



LUCIA SIMAS PARENTONI

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida
pela candidata Lucia Simas Parentoni e aprovada pela
Comissão Julgadora

J. Vercesi
20/11/91

**"EFEITO DE Ca^{++} E OXIDANTES SOBRE O SISTEMA ENERGETICO
MITOCONDRIAL"**

Orientador: Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de Bioquímica.

2985116C
P216e

15254/BC

Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP - Brasil
1991

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*Ao Donato,
por seu amor e
seus ensinamentos,
por meu amor e
meu crescimento.*

AGRADECIMENTOS

A Adhemar, Laura, Marcia, Marcos e Leila, pelo incentivo e pelo apoio recebidos ao longo de minha vida.

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, pelo aceite em seu grupo de pesquisa, pela orientação deste trabalho e pelo engrandecimento de meus conhecimentos.

A Prof. Dra. Ione Salgado Martins, por ter orientado meus primeiros passos na Bioenergética.

Aos Profs. Drs. Antônio Ari Gonçalves, Nilce Corrêa Keirelles e Satié Matsushika Ogo, pelas importantes críticas e sugestões feitas para o aprimoramento deste trabalho, por ocasião de sua análise prévia.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto M. Guimarães, pela análise estatística dos resultados.

Ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, pelo estímulo e discussões.

A todos os professores da UNICAMP com quem tive contato, pelo auxílio no aprimoramento de meus conhecimentos.

A Marcia, Marco Aurélio e Valderez, pelos ensinamentos teórico-práticos imprescindíveis para a execução deste trabalho.

A Regina Célia Rosseto, pela fundamental colaboração técnica.

A Andréia, Marina e Miriam, pelo importante suporte administrativo.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, que por diversas maneiras colaboraram para a realização deste trabalho.

A Ana Lia e Sônia, pela vivência de verdadeiras amizades, imprescindíveis para superar esta difícil etapa. A Helena e Renata, que reforçaram esta gratificante experiência.

A Maria de Lourdes, pela ajuda na árdua tarefa de me conhecer.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
DCCD	diciclohexilcarbodiimida
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	ácido etilenoglicol-bis(B-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetracético
FCCF	p-trifluoro-metoxicarbonil ciano fenilhidrazina
GSH	glutathiona, forma reduzida
GSSH	glutathiona, forma oxidada
Hepes	ácido 2-hidroxi-etil piperazina-2-etanosulfônico
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
ptn	proteína
SDS	dodecilsulfato de sódio
t-BH	t-butilhidroperóxido
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano

INDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	15
1- Isolamento de mitocôndrias	15
1.1- Mitocôndrias de fígado de rato	15
1.2- Mitocôndrias de coração de boi	16
2- Preparo de partículas submitocondriais de coração de boi	17
3- Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana de mitocôndrias de fígado de rato	18
4- Eletroforese de proteínas de membrana de mitocôndria de fígado de rato	20
4.1- Preparo da amostras	20
4.2- Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	21
5- Determinação da atividade ATPásica de partículas submitocondriais	22
6- Cálculo das concentrações das espécies (metais e seus complexos) nos meios de reação	23
7- Avaliação do efeito de Ca^{++} e oxidantes na atividade ATPásica de partículas submitocondriais	23
RESULTADOS	24
Efeito de Ca^{++} e oxidantes sobre o potencial elétrico de mitocôndrias de fígado de rato	24
Efeito de EGTA e DTT sobre o potencial elétrico de mitocôndrias de fígado de rato tratadas com Ca^{++} e oxidantes	24
Padrão eletroforético de proteínas de membrana de mitocôndrias de fígado de rato tratadas com Ca^{++} e oxidantes	29
Atividade ATPásica de partículas submitocondriais de coração de boi	29

Efeito de Ca^{++} e oxidantes na atividade ATPásica de partículas submitocondriais	36
DISCUSSÃO	37
RESUMO	49
SUMMARY	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

INTRODUÇÃO

O cálcio é um dos elementos químicos mais abundantes nos organismos superiores. De seu conteúdo total, apenas 1% é encontrado nos líquidos intra e extracelulares, enquanto que a maioria dos 99% restantes está no esqueleto como fosfatos, carbonatos e hidróxidos, assumindo função estrutural e de reservatório para a manutenção das concentrações dos fluidos corpóreos, na forma de hidroxiapatita (CARAFOLI, 1987; RICHTER & FREI, 1988).

A concentração de cálcio no plasma humano é mantida na faixa de 2,2 a 2,6 mmoles/L. Deste total, 41% apresentam-se ligados às proteínas plasmáticas e não se difundem pela membrana capilar. Nove por cento encontram-se em associação com outras substâncias e são não ionizáveis. Os restantes 50% estão sob a forma ionizada e são passíveis de se difundirem através das membranas capilares. Assim sendo, o líquido intersticial apresenta concentração de íons Ca^{++} da ordem de 1,2mM. Esta forma ionizada é a fisiologicamente ativa (CARAFOLI, 1987; RICHTER & FREI, 1988).

A concentração intracelular de cálcio varia de 20uM nos eritrócitos a 4mM nas células miocárdicas, sendo que apenas 0,1% ou menos está sob a forma ionizada (CARAFOLI, 1987; RICHTER & FREI, 1988).

A superfície celular possui receptores que detectam informações de hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, que são traduzidas e amplificadas em segundos mensageiros que controlam muitos processos celulares. A grande diferença de concentração entre o Ca^{++} extracelular e o citoplasmático lhe possibilita desempenhar função de mensageiro intracelular para um grande número de atividades. Muitos hormônios e outros estímulos extracelulares são conhecidos por agirem em células de mamíferos, causando aumento da concentração citoplasmática de Ca^{++} e produção de efeitos como excitação-contracção, transmissão do impulso nervoso, estímulo-secreção, regulação de vias metabólicas (CARAFOLI, 1987; RICHTER & FREI, 1988; GUNTER & PFEIFFER, 1990).

A regulação do tonus vascular, de fundamental importância nas hemodinâmicas sistêmica e pulmonar e na fisiopatologia do espasmo arterial coronariano, é dependente da regulação da contracção do músculo liso vascular. O aparato contrátil do músculo liso, assim como do músculo cardíaco, é controlado pela regulação da concentração intracelular de Ca^{++} . Assim, o neurotransmissor acetilcolina causa elevação da concentração intracelular de Ca^{++} , possibilitando uma mudança na orientação das proteínas contráteis e resultando em encurtamento da célula - contracção (MOVSESIAN, 1982).

Nas sinapses nervosas, o influxo de Ca^{++} é fator crítico para o acoplamento do potencial de acção à secreção de neurotransmissores. O Ca^{++} não é simplesmente um carreador de

cargas, como o Na^+ e o K^+ , na despolarização da membrana da célula nervosa; ele serve como mensageiro intracelular. Em concentrações extracelulares baixas de Ca^{++} , a transmissão sináptica fica reduzida e até mesmo bloqueada (KANDEL, 1985).

Em ácinos pancreáticos, receptores de alguns neuropeptídeos, como substância P, colecistoquinina e bombesina, utilizam o Ca^{++} como segundo mensageiro para a secreção de amilase pelas células exócrinas do pâncreas (JENSEN & GARDNER, 1986).

O Ca^{++} é co-fator necessário para a atividade de enzimas 5-lipoxigenases em uma variedade de células de mamíferos, assim como para muitas 12 e 15-lipoxigenases, atuando diretamente no metabolismo do ácido aracdônico e, conseqüentemente, na regulação de várias funções celulares. Alguns metabólitos do ácido aracdônico estão diretamente envolvidos em adesão leucocitária, degranulação e quimiotaxia de neutrófilos, reação alérgica, bronco e vasoconstricção e alteração de permeabilidade vascular (SAMUELSSON, 1983; VONAKIS & VANDERHOCK, 1989).

No fígado, o Ca^{++} modifica a atividade de várias enzimas, estimulando a glicogenólise (BLACKMORE et alii, 1989), assim como serve de mediador da fosforilação de enzimas de diversas etapas da gliconeogênese (HERS & HUE, 1983; PILKIS et alii, 1986).

O Ca^{++} intracelular é encontrado principalmente no citosol, no retículo endoplasmático, no núcleo e na mitocôndria, sendo a membrana plasmática e a membrana destas organelas responsáveis pela modulação de sua concentração. Essas membranas transportam o Ca^{++} de maneira independente, sendo mantidos diferentes gradientes de concentração entre o citoplasma e os espaços intravesiculares (CARAFOLI, 1987; NICOTERA et alii, 1990).

A membrana plasmática é a responsável pela manutenção do gradiente de concentração entre os compartimentos intra e extracelulares. O Ca^{++} entra na célula através de canais específicos que são abertos por variações no potencial elétrico da membrana e são sensíveis a neurotransmissores adrenérgicos. A extrusão do Ca^{++} citosólico contra o seu gradiente de concentração é feita por dois sistemas de transporte: o trocador Na^{+}/Ca^{++} , que é mais ativo em células de coração e cérebro e troca 3 Na^{+} por um Ca^{++} , e a enzima $Ca^{++}ATPase$, que extrui o Ca^{++} da célula, hidrolisando um mol de ATP para cada mol de Ca^{++} transportado (CARAFOLI, 1987; RICHTER & FREI, 1988).

O retículo endoplasmático é a organela que armazena maior concentração de Ca^{++} . Sua captação é feita por uma $Ca^{++}ATPase$, controlada por hormônios, que transporta dois íons Ca^{++} para cada ATP hidrolisado. O mecanismo de liberação de Ca^{++} pelo retículo endoplasmático envolve a produção do segundo mensageiro inositol 1,4,5-trifosfato, mas não está ainda completamente elucidado (BERRIDGE & IRVINE, 1984; CARAFOLI,

1987; RICHTER & FREI, 1988; JOSEPH & WILLIAMSON, 1989).

Recente trabalho evidenciou que o núcleo também possui capacidade de captar e tamponar Ca^{++} , podendo estar envolvido na regulação da concentração citosólica deste íon (NICOTERA et alii, 1990). Já foram identificados, apesar de parcialmente, mecanismos de captação e liberação de Ca^{++} específicos dessa organela. A captação envolve a ação de uma bomba calmodulina-dependente e gera um aumento líquido da concentração de Ca^{++} livre na matriz nuclear (NICOTERA et alii, 1989). Já a liberação é mediada pelo inositol 1,4,5-trifosfato, o que possibilita a participação de hormônios e outros agentes na regulação da concentração intranuclear de Ca^{++} (NICOTERA et alii, 1990).

O transporte de Ca^{++} através da membrana mitocondrial interna envolve diversos mecanismos. A sua captação é um processo eletrogênico, dirigido pelo componente elétrico (potencial de membrana) do gradiente eletroquímico de próton da mitocôndria. Algumas vezes a captação é descrita como um processo ativo secundário por estar acoplada à energia metabólica resultante da hidrólise do ATP ou da oxidação de substratos pela cadeia respiratória, com extrusão de prótons e entrada de Ca^{++} por um "uniporter". Já o efluxo de Ca^{++} parece ser mediado por, pelo menos, 2 mecanismos: um Na^{+} -dependente, que troca Ca^{++}/nNa^{+} , e outro Na^{+} -independente, que usa energia da oxidação de substratos, mas não da hidrólise do ATP (RICHTER & FREI, 1988; GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Em mitocôndrias, parece que o Ca^{++} desempenha importante papel na homeostase do metabolismo energético celular por permitir aumento na formação do NADH para a fosforilação oxidativa, sem que as razões NADH/NAD⁺ e ATP/ADP sejam diminuídas quando é necessário mantê-las ou mesmo aumentá-las. Isto é possível através da ativação das desidrogenases oxidativas piruvato, NAD⁺-isocitrato e 2-oxoglutarato, que suprem NADH para a cadeia respiratória e conseqüente produção de ATP (McCORMACK & DENTON, 1989).

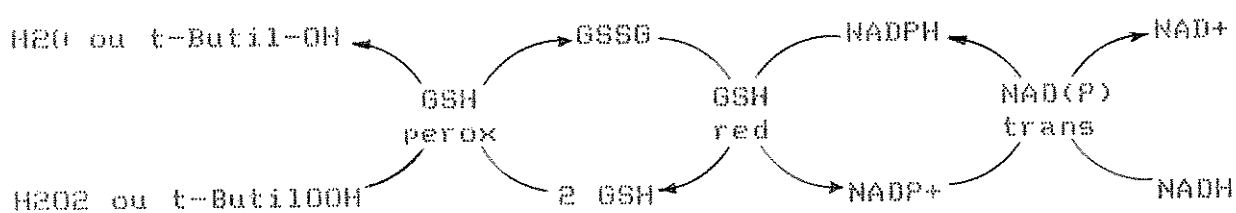
Em adição a esta regulação do metabolismo energético da mitocôndria em condições fisiológicas, o Ca^{++} possui um efeito altamente deletério sobre esta organela em algumas situações patológicas, como isquemia e estresse oxidativo (MALIS & BONVENTRE, 1988), envolvendo um processo chamado "transição de permeabilidade" (HUNTER et alii, 1976). O Ca^{++} , ao se ligar em unidades da membrana interna mitocondrial, induz um reversível aumento da permeabilidade, com conseqüente alteração da conformação mitocondrial da forma agregada para a ortodoxa. Este processo está associado a aumento de permeabilidade não apenas ao Ca^{++} , mas também a outros componentes da matriz mitocondrial, tais como nucleotídeos de piridina e adenina, Mg^{++} e proteínas (GUNTER & PFEIFFER, 1990). O acúmulo de Ca^{++} na matriz mitocondrial é requisito fundamental para a ocorrência do processo, não podendo ser substituído por outros íons divalentes (HUNTER et alii, 1976; HUNTER & HAWORTH, 1979).

Durante um estudo de estequiometria de ejeção de H^+ e

captação de Ca^{++} , acopladas ao transporte de elétrons, em mitocôndrias de coração de rato, VERCESI et alii (1978) observaram que o Ca^{++} , captado às custas da energia de respiração, não era completamente retido quando a mitocôndria oxidava substratos ligados ao NAD^+ . O mesmo não ocorria quando o substrato utilizado era succinato, na presença de rotenona, que mantém os nucleotídeos de piridina em estado predominantemente reduzido. Estudos adicionais (LEHNINGER et alii, 1978) demonstraram a importância do estado redox dos nucleotídeos de piridina da matriz mitocondrial no efluxo de Ca^{++} : a oxidação desses nucleotídeos pelo oxaloacetato causou liberação de Ca^{++} , que foi recaptado quando um redutor dos nucleotídeos foi adicionado. Estes resultados foram confirmados por outros autores, alguns utilizando hidroperóxidos orgânicos como agente oxidante dos nucleotídeos de piridina (HUNTER & HAWORTH, 1979; LOTSCHER et alii, 1979, 1980; BELLOMO et alii, 1982a, 1982b; MOORE et alii, 1983; BELLOMO et alii, 1984; BERNARDES et alii, 1986; VERCESI et alii, 1988).

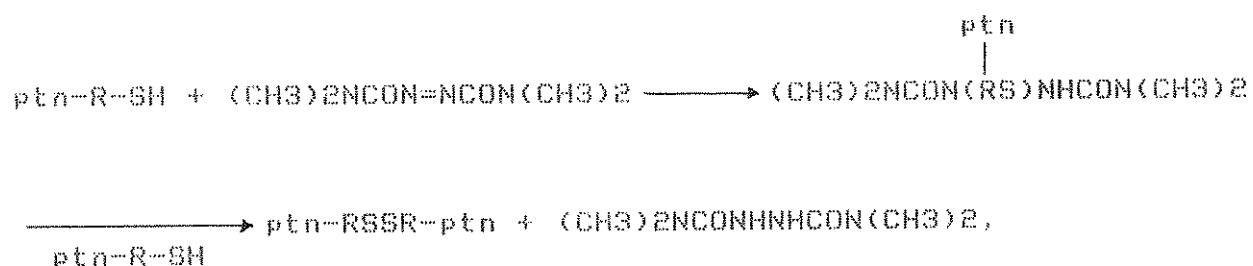
Monitorando o grau de redução do NAD^+ mitocondrial, HUNTER & HAWORTH (1979) demonstraram que o $NADH$ está envolvido num mecanismo protetor contra o processo de transição da permeabilidade. Entretanto, para qualquer grau de proteção proporcionado, existe um índice máximo a partir do qual a transição ocorrerá. Nenhum efeito na taxa de transição foi obtido pela adição externa de $NADH$, indicando que o sítio de proteção é interno.

Espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos, são reagentes fisiológicos no metabolismo celular e são produzidos na mitocôndria (CHANCE et OSHINO, 1971). O peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos orgânicos são reduzidos na mitocôndria às custas da oxidação dos nucleotídeos de piridina, como mostra o seguinte esquema (LOTSCHER et alii, 1979; BELLOMO et alii, 1984):



As observações de que hidroperóxidos produzem liberação de Ca^{++} por um mecanismo que requer a atividade da glutatona peroxidase intramitocondrial (LOTSCHER et alii, 1979) e que este mecanismo envolve alteração de permeabilidade da membrana interna mitocondrial (BEATRICE et alii, 1982) levaram à investigação da importância do estado redox da glutatona na regulação da permeabilidade da membrana interna e liberação de Ca^{++} . BEATRICE et alii (1984) mostraram que a razão GSSG/GSH, e não a $NAD(P)^+/NAD(P)H$, é o fator de correlação entre esses eventos. A mitocôndria apresentava-se impermeável ao Ca^{++} quando o conteúdo de GSH era alto, mas tornava-se permeável quando a GSH era convertida a GSSG. O mesmo não ocorria quando $NAD(P)H$ era convertido a $NAD(P)^+$.

A diamida, agente oxidante de grupamentos tiol, foi sintetizada com a finalidade de investigar o papel da GSH nos sistemas biológicos. Sendo um agente que prontamente penetra na célula, o efeito da perda temporária de GSH no comprometimento das funções metabólicas poderia ser estudado. Sua ação segue a seguinte reação geral:



onde R é o resíduo de cisteína de um peptídeo. Sendo um agente oxidante estável à hidrólise, não produz radicais livres (KOSOWER & KOSOWER, 1969).

A ação da diamida como oxidante de grupamentos tiol de proteínas de membrana celular foi bem caracterizada por KURANTSIN-MILLS & LESSIN (1981), que mostraram a formação de agregados proteicos de muito alto peso molecular exclusivamente na face protoplasmática de membrana de eritrócitos. Esses agregados foram revertidos pela ação de ditiotreitól, agente redutor de grupos tiol. Utilizando esses compostos, diversos autores demonstraram a participação do estado redox de grupamentos tiol da membrana mitocondrial no processo de alteração da permeabilidade de membrana ao Ca^{++} (SILIPRANDI et alii, 1975; RUGOLO et alii, 1981; BELLOMO et alii, 1982b; MOORE et alii, 1983).

Em 1984, VERCESI sugeriu que as alterações na configuração mitocondrial e a liberação de Ca^{++} induzidas por $NAD(P)^+$ e diamida tinham um denominador comum, a oxidação de grupamentos -SH críticos da membrana. O grau de permeabilização da membrana mitocondrial obtido foi semelhante com oxaloacetato, oxidante de $NAD(P)H$, e diamida. Esta hipótese foi confirmada por FAGIAN et alii em 1990. Os autores demonstraram a formação de agregados, de alto peso molecular, de proteínas de membrana, quando mitoplastos e/ou partículas submitocondriais foram incubadas em presença de Ca^{++} e diamida ou t-butilhidroperóxido. Paralelamente à formação dos agregados, ocorreram diminuição da intensidade e da duração do potencial elétrico de membrana, liberação de Ca^{++} e oxidação dos nucleotídeos de piridina. Estes efeitos foram revertidos por ditioneitol e o padrão eletroforético das proteínas de membrana restabelecido quando as amostras foram fervidas com B-mercaptoetanol antes de serem aplicadas ao gel de eletroforese. Estes resultados confirmam o envolvimento de ligações cruzadas de grupamentos SH de proteínas de membrana no processo de permeabilização da membrana mitocondrial.

Diversos autores evidenciaram que o EGTA, quelante de Ca^{++} , reverte a alteração de permeabilidade induzida por Ca^{++} , isolado ou em associação com t-butilhidroperóxido, repolarizando a membrana interna mitocondrial, recuperando o potencial elétrico de membrana e diminuindo o inchamento mitocondrial (HUNTER et alii, 1976; LOTSCHER et alii, 1980; BAUMHUTER & RICHTER, 1982; AL-NASSER & CROMPTON, 1986; BERNARDES et alii,

1984; CROMPTON & COSTI, 1988). Estes dados, acrescidos da recaptação do Ca^{++} liberado pela alteração de permeabilidade, foram também obtidos quando da utilização do ditiotreitól (HARRIS et alii, 1979; RUGOLO et alii, 1981; MOORE et alii, 1983; BEATRICE et alii, 1984; MACEDO et alii, 1988; FAGIAN et alii, 1990).

O estudo da reversibilidade do processo de permeabilização da membrana interna mitocondrial por Ca^{++} e/ou oxidantes é de extrema importância uma vez que este fenômeno pode ser relevante na viabilidade mitocondrial e celular. Durante os últimos 20 anos, tem crescido o conhecimento de que o aumento da concentração intracelular de Ca^{++} tem importante papel no dano celular (FARBER, 1981). Este aumento tem sido reconhecido como importante evento no mecanismo de injúria celular causada por determinadas alterações em diferentes tecidos: eritrócitos, em anemia falciforme e ativação de complemento; leucócitos, em presença de toxinas bacterianas; musculatura esquelética, em distrofias musculares e trauma. Foi também evidenciado em outros tecidos quando foram induzidos, experimentalmente em animais, isquemia, intoxicação por diferentes agentes químicos e cancer (CAMPBELL, 1983; MALIS & BONVENTRE, 1988).

Níveis elevados de Ca^{++} citosólico levam a um aumento na captação mitocondrial deste íon, que resulta em alteração da permeabilidade mitocondrial. Assim, objetivamos investigar o que ocorre com os agregados proteicos quando utilizamos EGTA e

DIT, em diferentes tempos, para reverter a alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial. Isto permite avaliar a participação destes agregados no processo de permeabilização da membrana em condições de estresse oxidativo com íons cálcio presentes.

Um outro aspecto extremamente importante, que envolve as funções mitocondriais ligadas à energia, é a ação da H^+ -ATP-sintetase. Esta enzima utiliza o gradiente eletroquímico de prótons, gerado pelo transporte de elétrons nas membranas transdutoras de energia, para liberar o ATP sintetizado espontaneamente em seus sítios catalíticos (BOYER, 1979; DE MEIS et alii, 1980; GÓMEZ-PUYDU et alii, 1986; KANDPAL et alii, 1987). É composta de duas partes funcionalmente distintas: a porção F_0 e a porção F_1 .

A porção F_0 é hidrofóbica, integral à membrana e responsável pela translocação de prótons em direção ao sítio catalítico situado na porção F_1 . Sua composição está bem caracterizada somente em *Escherichia coli*, onde é formada por três subunidades diferentes, denominadas a, b e c, com a estequiometria de 1 unidade a para cada 2 b e para 9 a 12 c (HOPP & SEBALD, 1984). Em mitocôndrias animais, subunidades adicionais são encontradas (F_6 , Fator B, A6L e OSCP) e possivelmente estão envolvidas na formação da haste de acoplamento juntamente com as subunidades S e e da porção F_1 (SENIOR, 1988).

A porção F₁ encontra-se voltada para a matriz mitocondrial e é composta de cinco subunidades diferentes, sendo três cópias das subunidades α e β e uma cópia de γ , δ e ϵ (HATEFI, 1985; SENIOR, 1988).

Como dito anteriormente, os grupamentos sulfidrílicos desempenham importante papel na manutenção da integridade da membrana interna mitocondrial. Assim sendo, modificações nos grupamentos tiol desta membrana poderiam levar ao mau funcionamento de proteínas integrais à membrana, como é o caso da H⁺-ATP-sintetase. Além disso, grupamentos SH essenciais de componentes estruturais e funcionais da enzima poderiam ser oxidados, alterando as suas funções.

Algumas investigações têm sido feitas com o intuito de identificar a importância de grupamentos tiol de determinadas subunidades da porção F₀ da H⁺-ATP-sintetase na manutenção de estrutura e função da enzima (HUANG et alii, 1985; LIPPE et alii, 1988; YAGI & HATEFI, 1984; ZANOTTI et alii, 1985). Os resultados são controversos, mesmo em relação apenas aos efeitos que os oxidantes causam na atividade da enzima como um todo. YAGI & HATEFI (1984) identificaram um estímulo na atividade ATPásica quando partículas submitocondriais de coração de boi foram tratadas com diamida, enquanto que LIPPE et alii (1988) não observaram qualquer alteração na atividade hidrolítica do Complexo V. Este complexo é o segmento do sistema mitocondrial de fosforilação oxidativa que está associado com síntese e hidrólise de ATP (STIGGALL et alii, 1979). Seu processo de

purificação forma uma preparação homogênea e não membranosa, contendo menos que 1 a 2% de estruturas vesiculadas (STIGGALL et alii, 1978), diferentemente das partículas submitocondriais.

Um outro objetivo do presente projeto foi estudar o efeito do estresse oxidativo, em presença e ausência de Ca^{++} , sobre a atividade da H^{+} -ATP-sintetase de partículas submitocondriais de músculo de coração de boi.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Os sais cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e cloreto de potássio foram adquiridos da Merck. Persulfato de amônio, metanol, ácido acético e formaldeído foram obtidos da Ecibra. Todos os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

MÉTODOS

1- Isolamento de mitocôndrias

1.1- Mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos Wistar, fêmeas, de aproximadamente 250g, mantidas em jejum por 12h e sacrificadas por concussão cerebral (SCHNEIDER & HOGEBOOM, 1950).

O fígado, retirado imediatamente após a morte do animal, foi lavado em solução de sacarose 250mM tamponada com Hepes 2,0mM pH 7,2, contendo EGTA 0,5mM, picado finamente com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. Este

material passou por uma primeira centrifugação (centrífuga refrigerada Hitachi SCR 20B) a 770xg por 5 min. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o sedimento foi homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados a 12.320xg por 10 min. A fase lipídica superior foi retirada com pipeta Pasteur, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em solução de sacarose 250mM tamponada com Hepes 1,0mM pH 7,2, contendo EGTA 0,3mM, e centrifugado a 7.884xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em solução de sacarose 250mM tamponada com Hepes 1,0mM pH 7,2. Todo o processo foi realizado a uma temperatura entre 0 e 4°C.

As suspensões mitocondriais obtidas continham concentração proteica na faixa de 80 a 100mg/mL, dosada pelo método do biureto modificado pela adição de colato 1% (GORNAL et alii, 1949).

1.2- Mitocôndrias de coração de boi

Mitocôndrias de coração de boi foram isoladas, segundo LOW & VALLIN (1963), para se poder preparar partículas submitocondriais. Apesar dos experimentos iniciais terem sido feitos com mitocôndrias de fígado de rato, as partículas submitocondriais de coração de boi apresentaram maior reprodutibilidade de resultados do que as partículas de fígado de rato. Já se conhece da literatura que as preparações de

partículas submitocondriais de coração de boi são mais estáveis do que as de fígado de rato (FAGIAN et alii, 1990).

Um coração de boi, de aproximadamente 1Kg após remoção de tecido adiposo, endocárdio, pericárdio, vasos sanguíneos e nervos, foi triturado em moedor de carne e colocado em 4 litros de meio contendo Tris-HCl 20mM pH7,4, sacarose 250mM e EDTA 5mM (meio A). Esta suspensão foi homogeneizada em liquidificador Maring por 90 seg, o pH ajustado para 7,4 com Tris e, então, centrifugada a 750xg por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em 4 camadas de gase e centrifugado a 12.000xg por 10 min. A fase lipídica aderida ao tubo de centrifugação foi removida com gase e o sobrenadante descartado. O sedimento foi suspenso em 500ml de meio contendo Tris-HCl 20mM pH7,4 e sacarose 250mM (meio B). O homogeneizado foi centrifugado a 750xg por 10 min. O sedimento foi ressuspenso em quantidade mínima de meio B. Todo o procedimento foi realizado a uma temperatura entre 0 e 4°C.

As suspensões mitocondriais continham concentração proteica de cerca de 50mg proteína/mL, determinada pelo método do biureto modificado (GORNAL et alii, 1949).

2- Preparo de partículas submitocondriais de coração de boi

Partículas Mg-ATP, ricas em proteína inibidora, foram preparadas segundo LEE & ERNSTER (1967). Em meio contendo ATP 6mM, MgCl₂ 6mM e sacarose 250mM, foram suspensas 15mg/mL de

mitocôndrias de coração de boi e o pH ajustado para 6,9. Aliquotas de 10 ou 25ml foram sonicadas 4 vezes por 20 seg, com intervalos de 1 minuto para resfriamento, em sonicador Lab Line Ultratip. A suspensão sonicada foi centrifugada (ultra-centrífuga Beckman L5-65) a 27.700xg por 15 min para sedimentação de mitocôndrias não rompidas. O sobrenadante foi centrifugado a 150.000xg por 45 min e o sedimento obtido foi suspenso em meio contendo sacarose 250mM e centrifugado a 150.000xg por 45 min, por 2 vezes, para remoção do Mg-ATP. O sedimento final foi ressuspenso em quantidade mínima de sacarose 250mM.

A concentração proteica, de cerca de 30mg/mL, foi determinada pelo método do biureto modificado (GORNAL et alii, 1949).

3- Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana de mitocôndrias de fígado de rato

O potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP⁺) entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, com eletrodo específico construído no laboratório de Bioenergética, Departamento de Bioquímica, IB-UNICAMP, de acordo com KAMO et alii (1979). Neste eletrodo utiliza-se uma membrana de cloreto de polivinila (PCV) contendo tetrafenilborato (TPB⁻) como trocador de ions. Esta membrana é preparada adicionando-se 3ml de tetrafenilborato de sódio 10mM (dissolvidos em

tetrahidrofurano) a 10ml de tetrahidrofurano contendo 0,5g de cloreto de polivinila e 1,5ml de dioctilftalato. A solução final é colocada em placa de Petri de 60cm de área e o solvente evaporado lentamente à temperatura ambiente. A membrana assim obtida é transparente e possui de 0,15 a 0,20cm de espessura. Um fragmento desta membrana é colado, com o uso de tetrahidrofurano, à extremidade de um tubo de PVC (3,5cm de comprimento/0,5cm de diâmetro) que, por sua vez, é preenchido com TPP+ 10mM (ETPP+_{in}). O contato entre esta solução de TPP+ e o eletrodo Ag/AgCl é feito através de uma ponte de agar (1,5% dissolvido em KCl saturado).

As concentrações de TPP+ no meio de reação foram monitoradas continuamente e os valores de $\Delta\psi$ calculados através da equação

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

onde v representa o volume mitocondrial por mg de proteína, considerado 1,4 μ l (KAMO et alii, 1979); V o volume do meio de incubação e ΔE o potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de TPP+ (ETPP+_{in}/ETPP+_{ex}) através da membrana, sendo que ETPP+_{ex} refere-se à concentração de TPP+ no meio de reação. Esta equação foi derivada assumindo-se que a distribuição de TPP+ entre as mitocôndrias e o meio segue a equação de Nernst (MURATSUGU et alii, 1977). Entretanto, uma quantidade significativa de TPP+ se liga às membranas mitocondriais (JENSEN et alii, 1986) e os valores de potencial

elétrico obtidos foram corrigidos utilizando-se a equação

$$\Delta\psi = \frac{\Delta\psi_{\text{eletrodo}} - 66,16\text{mV}}{0,92}$$

Os sinais do eletrodo (ΔE) foram quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de TPP+ ao meio de reação básico, que continha Hepes 5mM pH 7,4, sacarose 125mM, KCl 65mM, succinato 2mM e rotenona 5 μ M. Os experimentos foram iniciados pela adição de 1mg proteína mitocondrial/ml meio de reação e foram realizados em câmara de vidro termostaticada (30°C), com agitação magnética, e eletrodo acoplado a um registrador potenciométrico Varian.

4- Eletroforese de proteínas de membrana de mitocôndrias de fígado de rato

Eletroforese de proteínas de membrana mitocondrial foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS segundo LAEMMLI (1970), usando sistema descontínuo dissociante de placa vertical (15cm x 12cm x 0,15cm).

4.1- Preparo das amostras

Amostras de suspensões mitocondriais com 500 μ g de proteínas, submetidas aos mesmos tratamentos utilizados nas determinações dos potenciais elétricos de membrana, foram colhidas e submetidas a inchamento com água deionizada e

posterior congelamento-descongelamento (3 vezes por 1 min cada) em nitrogênio líquido para rompimento da membrana e liberação das proteínas da matriz. Após centrifugação por 2 min a 10.000xg em centrífuga Eppendorf Incibrás Spin I, o sedimento obtido foi lavado com água deionizada e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após desprezar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspense em 100ul de solução contendo SDS 5%, Tris-HCl 250mM pH 7,4, EDTA 10mM e sacarose 1,25M (LIU et alii, 1977). As amostras foram aquecidas a 100°C por 3 min e suas concentrações proteicas finais dosadas pelo método descrito por LOWRY et alii (1951). Foram aplicados 5ug de proteínas ao gel de eletroforese, com azul de bromofenol sendo usado como indicador de corrida.

4.2- Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

O gel de resolução continha acrilamida 12%, Tris-HCl 0,375M pH 8,8 e SDS 0,1%, e foi preparado a partir de uma solução estoque de 30% de acrilamida e 0,8% de N-N'-bis-metilenoacrilamida. A polimerização química foi feita pela adição de persulfato de amônio 0,075% e tetrametiletlenodiamina 0,06%, ambas concentrações finais.

O gel de empacotamento, com 3,75% de acrilamida e preparado a partir da mesma solução estoque, tinha Tris-HCl 0,125M pH 6,8 e SDS 0,1%. A polimerização química foi feita de maneira semelhante à do gel de resolução.

A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente e com voltagem fixada em 100V, até que o azul de bromofenol atingisse a base do gel (aproximadamente 4 h).

O padrão de peso molecular utilizado foi o LMW Calibration Kit (14,400 - 94,000) da Pharmacia LKB Biotechnology.

As proteínas foram fixadas no gel com solução de metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,02%, por 12h a 4°C. Utilizou-se o método descrito por BLUM et alii (1987) para coloração de gel de poliacrilamida por impregnação pela prata.

5- Determinação da atividade ATPásica de partículas submitocondriais

A atividade ATPásica de partículas submitocondriais de coração de boi foi medida através da dosagem de Pi liberado do ATP pelo método de Fiske-SubbaRow modificado por GRINDEY & NICHOL (1970).

O meio de reação, num volume final de 0,5ml em pH8,0 e 30°C, continha Tris-HCl 65mM, FCCP 1µM, ATP 1mM, partículas submitocondriais na faixa de 13 a 15µg.ml⁻¹ e concentrações diferentes de MgCl₂ e CaCl₂. As reações foram iniciadas pela adição de MgCl₂ após 5 min de pré-incubação das partículas no meio de reação e interrompidas a diferentes tempos ou a 5 min

pela adição de molibdato de amônio e banho de gelo.

Os resultados foram expressos em μmol de ATP hidrolisado $\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ uma vez que 1 mol de ATP hidrolisado corresponde a 1 mol de Pi produzido.

6- Cálculo das concentrações das espécies (metais e seus complexos) nos meios de reação

As concentrações das espécies presentes nos meios de reação foram estabelecidas usando-se as constantes de associação determinadas por FABIATO & FABIATO (1979). Os cálculos foram feitos através do programa de computador desenvolvido por Mark Kurzmack (Dept. Biochemistry, Univ. Maryland, Baltimore, USA) e utilizado pela primeira vez por INESI et alii (1980).

7- Avaliação do efeito de Ca^{++} e oxidantes na atividade ATPásica de partículas submitocondriais

Partículas submitocondriais de coração de boi, em concentração de $500\mu\text{g}/\text{mL}$, foram incubadas a 30°C em meio contendo Tris-acetato 25mM pH7,4, sacarose 250mM , succinato 2mM , rotenona $5\mu\text{M}$ e EGTA $0,1\text{mM}$ ou Ca^{++} $0,5\text{mM}$ ou EGTA $0,1\text{mM}$ + oxidante ou Ca^{++} $0,5\text{mM}$ + oxidante. Após 10 min de incubação, 13 a $15\mu\text{g}/\text{mL}$ de partículas submitocondriais foram retiradas para determinação da atividade ATPásica.

RESULTADOS

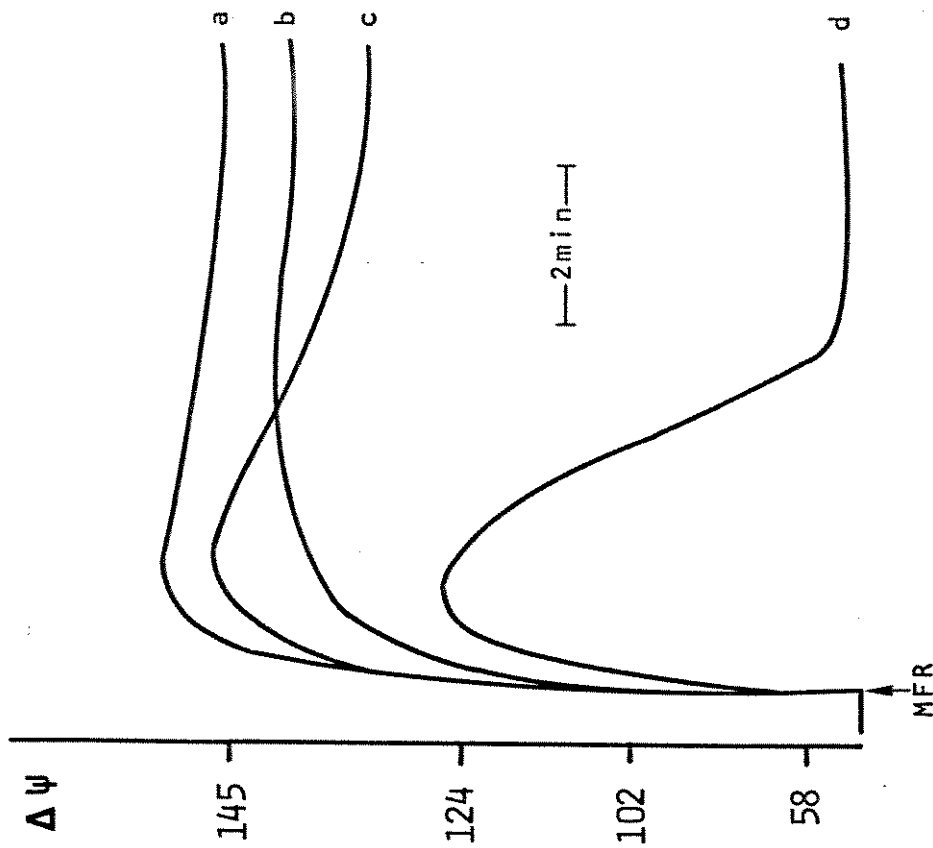
Efeito de Ca^{++} e oxidantes sobre o potencial elétrico de mitocôndrias de fígado de rato

Os experimentos da Figura 1 mostram o efeito de diamida (A) e t-BH (B) sobre o potencial elétrico de mitocôndrias hepáticas isoladas. Como pode ser visto, o potencial gerado, na presença de EGTA (a), foi da ordem de 150mV e mantido durante o período de observação. Na presença de Ca^{++} (b), os valores encontrados foram ligeiramente inferiores, mas também mantidos ao longo do tempo. A presença de diamida causou um pequeno decréscimo do potencial na ausência da Ca^{++} (A-c), porém, em sua presença (A-d), o potencial atingiu um valor máximo da ordem de 125mV e não foi retido pelas mitocôndrias. Em B pode ser observado que o t-BH não apresentou nenhum efeito na ausência de Ca^{++} (c), enquanto que, em sua presença (d), o efeito foi semelhante ao da diamida.

Efeito de EGTA e DTT sobre o potencial elétrico de mitocôndrias de fígado de rato tratadas com Ca^{++} e oxidantes

A fim de investigar possíveis mecanismos de reversão do $\Delta\psi$ e de analisar a contribuição do Ca^{++} e dos oxidantes no processo de permeabilização da membrana mitocondrial, foram adicionados EGTA e DTT, isoladamente e em conjunto, após a queda

A



B

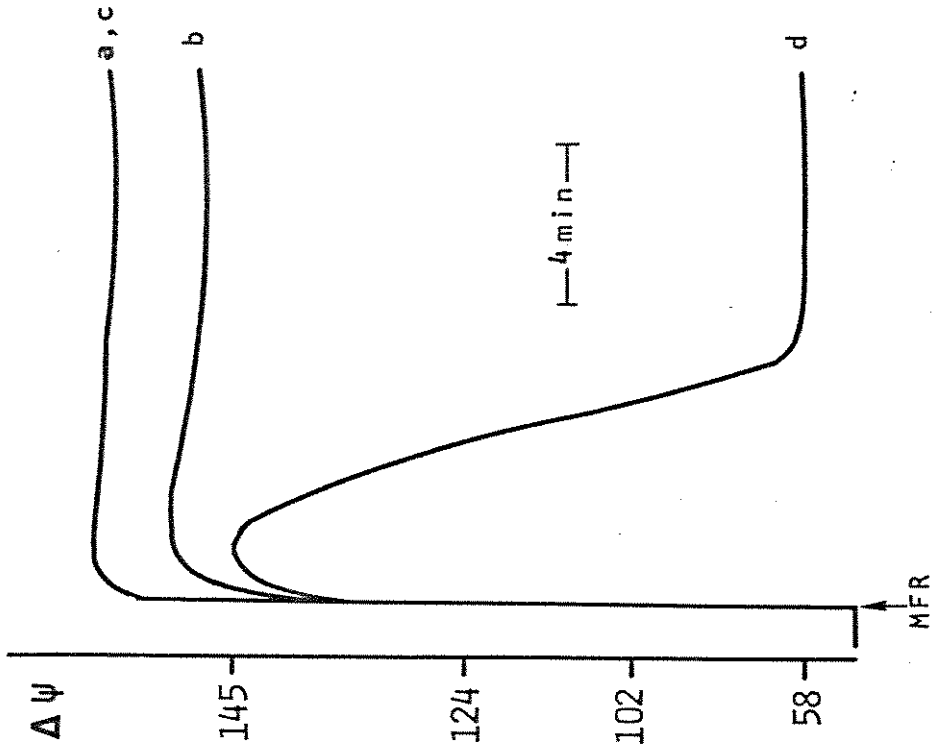


Figura 1: Efeito de diamida (A) e t-BH (B) sobre o potencial elétrico de mitocôndrias de fígado de rato em presença e ausência de Ca^{++}

Suspensões mitocondriais com 1mg de proteína foram adicionadas a 1ml de meio contendo Hepes 5mM pH 7,4, sacarose 125mM, KCl 65mM, succinato 2mM e rotenona 5 μM , na presença de: (a)EGTA 1mM; (b)20nmoles de Ca^{++} /mg proteína; (c)EGTA 1mM + diamida 0,5mM ou t-BH 100 μM ; (d)20nmoles Ca^{++} /mg proteína + diamida 0,5mM ou t-BH 100 μM . Os traçados são representativos de quatro repetições.

do potencial elétrico (Figura 2). Tanto com diamida (A) quanto com t-BH (B), o efeito das referidas adições foram basicamente os mesmos, variando em termos de amplitude da resposta na dependência do oxidante. O EGTA promoveu a recuperação parcial de $\Delta\psi$ para a diamida (A-a), ou total para o t-BH (B-a), mas não foi capaz de restaurar a integridade da membrana mitocondrial pois o potencial elétrico não foi mantido ao longo do tempo. Já o DTT (b) recuperou apenas parcialmente o $\Delta\psi$, que também progrediu para o colapso com maior ou menor velocidade. Entretanto, a adição simultânea de EGTA e DTT (c) foi capaz de recuperar integralmente a intensidade e a duração do potencial elétrico de membrana, considerando-se os valores obtidos para o controle do dia contendo somente EGTA.

A Figura 3 mostra experimentos com as mesmas adições da Figura 2 sendo realizadas 12 min após a queda de $\Delta\psi$. Podemos verificar que ocorre uma impossibilidade de recuperação total do potencial elétrico. A adição de EGTA + DTT (c) ainda continuou sendo a condição em que se obteve maior reversão de $\Delta\psi$. Foi excluída a possibilidade de anaerobiose estar contribuindo para os padrões de resposta através de experimentos realizados com infusão de ar atmosférico.

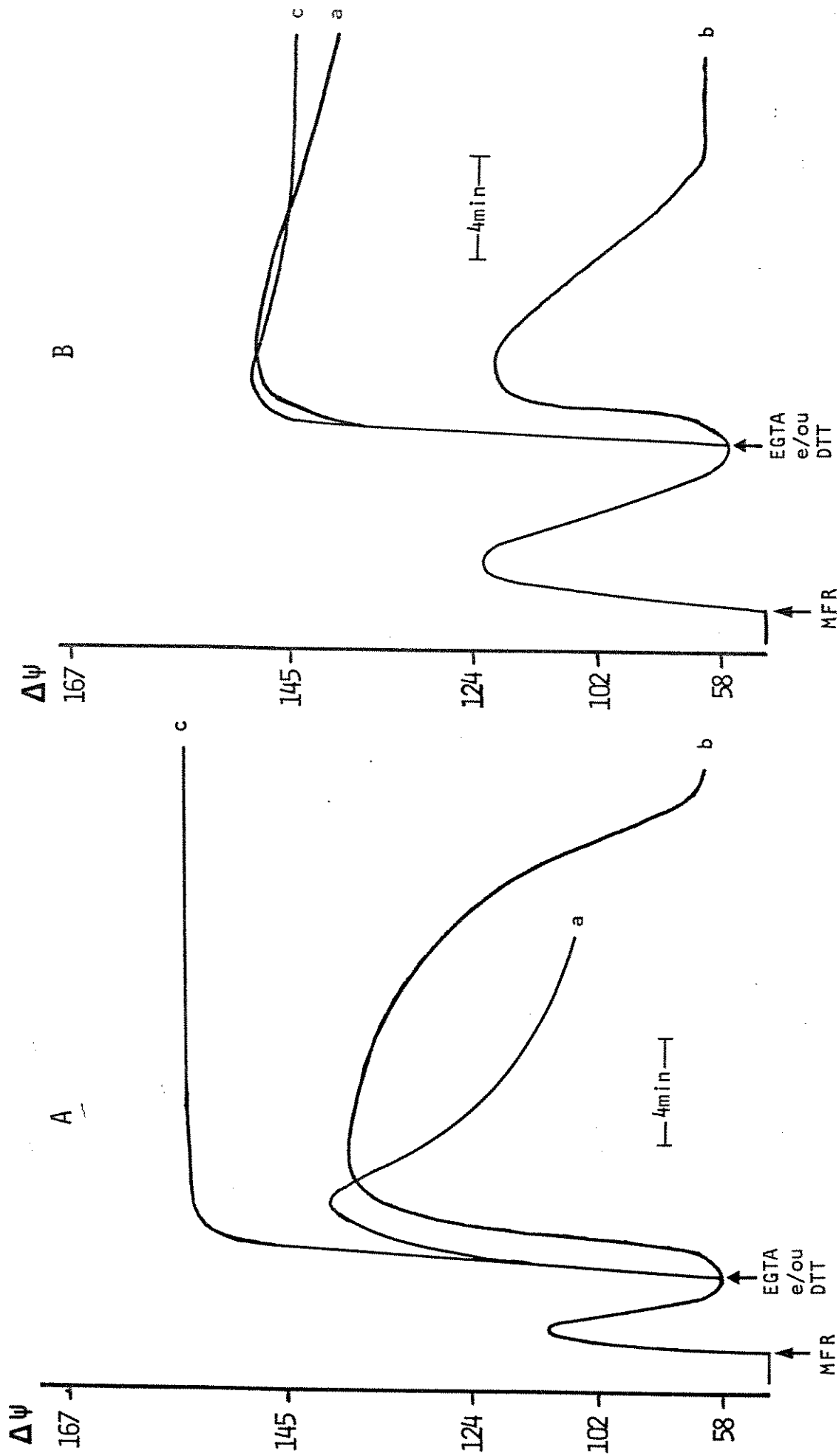


Figura 2: Efeito de EGTA e DTT sobre o potencial elétrico de mitocôndrias de fígado de rato tratadas com Ca^{++} e diamida (A) ou t-BH (B), após a queda do mesmo

Suspensões mitocondriais contendo 1mg de proteína foram adicionadas a 1ml de meio contendo Hepes 5mM pH 7,4, sacarose 125mM, KCl 65mM, succinato 2mM, rotenona 5 μM , 20nmoles Ca^{++} /mg proteína e diamida 0,5mM (A) ou t-BH 100 μM (B). Após a queda total do potencial elétrico, EGTA 1mM (a), DTT 2mM (b) ou ambos (c) foram adicionados. Os traçados são representativos de quatro repetições.

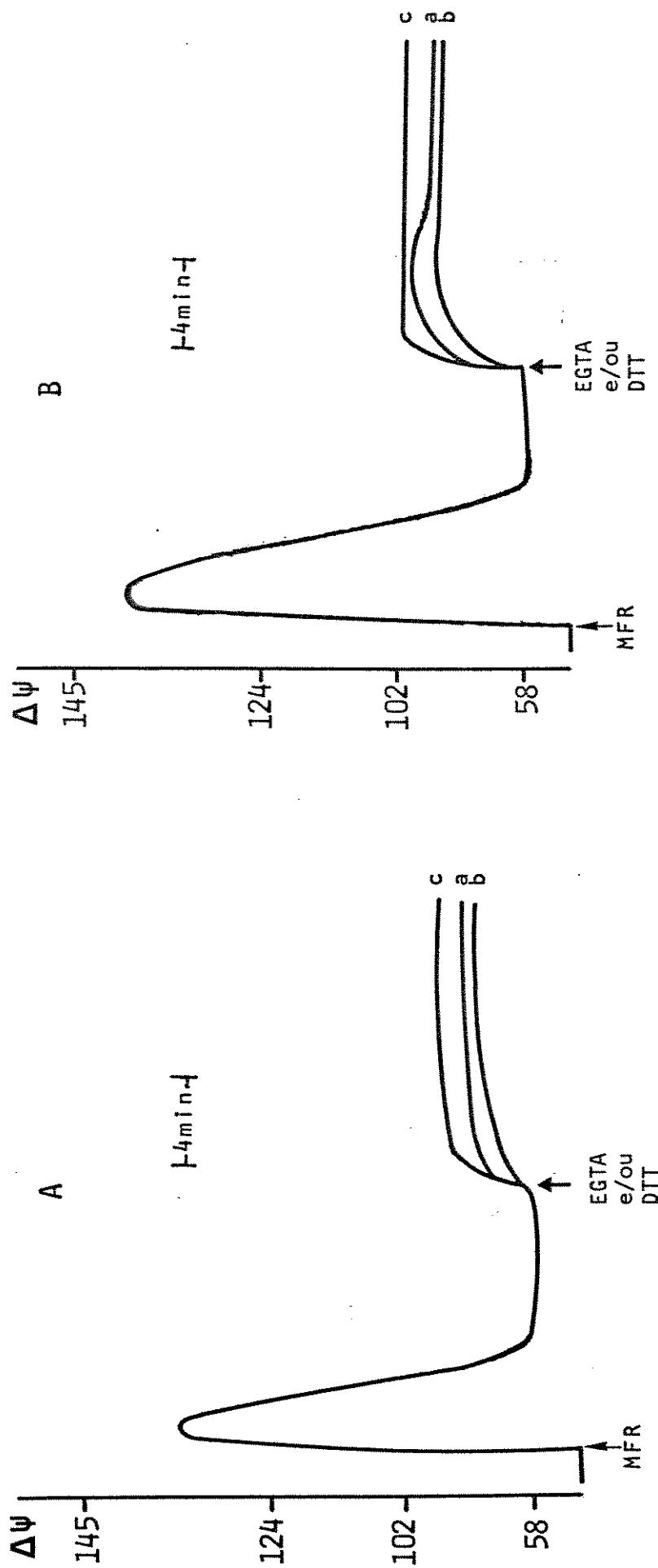


Figura 3: Efeito de EGTA e DTT sobre o potencial elétrico de mitocôndrias de fígado de rato tratadas com Ca^{++} e diamida (A) ou t-BH (B), após 12min de queda do potencial elétrico

Suspensões mitocondriais com 1mg de proteína foram adicionadas a 1ml de meio contendo Hepes 5mM pH 7,4, sacarose 125mM, KCl 65mM, succinato 2mM, rotenona 5 μM , 20nmol Ca^{++} /mg proteína e diamida 0,5mM (A) ou t-BH 100 μM (B). Após 12min de queda do potencial elétrico, foram adicionados EGTA 1mM (a), DTT 2mM (b) ou ambos (c). Os traçados são representativos de quatro repetições.

Padrão eletroforético de proteínas de membrana de mitocôndrias de fígado de rato tratadas com Ca^{++} e oxidantes

Para investigar a possível reversão da formação de agregados das proteínas de membrana quando presentes Ca^{++} e/ou diamida e t-BH, eletroforeses em gel de poliacrilamida-SDS foram feitas com amostras colhidas de cada uma das diferentes condições experimentais de avaliação do potencial elétrico (Figura 4). As colunas a, b e c mostram o padrão eletroforético das amostras colhidas com EGTA, Ca^{++} e Ca^{++} + oxidantes (A = diamida e B = t-BH), respectivamente. Podemos observar nas colunas c o aparecimento de agregado de alto peso molecular, que não penetra no gel de empacotamento. Nas colunas seguintes estão os padrões das amostras colhidas após a adição de EGTA (d), DTT (e) e EGTA + DTT (f) depois de ter ocorrido a queda do potencial elétrico de membrana. Podemos verificar que o agregado de alto peso molecular se manteve após a adição de EGTA (d), mas se desfez após DTT (e) e EGTA + DTT (f). Estes mesmos padrões eletroforéticos são vistos nas amostras onde EGTA (g), DTT (h) e EGTA + DTT (i) foram adicionados 12 min após a queda do potencial elétrico.

Atividade ATPásica de partículas submitocondriais de coração de boi

Para avaliar os efeitos de Ca^{++} e oxidantes na atividade ATPásica de partículas submitocondriais de coração de

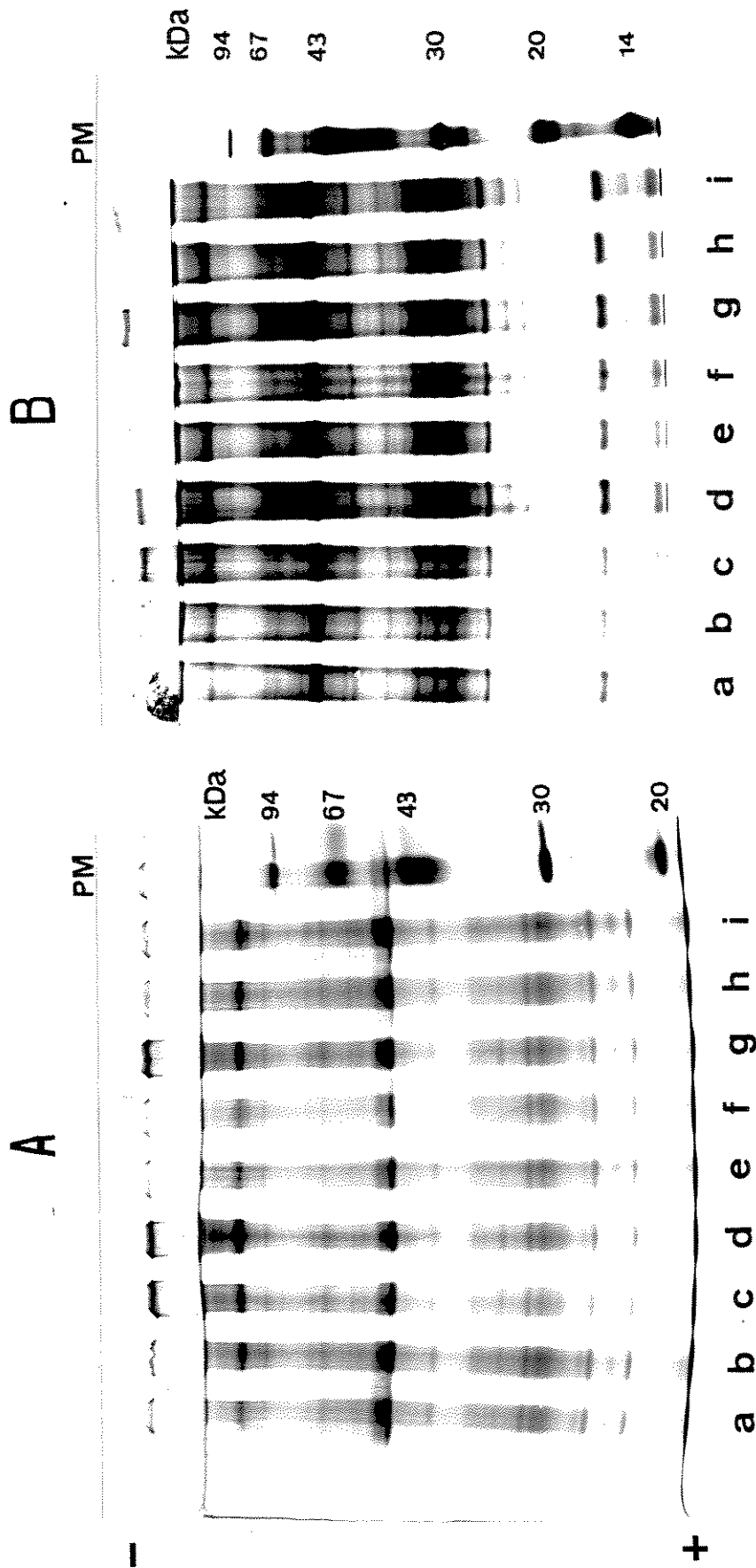


Figura 4: Padrão eletroforético de proteínas de membrana de mitocôndrias de fígado de rato tratadas com Ca^{++} e diamida (A) ou t-BH (B).

5 μg de proteínas de membrana, representativas das diferentes condições experimentais de avaliação do potencial elétrico, foram aplicadas ao gel de eletroforese na seguinte ordem: EGTA 1mM (a); 20nmoles Ca^{++} /mg proteína (b); 20nmoles Ca^{++} /mg proteína + diamida 0,5mM ou t-BH 100 μM (c); após a queda do potencial elétrico, EGTA 1mM (d), DTT 2mM (e) e EGTA 1mM + DTT 2mM (f); após 12min de queda do potencial elétrico, EGTA 1mM (g), DTT 2mM (h) e EGTA 1mM + DTT 2mM (i).

boi, foi necessário realizar previamente experimentos que permitissem a determinação da atividade ATPásica destas partículas sob condições padrões (presença de Mg^{++}) e em presença de Ca^{++} .

Assim, verificamos que as partículas submitocondriais de coração de boi apresentaram atividade ATPásica linear durante os 8 minutos investigados (Figura 5), com valores que variaram de 0,4 a 0,8 $\mu\text{mol ATP hidrolisado} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{min}^{-1}$ (média de 0,6 $\mu\text{mol ATP hidrolisado} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{min}^{-1}$).

Quando avaliada em função da concentração de magnésio, a atividade ATPásica apresentou comportamento hiperbólico, que pode ser visualizado na Figura 6. As concentrações de Mg^{++} e $Mg\text{ATP}$, calculadas para as diferentes adições de $MgCl_2$ (Mg^{++} TOTAL), podem ser vistas na Tabela 1.

TABELA 1

CONCENTRAÇÕES DE Mg^{++} LIVRE E $Mg\text{ATP}$, EM μM , CALCULADAS PARA O MEIO DE REAÇÃO UTILIZADO

Mg^{++} TOTAL	Mg^{++} LIVRE	$Mg\text{ATP}$
25	1,50	23,3
50	3,07	46,5
100	6,40	92,7
200	14,00	184,0
400	36,00	359,0
600	72,00	520,0
800	131,00	654,0

* Cálculos feitos através de programa de computação, considerando as constantes de associação para o meio de reação empregado.

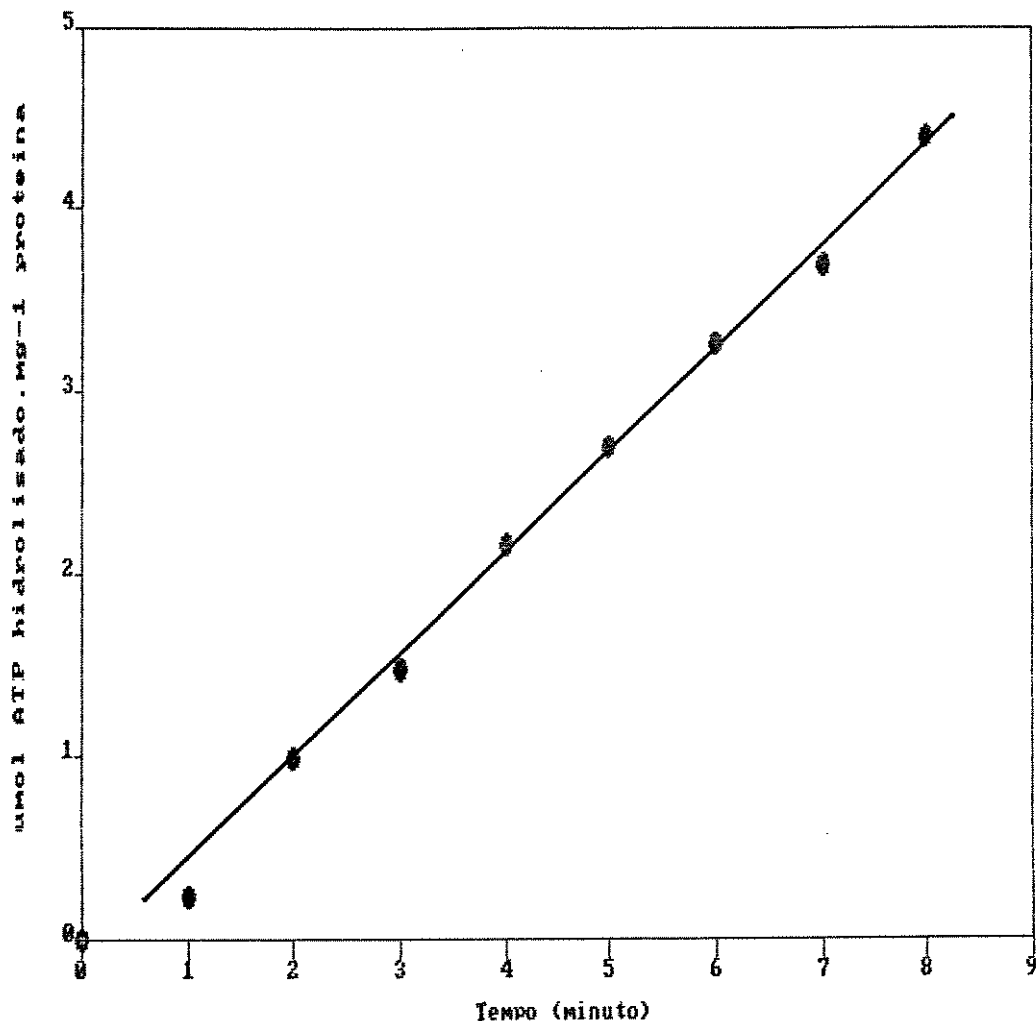


Figura 5: Determinação da atividade ATPásica em função do tempo

Suspensões de partículas submitocondriais de coração de boi, contendo 0,29mg proteína, foram adicionadas a 10ml de meio de reação contendo Tris-HCl 65mM pH8,0, FCCP 1μM e ATP 1mM. Após 5 minutos a 30°C, a reação foi iniciada pela adição de MgCl₂ 1mM. A intervalos de 1 minuto, 500ul do meio foram retirados para a dosagem colorimétrica do Pi produzido. Cada ponto representa a média de quatro experimentos realizados em duplicata.

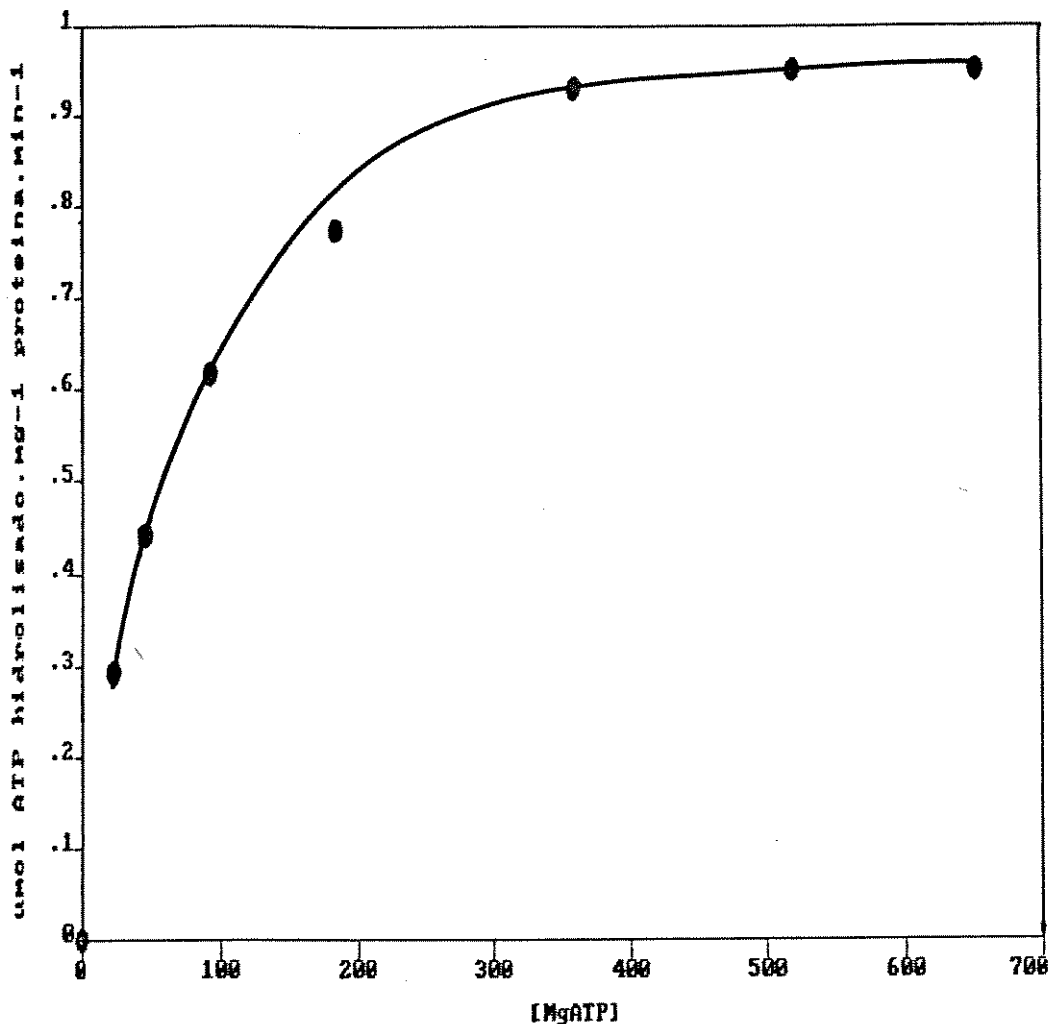


Figura 6: Determinação da atividade ATPásica em função de diferentes concentrações de Mg⁺⁺

Suspensões de partículas submitocondriais de coração de boi, contendo 14,5μg proteínas, foram adicionadas a 450ul de meio de reação contendo Tris-HCl 65mM pH8,0, FCCP 1μM, ATP 1mM e EGTA 81,9μM. Após 5 minutos a 30°C, a reação foi iniciada com 50ul de MgCl₂, em concentrações finais de 25, 50, 100, 200, 400, 600 e 800μM. Após 5 minutos a mesma temperatura, a reação foi interrompida e o aparecimento de Pi determinado colorimetricamente. Cada ponto representa a média de quatro experimentos realizados em duplicata.

O efeito do Ca^{++} na atividade ATPásica de partículas submitocondriais de coração de boi foi avaliado mantendo-se constante a concentração de CaATP. Os valores obtidos foram menores que quando da ausência de Ca^{++} , mas mantiveram comportamento hiperbólico (Figura 7A). Ao traçarmos o gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 7B), pudemos evidenciar que as retas se cruzavam no eixo das ordenadas, caracterizando a existência de uma $V_{\text{máx}}$ comum, de valor calculado igual a $1,05 \mu\text{mol ATP hidrolisado} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína} \cdot \text{min}^{-1}$. Os K_{ms} obtidos foram de 60,6 e $110 \mu\text{M}$, respectivamente, para ausência e presença de CaATP. Com estes dados podemos caracterizar a existência de uma inibição competitiva entre os dois cátions.

As concentrações calculadas dos cátions e seus complexos no meio de reação podem ser vistas na Tabela 2.

TABELA 2

CONCENTRAÇÕES CALCULADAS, EM μM , DOS CATIONS E SEUS COMPLEXOS PARA O MEIO DE REAÇÃO UTILIZADO

Mg ⁺⁺			Ca ⁺⁺		
TOTAL	LIVRE	MgATP	CaATP	LIVRE	TOTAL
25	2	22,8	275	51	400
50	4	45,0	274	53	400
100	9	90,4	271	56	400
200	21	178,0	270	65	410
400	59	338,0	270	95	440
700	183	510,0	274	199	550

* Cálculos feitos através de programa de computação, considerando as constantes de associação para o meio de reação empregado.

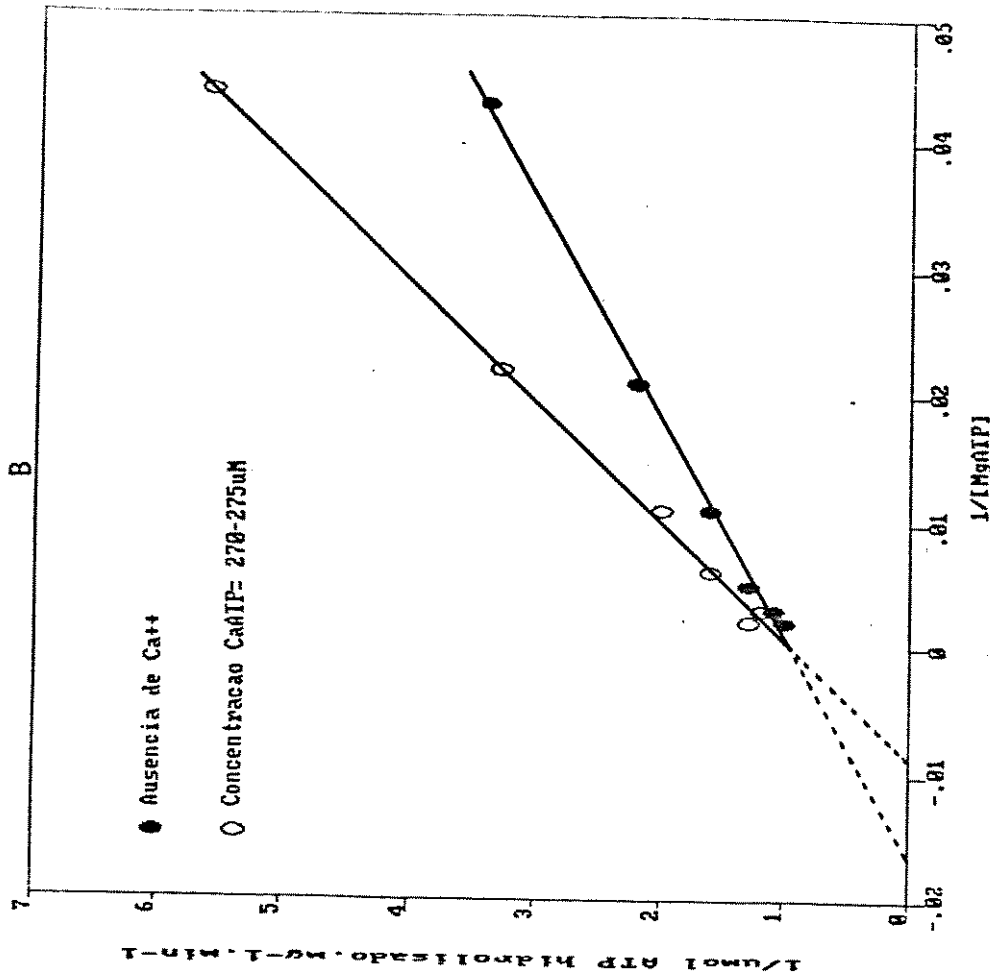
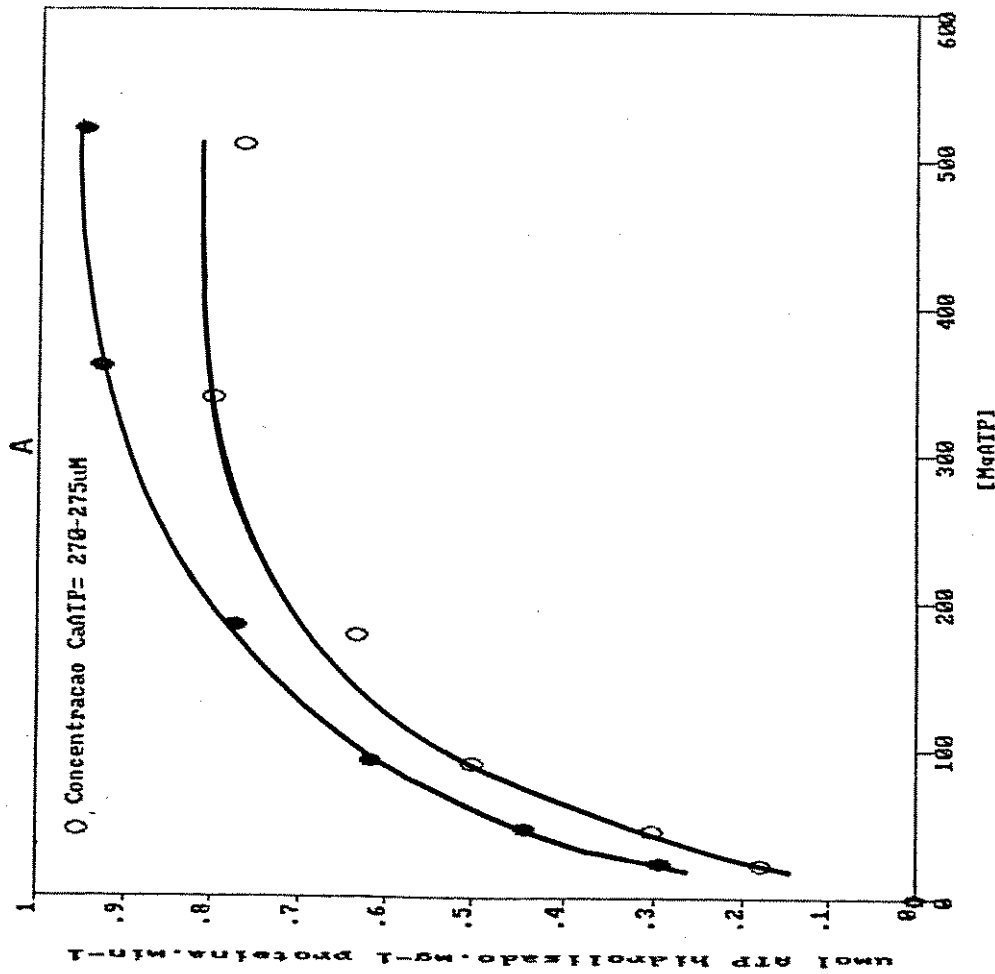


Figura 71 Determinação da atividade ATPásica em função de diferentes concentrações de MgCl e constante concentração de CaATP

Suspensões de partículas submitocondriais de coração de boi, contendo 14,5ug proteínas, foram adicionadas a 450ul de meio de reação contendo Tris-HCl 65mM PH8,0, FCCP 1uM, ATP 1mM e CaATP 270 a 275uM. Após 5 minutos a 30°C, a reação foi iniciada com 50ul de MgCl₂, em concentrações finais de 25, 50, 100, 200, 400 e 700uM. Após 5 minutos, a reação foi interrompida e o aparecimento de Pi determinado colorimetricamente (A). Cada ponto representa a média de quatro experimentos realizados em duplicata. Os resultados obtidos foram utilizados para a construção do gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo recíproco (B).

Efeito de Ca^{++} e oxidantes na atividade ATPásica de partículas submitocondriais

Tratando as partículas submitocondriais de coração de boi com Ca^{++} e oxidantes, obtivemos as atividades ATPásicas mostradas na Tabela 3. Cada valor representa a média de 4 experimentos realizados em triplicata. A análise estatística dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis mostrou que as diferenças observadas não são significativas, sendo os tratamentos iguais e não dependentes. Assim sendo, podemos afirmar que partículas submitocondriais de coração de boi, submetidas a Ca^{++} e oxidantes, não têm sua atividade ATPásica alterada.

TABELA 3

ATIVIDADE ATPásica DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAIS
TRATADAS COM Ca^{++} E OXIDANTES*

EGTA	0,75		
Ca^{++}	0,71		
EGTA + diamida	0,75	+ t-BH	0,75
Ca^{++} + diamida	0,65	+ t-BH	0,70

* $\mu\text{mol ATP hidrolisado} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, a captação do íon cálcio por mitocôndrias é feita por um processo eletroforético em resposta ao potencial elétrico de membrana. Assim, a entrada de Ca^{++} leva a uma diminuição da negatividade do lado interno da membrana interna mitocondrial, reduzindo seu potencial elétrico. Quando o Ca^{++} é adicionado após energização das mitocôndrias, verifica-se uma fase rápida de despolarização seguida por uma fase lenta de repolarização, até que se atinge novamente o estado de equilíbrio num valor de $\Delta\psi$ geralmente mais baixo que o inicial devido ao armazenamento do Ca^{++} adicionado (AKERMAN, 1978; BAUMHUTER & RICHTER, 1982). Esta é a situação observada em nosso experimento da Figura 1, onde o Ca^{++} já estava presente no meio de reação antes da adição da mitocôndria. Além disso, o Ca^{++} se liga a sítios internos da membrana interna mitocondrial (HAWORTH & HUNTER, 1979; VERCESI et alii, 1988), promovendo alteração descontínua e transitória da permeabilidade da membrana. O conjunto de mitocôndrias passa a apresentar duas populações distintas: uma em configuração ortodoxa e outra em agregada (HUNTER et alii, 1976; AL-NASSER & CROMPTON, 1986). Isto gera um equilíbrio populacional que mantém o potencial elétrico de membrana estável, mas com menor intensidade.

Sendo a diamida um oxidante de glutationa (KOSOWER & KOSOWER, 1969) e de grupamentos sulfidríla de membrana (KURANTSIN-MILLS & LESSIN, 1981), seu efeito de diminuir a intensidade do potencial elétrico (Figura 1A-c) deve ser devido

a um desarranjo parcial da estrutura da membrana mitocondrial por formação de pontes S-S entre os grupamentos SH expostos de proteínas da membrana, com dissipação do potencial elétrico. Estudos feitos nas mesmas condições que as utilizadas em nossos experimentos, mas com monitorização do inchamento mitocondrial (VERCESI, 1984; VERCESI et alii, 1988), comprovam a alteração parcial da permeabilidade da membrana interna induzida pela diamida. O envolvimento de alteração estrutural da membrana mitocondrial neste processo foi demonstrado por FAGIAN et alii (1990), que observaram o aparecimento de pequena quantidade de agregados de proteínas de membrana quando partículas submitocondriais foram tratadas com EGTA e diamida.

Já o t-BH necessita ser metabolizado pela mitocôndria, através da glutathiona peroxidase, para levar à oxidação de glutathiona. Esta é prontamente reduzida às custas dos nucleotídeos de piridina, que podem ser reduzidos pelos substratos endógenos. Assim, os níveis de glutathiona reduzida são mantidos, não havendo comprometimento da estrutura da membrana mitocondrial e do potencial elétrico (Figura 1B-c). Este resultado está de acordo com dados da literatura (LOTSCHER et alii, 1979, 1980; BERNARDES et alii, 1986; CROMPTON et alii, 1987; CARBONERA & AZZONE, 1988) e é reforçado pelo fato de FAGIAN et alii (1990) não terem observado qualquer alteração no potencial elétrico e no padrão eletroforético de partículas submitocondriais tratadas com EGTA e t-BH.

Quando associamos Ca^{++} e oxidantes, verificamos que o

potencial elétrico de membrana atingiu a menor intensidade obtida e não foi mantido ao longo do tempo (Figura 1-d). Este resultado está em concordância com os obtidos por LOTSCHER et alii (1980), BEATRICE et alii (1980, 1982), BAUMHUTER & RICHTER (1982) e CARBONERA & AZZONE (1988). Considerando que a queda do potencial elétrico ocorre em paralelo ao efluxo de Ca^{++} e ao inchamento mitocondrial (BEATRICE et alii, 1982; BERNARDES et alii, 1986), nosso resultado se soma ao de diversos autores que empregaram a monitorização destas alterações para avaliar o dano mitocondrial (BEATRICE et alii, 1982, 1984; MOORE et alii, 1983).

VERCESI (1981) e BEATRICE et alii (1982) demonstraram que o desenvolvimento do aumento de permeabilidade em uma população mitocondrial tratada com Ca^{++} e oxidantes é um processo dinâmico e heterogêneo. Mitocôndrias individuais se tornam permeáveis em diferentes tempos, na dependência de sua resistência à permeabilização, formando-se subpopulações distintas de mitocôndrias permeáveis e impermeáveis. A medida que a subpopulação permeável vai liberando o Ca^{++} armazenado e ele vai sendo captado pela subpopulação impermeável, uma fração desta subpopulação vai se permeabilizando, até que, com a continuidade do processo, toda a população mitocondrial é atingida. Assim, antes que toda a população tenha se tornado permeável, a subpopulação que permanece na forma agregada pode ainda construir potencial elétrico, só que com menor intensidade. A partir do momento em que o Ca^{++} e os oxidantes alteram a estrutura conformacional da maioria da população

mitocondrial e há o predomínio da forma inchada, o potencial elétrico começa a cair, até colapsar. O extenso comprometimento da estrutura de membrana das mitocôndrias pode ser reforçado pelo aparecimento de grande quantidade de agregados proteicos de alto peso molecular à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Figura 4 A e B, coluna c), confirmando os achados de FAGIAN et alii (1990).

O estudo da reversibilidade do processo de permeabilização da membrana interna mitocondrial por Ca^{++} e oxidantes demonstrou que a retirada do íon do meio de reação pela adição de EGTA possibilitou a recuperação parcial do potencial elétrico de membrana, que, todavia, não foi mantido estável ao longo do tempo (Figura 2 A e B-a). Observando as eletroforeses de proteínas de membrana, verificamos que os agregados de alto peso molecular não foram desfeitos (Figura 4 A e B, coluna d). Analisando pelo enfoque ultra-estrutural, o EGTA estaria quelando o Ca^{++} antes que toda a população mitocondrial se tornasse permeável, possibilitando que a subpopulação impermeável remanescente ainda desenvolvesse potencial elétrico de membrana (BEATRICE et alii, 1982). No caso da diamida, em que o dano é maior por agir diretamente a nível de membrana e formar maior quantidade de agregados proteicos, a recuperação do potencial elétrico é menor e pouco duradoura. Em relação ao t-BH, que causa dano somente quando o Ca^{++} está presente (CROMPTON et alii, 1987) e através da oxidação da glutathiona, o efeito é mais brando. Estes dados são confirmados pela observação da ultra-estrutura mitocondrial feita por BEATRICE

et alii (1982).

Quando da adição de DTT, um regenerador não enzimático de grupamentos sulfidríla e, portanto, também de glutatona reduzida, os agregados proteicos foram desfeitos (Figura 4 A e B-e), o potencial elétrico de membrana pôde ser parcialmente construído, mas não mantido ao longo do tempo. Estes resultados nos indicam que somente a redução das pontes S-S não é capaz de recuperar a permeabilidade seletiva da membrana mitocondrial, muito provavelmente por não retirar o Ca^{++} ligado em seus sítios. MOORE et alii (1983) demonstraram que o DTT foi capaz de reverter a liberação de Ca^{++} induzida pelo t-BH, sendo esta reversão acompanhada de diminuição da oxidação do NAD(P)H e permanente inibição do inchamento mitocondrial. Entretanto, os autores utilizaram albumina sérica bovina em seus meios de reação, que previne danos não específicos na membrana e possibilita maior resistência a Ca^{++} e oxidantes.

Assim, supomos que somente a redução das ligações dissulfeto em conjunto com a retirada do Ca^{++} poderia ser eficaz na recuperação da integridade estrutural da população mitocondrial. E isto foi confirmado quando obtivemos recuperação do potencial elétrico em amplitude e extensão (Figura 2 A e B-c) e desaparecimento dos agregados proteicos (Figura 4 A e B, coluna f) pela adição simultânea de EGTA e DTT.

Investigando o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no dano mitocondrial, HERMES-LIMA et alii (1991)

observaram queda do potencial elétrico de membrana e efluxo de Ca^{++} quando mitocôndrias de fígado de rato foram tratadas com ácido S-aminolevulínico. Este processo de alteração de permeabilidade mostrou ser também dependente da presença de Ca^{++} intramitochondrial (HERMES-LIMA et alii, a), à semelhança do que ocorre com o t-BH (CROMPTON et alii, 1987). A reversão parcial do potencial elétrico de membrana por DTT e total por EGTA (HERMES-LIMA et alii, b), levou os autores a sugerirem que as espécies ativas de oxigênio oxidam componentes de membrana e deixam as mitocôndrias susceptíveis à permeabilização causada pelo Ca^{++} .

Com o passar do tempo, um outro mecanismo de lesão mitochondrial deve associar-se à formação de pontes S-S e agregados proteicos na alteração de permeabilidade da membrana interna mitochondrial. Isto porque verificamos que, após 12 minutos de queda do potencial elétrico de membrana, houve uma incapacidade de recuperá-lo, mesmo com a adição de EGTA + DTT, e os padrões eletroforéticos não se alteraram. Provavelmente o mecanismo de lesão associado seja lipoperoxidação (BINDOLI, 1988; CARBONERA & AZZONE, 1988; CARBONERA et alii, 1988).

A peroxidação de lipídeos é um processo mediado por radicais livres que, ocorrendo em sistemas biológicos, pode acarretar alterações de suas estruturas e funções. O radical hidroxil, altamente reativo, tem sido responsabilizado pela iniciação da lipoperoxidação. Sua reatividade química é suficiente para retirar um átomo de hidrogênio de grupamentos

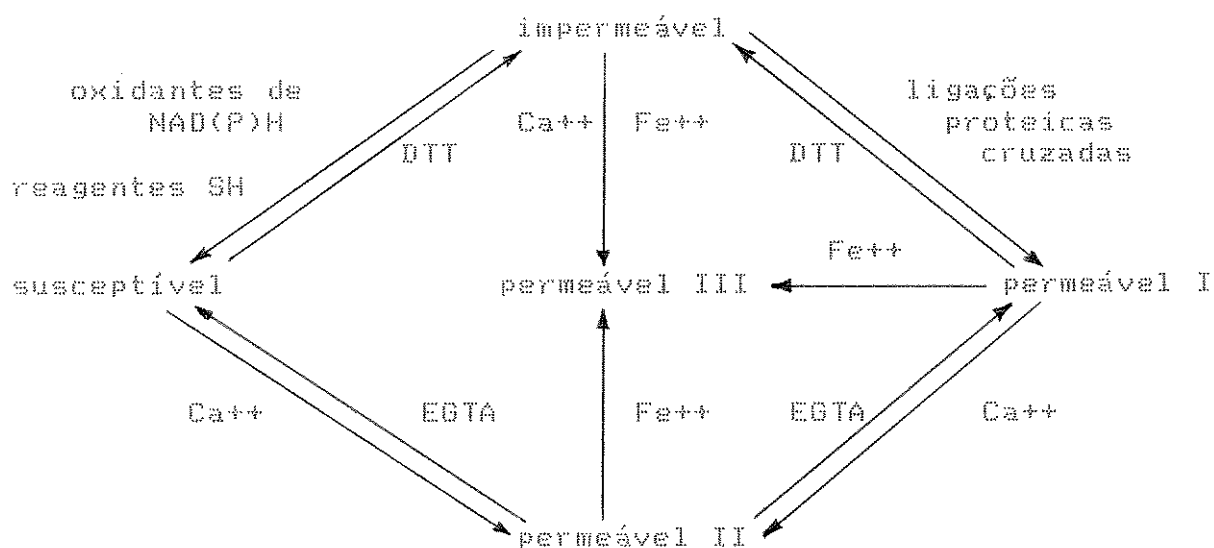
metilenos do ácido graxo insaturado. A formação deste radical nos sistemas biológicos pode ocorrer a partir de anion superóxido e peróxido de hidrogênio, através das reações de Fenton e Haber-Weiss. Em ambas as vias, a participação do metal ferro é fundamental (KAPPUS, 1985; MINOTTI & AUST, 1987; BINDOLI, 1988).

A reação entre o radical hidroxil e o ácido graxo insaturado inicia um processo em cascata que acarreta a quebra da molécula lipídica e a formação de radicais alquila. Estes podem iniciar um novo ciclo de reações (KAPPUS, 1985).

A mitocôndria possui grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados em sua membrana, que podem sofrer lipoperoxidação. Em condições fisiológicas, o radical hidroxil não deve estar presente em quantidades suficientes para iniciar o processo (KAPPUS, 1985; BINDOLI, 1988). Entretanto, em condições de estresse oxidativo, os oxidantes consomem as defesas anti-oxidantes da organela, possibilitando o acúmulo de radicais hidroxil. Além disso, a desestabilização que causam, junto com o Ca^{++} , na membrana mitocondrial, pela formação de pontes S-S, possibilita que a lipoperoxidação ocorra, levando a uma permeabilização irreversível da membrana (KAPPUS, 1985; MINOTTI & AUST, 1987; BINDOLI, 1988).

Todos esses resultados nos levaram a propor a existência de estados de permeabilidade intercambiáveis e de graus variados da membrana interna mitocondrial. Os agentes

oxidantes atuam a nível de grupamentos proteicos da membrana interna, tornando as mitocôndrias susceptíveis ou ligeiramente permeáveis, na dependência do grau de potência deletéria do agente, e possibilitando ao Ca^{++} permeabilizar completamente, mas ainda de modo reversível, a membrana mitocondrial. Com o tempo, a lipoperoxidação se associaria ao processo, tornando a mitocôndria irreversivelmente permeável, como mostra o esquema a seguir:



Pouco há na literatura sobre o efeito de oxidantes, associados ou não a Ca^{++} , na atividade ATPásica da H^{+} -ATP-sintetase. Para investigarmos este aspecto, inicialmente caracterizamos a cinética enzimática e a interferência do Ca^{++} na atividade dessa enzima.

O $MgATP$ é o verdadeiro substrato da H^{+} -ATP-sintetase (SELWYN, 1967). Quando adicionamos diferentes concentrações de

Mg⁺⁺ ao meio de reação, observamos que a atividade ATPásica da enzima de partículas submitocondriais de coração de boi aumentou à medida em que maior concentração do substrato se tornou disponível, até atingir um platô (Figura 6, Tabela 1). Este padrão enzimático segue a cinética de Michaelis-Menten: em concentrações iniciais baixas de substrato, a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do substrato e, à medida que esta vai aumentando, a enzima é saturada e a velocidade se torna constante e independente de aumentos adicionais da concentração de substrato.

O Ca⁺⁺ é um íon divalente que também forma complexo com o ATP. Quando CaATP estava presente no meio de reação em que as concentrações de MgATP foram mantidas próximas às do experimento anterior (Tabela 2), observamos uma diminuição da atividade ATPásica, mas ainda seguindo a cinética de Michaelis-Menten (Figura 7A). Ao traçarmos o gráfico de Lineweaver-Burk, observamos a existência de uma V_{máx} comum (1,05 $\mu\text{mol ATP hidrolisado} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{min}^{-1}$) e K_ms diferentes (MgATP = 60,6 μM ; MgATP + CaATP = 110 μM), caracterizando uma inibição competitiva entre os dois complexos (Figura 7B). Estes resultados corroboram os obtidos por FAGIAN et alii (1986) e VERCESI et alii (1990).

Para estudarmos a ação de Ca⁺⁺ e oxidantes na atividade ATPásica da H⁺-ATP-sintetase de partículas submitocondriais de coração de boi, utilizamos uma concentração de Ca⁺⁺ no meio de tratamento da ordem de 500 μM , mas que foi

reduzida a $66,7\text{nM}$ durante os ensaios de medida da atividade ATPásica. Esta concentração, frente a 1mM de Mg^{++} , produz apenas $0,0406\mu\text{M}$ de CaATP. Para avaliarmos se esta concentração poderia interferir competitivamente com o MgATP na medida da atividade enzimática, calculamos a constante de inibição a partir dos Kms obtidos e, posteriormente, o Km aparente para esta concentração de CaATP. Obtivemos o valor de $60,6\mu\text{M}$, que é igual ao Km para o MgATP. Concluimos, então, que a concentração de CaATP presente no meio de reação para medida da atividade ATPásica não interferiu competitivamente com o MgATP pela enzima.

Assim, observamos que a presença de oxidantes, com ou sem Ca^{++} , não altera a atividade ATPásica da H^{+} -ATP-sintetase de partículas submitocondriais de coração de boi (Tabela 3).

Investigando a importância de grupamentos tiol de subunidades dessa enzima na fosforilação oxidativa, YAGI & HATEFI (1984) observaram que a diamida estimulou a atividade ATPásica da H^{+} -ATP-sintetase de partículas submitocondriais de coração de boi e diminuiu sua capacidade de construir e manter potencial elétrico de membrana. Este segundo efeito não foi abolido pela adição de oligomicina ou DCCD.

Nos tilacóides, a permeabilidade aumentada a prótons, decorrente de tratamento com oxidantes, é devida a ligação cruzada de grupamentos SH e modificação estrutural da subunidade gama, com recuperação da captação dos prótons pela adição de

DCCD. Assim sendo, YAGI & HATEFI (1984) concluíram que, apesar de mitocôndrias e cloroplastos terem a característica comum de possuir grupamentos tiol, cuja modificação por reagentes oxidantes resulta em desacoplamento, a localização destes grupamentos deveria ser diferente nos dois sistemas. As observações de que a alteração das partículas submitocondriais pela diamida resultava em estímulo da atividade ATPásica e, em alguns casos, um transiente potencial elétrico podia ser formado como resultado da hidrólise do ATP indicaram que as modificações não interferem com a hidrólise do ATP e nem com a translocação de prótons através da H^+ -ATP-sintetase. Entretanto, os autores consideraram que a lesão não necessariamente estava em outra parte da membrana que não na H^+ -ATP-sintetase.

LIPPE et alii (1988) demonstraram que grupamentos tiol da subunidade 25kDa da F_0 são fundamentais para o acoplamento entre as porções F_0 e F_1 da H^+ -ATP-sintetase. Entretanto, os autores, trabalhando com o complexo U, não observaram nenhuma alteração na atividade ATPásica quando o submeteram a tratamento com diamida. Este resultado é concordante com o nosso e contrário ao de YAGI & HATEFI (1984).

Em 1990, FAGIAN et alii mostraram que a diamida, mesmo na ausência de Ca^{++} , causa formação de agregados de proteínas de membrana de partículas submitocondriais, levando a desacoplamento e queda na extensão e duração do potencial elétrico de membrana.

Verificando as metodologias utilizadas para medir a atividade ATPásica das partículas submitocondriais, observamos que YAGI & HATEFI (1984) não trabalharam em condições de atividade máxima, não usando desacoplador. Em nossos experimentos, o FCCP foi empregado. Assim sendo, concluímos que, quando esses autores observaram aumento da atividade ATPásica de partículas submitocondriais tratadas com diamida, esta estava realmente lesando a membrana pela formação de agregados proteicos, acarretando o desacoplamento observado, e não agindo sobre a H^+ -ATP-sintetase. Isto é reforçado pelo fato de que LIPPE et alii (1988) não obtiveram qualquer alteração na atividade ATPásica do complexo V tratado, estrutura esta não membranosa.

A adição de Ca^{++} ao meio de tratamento e a substituição da diamida pelo t-BH não alteraram a atividade ATPásica da H^+ -ATP-sintetase. Estes resultados estão condizentes com o esperado. Como já mostrado, o Ca^{++} inibe a atividade ATPásica desta enzima por competir com o Mg^{++} pela formação de seu verdadeiro substrato. O t-BH, por sua vez, é um oxidante que requer metabolização por um sistema enzimático, não mais presente nas partículas submitocondriais, para produzir seu efeito.

Assim, concluímos que Ca^{++} e oxidantes desacoplam a transdução de energia na mitocôndria por causar dano em sua membrana e não por agir na H^+ -ATP-sintetase.

RESUMO

O Ca^{++} possui um efeito altamente deletério sobre mitocôndrias em diversas situações patológicas, envolvendo um processo de alteração de permeabilidade da membrana interna desta organela. Resultados prévios de nosso laboratório indicaram que esta permeabilização causada por Ca^{++} e oxidantes é devida à formação de ligações cruzadas entre grupamentos tiol de proteínas da membrana, com o aparecimento de agregados proteicos de alto peso molecular (FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DASILVA, L.; MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. Membrane Protein Thiol Cross-linking Associated with the Permeabilization of the Inner Mitochondrial Membrane by Ca^{++} plus Prooxidants. *J.Biol.Chem.*, 265:19955-60, 1990). O estudo da reversibilidade destas alterações é de extrema importância uma vez que este fenômeno pode ter um significado relevante na viabilidade mitocondrial e celular. O comprometimento da enzima H^+ -ATP-sintetase neste processo de dano mitocondrial causado por estresse oxidativo, na presença e ausência de Ca^{++} , foi também investigado.

O grau de permeabilização da membrana interna mitocondrial foi monitorado através da medida do potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$). Observamos que EGTA ou DTT, adicionados a preparações de mitocôndrias tratadas com Ca^{++} e oxidantes imediatamente após a queda de $\Delta\psi$, reverteram parcialmente sua intensidade. Entretanto, as mitocôndrias não conseguiram sustentá-lo ao longo do tempo. A adição simultânea de EGTA e DTT restaurou a intensidade e a capacidade de

sustentação do potencial elétrico. Todavia, quando adicionados 12 minutos após a queda de $\Delta\Psi$, houve uma impossibilidade de sua recuperação total.

A reversão da formação dos agregados de proteínas de membrana foi investigada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Os agregados proteicos foram desfeitos quando presentes DTT ou DTT e EGTA, mas não quando adicionados somente EGTA. Os mesmos padrões eletroforéticos foram obtidos quando os reagentes foram adicionados 12 minutos após a queda do potencial elétrico.

Propomos, então, que os agentes oxidantes atuam a nível de grupamentos proteicos da membrana interna, tornando as mitocôndrias susceptíveis ou ligeiramente permeáveis, possibilitando ao Ca^{++} permeabilizá-las completamente, mas de modo reversível. Com o passar do tempo, as mitocôndrias se tornariam irreversivelmente permeáveis pela associação de um outro tipo de lesão na membrana interna, possivelmente lipoperoxidação.

As partículas submitocondriais de músculo de coração de boi não tiveram sua atividade ATPásica alterada quando submetidas a tratamento com Ca^{++} e/ou oxidantes.

Assim, concluímos que Ca^{++} e oxidantes desacoplam a transdução de energia na mitocôndria por causar dano em sua membrana e não por agir sobre a H^+ -ATP-sintetase.

SUMMARY

Calcium ion (Ca^{++}) is deleterious for mitochondria in many pathological conditions by a mechanism that involves alterations in the permeability of the mitochondrial inner membrane. Previous results from our laboratory have indicated that the permeabilization of the mitochondrial inner membrane by Ca^{++} plus oxidants is associated with the production of protein aggregates due to thiol cross-linking (FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DASILVA, L.; MARTINS, I.S. & VRECESI, A.E. Membrane Protein Thiol Cross-linking Associated with the Permeabilization of the Inner Mitochondrial Membrane by Ca^{++} plus Prooxidants. *J. Biol. Chem.*, 265:19955-60, 1990). The reversibility of these alterations is very important because this mechanism may be involved in both mitochondrial and cell viability. The involvement of H^{+} -ATP- synthase in this mitochondrial damage, caused by oxidative stress in the presence or absence of Ca^{++} , was also investigated.

The permeabilization of the mitochondrial inner membrane was monitored as a function of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$). Our results showed that the addition of EGTA or DTT to mitochondrial preparations treated with Ca^{++} plus oxidants after $\Delta\psi$ dissipation was able to restore the membrane potential. However, this potential could not be sustained for very long. Simultaneous addition of EGTA and DTT restored both the magnitude and the maintenance of $\Delta\psi$. The addition of these reagents 12 minutes after $\Delta\psi$ dissipation

was unable to restore the potential.

The reversibility of membrane protein aggregates was investigated by SDS-PAGE. The protein aggregates disappeared when DTT or both DTT and EGTA were added, but not when only EGTA was added. The same electrophoretic patterns were obtained when the reagents were added 12 minutes after the $\Delta\psi$ dissipation.

It is suggested that mitochondria become susceptible or partially permeable when oxidants interact with membrane proteins and that Ca^{++} can cause a reversible permeabilization. After a period of time, the reversibility of the process is lost due to the appearance of additional membrane damage, probably lipoperoxidation.

The ATP hydrolytic activity of H^+ -ATP-synthase was not impaired when submitochondrial particles of beef heart were treated with Ca^{++} and/or oxidants.

We conclude that Ca^{++} plus oxidants uncouple the energy transduction in mitochondria by causing damage to their membranes and not by acting on the H^+ -ATP-synthase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- AL-NASSER, I. & CROMPTON, M. The reversible Ca^{++} -induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Biochem.J.*, 239:19-29, 1986.
- BAUMHUTER, S. & RICHTER, C. The hydroperoxide-induced release of mitochondrial calcium occurs via a distinct pathway and leaves mitochondria intact. *FEBS Lett.*, 148:271-5, 1982.
- BEATRICE, M.C.; PALMER, J.W. & PFEIFFER, D.R. The Relationship between Mitochondrial Membrane Permeability, Membrane Potential, and the Retention of Ca^{++} by Mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 255:8663-71, 1980.
- BEATRICE, M.C.; STIERS, D.L. & PFEIFFER, D.R. Increased Permeability of Mitochondria during Ca^{++} Release Induced by t-Butyl Hydroperoxide or Oxalacetate. The effect of Ruthenium Red. *J.Biol.Chem.*, 257:7161-71, 1982.
- BEATRICE, M.C.; STIERS, D.L. & PFEIFFER, D.R. The Role of Glutathione in the Retention of Ca^{++} by Liver Mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 259:1279-87, 1984.
- BELLOMO, G.; JEWELL, S.A. & ORRENIUS, S. The Metabolism of Menadione Impairs the Ability of Rat Liver Mitochondria to Take up and Retain Calcium. *J.Biol.Chem.*, 257:11558-62, 1982a.
- 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*, 79:6842-46, 1982b.
- BELLOMO, G.; MARTINO, A.; RICHELMI, P.; MOORE, G.A.; JEWELL, S.A. & ORRENIUS, S. Pyridine-nucleotide oxidation, Ca^{++} cycling and membrane damage during tert-butyl hydroperoxide metabolism by rat-liver mitochondria. *Eur.J.Biochem.*, 140:1-6, 1984.

- BERNARDES, C.F.; PEREIRA DA SILVA, L. & VERCESI, A.E. t-Butylhydroperoxide-induced Ca^{++} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{++} and ATP. **Biochim.Biophys.Acta**, 850:41-8, 1986.
- BERRIDGE, M.J. & IRVINE, R.F. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature**, 312:315-21, 1984.
- BINDOLI, A. Lipid peroxidation in mitochondria. **Free Rad.Biol.Med.**, 5:247-61, 1988.
- BLACKMORE, P.F.; LYNCH, C.J.; BOCCKINO, S.B. & EXTON, J.H. Regulation of hepatic glycogenolysis by calcium-mobilizing hormones. In: FISKUM, G., ed. **Cell Calcium Metabolism**. New York, Plenum Press, 1989. pp.179-85.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8:93-9, 1987.
- BOYER, P.D. A Perspective of the Binding Change Mechanism for ATP Synthesis. **FASEB J.**, 3:2164-78, 1989.
- CAMPBELL, A.K. The pathology and pharmacology of intracellular Ca^{++} . In: **Intracellular calcium: its universal role as regulator**. London, John Wiley & Sons Ltda., 1983. pp.393-454.
- CARAFOLI, E. Intracellular Calcium Homeostasis. **Ann.Rev.Biochem.**, 56:395-433, 1987.
- CARONERA, D.; ANGRILLI, A. & AZZONE, G.F. Mechanism of nitrofurantoin toxicity and oxidative stress in mitochondria. **Biochim.Biophys.Acta**, 936:139-47, 1988.
- CARONERA, D. & AZZONE, G.F. Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress. **Biochim.Biophys.Acta**, 943:245-55, 1988.
- CHANCE, B. & OSHINO, N. Kinetics and Mechanisms of Catalase in Peroxisomes of Mitochondrial Fraction. **Biochem.J.**, 122:225-33, 1971.

- CROMPTON, M.; COSTI, A. & HAYAT, L. Evidence for the presence of a reversible Ca^{++} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. **Biochem.J.**, 245:915-8, 1987.
- CROMPTON, M. & COSTI, A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{++} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{++} overload. **Eur.J.Biochem.**, 178:489-501, 1988.
- DE MEIS, L.; MARTINS, O.B. & ALVES, E.W. Role of Water, Hydrogen Ion, and Temperature on the Synthesis of Adenosine Triphosphate by the Sarcoplasmic Reticulum Adenosine Triphosphatase in the Absence of a Calcium Ion Gradient. **Biochemistry**, 19:4252-61, 1980.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metal and ligands used for experiments in skinned muscle cells. **J.Physiol.Paris**, 75:463-505, 1979.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DA-SILVA, L. & VERCESI, A.E. Inhibition of oxidative phosphorylation by Ca^{++} or Sr^{++} : a competition with Mg^{++} for the formation of adenine nucleotide complexes. **Biochim.Biophys.Acta**, 852:262-8, 1986.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA DA SILVA, L.; MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. Membrane Protein Thiol Cross-linking Associated with the Permeabilization of the Inner Mitochondrial Membrane by Ca^{++} plus Prooxidants. **J.Biol.Chem.**, 265:19955-60, 1990.
- FARBER, J.L. The role of calcium in cell death. **Life Sci.**, 29:1289-95, 1981.
- GÓMEZ-PUYOU, A.; TUENA DE GÓMEZ PUYOU, M. & DE MEIS, L. Synthesis of ATP by Soluble Mitochondrial F_1 -ATFase and F_1 -Inhibitor-Protein Complex in the Presence of Organic Solvents. **Eur.J.Biochem.**, 196:1-8, 1986.
- GORNAL, A.G.; BARDWILL, C.J. & DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **J.Biol.Chem.**, 177:751, 1949.

- GRINDEY, G.B. & NICHOL, C.A. Micro procedure for determination of pyrophosphate and orthophosphate. *Anal. Biochem.*, 33:114-9, 1970.
- GUNTER, T.E. & PFEIFFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am.J.Physiol.*, 258:C755-86, 1990.
- HARRIS, E.J.; AL-SHAIKHLY, M. & BAUM, H. Stimulation of Mitochondrial Calcium Ion Efflux by Thiol-Specific Reagents and by Thyroxine. The Relationship to Adenosine Diphosphate Retention and to Mitochondrial Permeability. *Biochem.J.*, 182:455-64, 1979.
- HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu.Rev.Biochem.*, 54:1015-69, 1985.
- HAWORTH, R.A. & HUNTER, D.R. The Ca⁺⁺ -Induced Membrane Transition in Mitochondria. II. Nature of the Ca⁺⁺ Trigger Site. *Arch.Biochem.Biophys.*, 195:460-7, 1979.
- HERMES-LIMA, M.; VALLE, V.G.R.; VERCESI, A.E. & BECHARA, E.J.H. Damage to rat liver mitochondria promoted by 5-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim.Biophys.Acta*, 1056:57-63, 1991.
- HERMES-LIMA, M.; VALLE, V.G.R.; BECHARA, E.J.H. & VERCESI, A.E. Aerobic oxidation of 5-aminolevulinic acid induces Ca⁺⁺ -dependent mitochondrial oxidative stress: connections with acute intermittent porphyria. (a, submetido).
- HERMES-LIMA, M.; VERCESI, A.E.; VALLE, V.G.R.; BECHARA, E.J.H. & VERRESCHI, M. How reactive oxygen species generated by 5-aminolevulinic acid aerobic oxidation induce Ca⁺⁺ -dependent damage to mitochondria? (b, submetido).
- HERS, H.G. & HUE, L. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann.Rev.Biochem.*, 52:617-53, 1983.
- HOPPE, J. & SEBALD, W. The proton conducting Fo-part of bacterial ATP synthase. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1768:1-27, 1984.

- HUANG, Y.; PRINGLE, M.J. & SANADI, D.R. Diamide blocks H⁺ conductance in mitochondrial H⁺ -ATPase by oxidizing FB dithiol. *FEBS Lett.*, 192:83-7, 1985.

- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. & SOUTHARD, J.H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 251:5069-77, 1976.

- HUNTER, D.R. & HAWORTH, R.A. The Ca⁺⁺ -Induced Membrane Transition in Mitochondria. I. The Protective Mechanisms. *Arch.Biochem.Biophys.*, 195:453-9, 1979.

- HUNTER, D.R. & HAWORTH, R.A. The Ca⁺⁺ -Induced Membrane Transition in Mitochondria. III. Transition Ca⁺⁺ Release. *Arch.Biochem.Biophys.*, 195:468-77, 1979.

- INESI, G.; KURZMACK, M.; COAN, C. & LEWIS, D.E. Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J.Biol.Chem.*, 255:3025-31, 1980.

- JENSEN, B.D.; GUNTER, K.K. & GUNTER, T.E. The efficiencies of the component steps of oxidative phosphorylation. II. Experimental determination of the efficiencies in mitochondria and examination of the equivalence of membrane potential and pH gradient in phosphorylation. *Arch.Biochem.Biophys.*, 248:305-23, 1986.

- JENSEN, R.T. & GARDNER, J.D. Structure-function studies of agonists and antagonists for gastrointestinal peptide receptors on pancreatic acinar cells. In: MOODY, T.W., ed. - *Neural and Endocrine Peptides and Receptors*. New York, Plenum Press, 1986. pp.485-500.

- JOSEPH, S.K. & WILLIAMSON, J.R. Inositol polyphosphates and intracellular calcium release. *Arch.Biochem.Biophys.*, 273:1-15, 1989.

- KAMO, N.; MURATSUGU, M.; HONGOH, 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.Memb.Biol.*, 49:105-21, 1979.

- KANDEL, E.R. Factors Controlling Transmitter Release. In: KANDEL, E.R. & SCHWARTZ, J.H., eds. - **Principles of Neural Science**. New York, Elsevier, 1985. pp.108-31.
- KANDPAL, R.P.; STEMPEL, K.E. & BOYER, P.D. Characteristics of the Formation of Enzyme-Bound ATP from Medium Inorganic Phosphate by Mitochondrial F₁ Adenosine Triphosphatase in the Presence of Dimethyl Sulfoxide. **Biochemistry**, **26**:1512-17, 1987.
- KAPPUS, H. Lipid Peroxidation: Mechanisms, Analysis, Enzymology and Biological Relevance. In: SIES, H., ed. **Oxidative Stress**. London, Academic Press, 1985. pp.273-310.
- KOSOWER, E.M. & KOSOWER, N.S. Lest I Forget Thee, Glutathione... **Nature**, **224**:117-20, 1969.
- KURANTSIN-MILLS, J. & LESSIN, L.S. Aggregation of Intramembrane Particles in Erythrocyte Membranes Treated with Diamide. **Biochim.Biophys.Acta**, **641**:129-37, 1981.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-5, 1970.
- LEE, C.P. & ERNSTER, L. Energy-Coupling in Nonphosphorylating Submitochondrial Particles. **Methods Enzymol.**, **10**:543-8, 1967.
- LEHNINGER, A.L.; VERCESI, A.E. & BABABUNMI, E.A. Regulation of Ca⁺⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **75**:1690-4, 1978.
- LIPPE, G.; SALA, F.D. & SORGATO, M.C. ATP Synthase Complex from Beef Heart Mitochondria. Role of the thiol group of the 25-kDa subunit of F_o in the coupling mechanism. **J.Biol.Chem.**, **263**:18627-34, 1988.
- LIU, S.-C.; FAIRBANKS, G. & PALEK, J. Spontaneous, reversible protein cross-linking in the human erythrocyte membrane. Temperature and pH dependence. **Biochemistry**, **16**:4066-74, 1977.

- LÖTSCHER, 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.USA*, **76**:4340-4, 1979.
- LÖTSCHER, H.R.; WINTERHALTER, K.H.; CARAFOLI, E. & RICHTER, C. Hydroperoxide-induced Loss of Pyridine Nucleotides and Release of Calcium from Rat Liver Mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **255**:9325-30, 1980.
- LOW, H. & VALLIN, J. Succinate-Linked DPN reduction in Submitochondrial Particles. *Biochim.Biophys.Acta*, **69**:361-74, 1963.
- LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, **193**:265-75, 1951.
- MACEDO, D.V.; FERRAZ, V.L.; PEREIRA-DA-SILVA, L. & VERCESI, A.E. Ca⁺⁺ -dependent NAD(P)⁺ -induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. In: Le MASTER, J.J. et al, eds. *Integration of Mitochondrial Functions*. New York, Plenum Press, 1988. pp.535-42.
- MALIS, C.D. & BONVENTRE, V. Susceptibility of Mitochondrial Membranes to Calcium and Reactive Oxygen Species: Implications for Ischemic and Toxic Tissue Damage. In: *Biological Membranes: Aberrations in Membrane Structure and Functions*. Alan R. Liss Inc., 1988. pp.235-59.
- McCORMACK, J.G. & DENTON, R.M. Calcium ions, hormones, and mammalian oxidative metabolism. In: FISKUM, G.,ed. *Cell Calcium Metabolism*. New York, Plenum Press, 1989. pp.387-96.
- McMILLIN, J.B.; FAULY, D.F. & KAJIYAMA, K. Ischemic Alterations in Mitochondrial Calcium Transport Kinetics. In: FISKUM, G., ed. *Cell Calcium Metabolism*. New York, Plenum Press, 1989. pp.561-70.
- MINOTTI, G. & AUST, S.D. The Requirement for Iron(III) in the Initiation of Lipid Peroxidation by Iron(II) and Hydrogen Peroxide. *J.Biol.Chem.*, **262**:1098-104, 1987.

- MOORE, G.A.; JEWELL, S.A.; BELLOMO, G. & ORRENIUS, S. On the relationship between Ca⁺⁺ efflux and membrane damage during t-butylhydroperoxide metabolism by liver mitochondria. *FEBS Lett.*, **153**:289-92, 1983.
- MOVSESIAN, M.A. Calcium Physiology in Smooth Muscle. *Progr.Cardiov.Dis.*, **25**:211-24, 1982.
- MURATSUGU, M.; KAMO, N.; KURIKARA, K. & KOBATAKE, Y. Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of membrane potential in biological systems. *Biochim.Biophys.Acta*, **484**:613-9, 1977.
- NICOTERA, P.; McCONKEY, D.J.; JONES, D.P. & ORRENIUS, S. ATP stimulates Ca⁺⁺ uptake and increases the free Ca⁺⁺ concentration in isolated rat liver nuclei. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **86**:453-57, 1989.
- NICOTERA, P.; ORRENIUS, S.; NILSSON, T. & BERGGREN, P.O. An inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca⁺⁺ pool in liver nuclei. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **87**:6858-62, 1990.
- PILKIS, S.J.; FOX, E.; WOLFE, L.; ROTHBARTH, L.; COLOSIA, A.; STEWART, H.B. & EL-MAGHRABI, M.R. Hormonal modulation of key hepatic regulatory enzymes in the gluconeogenic/glycolytic pathway. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **478**:1-19, 1986.
- RICHTER, C. & FREI, B. Ca⁺⁺ -release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Radical Biol.Med.*, **4**:365-75, 1988.
- RUGOLO, M.; SILIPRANDI, D.; SILIPRANDI, N. & TONINELLO, A. Parallel efflux of Ca⁺⁺ and Pi in energized rat liver mitochondria. *Biochem.J.*, **200**:481-6, 1981.
- SAMUELSSON, B. Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation. *Science*, **220**:568-75, 1983.
- SCHNEIDER, W.C. & HOGEBROOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J.Biol.Chem.*, **183**: 123-8, 1950.

- SENIOR, A.E. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol.Rev.*, 68:172-231, 1988.
- SELWYN, M.J. Preparation and General Properties of a Soluble Adenosine Triphosphatase from Mitochondria. *Biochem.J.*, 105:279-88, 1967.
- SILIPRANDI, D.; TONINELLO, A.; ZOCCARATO, F.; RUGOLO, M. & SILIPRANDI, N. Synergic action of calcium ions and diamide on mitochondrial swelling. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 66:956-61, 1975.
- STIGGALL, D.L.; GALANTE, Y.M. & HATEFI, Y. Preparation and Properties of an ATP-Pi Exchange Complex (Complex V) from Bovine Heart Mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 253:956-64, 1978.
- STIGGALL, D.L.; GALANTE, Y.M. & HATEFI, Y. Preparation and Properties of Complex V. *Methods Enzymol.*, 55:308-15, 1979.
- VERCESI, A.E.; REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of H⁺ Ejection and Ca⁺⁺ Uptake Coupled to Electron Transport in Rat Liver Mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 253:6379-85, 1978.
- VERCESI, A.E. Sequence of events in Ca⁺⁺ efflux induced by the oxidized steady state of mitochondrial NAD(P). ASBC Meeting Abstract, St.Louis, Missouri, USA, 1981.
- VERCESI, A.E. Possible Participation of Membrane Thiol Groups on the Mecanism of NAD(P)⁺ -Stimulated Ca⁺⁺ Efflux from Mitochondria. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 119:305-10, 1984.
- VERCESI, A.E.; FERRAZ, V.L.; MACEDO, D.V. & FISKUM, G. Ca⁺⁺ dependent NAD(P)⁺ -induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 154:934-41, 1988.
- VERCESI, A.E.; HERMES-LIMA, M.; MEYER-FERNANDES, J.R. & VIEYRA, A. Calcium inhibition of the ATP \leftrightarrow [32P]Pi exchange and of net ATP synthesis catalyzed by bovine submitochondrial particles. *Biochim.Biophys.Acta*, 856: 101-6, 1990.

- VONAKIS, B.M. & VANDERHOEK, J.Y. Role of calcium in the regulation of mammalian lipoxygenases. In: FISKUM, G., ed. **Cell Calcium Metabolism**. New York, Plenum Press, 1989. pp.387-96.

- YAGI, T. & HATEFI, Y. Thiols in Oxidative Phosphorylation: Inhibition and Energy-Potentiated Uncoupling by Monothiol and Dithiol Modifiers. **Biochemistry**, 23:2449-55, 1984.

- ZANOTTI, F.; GUERRIERI, F.; SCARFÒ, R.; BERDEN, J. & FAPA, S. Effect of diamide on proton translocation by the mitochondrial H^+ -ATPase. **Biochem.Biophys.ResCommun.**, 132:985-90, 1985.