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides, and calcium retention by rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 255 (13):6193-9, 1980.
- REED, K.C. & BYGRAVE, F.L. The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanidic and ruthenium red. Biochem. J., 140: 143-55, 1974.
- RICHTER, C., WINTERHALTER, K.H., BAUMHUTER, S., LOTSCHER, H.R. & MOSER, B. ADP-ribosylation in inner membrane of rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 3188-92, 1983.
- RILEY, W.W. & PFEIFFER, D.R. Relationships between Ca^{2+} release, Ca^{2+} cycling, and Ca^{2+} mediated permeability changes in mitochondria. J. Biol. Chem., 260(23): 12416-25, 1985.
- ROSSI, C.S. & LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of calcium and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 239: 3971-80, 1964.
- ROTH, Z. & DIKSTEIN, S. Inhibition of ruthenium red-insensitive mitochondrial Ca^{2+} release and its pyridine nucleotide specificity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105(3): 991-6, 1982.
- ROTTENBERG, H. & SCARPA, A. Calcium uptake and membrane potential mitochondria. Biochemistry, 13(23): 4811-7, 1974.

- RYDSTROM, J. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenases. Biochim. Biophys. Acta., 463: 155-84, 1977.
- SANDRI, G., SOTTOCASA, G., PANFILI, E. & LIUT, G. The ability of the mitochondrial Ca^{2+} -binding glycoprotein to restore Ca^{2+} transport in glycoprotein-depleted rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 558: 214-20, 1979.
- SARIS, N.E. & AKERMAN, K.E.O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Cur. Tops. Bioenerg., 10: 103-79, 1980.
- SATRUSTEGUI, J. & RICHTER, C. The role of hydroperoxides as calcium release agents in rat brain mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 233(2): 736-40, 1984.
- SCHERPHOF, G.L., SCARPA, A. & TOORENENBERG, A.V. The effect of local anesthetics on the hydrolysis of free and membrane-bound phospholipids catalysed by various phospholipases. Biochim. Biophys. Acta., 270: 226-40, 1972.
- SCHNEIDER, W.C. & HOGEBOOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. V further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. J. Biol. Chem., 183:123-8, 1950.
- SELWYN, M.J., DAWSON, A.P. & DUNNETT, S.J. Calcium transport in mitochondria. FEBS Lett., 10(1): 1-5, 1970.

- SEPPALA, A.J., SARIS, N.E.L. & GAUFFIN, M.L. Inhibition of phospholipase A-induced swelling of mitochondria by local anesthetics and related agents. Biochem. Pharmac., 20: 305-13, 1971.
- SIES, H. Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. In: SIES, H. (Ed.) Oxidative Stress. Academic Press Inc. (London), p.73-90, 1985.
- SIES, H., GRAF, P. & ESTRELA, J.M. Hepatic calcium efflux during cytochrome P-450-dependent drug oxidations at the endoplasmic reticulum in intact liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78(6): 3358-62, 1981.
- SILIPRANDI, D., SILIPRANDI, N. & TONINELLO, A. On the relationship between calcium and phosphate transport, transmembrane potential and acetoacetate-induced oxidation of pyridine nucleotides in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 130: 173-5, 1983.
- SILIPRANDI, D., TONINELLO, A., ZOCCARATO, F. & SILIPRANDI, N. A possible mechanism for respiration-dependent efflux of Mg^{2+} ions from liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 78(1): 23-7, 1977.
- SOMLYO, A.P., BOND, M. & SOMLYO, A.V. Calcium content of mitochondria and endoplasmic reticulum in liver frozen rapidly in vivo. Nature, 314(6012): 622-5, 1985.

- SOTTOCASA, G., SANDRI, G., PANFILI, E., BERNARD, B., GAZZOTTI, P., VASINGTON, F.D. & CARAFOLI, E. Isolation of a soluble Ca^{2+} binding glycoprotein from ox liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47: 808-13, 1972.
- TEDESCHI, H. The transport of cations in mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 639: 157-96, 1981.
- THOR, H., SMITH, M.T., HARTZELL, P., BELLOMO, G., JEWELL, S.A. & ORRENIUS, S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. J. Biol. Chem., 257(20): 12419-25, 1982.
- VALLE, V.G.R., PEREIRA DA SILVA, L. & VERCESI, A.E. Undesirable feature of safranin as a probe for mitochondrial membrane potential. Biochem. Biophys. Res. Commun., 135(1): 189-95, 1986.
- VASINGTON, F.D. & MURPHY, J.V. Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem., 237: 2670-6, 1962.
- VASINGTON, F.D., GAZZOTTI, P., TIOZZO, R. & CARAFOLI, E. The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 256(1): 43-54, 1972.
- VERCESI, A.E. Dissociation of NAD(P)^+ -stimulated mitochondrial Ca^{2+} efflux from swelling and membrane damage. Arch. Biochem. Biophys., 232(1): 86-91, 1984a.

- VERCESI, A.E. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)^+ -stimulated Ca^{2+} efflux from mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 119(1):305-10, 1984b.
- VERCESI, A.E. Transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias. Características do efluxo induzido por NAD(P)^+ . Arg. Biol. Tecnol., 27(4): 477-94, 1984c.
- VERCESI, A.E. Stimulation of mitochondrial Ca^{2+} efflux by NADP^+ with maintenance of respiratory control. An. Acad. Brasil. Ciên., 57(3): 369-75, 1985.
- VERCESI, A.E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 1986. (Aceito para publicação).
- VERCESI, A.E. & LEHNINGER, A.L. Uncoupling is not obligatory for NADP^+ -induced Ca^{2+} efflux from mitochondria. Fed. Proc., 41(4): 1434, 1982.
- VERCESI, A.E. & PEREIRA-DA-SILVA, L. NADP redox state and mitochondrial Ca^{2+} efflux: a controversial issue. Brazil. J. Med. Biol. Res., 17: 353-6, 1984.

- VERCESI, A.E., REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of H^+ ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem., 253(18): 6379-85, 1978.
- ZOCCARATO, F. & NICHOLLS, D. The role of phosphate in the regulation of the independent calcium-efflux pathway of liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 127: 333-8, 1982.
- ZOCCARATO, F., RUGOLO, M., SILIPRANDI, D. & SILIPRANDI, N. Correlated effluxes of adenine nucleotides, Mg^{2+} and Ca^{2+} induced in rat liver mitochondria by external Ca^{2+} and Pi. Eur. J. Biochem., 114: 195-9, 1981.
- WILLIAMSON, J.R. & CORKEY, B.E. Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorimetric enzyme methods. LOW ENSTEIN, J.M. (ed), Methods in Enzymology, XIII, Acad. Press, New York and London, p.434-513, 1969.
- WILLIAMSON, J.R., COOPER, R.H. & HOEK, J.B. Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism. Biochim. Biophys. Acta., 639: 243-95, 1981.
- WOLKOWICZ, P.E. & McMILLIN-WOOD, J. Dissociation between mitochondrial calcium ion release and pyridine nucleotide oxidation. J. Biol. Chem., 255(21): 10348-53, 1980.

Os resultados descritos nesta Tese foram parcialmente apresentados como Comunicações nos seguintes Congressos:

L.P.S.AIROLDI, C.F.BERNARDES, E.V.BAREL e A.E.VERCESI
"INHIBITION OF NADP⁺-STIMULATED Ca²⁺ EFFLUX FROM
MITOCHONDRIA BY THE ANTIBIOTIC X-537A"

XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica
Caxambú - MG - 1984.

L.P.S.AIROLDI, C.F.BERNARDES e A.E.VERCESI
"INHIBITION OF Ca²⁺ EFFLUX FROM MITOCHONDRIA BY
THE ANTIBIOTIC X-537A"

IV Congresso Pan-Americano das Sociedades de Bioquímica
Buenos Aires - Argentina - 1984.

C.F.BERNARDES, L.PEREIRA DA SILVA e A.E.VERCESI
"STUDIES ON HYDROPEROXIDE INDUCED Ca²⁺ EFFLUX FROM
LIVER MITOCHONDRIA"

XIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica
Caxambú - MG - 1985.

C.F.BERNARDES, L.PEREIRA DA SILVA e A.E.VERCESI
"STUDIES ON HYDROPEROXIDE INDUCED Ca²⁺ EFFLUX FROM
LIVER MITOCHONDRIA"

XIII Congresso Internacional de Bioquímica
Amsterdam - 1985.

C.F.BERNARDES, L.PEREIRA DA SILVA e A.E.VERCESI
"INDUÇÃO DO EFLUXO DE Ca^{2+} EM MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS
POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDO"

II Encontro de Pós Graduação em Ciências Biológicas
UNICAMP - Campinas - SP - 1985.

A.E.VERCESI, L.PEREIRA DA SILVA, I.S.MARTINS,
E.G.S.CARNIERI, C.F.BERNARDES, V.G.R.VALLE,
M.M.FAGIAN and V.L.FERRAZ
"ASPECTS LINKED TO THE ENERGETICS AND REGULATION OF
 Ca^{2+} FLUX IN MITOCHONDRIA"

XI Congresso Brasileiro de Biofísica
USP - SP - 1986.

e reunidos nas seguintes Publicações:

L.PEREIRA DA SILVA, C.F.BERNARDES & A.E.VERCESI
"INHIBITION OF RUTHENIUM RED INDUCED Ca^{2+} EFFLUX
FROM LIVER MITOCHONDRIA BY THE ANTIBIOTIC X-537A"
Biochemical and Biophysical Research Communications,
124: 80-6, 1984.

C.F.BERNARDES, L.PEREIRA DA SILVA & A.E.VERCESI
"T-BUTYL HYDROPEROXIDE-INDUCED Ca^{2+} EFFLUX FROM LIVER
MITOCHONDRIA IN THE PRESENCE OF PHYSIOLOGICAL
CONCENTRATIONS OF Mg^{2+} AND ATP"
Biochimica et Biophysica Acta, 850: 41-8, 1986.

XIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA
DE BIOQUÍMICA - maio de 1984.

E5

INHIBITION OF NADP⁺-STIMULATED Ca²⁺ EFFLUX FROM MITOCHONDRIA BY THE ANTIBIOTIC X-537A

L.P.S. Airoidi, C.F. Bernardes, E.V. Barel and A.E. Vercesi

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo

The carboxylic-acid antibiotic X-537A, at concentrations far below those required for ionophorus activity, selectively inhibits the reduction of mitochondrial NADP by glutamate and isocitrate (D.C. Lin and E. Kun, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 3450, 1973). The authors concluded that the inhibitory site is localized in the inner mitochondrial membrane, and that this site may contain a membrane-bound bivalent cation. This communication reports experiments showing that the antibiotic X-537A, at these low concentrations, inhibits the ruthenium red-insensitive Ca²⁺ efflux from mitochondria induced by the oxidized state of NADP. The dose-response relationship between the concentration of the antibiotic and its effect on glutamate oxidation and Ca²⁺ efflux was found to be identical. This suggests the existence of a specific binding site for X-537A in the inner membrane, responsible for the regulation of NADP redox state and Ca²⁺ efflux. Furthermore it is shown that the inhibition of oxidative phosphorylation by these low concentrations of X-537A does not take place in inverted submitochondrial particles, indicating that the inhibition occurs at the level of the adenine nucleotide transport.

Supported in part by FAPESP (Grant 83/1760)

IV CONGRESSO PAN-AMERICANO DE BIOQUÍMICA
novembro de 1984.

501

INHIBITION OF Ca^{2+} EFFLUX FROM MITOCHONDRIA BY THE ANTIBIOTIC X-537A. L.F.S. Airoldi, C.F. Bernardes and A.E. Vercesi. Dept. de Bioquímica, Inst. de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

We have already shown that the antibiotic X-537A, at concentrations far below those required for ionophorous activity, inhibits Ca^{2+} efflux, from liver mitochondria, induced by ruthenium red. This effect was studied in conditions where mitochondrial integrity was preserved and Ca^{2+} efflux was supposed to be mediated by the putative $Ca^{2+}/2H^{+}$ antiporter. The experiments reported here show that X-537A, at these same low concentrations, also prevents Ca^{2+} release induced by a group of Ca^{2+} releasing agents, including oxaloacetate, acetoacetate, diamide, hydroperoxides and phosphate, which operate only in the presence of high Ca^{2+} concentrations and in the absence of those protecting agents, by a mechanism associated to a nonspecific increase in the inner membrane permeability. Since X-537A binds to the inner membrane, where is located a membrane-binding site for bivalent cations, one can suggest that this site could be associated to the pathway responsible for Ca^{2+} efflux induced by both ruthenium red and the releasing agents above. The increase in permeability would then be a consequence and not the cause of Ca^{2+} efflux.

Supported by FAPESP and CNPq

XIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA
DE BIOQUÍMICA - abril de 1985.

B7

STUDIES ON HYDROPEROXIDE-INDUCED Ca^{2+} EFFLUX FROM LIVER MITOCHONDRIA

Celene F. Bernardes, Lucia Pereira-da-Silva and Aníbal E. Vercesi
Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo

Isolated rat liver mitochondria energized either by succinate oxidation or ATP hydrolysis present a transient increase in Ca^{2+} efflux during hydroperoxide reduction via the mitochondrial glutathione peroxidase/glutathione reductase system. This is paralleled by NADPH oxidation and occurs when mitochondria are loaded with physiological Ca^{2+} concentrations and acetate instead of phosphate is used as permeant anion. During this event the respiration rate (succinate oxidation) increases from 26 to 50 $\text{ng atom O}_2 \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, the membrane potential ($\Delta\psi$) decreases from about 190 mV to about 165 mV and the extramitochondrial free Ca^{2+} concentration increases from 0.4 μM to 0.8 μM . After the consumption of the added hydroperoxide, NADP^+ is reduced and the rate of respiration, the extramitochondrial Ca^{2+} concentration and $\Delta\psi$ return to values close to the control experiments. The respiratory control of mitochondria remains practically the same during hydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux.

Supported by FAPESP and CNPq

XIII CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA
agosto de 1985.

Area 6: Membrane structure and functions

TU-419

STUDIES ON HYDROPEROXIDE-INDUCED Ca^{2+} EFFLUX FROM LIVER MITOCHONDRIA. C.F. Bernardes, Lucia Ferreira-da-Silva and A.E. Vercesi. Depto Bioquímica, I.B., UNICAMP, Caixa Postal 6109 - 13100 - Campinas, SP. Brasil.

Isolated rat liver mitochondria, energized either by succinate oxidation or ATP hydrolysis present a transient increase in Ca^{2+} efflux concomitant to hydroperoxide reduction when suspended in medium containing 3mM ATP, 4mM Mg^{2+} , acetate as permeant anion and loaded with 20 to 30 nmoles $\text{Ca}^{2+} \text{mg}^{-1}$. This is paralleled by NADPH oxidation, increase in the steady state concentration of extramitochondrial Ca^{2+} from 0.5 to 1.0 μM , decrease in the membrane potential ($\Delta\psi$) from about 185 to 165 mV and increase in the rate of respiration (succinate oxidation) from 20 to 35ng atom $\text{O}_2 \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Under these experimental conditions, after the consumption of the added hydroperoxide, NADP^+ is reduced and all the parallel events (rate of respiration, external Ca^{2+} concentration, and $\Delta\psi$) return to the original values. An expected relationship was not found between the rate of Ca^{2+} cycling and $\Delta\psi$ values since it was not affected by the addition of either EGTA or ruthenium-red. The respiratory control of mitochondria remains unaltered after the hydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux.

Supported by FAPESP and CNPq

II ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS - novembro de 1985.

BERNARDES, C. F.; PEREIRA-DA-SILVA, L. e VERCESI, A. E. - Indução do efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias hepáticas t-butil hydroperóxido.

Mitocôndrias de fígado de rato energizadas por oxidação de succinato ou hidrólise de ATP apresentam um aumento transitório no efluxo de Ca^{2+} durante a redução de hidroperóxido. Este efeito é acompanhado por oxidação de NADPH e ocorre na presença de baixas concentrações de Ca^{2+} quando acetato ao invés de fosfato é usado como ânion permeante. Após o consumo de hidroperóxido as mitocôndrias ainda apresentam elevado controle respiratório.

XI CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOFÍSICA
julho de 1986.

ASPECTS LINKED TO THE ENERGETICS AND REGULATION OF Ca^{2+} FLUX IN MITOCHONDRIA.
A.E.Vercesi, L.Pereira-da-Silva, I.S.Martins, E.G.S.Carnieri, C.F.Bernardes, V.
G.R.Valle, M.M. Fagian and V.L.Ferraz. Depto. de Bioquímica, IB, UNICAMP,
CP. 6109, CEP.13081, Campinas, SP, Brasil.

Most animal mitochondria contain two Ca^{2+} translocases, one for influx and other for efflux. Ca^{2+} influx is driven by the negative-inside electrochemical H^+ gradient developed by electron transport. Efflux of Ca^{2+} takes place through an electroneutral exchange of internal Ca^{2+} for external H^+ or Na^+ . Whether this integrated system operates to regulate the activity of Ca^{2+} -dependent enzymes in the cytosol or matrix is still a matter of study. Recent data from our laboratory have indicated that: i) some plant mitochondria also possess two distinct pathways for Ca^{2+} transport, although with lower affinity for the cation than those from animal mitochondria. Contrary to what happens in some animal mitochondria the isocitric dehydrogenase is not activated by Ca^{2+} in plant mitochondria; ii) the Ca^{2+} efflux stimulated by NAD(P)^+ in isolated liver mitochondria also occurs under near physiological conditions but the correlated mitochondrial swelling and decrease in membrane potential do not support the idea that it takes place through the electroneutral $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ antiporter; iii) swelling of deenergized mitochondria in isosmotic KCl or sucrose medium containing NAD(P) oxidants and Ca^{2+} in the mM range is independent of phospholipase A₂ activation but is inhibited by ruthenium red or N-ethylmaleimide; iiiii) the use of safranin as a probe for the mitochondrial membrane potential in experiments of Ca^{2+} transport should be avoided because of its undesirable side effects on membrane permeability; iiiiii) high intramitochondrial Ca^{2+} concentrations inhibit oxidative phosphorylation by competing with Mg^{2+} for the formation of adenine nucleotides complexes.

Supported by FAPESP and CNPq

INHIBITION OF RUTHENIUM RED-INDUCED Ca^{2+} EFFLUX FROM LIVER
MITOCHONDRIA BY THE ANTIBIOTIC X-537A

L. Pereira da Silva, C.F. Bernardes and A.E. Vercesi

Departamento de Bioquímica, IB, Universidade Estadual de Campinas,
13100 Campinas, São Paulo, Brazil

Received August 17, 1984

SUMMARY: It has been reported (Becker, G.L., Fiskum, G. and Lehninger, A.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9009-9012) that respiring $^{2+}$ rat liver mitochondria suspended in KCl medium containing ATP, Mg^{2+} and phosphate, maintain a steady state extramitochondrial free Ca^{2+} concentration of about 0.5 μM . The results reported here show that the addition of the antibiotic X-537A, at concentrations far below those required for ionophorous activity, caused a perturbation in this steady state, lowering the extramitochondrial free Ca^{2+} concentration by about 0.20 μM . This shift in steady state was clarified by a study of X-537A inhibition of the Ca^{2+} efflux induced by ruthenium red; a half-maximum effect was observed at approximately 25 nM X-537A. No effect on Ca^{2+} transport through the influx uniporter was observed. The possibility of a generalized stabilizing action of the antibiotic on the mitochondrial membrane seems to be ruled out by its effectiveness at very low concentrations. © 1984 Academic Press, Inc.

Experimental evidence indicates that the steady state distribution of free Ca^{2+} concentration between intra and extra-mitochondrial space is kinetically regulated by the simultaneous operation of two independent pathways (cf. (1-3)). Ca^{2+} influx is mediated by a ruthenium red-sensitive uniporter driven by the transmembrane potential (4,5). Ca^{2+} efflux takes place through a ruthenium red-insensitive antiporter which catalyzes a $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^{+}$ exchange in mitochondria from excitable tissues (6) and a sodium-independent, possibly a $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ antiporter in liver mitochondria (7) (but see (8)). Therefore, the steady state depends on the relative rates of Ca^{2+} transport through the influx and efflux

Abbreviations: BSA, Bovine serum albumin; EGTA, ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether) N,N'-tetra acetic acid; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane-sulfonic acid; DNP, 2,4-dinitrophenol; suc, succinate.

0006-291X/84 \$1.50

Copyright © 1984 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

pathways and can be altered by the stimulation or inhibition of one or both pathways (3). One strong evidence supporting this model comes from the fact that inhibition of the Ca^{2+} influx pathway by addition of ruthenium red after Ca^{2+} accumulation reaches a steady state triggers a net release of Ca^{2+} from the mitochondria into the medium (cf.(1-3)). This communication reports experiments showing that the antibiotic X-537A, at concentrations far below those required for ionophorous activity (9,10) specifically inhibits the ruthenium red-insensitive Ca^{2+} efflux from liver mitochondria but has no effect on Ca^{2+} transport through the influx uniporter. A preliminary report of some of these findings has been presented (11).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Liver mitochondria were isolated by the method of Schneider (12), and heart mitochondria by the method of Vercesi *et al* (13) from overnight fasted male Wistar-strain rats weighing approximately 250 g. All the incubations were carried out at 25°C, in a medium containing 65 mM KCl, 125 mM sucrose, 3.0 mM Hepes pH 7.2, 0.25 mM Pi, 0.05% BSA, 3.0 mM ATP and 4.0 mM Mg^{2+} . Changes in free Ca^{2+} concentration in the suspending medium were followed using a Ca^{2+} -selective electrode (Radiometer, F2112 Calcium selectrode), calibrated by the addition of Ca^{2+} /EGTA buffers to the reaction medium alone (14,15). Changes in the mitochondrial membrane potential were monitored in a dual-wavelength double beam spectrophotometer (Perkin-Elmer model 356), employing 10 μM safranin as the indicating dye at the wavelength pair 533-511 nm (16). Oxygen consumption was measured using a Clark electrode connected to a Gilson oxygraph. The antibiotic X-537A (sodium salt), from Hoffmann-La Roche, was dissolved in water at a stock concentration of 0.2 mM.

RESULTS

The experiment in Fig.1 shows that addition of rat liver mitochondria to aerobic medium containing succinate as respiratory substrate and a free Ca^{2+} concentration of about 2.0 μM resulted in Ca^{2+} uptake with a decrease in free Ca^{2+} concentration. In agreement with the results of Becker *et al* (15), a steady state level of about 0.50 μM was reached, and maintained constant during the course of the experiment (trace A). However, the addition of the antibiotic X-537A at the point shown at a concentration of

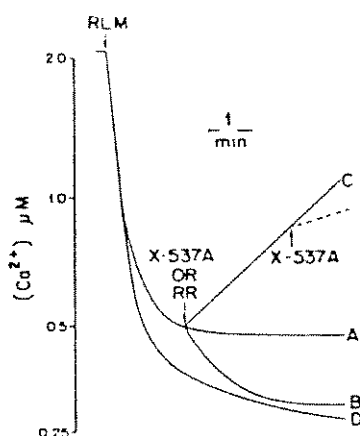


Figure 1. Effect of the antibiotic X-537A and ruthenium red on mitochondrial Ca^{2+} fluxes. To 1.0 ml of the reaction medium described under "Experimental Procedures", were added $5.0 \mu\text{M}$ rotenone, $2.0 \mu\text{g}$ oligomycin, 2.0 mM succinate and 2.0 mg mitochondrial protein. Ruthenium red ($0.7 \mu\text{M}$, trace C) and X-537A (125 pmol/mg protein, trace B) were added where shown. Trace A is the control and in trace D mitochondria were added to the medium already containing the antibiotic.

$125 \text{ pmols mg}^{-1}$ protein (125 nM), caused a lowering of the medium free Ca^{2+} concentration to approximately $0.30 \mu\text{M}$ (trace B). If ruthenium red instead of X-537A was added at the same point, a net release of Ca^{2+} from mitochondria occurred, at a rate of about $0.85 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (trace C). This rate of Ca^{2+} efflux was markedly decreased by the addition of X-537A (dotted line). Trace D shows that when mitochondria were added to the medium already containing the antibiotic, the steady state extramitochondrial free Ca^{2+} concentration attained was the same as that observed when X-537A was added after the steady state had been reached.

It has been reported that the antibiotic X-537A selectively inhibits the oxidation of glutamate and isocitrate in liver mitochondria by binding to a site for bivalent cations that is associated with the inner mitochondrial membrane (9,10). The dose-response relationships for the inhibition of Ca^{2+} efflux and of glutamate oxidation by X-537A were identical (Fig.2). This data are consistent with the existence of a common binding site

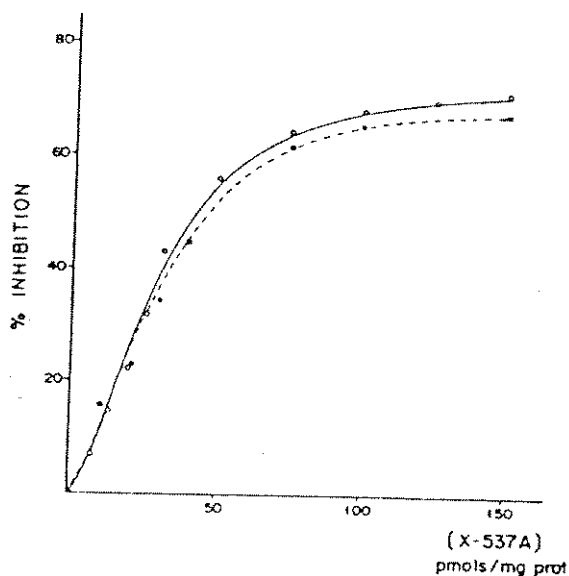


Figure 2. Dose-response relationship between the antibiotic X-537A and glutamate oxidation (solid line) or ruthenium red-induced Ca^{2+} -efflux (dotted line). Mitochondria (2.0 mg of protein) were added to 2.0 ml of the reaction medium containing 5.0 mM glutamate or 5.0 μM rotenone, 2.0 mM succinate and 0.7 μM ruthenium red. X-537A was present at the concentrations shown.

responsible for both effects. Half-maximum inhibition of both phenomena was obtained at approximately 25 nM X-537A. An inhibition of 70% was observed at a concentration of 125 nM (125 pmols mg^{-1}).

Since a recent report (17) indicated the existence of a relationship between membrane potential ($\Delta\psi$), steady state extramitochondrial Ca^{2+} concentration and the rate of ruthenium red-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria, experiments were performed to study the effect of X-537A on $\Delta\psi$. Fig. 3 shows that the antibiotic induced a slight increase in $\Delta\psi$ with a maximum effect (about 15 mV) at a concentration of 250 nM. This effect decreased with concentrations of X-537A higher than 400 nM, and was almost absent at a concentration of 1 μM (not shown). It should be emphasized that the effect of X-537A on $\Delta\psi$ was independent of changes in the rate of Ca^{2+} cycling across the membrane, since the same result was observed in a Ca^{2+} -free medium (not shown). The experiment of Fig. 4 shows that the antibiotic X-537A had no effect

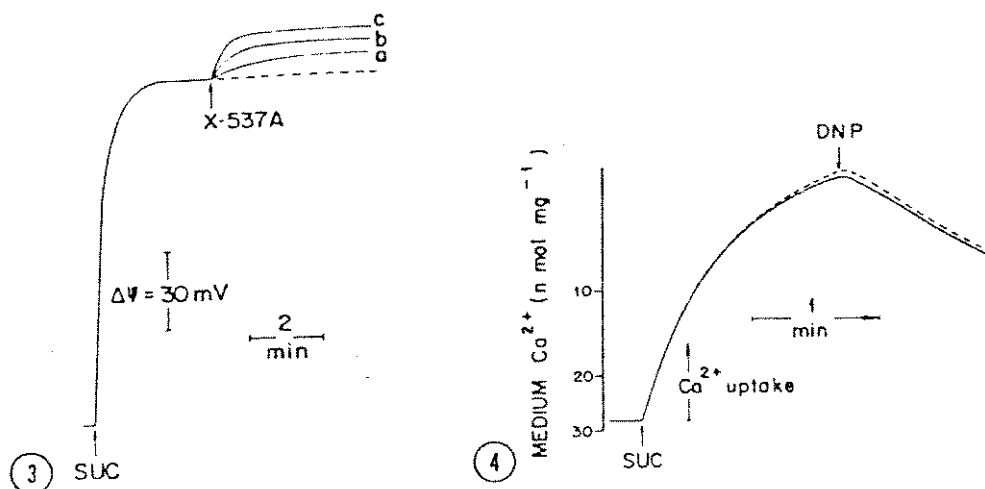


Figure 3. Effect of the antibiotic X-537A on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$). Mitochondria (2.0 mg of protein) were added to 2.0 ml of the reaction medium containing 10 μM safranin, 5.0 μM rotenone and 2.0 mM succinate. After $\Delta\psi$ reached a constant value, X-537A was added at different concentrations (a) 62.5 nM, (b) 125 nM, (c) 250 nM.

Figure 4. The Ca^{2+} flux through the uniporter is not affected by the antibiotic X-537A. To 1.0 ml of the reaction medium containing 5.0 μM rotenone and 2.0 mM succinate, was added 1.0 mg mitochondrial protein. DNP (50 μM) was added where shown, in the absence (solid line) or in the presence (dotted line) of 125 pmol X-537A/mg protein.

on the rate of Ca^{2+} movements through the uniporter. In this experiment, de-energized mitochondria were preincubated in the presence of Ca^{2+} and Ca^{2+} influx was started by the addition of succinate. After the completion of Ca^{2+} uptake, DNP was added to induce Ca^{2+} efflux by reversal of the uniporter. The dotted line shows the experiment in the presence of X-537A. The Na^+ -induced Ca^{2+} efflux in rat heart mitochondria was not inhibited by these low concentrations of X-537A (not shown).

DISCUSSION

The results described in this communication are consistent with the current model of two separate routes for Ca^{2+} transport across the inner mitochondrial membrane (cf. (1-3)). According to this model the steady state distribution of Ca^{2+} between the intra and extramitochondrial space is determined by a continuous Ca^{2+}

cycling. Indeed, the inhibition of the ruthenium red-induced Ca^{2+} efflux by the antibiotic X-537A caused a perturbation in the steady state, lowering the extramitochondrial free Ca^{2+} concentration by about 0.20 μM . This effect appears to be unrelated to enhanced mitochondrial stability, since the experiments were carried out in a medium containing BSA, low concentrations of Ca^{2+} and phosphate and physiological concentrations of the membrane stabilizers Mg^{2+} and ATP (15). However, the slight increase in $\Delta\psi$ observed in Fig.3 may reflect a specific decrease in the proton conductance of the inner mitochondrial membrane. A direct relationship between the effects of X-537A on Ca^{2+} efflux and on the transmembrane potential observed in Fig.3 is unlikely, since the results of Bernardi and Azzone (17) indicate that this slight increase in membrane potential would be expected to cause an increase in the rate of ruthenium red-induced Ca^{2+} efflux rather than the inhibition observed here. Moreover, other results indicate that the rate of ruthenium red-induced Ca^{2+} efflux is not affected by changes in membrane potentials (8,18).

With respect to the mechanism of this inhibition, it is important to recall earlier reports (9,10), that showed an interaction between low concentration of the antibiotic X-537A and a membrane binding site for bivalent cations. The experiments here favor the notion of a close relationship between this specific binding site for the antibiotic X-537A, located in the inner mitochondrial membrane, and the pathway for ruthenium red-induced Ca^{2+} efflux. This pathway might be a passive $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ antiporter that binds X-537A (cf. however 8), or the antibiotic may be a specific inhibitor of either independent H^+ or Ca^{2+} fluxes across the membrane. As the binding site for X-537A has been localized specifically at the site for reduction of NADP^+ by glutamate or isocitrate in liver mitochondria (9,10), we are currently trying

to determine whether this site is involved in the mechanism responsible for Ca^{2+} efflux stimulated by the oxidized state of mitochondrial NADP (19-21). The use of X-537A at low concentrations will certainly be a valuable tool in the study of the mechanism of Ca^{2+} efflux from mitochondria.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian agencies FAPESP (proc. 83/1760) and CNPq (400239/84-BF). We would like to thank Dr. W.C. Sgarbieri for the use of his dual-wavelength spectrophotometer and Ms Regina C. Rosseto for skilled technical assistance.

REFERENCES

1. Fiskum, G. and Lehninger, A.L. (1981) in Calcium and Cell Function (Cheung, W.Y., ed) vol II, pp.39-80, Academic Press, New York.
2. Williamson, J.R., Copper, R.H. and Hoek, J.B. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 639, 243-295.
3. Nicholls, D. and Akerman, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 683, 57-88.
4. Scarpa, A. and Azzone, G.F. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 328-335.
5. Selwyn, M.J., Dawson, A.P. and Dunnet, S.J. (1970) *FEBS Lett.* 10, 1-5.
6. Crompton, M., Kunzi, M. and Carafoli, E. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79, 549-558.
7. Nicholls, D.G. (1978) *Biochem. J.* 176, 463-474.
8. Gunter, T.E., Chace, J.H., Puskin, J.S. and Gunter, K.K. (1983) *Biochemistry* 22, 6341-6351.
9. Lin, D.C. and Kun, E. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 820-825.
10. Lin, D.C. and Kun, E. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70, 3450-3453.
11. Vercesi, A.E. and Airoidi, L.P.S. (1984) IX Congresso Brasileiro de Biofísica Abst. p.84.
12. Schneider, W.C. (1948) *J. Biol. Chem.* 176, 259-266.
13. Vercesi, A.E., Reynafarje, B. and Lehninger, A.L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6379-6385.
14. Becker, G.L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 591, 234-239
15. Becker, G.L., Fiskum, G. and Lehninger, A.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9009-9012.
16. Akerman, K.E.O. and Wikstrom, M.K.F. (1976) *FEBS Lett.* 68, 191-197.
17. Bernardi, P. and Azzone, G.F. (1983) *Eur. J. Biochem.* 134, 377-383.
18. Fiskum, G. and Lehninger, A.L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6236-6239.
19. Lehninger, A.L., Vercesi, A.E. and Bababunmi, E.A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1690-1694.
20. Vercesi, A.E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 305-310.
21. Vercesi, A.E. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 86-91.

BBA 42013

t-Butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and ATP

Celene Fernandes Bernardes, Lucia Pereira da Silva
and Aníbal Eugênio Vercesi *

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas,
C.P. 6109, 13100 Campinas, São Paulo (Brazil)

(Received November 22nd, 1985)

Key words: Ca^{2+} efflux; NAD(P)H oxidation; Hydroperoxide; Ruthenium red; Acetate; (Rat liver mitochondria)

Isolated rat liver mitochondria, energized either by succinate oxidation or by ATP hydrolysis, present a transient increase in the rate of Ca^{2+} efflux concomitant to NAD(P)H oxidation by hydroperoxides when suspended in a medium containing 3 mM ATP, 4 mM Mg^{2+} and acetate as permeant anion. This is paralleled by an increase in the steady-state concentration of extramitochondrial Ca^{2+} , a small decrease in $\Delta\psi$ and an increase in the rate of respiration and mitochondrial swelling. With the exception of mitochondrial swelling all other events were found to be reversible. If Ca^{2+} cycling was prevented by ruthenium red, the changes in $\Delta\psi$, the rate of respiration and the extent of mitochondrial swelling were significantly diminished. In addition, there was no significant decrease in the content of mitochondrial pyridine nucleotides. Mitochondrial coupling was preserved after a cycle of Ca^{2+} release and re-uptake under these experimental conditions. It is concluded that hydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from intact mitochondria is related to the redox state of pyridine nucleotides.

Introduction

Energized liver mitochondria, particularly in the presence of membrane stabilizers such as ATP and Mg^{2+} , show the ability to buffer extramitochondrial Ca^{2+} at concentrations between 0.25 and 1.0 μM , depending on the medium composition [1–5]. This is the result of Ca^{2+} flux through two operative pathways: a uniporter that promotes an electrophoretic Ca^{2+} influx in re-

sponse to the electrical membrane potential [6–11] and an electroneutral Ca^{2+} efflux through an antiport that exchanges one internal Ca^{2+} for two external H^+ [12–14], but see also Ref. 15. This model of Ca^{2+} transport in mitochondria was first suggested by Drahotka et al. [16]. The concept of Ca^{2+} cycling through two independent pathways became established after experiments showing net Ca^{2+} efflux in the presence of ruthenium red, a specific inhibitor of the Ca^{2+} uniporter [17–19].

The steady-state extramitochondrial Ca^{2+} concentration can be altered in the presence of different agents which modify the rate of either Ca^{2+} influx or efflux [11,14,20]. It was first shown by Lehninger et al. [21] that Ca^{2+} efflux from isolated mitochondria could be stimulated by the oxidized state of mitochondrial pyridine nucleotides. This

* To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: *t*-BuOOH, *t*-butylhydroperoxide; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; TPP^+ , tetraphenylphosphonium; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrozone; $\Delta\psi$, transmembrane potential; EGTA, ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid.

was subsequently confirmed by other laboratories not only in isolated mitochondria (Refs. 22–31, see also Vercesi, A.E., unpublished results), but also in intact cells [32] and perfused liver [33]. These findings resulted in a great controversy on the subject; some authors claimed that Ca^{2+} efflux stimulated by NAD(P)^+ was due mainly to non-specific increase in membrane permeability [22–27]. Others concluded that this release mechanism was independent of gross alterations in membrane permeability and could be of physiological relevance (Refs. 28–35, see also Vercesi, A.E., unpublished data). It has been shown that NAD(P)^+ -induced Ca^{2+} release from mitochondria is accompanied by hydrolysis of oxidized pyridine nucleotides catalysed by an ATP-sensitive intramitochondrial NADase activated by Ca^{2+} [34,35]. This reaction produces nicotinamide, ADP-ribose and 5'-AMP [36]. It has been proposed that a posterior ADP-ribosylation of a protein in the inner mitochondrial membrane might allow Ca^{2+} release from mitochondria [36]. Inhibition of the NADase by ATP prevents both NAD(P)^+ hydrolysis and Ca^{2+} release from mitochondria [35,37].

It has also been shown that NAD(P)^+ -induced Ca^{2+} release from mitochondria is involved in the perturbation of Ca^{2+} homeostasis and loss of cell viability during oxidative stress [38]. However, the inhibition by ATP would argue against the occurrence of this mechanism under physiological conditions [26]. In fact, it has been claimed [39] that NAD(P) oxidants cause a spontaneous Ca^{2+} discharge from mitochondria incubated in phosphate-containing media only in the absence of Mg^{2+} and adenine nucleotides.

In the present paper it is shown that NAD(P)H oxidation induced by *t*-butylhydroperoxide leads to a stimulation of Ca^{2+} efflux from mitochondria loaded with moderate Ca^{2+} concentrations even in the presence of physiological concentrations of ATP and Mg^{2+} , provided acetate instead of phosphate is used as permeant anion. Moreover, under these conditions, we found that NAD(P)^+ -induced Ca^{2+} efflux is not attributed to mitochondrial uncoupling. A preliminary report of some of these findings has been presented [40].

Materials and Methods

Isolation of mitochondria. Adult female Wistar rats (4–6 months age) of 230–260 g body weight were fasted overnight and killed by decapitation. Liver mitochondria were isolated by homogenization in a medium containing 250 mM sucrose and 0.5 mM EGTA, followed by conventional differential centrifugation. The mitochondrial pellet was washed three times and then resuspended in the same medium without EGTA, at a concentration of 100 mg of protein per ml. The protein content was determined by the method of Kies and Murphy [41].

Standard incubation procedure. The experiments were carried out at 32°C in a basic medium containing 125 mM sucrose/65 mM KCl/3.0 mM Hepes buffer (pH 7.2)/4.0 mM Mg^{2+} /3.0 mM ATP/0.05% bovine serum albumin/4.0 μM rotenone/0.5 μg oligomycin per mg/10 mM K^+ -acetate and 2.0 mM succinate. *t*-Butylhydroperoxide (40–80 μM) was added where indicated. The final Ca^{2+} loads given in Results and Discussion represent the sum of the endogenous and added Ca^{2+} . Other modifications of the basic medium are described in the figure legends.

Determination of Ca^{2+} movements and O_2 consumption. Ca^{2+} uptake and release were monitored using a Ca^{2+} -selective electrode (Radiometer, F2112 calcium selectrode). The response of the Ca^{2+} electrode was calibrated by addition of appropriated Ca^{2+} -EGTA buffer mixtures to the reaction medium [2,42]. Oxygen uptake was monitored with a Clark oxygen electrode (Yellow Springs Instruments Co.), in a 1 ml thermostated chamber equipped with magnetic stirring. Total Ca^{2+} content of mitochondria was determined with an atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer 303).

Determination of the redox state of mitochondrial pyridine nucleotides. The redox state of NAD(P) was continuously measured fluorimetrically (366 → 450 nm) in an Aminco Bowman spectrofluorometer. In some experiments NADH and NADPH were determined enzymatically using lactate dehydrogenase and glutathione reductase as described by Beatrice et al. [43]. In this case, the fluorescence was compared to that obtained adding known amounts of NADH and NADPH as internal standards.

Determination of mitochondrial swelling. Mitochondrial swelling was estimated from light-scattering measurements at 520 nm, in an Aminco Bowman spectrofluorometer.

Measurement of mitochondrial transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$). Mitochondria were incubated in the reaction medium containing 3 μM tetraphenylphosphonium (TPP^+). The concentration of TPP^+ in the extramitochondrial medium was continuously monitored with a TPP^+ -selective electrode prepared in our laboratory according to Kamo et al. [44]. The mitochondrial membrane potential was then calculated assuming that the TPP^+ distribution between mitochondria and medium follows the Nernst equation [45].

Materials. Rotenone, oligomycin, ATP, NAD(P)H and *t*-butylhydroperoxide were obtained from Sigma; TPP^+ from Aldrich; all other reagents were commercial products of the highest available grade of purity.

Results and Discussion

Ca²⁺ flux and the redox state of mitochondrial pyridine nucleotides in the presence of t-butylhydroperoxide or acetoacetate

The experiment in Fig. 1 studies the Ca^{2+} flux in mitochondria exposed to either 1.0 mM acetoacetate or 50 μM hydroperoxide in the presence of 20 nmol Ca^{2+} per mg protein and physiological concentrations of ATP and Mg^{2+} [3]. It is claimed that in the presence of ATP and Mg^{2+} Ca^{2+} efflux is not stimulated by NAD(P)H oxidation because ATP and Mg^{2+} protect the 'damaging' effect of the oxidants on the membrane [26,27,39], or because ATP inhibits the activity of the mitochondrial NADase [35].

It can be observed that addition of mitochondria decreased the free Ca^{2+} concentration of the reaction medium until a steady state was achieved at an extramitochondrial Ca^{2+} concentration in the range of 0.75 μM in agreement with previous reports [1-4]. When 50 μM *t*-butylhydroperoxide was present in the medium prior to the inclusion of mitochondria the initial rate of Ca^{2+} uptake was identical to the control experiment but a transient increase in extramitochondrial Ca^{2+} concentration started just before the steady state was expected to be attained. Under such experimental

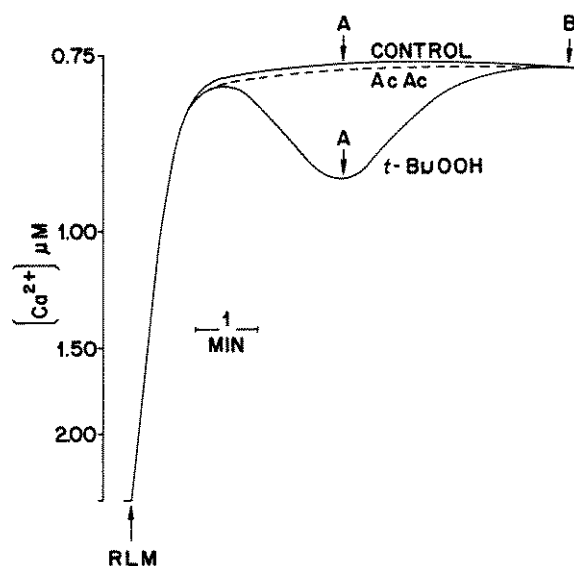


Fig. 1. Effect of *t*-butylhydroperoxide and acetoacetate (AcAc) on Ca^{2+} flux in liver mitochondria. Mitochondria (1.0 mg) were suspended in 1.0 ml of the basic medium (see Materials and Methods), in the absence of NAD(P)H oxidants (control), or in the presence of 50 μM *t*-butylhydroperoxide or 1.0 mM acetoacetate. RLM, rat liver mitochondria.

conditions this hydroperoxide-induced effect occurred only when acetate instead of phosphate was used as permeant anion. Acetoacetate at a concentration of 1.0 mM failed to induce net Ca^{2+} release, in agreement with previous experiments carried out in the presence of ATP [26]. To investigate at what extent pyridine nucleotides were oxidized under these conditions, samples were

TABLE I

CONTENT OF REDUCED PYRIDINE NUCLEOTIDES IN LIVER MITOCHONDRIA IN THE PRESENCE OF *t*-BUTYLHYDROPEROXIDE OR ACETOACETATE

Samples were taken from experiments described in Fig. 1, at the points indicated by the arrows and the reduced pyridine nucleotides were determined enzymatically as described in Materials and Methods.

Condition	Reduced pyridine nucleotides (nmol per mg protein)	
	NADH	NADPH
Control	3.52	4.75
<i>t</i> -BuOOH (A)	1.66	1.99
<i>t</i> -BuOOH (B)	3.37	4.08
Acetoacetate	1.59	4.73

taken from the reaction medium for enzymatic analysis where indicated by the arrows in Fig. 1. It can be seen in Table I that there was a marked decrease on both NADH and NADPH content in the samples taken during the hydroperoxide-induced increase in medium Ca^{2+} (A). Levels close to that of the control experiment were obtained in the samples taken after the Ca^{2+} re-uptake occurred (B). In the presence of acetoacetate, however, only NADH was significantly oxidized. These results are in agreement with our previous findings [29] that acetoacetate does not oxidize NADPH at high membrane potential, and therefore fails to stimulate Ca^{2+} efflux from mitochondria. On the other hand, hydroperoxide that oxidizes both NADH and NADPH stimulates Ca^{2+} efflux even in the presence of ATP and Mg^{2+} . The almost complete return of NAD(P)^+ to the reduced state observed when Ca^{2+} re-uptake was finished indicates that in the presence of ATP plus Mg^{2+} , Ca^{2+} efflux can occur in the absence of significant net loss of pyridine nucleotides, in agreement with recent results reported by Frei et al. [46]. The role of acetate on the process is still uncertain and may be explained, at least in part, on the basis of the findings of Bernardi et al. [47] showing that FCCP-induced Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria is increased by acetate and decreased by phosphate. Zoccarato and Nicholls [48] have also shown that in the presence of phosphate Ca^{2+} efflux from mitochondria is slower than in the presence of acetate due to intramitochondrial Ca^{2+} complexation by phosphate.

O₂ consumption, Ca²⁺ flux and swelling during hydroperoxide metabolism in liver mitochondria loaded with different Ca²⁺ concentrations: effect of ATP and Mg²⁺

Some authors studying the mechanism of NAD(P)^+ -induced Ca^{2+} efflux from mitochondria loaded with massive amounts of Ca^{2+} reported that Ca^{2+} release was preceded by a large-amplitude mitochondrial swelling and uncoupling [22–27]. This led us to study these parameters in liver mitochondria loaded with different Ca^{2+} concentrations, under the conditions of Fig. 1, where Ca^{2+} release was completely reversible. The oxidation of mitochondrial pyridine nucleotides was promoted by 50 μM *t*-butylhydroperoxide and

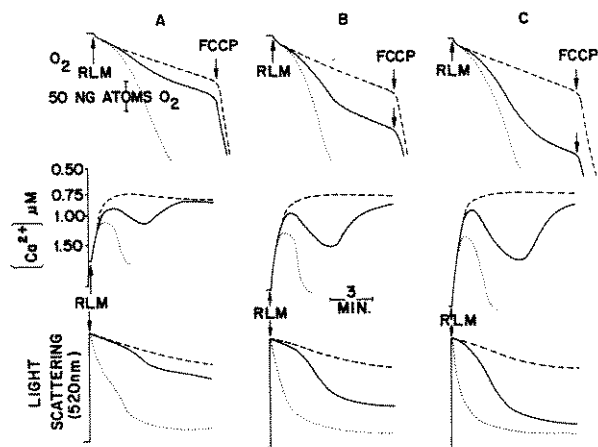


Fig. 2. Effect of *t*-butylhydroperoxide on Ca^{2+} flux, the rate of respiration and swelling in mitochondria loaded with different Ca^{2+} concentrations. Mitochondria (1.0 mg) were suspended in the basic medium in the presence (solid line) or absence (dashed line) of 50 μM *t*-butylhydroperoxide. The dotted lines show the effect of 50 μM *t*-butylhydroperoxide in mitochondria suspended in the absence of ATP and Mg^{2+} . Panels A, B and C correspond to 20, 30 and 40 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively. FCCP (0.5 μM) was added at the points shown by the arrows. RLM, rat liver mitochondria.

during its metabolism a transient Ca^{2+} release was observed, paralleled by an increase in the rate of oxygen consumption and mitochondrial swelling. The mitochondria, however, remained highly coupled, as shown in Fig. 2 (traces A, B and C) by the addition of FCCP. The experiments were performed varying the mitochondrial Ca^{2+} from 20 to 40 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$. An increase in the hydroperoxide-induced effects was observed as the Ca^{2+} concentration increased. However, even at the highest Ca^{2+} load there was full re-uptake of the released Ca^{2+} , paralleled by the return of the respiration rate to the original values. The Ca^{2+} release and the increase in the rate of respiration were irreversible in the absence of ATP and Mg^{2+} , which showed to be extremely important in decreasing the rate and extent of mitochondrial Ca^{2+} release and swelling at all Ca^{2+} loads. A direct relationship between the rates of Ca^{2+} efflux and the extent of both Ca^{2+} load and hydrolysis of pyridine nucleotides was recently shown [46]. Therefore, the inhibitory effect of ATP observed under our conditions may suggest its regulatory role on the mitochondrial NADase and on the ability of Ca^{2+} retention by mitochondria. In addition, it

has been shown that both ATP and Mg^{2+} have an important stabilizing effect on the mitochondrial membrane [49,50].

Ca²⁺ flux during hydroperoxide metabolism in mitochondria energized by endogenous respiration plus exogenous ATP

Most of the experiments on the effect of NAD(P) redox state on mitochondrial Ca^{2+} efflux were performed in the presence of respiratory inhibitors and the reversibility of the pyridine nucleotides oxidation and Ca^{2+} release was shown by subsequent addition of NAD(P) reductants [22–36]. This has generated a controversy concerning the effect of redox states themselves on Ca^{2+} flux in mitochondria [22–27]. For instance, it was proposed that Ca^{2+} release induced by oxaloacetate was due to a direct effect of the oxidant on the mitochondrial membrane rather than to oxidation of NAD(P)H [22]. As a corollary, it was proposed that β -hydroxybutyrate reversed Ca^{2+} release by displacing oxaloacetate from its binding site on the membrane [22]. The experiment reported in Fig. 3 shows the reversibility of NAD(P)⁺-stimulated Ca^{2+} efflux from mitochondria incubated in the absence of either inhibitors or reductants. Under these experimental conditions, reversible oxidation of NAD(P)H was caused

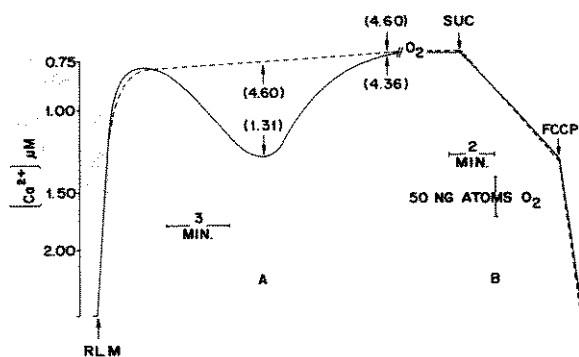


Fig. 3. Maintenance of respiratory control after a cycle of Ca^{2+} release and re-uptake induced by *t*-butylhydroperoxide in mitochondria energized by endogenous substrates plus ATP. Mitochondria (1.0 mg) were suspended in the basic medium (oligomycin, rotenone and succinate (suc), absent), in the presence (solid line) or absence (dashed line) of $40 \mu M$ *t*-butylhydroperoxide. Panel A shows the Ca^{2+} traces and panel B shows the rates of respiration after the addition of rotenone, oligomycin and succinate. FCCP ($0.5 \mu M$) was added where shown by the arrow. RLM, rat liver mitochondria.

by the addition of a limited amount of hydroperoxide which was paralleled by a transient Ca^{2+} release from mitochondria. When the Ca^{2+} steady state returned to the control levels, NADPH was found to be almost at the same concentration as in the control experiment. This result indicates that hydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria is related directly or indirectly to the redox state of pyridine nucleotides.

After a cycle of Ca^{2+} release and re-uptake the degree of mitochondrial coupling was investigated. Thus, the addition of rotenone, oligomycin and succinate to these mitochondria led to the same rate of state-4 respiration compared to the control experiment. To prove that the state-4 respiration was actually a controlled state, FCCP was subsequently added. There was an immediate and very large acceleration of oxygen consumption, which was identical in both the hydroperoxide containing and control systems (Fig. 3B). The respiratory control ratio was about 7.5 in both cases.

Changes in membrane potential and mitochondrial swelling during the onset of Ca^{2+} efflux induced by hydroperoxide

The participation of $\Delta\psi$ on the mechanism of NAD(P)⁺-stimulated Ca^{2+} efflux from mitochondria is controversial. Some workers claimed that NAD(P)⁺-induced Ca^{2+} efflux is preceded by a collapse in $\Delta\psi$ [22,24–27], while others have shown that a decrease in $\Delta\psi$ during Ca^{2+} efflux is the result of a stimulated-energy-dissipating Ca^{2+} cycling across the mitochondrial membrane [30,31,51]. This question was studied under our experimental conditions where mitochondrial coupling was completely retained after the onset of Ca^{2+} release and re-uptake induced by hydroperoxide. It can be observed in Fig. 4 that the transient increase in extramitochondrial Ca^{2+} concentration is paralleled by a small decrease in $\Delta\psi$ (about 20 mV). The decrease in $\Delta\psi$ was smaller and the rate of net Ca^{2+} efflux was much faster when ruthenium red was added to the system containing hydroperoxide (dashed line). The rate of ruthenium red-induced Ca^{2+} efflux was $8 \text{ nmol } Ca^{2+} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ in the presence of hydroperoxide whereas in its absence it was only $1 \text{ nmol } Ca^{2+} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. The extent of mitochondrial swelling was also significantly decreased by

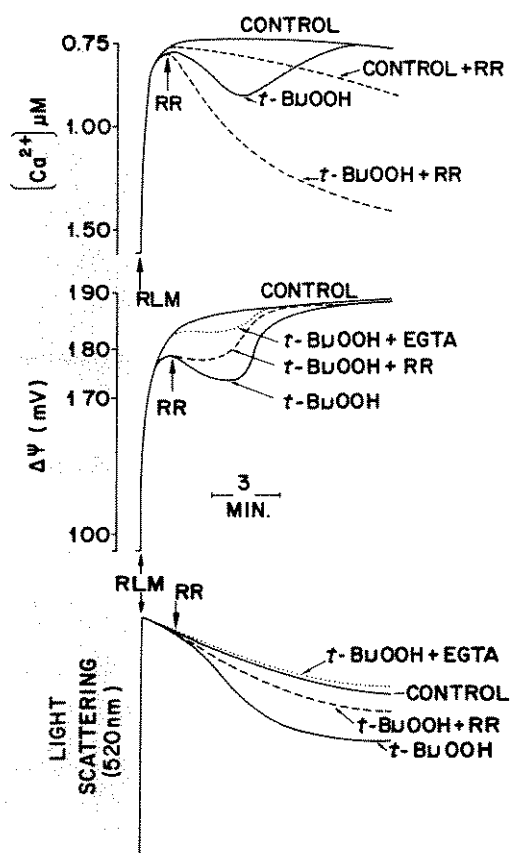


Fig. 4. Changes in $\Delta\psi$ and mitochondrial swelling during *t*-butylhydroperoxide induced Ca^{2+} release from liver mitochondria. Mitochondria (1.0 mg) were suspended in 1.0 ml of the basic medium in the presence or absence of $50 \mu\text{M}$ *t*-butylhydroperoxide. Ruthenium red (RR) ($0.7 \mu\text{M}$) was added where indicated (dashed lines). The dotted lines indicate an experiment carried out in the presence of 0.5 mM EGTA added prior to the addition of mitochondria. RLM, rat liver mitochondria.

ruthenium red. The addition of ruthenium red, which blocks Ca^{2+} cycling, was not followed by an immediate return of $\Delta\psi$ to the control values as it would be expected if the hydroperoxide-stimulated Ca^{2+} efflux was taking place through a $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ antiporter. This also indicates that the observed decrease in $\Delta\psi$ cannot be attributed exclusively to an increased rate of Ca^{2+} cycling. Rather, it may be related to a transient increase in membrane permeability which would explain the parallel mitochondrial swelling. Addition of EGTA instead of ruthenium red caused similar alterations in both $\Delta\psi$ and swelling (not shown). The

decrease in the extent of mitochondrial swelling upon the addition of ruthenium red is also in agreement with some previous reports [49,52,53] and corroborates the idea that mitochondrial swelling is increased by fast Ca^{2+} cycling [49,52, 53]. The dotted lines show the experiments where hydroperoxide was added to mitochondria suspended in a Ca^{2+} -free medium (EGTA present from the beginning). It can be observed that although the mitochondrial swelling was completely abolished in the absence of Ca^{2+} cycling there was still a small decrease in $\Delta\psi$. The nature of this decrease in $\Delta\psi$ is under study in this laboratory and appears to be related to the activity of the energy-linked transhydrogenase reaction using reducing equivalents from NADH to reduce NADP^{+} and hydroperoxide driven by the electrochemical proton gradient ($\Delta\mu\text{H}^{+}$) (Vercesi, A.E., unpublished data).

It can be concluded that the decrease in $\Delta\psi$ observed in the presence of hydroperoxide is probably due to at least three different energy-dissipating processes: a faster Ca^{2+} cycling, the transhydrogenase reaction transferring reducing equivalents from NADH to NADP^{+} and an increase in proton leak. The latter may explain the difference in $\Delta\psi$ observed between the conditions where EGTA was present from the beginning (dotted line) and where ruthenium red was added to prevent Ca^{2+} cycling (dashed line).

Correlation between the rate of O_2 consumption, NAD(P)H fluorescence and Ca^{2+} cycling induced by hydroperoxide

Fig. 5 shows a correlation between the time-course of the stimulation in O_2 consumption and the oxidation of NAD(P)H by hydroperoxide in Ca^{2+} -loaded mitochondria. If Ca^{2+} cycling was prevented by the addition of ruthenium red the hydroperoxide-induced increase in respiration was not completely abolished (dashed line) indicating that it was only partially caused by Ca^{2+} cycling. It can also be observed that even in a Ca^{2+} -free medium (EGTA present) hydroperoxide induced a small increase in the rate of respiration (dotted line). The different rates of O_2 consumption observed in this experiments (Fig. 5) reflect the different values of $\Delta\psi$ observed for the same experimental conditions in Fig. 4.

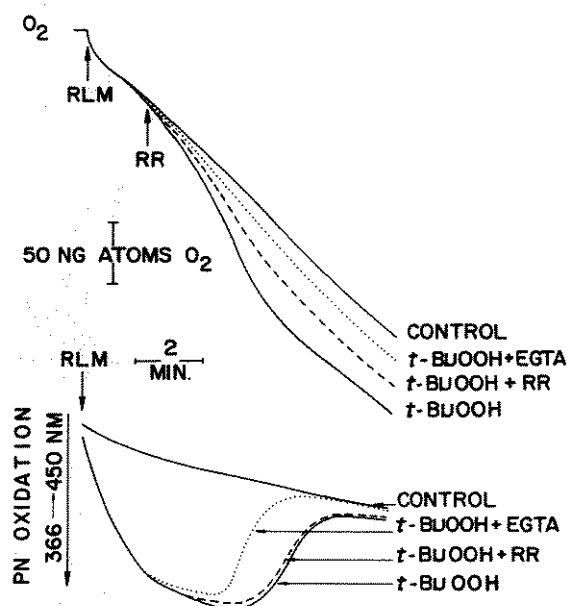


Fig. 5. Time-course of NAD(P)H oxidation and stimulation of O_2 consumption induced by *t*-butylhydroperoxide in liver mitochondria. Experimental conditions were exactly as in Fig. 4. RR, ruthenium red; RLM, rat liver mitochondria; PN, pyridine nucleotide.

The results of the fluorescence experiments showed that under these experimental conditions the re-reduction of pyridine nucleotides previously oxidized by hydroperoxide was reversible and occurred presumably at the expense of endogenous substrates. The earlier re-reduction observed in the presence of EGTA may reflect an inhibitory effect of Ca^{2+} on the transhydrogenase [54].

The results reported in the present paper indicate that under our experimental conditions the NAD(P)⁺-induced transient increase in extramitochondrial Ca^{2+} concentration was independent of irreversible mitochondrial uncoupling and occurred in the absence of massive loss of internal pyridine nucleotides [30,31]. It was also recently shown by Frei et al. [46] that net loss of mitochondrial pyridine nucleotides during hydroperoxide-induced Ca^{2+} release was observed only at relatively high Ca^{2+} loads. These observations do not argue against the hypothesis that ADP-ribosylation of a protein in the inner mitochondrial membrane triggers Ca^{2+} release from liver mitochondria since it was shown that these mitochondria have the ability to rapidly resynthesize the

hydrolysed nucleotides [46]. It should, however, be pointed out that this and a previous report from our laboratory [29] strongly indicate that in addition to the oxidation of NADH, NADPH must also be oxidized to stimulate Ca^{2+} release from mitochondria.

In conclusion, our results indicate that NAD(P)⁺-stimulated Ca^{2+} efflux can be observed in tightly coupled mitochondria suspended in the presence of physiological concentrations of ATP and Mg^{2+} , but the ruthenium red insensitive decrease in $\Delta\psi$ observed during stimulated Ca^{2+} release and the parallel mitochondrial swelling do not support the idea that NAD(P)⁺-induced Ca^{2+} release occurs through a $Ca^{2+}/2 H^+$ antiporter.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants of the Brazilian agencies FAPESP (Proc. 84/2483-4) and CNPq (Proc. 400239/84 BF).

References

- Nicholls, D.G. (1978) *Biochem. J.* 176, 463-474
- Becker, G.L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 591, 234-239
- Becker, G.L., Fiskum, G. and Lehninger, A.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9009-9012
- Pereira da Silva, L., Bernardes, C.F. and Vercesi, A.E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 80-86
- Nichita, C.V. and Williamson, J.R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 12978-12983
- Lehninger, A.L. (1970) *Biochem. J.* 119, 129-138
- Scarpa, A. and Azzone, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 328-335
- Selwin, M.J., Dawson, A.P. and Dunnet, S.J. (1970) *FEBS Lett.* 10, 1-5
- Rottenberg, H. and Scarpa, A. (1974) *Biochemistry* 13, 1635-1646
- Saris, N.E.L. and Åkerman, K.E.O. (1980) *Curr. Topics Bioenerg.* 10, 104-179
- Nicholls, D. and Åkerman, K.E.O. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 683, 57-88
- Åkerman, K.E.O. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 502, 359-366
- Nicholls, D.C. (1978) *Biochem. J.* 170, 511-522
- Fiskum, G. and Lehninger, A.L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6236-6239
- Gunter, T.E., Chace, J.H., Puskin, J.I. and Gunter, K.K. (1983) *Biochemistry* 22, 6341-6351
- Drahota, Z., Carafoli, E., Rossi, C.S., Gamble, P.L. and Lehninger, A.L. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2712-2720
- Moore, C.L. (1971) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 42, 298-305

- 18 Vasigton, F.D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. and Carafoli, E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 256, 43-54
- 19 Reed, K.C. and Bygrave, F.L. (1974) *Biochem. J.* 140, 143-155
- 20 Fiskum, G. and Lehninger, A.L. (1981) in *Calcium and Cell Function* (Cheung, W.Y., ed.), Vol. II, pp. 39-80, Academic Press, New York
- 21 Lehninger, A.L., Vercesi, A.E. and Bababunmi, E.A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1690-1694
- 22 Beatrice, M.C., Palmer, J.W. and Pfeiffer, D.R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8863-8671
- 23 Wolkowicz, P.E. and McMillin-Wood, J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10348-10353
- 24 Palmer, J.W. and Pfeiffer, D.R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6742-6750
- 25 Beatrice, M.C., Stiers, D.L. and Pfeiffer, D.R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7161-7171
- 26 Nicholls, D.G. and Brand, M.D. (1980) *Biochem. J.* 118, 113-118
- 27 Bardsley, M.E. and Brand, M.D. (1982) *Biochem. J.* 202, 197-201
- 28 Vercesi, A.E. and Lehninger, A.L. (1982) *Fed. Proc.* 41, 1434
- 29 Vercesi, A.E. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, in the press
- 30 Lötscher, H.R., Winterhalter, K.H., Carafoli, E. and Richter, C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4340-4344
- 31 Lötscher, H.R., Winterhalter, K.H., Carafoli, E. and Richter, C. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9325-9330
- 32 Bellomo, G., Jewell, S.A., Thor, H. and Orrenius, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6842-6846
- 33 Sies, H., Graf, P. and Estrela, J.M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3358-3362
- 34 Lötscher, H.R., Winterhalter, K.H., Carafoli, E. and Richter, C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4340-4344
- 35 Hofstetter, W., Mühlebach, T., Lötscher, H.R., Winterhalter, K.H. and Richter, C. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 361-367
- 36 Richter, C., Winterhalter, K.H., Baumhuter, S., Lötscher, H.R. and Moser, B. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3188-3192
- 37 Moser, B., Winterhalter, K.H. and Richter, C. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 358-364
- 38 Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A. and Orrenius, S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12419-12425
- 39 Åkerman, K.E.O. and Nicholls, D.G. (1983) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 95, 149-201
- 40 Bernardes, C.F., Pereira da Silva, L. and Vercesi, A.E. (1985) 13th International Congress of Biochemistry, Amsterdam, The Netherlands, BBA Abstracts, p. 336, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
- 41 Kies, M.W. and Murphy, J.B. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 45, 382-384
- 42 Burgess, G.M., McKinney, J.S., Fabiato, A., Leshie, B.A. and Putney, J.W., Jr. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 15336-15345
- 43 Beatrice, M.C., Stiers, D.L. and Pfeiffer, D.R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1279-1287
- 44 Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, J. (1979) *J. Membrane Biol.* 49, 105-121
- 45 Muratsugu, M., Kamo, N., Kurihara, K. and Kabatake, J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 464, 613-619
- 46 Frei, B., Winterhalter, K.H. and Richter, C. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 633-639
- 47 Bernardi, P., Paradisi, V., Pozzan, T. and Azzone, G.F. (1984) *Biochemistry* 23, 1645-1651
- 48 Zoccarato, F. and Nicholls, D.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 333-338
- 49 Coelho, J.L.C. and Vercesi, A.E. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 141-147
- 50 Zoccarato, F., Rugolo, M., Silliprandi, D. and Siliprandi, N. (1985) *Eur. J. Biochem.* 114, 195-199
- 51 Baumhuter, S. and Richter, C. (1982) *FEBS Lett.* 148, 271-275
- 52 Moore, G.A., Jewell, S.A., Bellomo, G. and Orrenius, S. (1983) *FEBS Lett.* 153, 289-292
- 53 Bellomo, G., Martino, A., Richelmi, P., Moore, G.A., Jewell, S.A. and Orrenius, S. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140, 1-6
- 54 Rydström, J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 463, 155-184