



Maria de Fátima [Nepomuceno] 352

ESTUDO DA PEROXIDAÇÃO EM MITOCONDRIAS DURANTE A INDUÇÃO DE
ALTERAÇÕES DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA INTERNA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida por (a) candidato (a)
Maria de Fátima Nepomuceno
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Curso de Pós
Graduação do Departamento de Bioquímica
-I.B. da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
Doutor em Ciências - área de Bioquímica.

ORIENTADORA: Profa Dra. Lúcia Pereira da Silva

Campinas- 1994

AGRADECIMENTOS

A profa. Dra. Lucia Pereira-da-Silva, pela orientação segura e confiança em mim depositada, meu sincero agradecimento.

A profa. Dra. Denise Vaz de Macedo atenção pela contínua, sugestões, discussões e trabalhos conjuntos, agradeço de forma especial.

Ao Dr. Antonio Alonso pela ajuda na parte experimental, pela leitura, correções e sugestões na etapa final

A profa. Dra. Nora Marcela Haun e profa. Dra. Satie Ogo pela leitura, críticas e sugestões.

Ao Paulo Sérgio Dédalo pela ajuda na elaboração das figuras e apoio constante.

A Regina Rosseto pelo apoio técnico no início deste trabalho.

A Dona Cair pelo apoio técnico, atenção e amizade.

A Ana Célia Ruggiero, pelas múltiplas conversas, troca de idéias e sobretudo pela companhia que tornou as viagens mais amenas e agradáveis.

As funcionárias da Secretaria Mirian, Marina e secretária da Pós-graduação Andréia pela atenção dispensada.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia pela atenção e colaboração.

Aos colegas da pós-graduação em Bioquímica.

Aos meus alunos da Universidade Metodista de Piracicaba, estímulo constante na busca do saber.

INDICE

I. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A geração de espécies ativas de oxigênio na mitocôndria e o estresse oxidativo decorrente.....	03
1.2 O processo de peroxidação lipídica em mitocôndrias induzido por hidroperóxidos.....	08
1.3 A transição da permeabilidade mitocondrial	13
1.4 Atuação de hidroperóxidos na transição de permeabilidade da membrana mitocondrial e a ocorrência de lipoperoxidação.....	15
1.5 A ocorrência de peroxidação lipídica e alterações no estado físico da membrana	20
II. OBJETIVOS.....	23
III. MATERIAIS E METODOS.....	24
3.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato	24
3.2 A preparação de mitoplastos.....	25
3.3 Dosagem de proteínas Mitocondriais.....	25
3.4 Meios de reação e condições de incubação.....	26
3.5 Determinação espectrofluorimétrica da ocorrência de lipoperoxidação pela formação de TBARS.....	25
3.6 Determinação de variação de volume mitocondrial.	27
3.7 Determinação do consumo de oxigênio.....	30
3.8 Determinação de fluidez da membrana mitocondrial pelo método do marcador de spin em ressonância paramagnética.....	31
3.9 Reagentes empregados.....	34
IV RESULTADOS.....	35
4.1 Ocorrência de peroxidação lipídica.....	35

..4.2 Efeitos do Ca^{2+} e fosfato sobre a peroxidação lipídica induzida por t- BuOOH.....	35
..4.3 Correlação entre ocorrência de peroxidação lipídica e inchamento mitocondrial.....	40
4.4 Efeito de EGTA e BHT nos processos de peroxidação lipídica e inchamento mitocondrial... ..	42
4.5 O possível papel do cálcio no processo de peroxidação lipídica	44
4.6 Efeito do vermelho de rutênio (V.R.) sobre a peroxidação lipídica e o aumento da permeabilidade mitocondrial induzido por t -BuOOH.....	48
4.7 Ação do ADP e carboxiatractilato (CAT) sobre a peroxidação lipídica e o aumento da permeabilidade mitocondrial.....	50
..4.8 Ação da ciclosporina-A e trifluoperazina sobre o aumento de permeabilidade e ocorrência de lipoperoxidação.....	52
..4.9 Alterações no estado físico das membranas mitocondriais	56
5.0 DISCUSSÃO.....	62
6.0 RESUMO.....	82
7.0 SUMMARY.....	84
8.0 BIBLIOGRAFIA.....	86
9.0 COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS.....	100
Trabalhos publicados	

A B R E V I A T U R A S

AA	- Antimicina-A.
ADP	- Difosfato de adenosina
ANT	- Translocase de nucleotídeos de adenina
ATP	- Trifosfato de adenosina
ATR	- Atractilosídeo
BHT	- Butil hidroxitolueno
BSA	- Albumina de soro bovino
CAT	- Catalase
CuOOH	- Hidroperóxido de cumeno
CsA	- Ciclosporina A
EDTA	- Ácido etileno B.diamino tetracético.
EGTA	- Ácido etileno glicol Bis (B amino etil éter) NN' tetraacético.
CAT	- Carboxiatractilosídeo
RPE	- Resonância paramagnética eletrônica
GSH	- Glutathiona reduzida
GSSG	- Glutathiona oxidada
GSHPx	- Glutathiona peroxidase
MDA	- Malondialdeído.
MFR	- Mitocôndria de fígado de rato.
NAD	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.
OLIGO	- Oligomicina
SOD	- Superóxido dismutase

SDS	- Dodecil sulfato de sódio.
PHGPX	- fosfolipídeo hidroperóxido glutationala peroxidase
Pi	- Fosfato
TBA	- Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BuOOH	- hidroperóxido de t-butila
TFP	- trifluoperazina.

I N T R O D U Ç Ã O

As mitocôndrias apresentam duas membranas, uma interna e outra externa que diferem entre si na composição lipídica e proteica. A membrana mitocondrial interna é rica em proteínas envolvidas no metabolismo celular, que correspondem a cerca de 80% dos componentes dessa membrana e atuam como canais iônicos (Halliwell e Gutteridge, 1989). A composição lipídica varia conforme o tecido, porém destaca-se a alta porcentagem de cardiolipina e pequena quantidade de esteróis e esfingolipídios. Os fosfolipídios mais abundantes são a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, que juntos perfazem cerca de 70% do total, enquanto a cardiolipina representa cerca de 20% (Strickland e Benson, 1960; Zambrano et alii, 1975). Com relação a composição dos ácidos graxos presentes nos fosfolipídios da membrana mitocondrial interna, aproximadamente 50% correspondem a ácidos graxos insaturados sendo os ácidos linoleico, linolênico e araquidônico os que ocorrem em maior quantidade (Hoch et alii, 1981; Palmer et alii, 1981). Já com relação à cardiolipina, esta apresenta 90% de ácidos graxos poliinsaturados, (Bindoli, 1988).

Na extensa revisão apresentada por Daum, (1985) está descrita a participação dos lipídios nas funções mitocondriais, entre as quais: (1) influência na estabilidade e comportamento osmótico das mitocôndrias; (2) na permeabilidade e nos processos de transporte de metabólitos e íons; (3) na síntese e transporte de

proteínas através das membranas; (4) na estrutura física das membranas através de interações lipídeo-proteína e (5) na atividade de enzimas mitocondriais "in vivo" e "in vitro". Como consequência do envolvimento dos lipídios das membranas mitocondriais nesses mecanismos, processos de degradação ou de peroxidação devem levar a profundas alterações funcionais nessas organelas (Vladimirov et alii, 1980).

A degradação de fosfolipídios é promovida por fosfolipases, (EC 3.1.1.4), presentes nas mitocôndrias e ativadas por Ca^{2+} (Van den Bosch, 1982; Beatrice et alii, 1984). O processo de peroxidação lipídica ocorre devido a um ataque de radicais livres aos ácidos graxos poliinsaturados presentes nos fosfolipídios da membrana e que, devido às insaturações são especialmente alvo do ataque de espécies radicalares (Bindoli, 1988; Carbonera e Azzone, 1988; Halliwell e Gutteridge, 1989).

Dados da literatura referem-se frequentemente a sais de ferro como iniciadores do processo de lipoperoxidação (Vladimirov et alii, 1980; Masini et alii, 1985), porém a presença de hidroperóxidos orgânicos tem sido também indicada como desencadeadora do processo peroxidativo "in vitro" (Bindoli e Cavalini, 1982; Marshansky et alii, 1983; Kennedy e Pryor, 1986; Kennedy et alii, 1992; Radi et alii, 1993). Estes apresentam características químicas semelhantes às do peróxido de hidrogênio (gerado pela redução monovalente do oxigênio molecular na mitocôndria), e não são decompostos pela catalase (EC 1.11.1.6) que geralmente contamina as preparações mitocondriais (Kennedy e

Pryor, 1986).

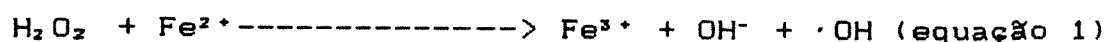
Paralelamente, vários grupos tem buscado uma possível correlação do processo de lipoperoxidação com alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, e subsequente liberação de íons previamente acumulados (Augustin et alii, 1979; Marshansky et alii, 1983; Marshansky e Yaguzchinsky, 1986; Carbonera e Azzone, 1988; Novgorodov et alii, 1989).

A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA MITOCONDRIA E O ESTRESSE OXIDATIVO DECORRENTE.

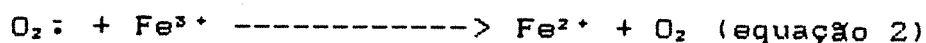
A mitocôndria é uma importante fonte de geração de espécies reativas de oxigênio, pois de 1 a 2% do oxigênio molecular consumido por esta organela no estado 4 da respiração é reduzido de forma univalente. Isto ocorre devido ao vazamento de elétrons em sítios distintos da cadeia de transporte de elétrons, com formação do radical ânion superóxido (O_2^-) e subsequentemente do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estes dois sítios foram identificados a nível de semiubiquinona (coenzima Q) e da enzima NADH desidrogenase (EC 1.6.5.3) (Forman e Boveris, 1982). Desta forma a membrana interna mitocondrial tem sido apontada como alvo do estresse oxidativo devido à geração contínua do radical ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso por apresentar grandes concentrações de metaloproteínas estas podem reagir com o peróxido de hidrogênio e geram espécies capazes de oxidar várias moléculas orgânicas, entre elas,

lipídios e proteínas de membrana (Forman e Boveris, 1982; Radi et alii, 1993). Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), a geração dessas espécies levam à formação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), a mais agressiva das espécies ativas de oxigênio, e de vida extremamente curta. Consequentemente o radical hidroxila reage praticamente com todos os compostos orgânicos, oxidando compostos sulfidrilícos, degradando ácidos nucleicos e causando a peroxidação lipídica.

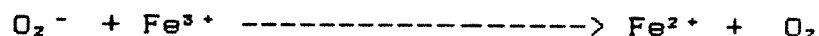
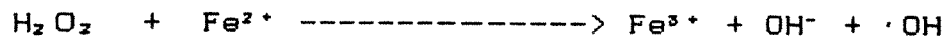
Metais de transição como o ferro e cobre (por poderem doar ou aceitar elétrons no seu trânsito de um estado de valência para o outro) podem catalisar a decomposição de peróxidos. A formação do radical hidroxila pode ocorrer através da reação de Fe^{2+} ou Cu^+ com o peróxido de hidrogênio, conforme está mostrado na equação 1, que representa a equação de Fenton. Nesta reação o radical hidroxila é formado diretamente pela redução monoelétrica do H_2O_2 , catalisada por Fe^{2+} .



O Fe^{3+} formado é reduzido novamente a Fe^{2+} , por transferência de elétron do radical superóxido, conforme indicado na equação 2, fundamental para repor o "pool" do estado ferroso.



A reação de Haber-Weiss (equação 3) é um balanço das equações 1 e 2.



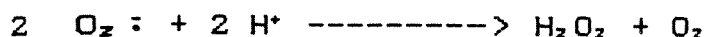
Peróxidos orgânicos também apresentam as reações de Fenton e Haber-Weiss, sendo o radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$) e o radical alcóxil ($\text{RO}\cdot$) os seus respectivos produtos (Cadenas e Sies, 1982, Halliwell, 1988-b).

O estresse oxidativo é considerado como uma situação de desequilíbrio entre os sistemas que estimulam a geração de espécies ativas e os sistemas protetores, que previnem a ação dos mesmos (Sies, 1986). Da mesma forma que no processo evolutivo grande parte dos seres vivos incorporaram o oxigênio como componente fundamental no processo de produção de energia a partir dos componentes orgânicos, desenvolveram também uma série de defesas em relação à sua ação deletéria (Meneghini, 1987).

As enzimas superóxido dismutase (EC 1.15.1.9), catalase (EC 1.11.1.6) e a glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.a) são fundamentais na defesa anti-oxidante das células. A enzima superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima, faz a dismutação do

radical superóxido, gerando peróxido de hidrogênio mais oxigênio molecular, conforme reação indicada a seguir:

SOD



Dois tipos de enzimas removem o peróxido de hidrogênio do interior da célula: a catalase e a glutathione peroxidase. A catalase é amplamente distribuída nos animais e está especialmente concentrada nos eritrócitos e fígado sendo neste último encontrada no interior de estruturas citoplasmáticas denominadas peroxissomas (Forman e Boveris, 1982). Ela decompõe o peróxido de hidrogênio, catalizando a seguinte reação:

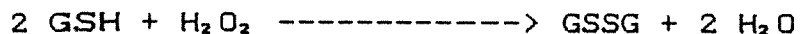
CAT



A presença de catalase em mitocôndrias de coração foi mostrada recentemente por Radi et alii (1991), indicando o papel crítico desta enzima na decomposição do peróxido de hidrogênio neste órgão.

Já a glutathione peroxidase (GSHPx), que é uma enzima dependente de selênio, e está presente tanto no interior da mitocôndria quanto no citossol, cataliza a redução do peróxido de hidrogênio às expensas da forma reduzida do tripeptídeo glutathione (GSH) que passa à forma oxidada (GSSG), segundo a reação:

GSHPx



A glutathiona oxidada é reduzida novamente através da enzima glutathiona redutase (EC 1.6.4.2), tendo NADPH como doador dos equivalentes redutores.

Mais recentemente, a enzima fosfolipídio hidroperóxido glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9) (PHGPx) foi identificada na membrana mitocondrial interna (Panfili et alii, 1991). Esta enzima, que apresenta um caráter estritamente hidrofóbico, está distribuída em diferentes tipos de membrana, sendo eficiente na redução de fosfolípidios hidroperóxidos formados na membrana interna pela peroxidação lipídica decorrente do estresse oxidativo (Thomas et alii, 1990).

Além desses sistemas de defesa enzimáticos, uma série de outras substâncias desempenham papel antioxidante. Dados da literatura apontam a ação antioxidante da vitamina E (alfa-tocoferol) como um sistema protetor para a integridade de membranas. Devido a seu caráter lipofílico, associa-se aos fosfolípidios da membrana e interrompe a ação das espécies reativas de oxigênio ao fornecer às mesmas átomos de hidrogênio impedindo portanto a propagação do processo oxidativo. O radical tocoferil formado pode ser novamente reduzido através da ação do ascorbato ou formar um alfa-tocoferil quinona (Mc Cay, 1985; Halliwell, 1989). Os níveis de Fe^{2+} , que como vimos na

reação de Fenton participa diretamente na produção de radicais hidroxila (Thorstensen e Romslo, 1990) também são mantidos sob controle através da sua ligação às proteínas transferrina e ceruloplasmina.

Em suma, acredita-se que o equilíbrio deve ser mantido entre os sistemas que estimulam a geração de espécies ativas de oxigênio e sistemas protetores que previnem a ação das mesmas. Quando este equilíbrio é rompido devido à depleção dos sistemas antioxidantes ou quando as espécies ativas são geradas em excesso, inicia-se o estresse oxidativo, comprometendo a homeostase dos sistemas celulares (Sies, 1986).

O PROCESSO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM MITOCONDRIAS INDUZIDO POR HIDROPERÓXIDOS.

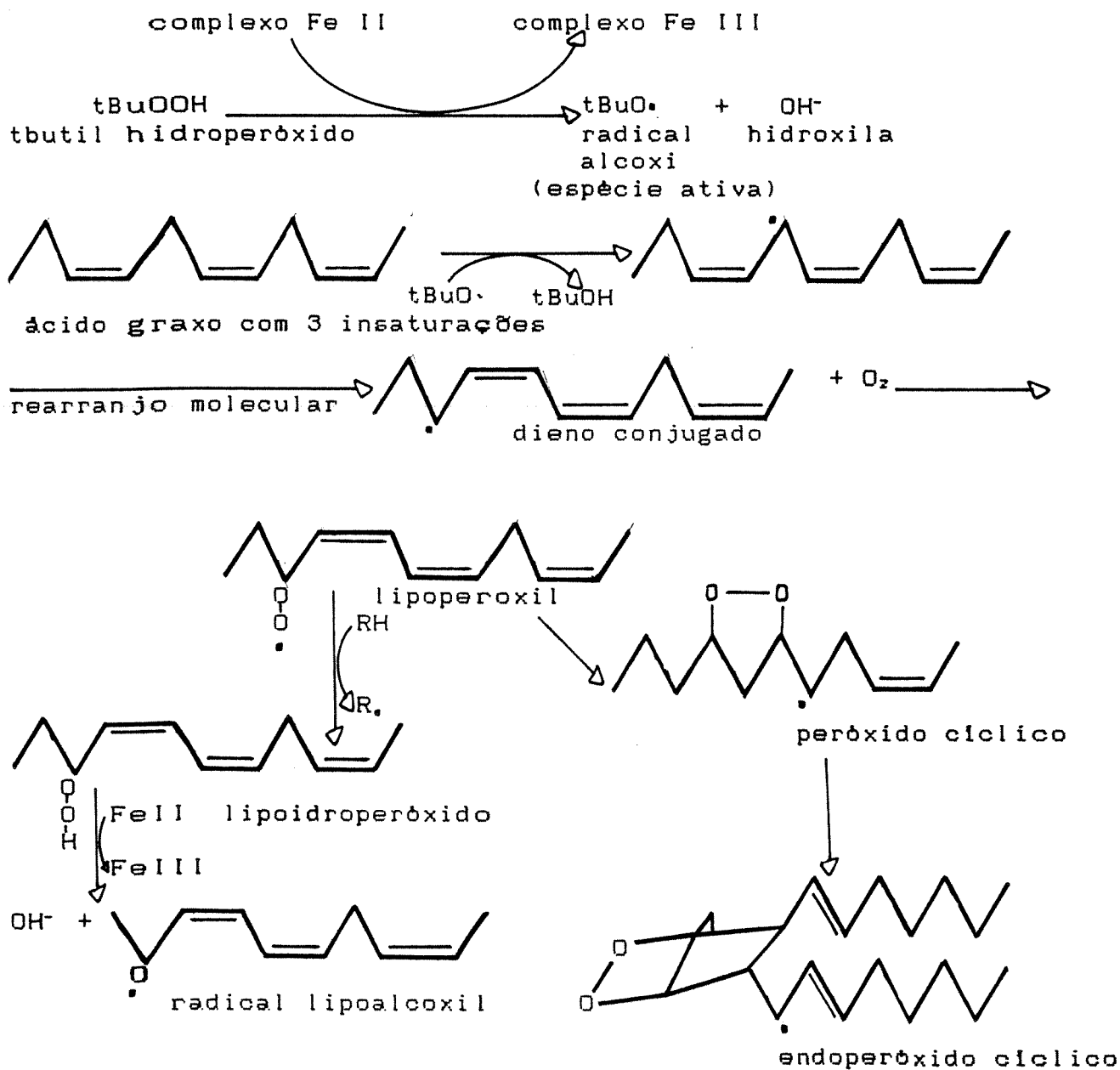
A geração de espécies reativas de oxigênio através de hidroperóxidos dá-se pela cisão homolítica ou heterolítica da ligação O-O do hidroperóxido catalizada por íons metálicos como Fe^{2+} complexado na hemoglobina em eritrócitos, citocromo P 450 em microsossomos e Fe^{2+} e Cu^+ nos citocromos da cadeia respiratória em mitocôndrias (Bindoli, 1988).

Mais recentemente e utilizando o método de marcadores de spin, Kennedy et alii, (1992), sugeriram a participação direta dos citocromos c e c₁ na cisão do t-butil hidroperóxido (t-BuOOH) quando a mitocôndria se encontra no estado 4 da respiração,

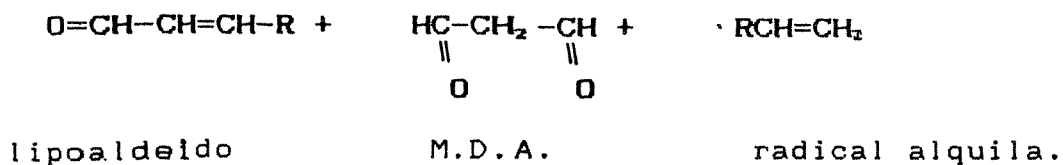
portanto com os componentes da cadeia respiratória predominantemente reduzidos. Devido à baixa velocidade no fluxo de elétrons nestas condições, o hidroperóxido reage predominantemente com os componentes da cadeia respiratória que estão reduzidos. Porém quando o t-BuOOH foi adicionado a preparações mitocondriais com baixo controle respiratório ou na presença de um agente desacoplador, a reação ocorre inicialmente com o centro metálico dos citocromos oxidados sugerindo que o hidroperóxido pode reagir com o citocromo no estado férrico ou ferroso (Kennedy et alii, 1992).

O papel fundamental do citocromo c na peroxidação lipídica de mitoplastos e mitocôndrias de coração e rins de ratos, quando o processo é induzido por hidroperóxidos foi também mostrado por Radi et alii, (1993-b) que observou acentuado decréscimo na produção de TBARS em mitoplastos depletados de citocromo c em condições oxidativas induzidas por H_2O_2 , mostrando ainda que o t-BuOOH devido a sua baixa polaridade, pode interagir com outros citocromos ou proteínas ferro-enxofre presentes de forma mais internizada nas membranas, o que não determinou diferenças significativas na produção de TBARS em mitoplastos intactos ou depletados do citocromo c, quando o processo oxidativo foi induzido por t-BuOOH. Entretanto a incorporação de citocromo c em lipossomos resultou na produção intensa de TBARS quando a preparação foi submetida a ação de hidroperóxidos. Isto indica mais uma vez o papel central de proteínas que contêm ferro no processo de cisão de hidroperóxidos e consequente ocorrência

de peroxidação lipídica (Radi et alii, 1993-a). O processo de peroxidação lipídica induzida por t-BuOOH na presença de um complexo de Fe^{2+} pode ser esquematizado como se segue, de acordo com Halliwell e Gutteridge, 1989.



(fragmentam-se por hidrólise ou aquecimento em aldeídos incluindo malondialdeído (MDA) e produtos polimerizados)



A iniciação da peroxidação lipídica em uma membrana ocorre com o ataque de algumas espécies que são suficientemente reativas para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metilênico de um ácido graxo. Como o átomo de hidrogênio apresenta somente um elétron, o carbono do grupo metilênico fica com um elétron desemparelhado (Halliwell e Gutteridge, 1989), gerando um radical de carbono. Este tende a se estabilizar por um rearranjo molecular que produz um dieno conjugado, o qual reage facilmente com o oxigênio molecular gerando um radical lipoperoxil. Este, por sua vez, retira um átomo de hidrogênio de uma ponte metilênica de outro ácido graxo, sendo este o estágio de propagação da peroxidação lipídica. Então, uma vez que o processo se iniciou ele tende a continuar. O radical peróxido combina com um átomo de hidrogênio gerando um lipídio hidroperóxido. Outra possibilidade é a geração de hidroperóxidos cíclicos. Estes sofrem nova ação de íons metálicos, formando radical lipoperoxil que fragmenta-se em estruturas menores como lipoaldeído, radicais alquila e malondialdeído (Kappus, 1985, Halliwell e Gutteridge, 1989).

Uma característica relevante da lipoperoxidação mitocondrial induzida por hidroperóxido é a sua aparente independência de ferro livre, já que a presença da EDTA, um agente quelante deste íon, não inibe o processo (Bindoli, 1988). Porém os trabalhos de Kennedy et alii (1986) indicam que a presença de EDTA reduz a geração de espécies ativas formadas na presença de t-BuOOH.

Sabe-se também que a mitocôndria apresenta ferro endógeno estimado aproximadamente em 4 nmol/mg de proteínas e que 30% deste "pool" não está ligado ao grupo heme ou ao centro Fe - S de proteínas da cadeia respiratória. Segundo Tangeras (1983), este ferro não ligado, em condições apropriadas, pode induzir lipoperoxidação. Porém quando a suspensão mitocondrial foi aquecida antes da adição do hidroperóxido, a produção de espécies radicalares sofreu significativa diminuição, indicando que hidroperóxidos reagem com componentes mitocondriais sensíveis ao aquecimento (Kennedy et alii, 1992).

Os hidroperóxidos fazem parte do variado grupo de compostos que são capazes de promover a permeabilização da membrana interna de mitocôndrias previamente carregadas com Ca^{2+} (Richter e Frei, 1988). Assim sendo, grande parte do interesse direcionado à ação de hidroperóxidos envolve a atuação destes na permeabilização da membrana mitocondrial interna.

A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

Diferentes graus de alteração na permeabilidade mitocondrial podem ser induzidos por vários compostos conhecidos como agentes liberadores de Ca^{2+} e a literatura enumera cerca de 65 compostos capazes de desencadear esse processo de permeabilização, entre eles P_i (fosfato) e hidroperóxidos (Gunter e Pfeiffer, 1990).

Como esses agentes possuem propriedades químicas muito

variadas, tem sido questionado se compartilham ou não o mesmo mecanismo de ação. Vários grupos apresentaram evidências de que quando mitocôndrias são expostas a altas concentrações de Ca^{2+} , na presença destes agentes, ocorre a abertura de um poro (Hunter e Haworth, 1979; Crompton e Costi, 1988; Gunter e Pfeiffer, 1990; Szabo e Zoratti, 1992; Crompton et alii, 1992), que seria o responsável por esse fenômeno conhecido como transição de permeabilidade, por ser reversível através da retirada do Ca^{2+} .

Várias propostas foram feitas na tentativa de explicar a transição de permeabilidade, sendo que atualmente há um consenso que o sistema é modulado por um poro inespecífico, cuja abertura está diretamente relacionada à ligação de Ca^{2+} a sítios internos da membrana interna (Gunter e Pfeiffer, 1990, Novgorodov et alii, 1990; 1991-b, Bernardi et alii, 1993). Este mecanismo tem sido apontado como a base do dano mitocondrial observado em situações patológicas como a isquemia e a reoxigenação pós-isquêmica. Nesta situação ocorre uma sobrecarga de Ca^{2+} nas mitocôndrias, associada a alta concentração de fosfato, depleção de ATP e estresse oxidativo, que culmina com a perda da homeostase celular (Crompton e Costi, 1988, Richter e Kass, 1991).

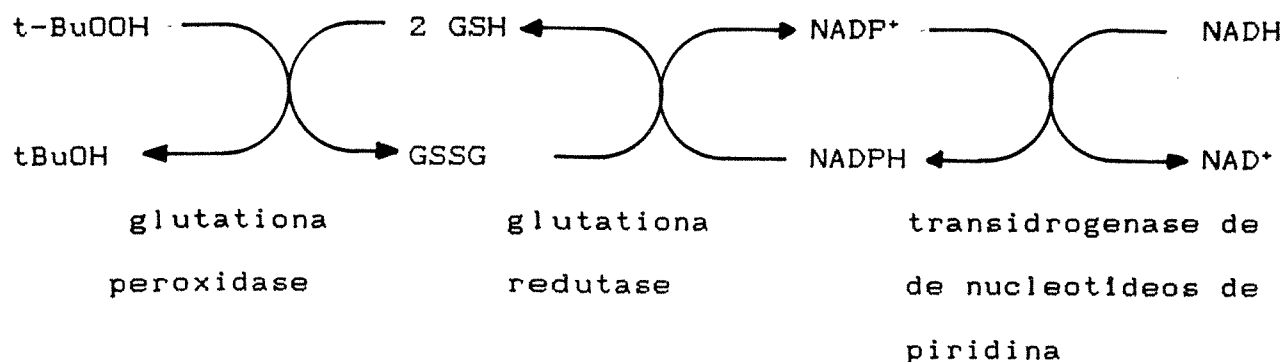
A transição de permeabilidade pode ser inibida por substâncias ou condições que previnem a captação de Ca^{2+} ou ação dos agentes liberadores de Ca^{2+} . Entre esses inibidores incluem-se os anestésicos locais, o bonkrecato (inibidor da

translocase de nucleotídeos de adenina), butil-hidroxitolueno (sequestrador de radicais livres), agentes redutores sulfidrílicos, antagonistas da calmodulina, carnitina, ADP e cátions bivalentes como o Sr^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} (Gunter e Pfeiffer, 1990).

A reversibilidade da transição pode ser obtida pela adição de quelantes de Ca^{2+} (Crompton et alii, 1988; Gunter e Pfeiffer, 1990), adição de ciclosporina-A (Halestrap e Davidson, 1990; Novgorodov et alii, 1992) ou espermina, (Lapidus e Sokolove, 1992). A presença de ADP, Mg^{2+} e o estado reduzido de nucleotídeos de piridina, parecem favorecer a ação da ciclosporina-A na reversão da transição de permeabilidade; Broekemeier et alii, 1992; Novgorodov et alii, 1992; Szabó e Zoratti, 1992). Essa reversão da transição de permeabilidade tem levado alguns grupos a sugerir a possibilidade do mecanismo apresentar um papel fisiológico (Crompton et alii, 1987; Crompton e Costi; 1988; Sandri et alii, 1990). A abertura reversível desse poro, "in vivo" poderia constituir uma via de liberação de vários produtos metabólicos que não pudessem ser transportados através da membrana mitocondrial (Gunter e Pfeiffer, 1990).

ATUAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS NA TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL E A OCORRÊNCIA DE LIPOPEROXIDAÇÃO.

Lehninger et alii, (1978) observaram que o Ca^{2+} pode ser liberado de mitocôndrias isoladas e carregadas com este íon pelo aumento do estado de oxidação dos nucleotídeos de piridina, sendo que hidroperóxidos orgânicos estimulam este processo, portanto se classificando como agentes liberadores de cálcio (Richter e Frei, 1985). Isto ocorre pela redução dos hidroperóxidos a alcoóis com a concomitante oxidação de NADPH, através do sistema enzimático glutathiona peroxidase/glutathiona redutase (Sies e Moss, 1983), de acordo com o seguinte esquema:



Desta forma, o efeito de hidroperóxidos nas alterações de permeabilidade da membrana interna de mitocôndrias poderia estar ligado ao aumento das formas oxidadas dos nucleotídeos de piridina (Jocelyn e Dickson, 1980; Richter e Frei, 1985; Richter e Kass, 1991), ou associado à formação de espécies ativas de oxigênio (Kennedy et alii, 1986, 1992), dando início ao processo de lipoperoxidação (Bindoli e Cavalini, 1982, Marshansky et alii, 1983; Marshansky e Yagushinsky 1986; Novgorodov et alii, 1991-c).

A possível correlação entre a peroxidação lipídica e a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial foi proposta inicialmente por Marshansky et alii (1983). Em consonância com trabalho anterior de Bindoli e Cavallini (1982), este grupo apresentou dados correlacionando a ocorrência de peroxidação lipídica e alterações na integridade da membrana mitocondrial, como inchamento e efluxo de cátions da mitocôndria na presença hidroperóxidos orgânicos. A possibilidade da participação da ATP sintetase como um passo regulador desses processos foi sugerida inicialmente com base na proteção conferida pelo ADP, que retardava a ocorrência de inchamento e diminuía a formação de produtos da lipoperoxidação como o malondialdeído (MDA) e pela reversão desta proteção após a adição de carboxiatractilato (CAT), um inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina (Marshansky e Yagushinsky, 1986; Novgorodov et alii, 1987, 1989-a), que desliga ADP de seus sítios de ligação.

A correlação mais direta entre a permeabilização da membrana interna mitocondrial e o acúmulo de produtos de lipoperoxidação foi mostrada por Novgorodov et alii (1991-c). Esses autores propõe que a ação de espécies ativas de oxigênio intermediam de alguma forma a transição de permeabilidade mitocondrial. Neste caso a formação de produtos finais de peroxidação lipídica pode ser considerado um processo que acompanha a liberação de Ca^{2+} quando concentrações mais altas de hidroperóxidos foram utilizadas (Gogvadze e Zhukova, 1991). A possibilidade de que a peroxidação lipídica pudesse ser um dos componentes da transição

de permeabilidade também foi levantada, considerando a hipótese de que pudesse favorecer a transição por facilitar a hidrólise de fosfolipídios pela ação da fosfolipase A₂ (Erdahl et alii, 1991).

Outro aspecto que relaciona a produção de espécies ativas com a transição de permeabilidade diz respeito à proteção conferida pelo butil-hidroxitolueno (BHT) em relação à ocorrência de fluxo iônico e desacoplamento mitocondrial induzidos por Ca²⁺ e Pi, hidroperóxidos orgânicos e agentes causadores da formação de dissulfeto entre grupos sulfidríla (SH) de proteínas, como a fenilarsina, diamida e arsenito, pois o BHT é um clássico sequestrador de radicais livres (Novgorodov et alii, 1987; Carbonera e Azzone, 1988).

O estado redox de grupos SH de proteínas da membrana interna mitocondrial parece influir diretamente sobre a peroxidação lipídica, pois quando suspensões mitocondriais foram tratadas previamente com diamida, um oxidante de grupos SH que induz a formação de dissulfetos em proteínas, a peroxidação lipídica provocada por ferro e ascorbato, mostrou-se mais intensa (Bindoli et alii, 1977).

A formação de pontes dissulfeto em proteínas da membrana mitocondrial na presença de pró-oxidantes como diamida e t-BuOOH foi apontada como a causa de permeabilização de mitocôndrias (Fagian et alii, 1990). O mecanismo protetor conferido pela trifluoperazina, um neuroleptico da classe dos fenotiazínicos, em

relação ao efeito dos pró-oxidantes foi relacionado a uma possível inibição exercida pela droga em relação à formação dessas pontes dissulfeto (Pereira et alii, 1992). Ainda segundo estes autores, o Ca^{2+} teria seu papel crítico no processo de permeabilização por reduzir a distância entre os grupos SH das proteínas de membrana, induzindo uma mudança conformacional nestas proteínas e facilitando a formação de pontes dissulfeto (Fagian et alii, 1990; Pereira et alii, 1992).

Entretanto, mostramos recentemente que agentes redutores de grupos dissulfeto como o ditioneitol (DTT) não previnem a perda de atividade do carreador ADP/ATP em mitocôndrias incubadas na presença de Ca^{2+} em condições de baixo potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$). Esses dados sugerem que o carreador ADP/ATP faz parte do poro dependente de cálcio pois nessas mesmas condições, ciclosporina A (CsA) exerce um nítido efeito protetor (Macedo et alii, 1993). Esses resultados por sua vez descartam a formação de pontes dissulfeto como evento primário do processo de permeabilização.

Novgorodov et alii (1991-a) mostraram que a presença de hidroperóxidos determina a perda gradativa da proteção conferida pela ciclosporina-A em relação à transição de permeabilidade quando a mitocôndria está carregada com íons Ca^{2+} e sugerem que este aspecto pode ser resultante da ativação de um enzima fosfolipase A_2 que leva à hidrólise de fosfolípidos de membrana como já proposto anteriormente por Broekemeier et alii (1989).

É também possível que o metabolismo de hidroperóxidos conduza à perda de um fator que modularia a sensibilidade do poro em relação à CsA (Novgorodov et alii, 1991-a), porém não há dados da ação da ciclosporina-A sobre a peroxidação lipídica decorrente do estresse oxidativo. No entanto, quando trifluoperazina, que também inibe a fosfolipase A_2 (Broekemeier et alii, 1985), é utilizada conjuntamente à CsA, o efeito protetor desta última torna-se mais efetivo (Broekemeier et alii, 1989).

A OCORRÊNCIA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ALTERAÇÕES NO ESTADO FÍSICO DA MEMBRANA.

Um outro aspecto fundamental para se compreender os danos peroxidativos sobre a membrana mitocondrial está relacionado com as possíveis alterações no estado físico da membrana decorrente da peroxidação lipídica. Assim além de mudanças metabólicas e inativação direta de enzimas, ocorrem também alterações nas propriedades físicas de fosfolípidios de membrana (Vladimirov et alii, 1980). A perda de ácidos graxos poliinsaturados tende a reduzir a fluidez da membrana que é uma propriedade essencial para as funções das membranas biológicas (Halliwell & Gutteridge, 1989). Através do método de fluorescência com utilização de marcadores que atingem diferentes níveis de profundidade da membrana e determinação da concentração de MDA, foi demonstrado que a peroxidação lipídica aumenta a rigidez da membrana e a carga negativa na superfície da mesma. Quando

suspensões mitocondriais, microssomais e mesmo lipossomos sofreram peroxidação lipídica induzida por ferro e ascorbato, observou-se uma diminuição no parâmetro de fluidez entre 20 e 30% em cada tipo de membrana estudada (Dobretsov et alii, 1977).

A microviscosidade das membranas é um fator fundamental na atividade das enzimas integrais como ATPases, adenilato ciclase, várias translocases e sob certas condições, a desaceleração das reações enzimáticas pode destruir a organização da vida celular e desenvolver processos patológicos (Vladimirov et alii, 1980).

A peroxidação lipídica parece influir diretamente na permeabilidade iônica da bicamada. O parâmetro alfa de solubilização que está correlacionado à fluidez da membrana, diminui em temperaturas abaixo de 30°C. A diminuição deste parâmetro parece estar envolvida com o desaparecimento de ácidos graxos insaturados decorrente da peroxidação dos mesmos. Esta modificação no estado físico da bicamada parece ocorrer concomitantemente ao aumento de permeabilização da membrana para íons Ca^{2+} . Como consequência, há perda da atividade da ATPase, sendo que este aspecto parece estar correlacionado com a alteração no micro ambiente da enzima, decorrentes da peroxidação lipídica (Vladimirov et alii, 1980).

Entretanto, quando se comparou o grau de peroxidação lipídica causada por ferro com alterações na fluidez de membrana em microssomos e em mitocôndrias hepáticas, através do uso de marcadores específicos para a superfície da membrana (interface

membrana-aqua) e de marcadores que se posicionam mais profundamente na bicamada, observou-se que mudanças na viscosidade das membranas só foram detectadas após o acúmulo de 10 nmol de malondialdeído /mg de proteínas mitocondriais. Esses resultados demonstraram que as mudanças no estado físico da membrana eram decorrentes de um processo de peroxidação lipídica intenso e da perda da barreira de permeabilidade de forma irreversível (Dobretsov et alii, 1977, Vladimirov et alii, 1980; Masini et alii, 1992).

O B J E T I V O S

Tivemos como objetivo estudar a existência de uma correlação entre a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna e a ocorrência de peroxidação lipídica em mitocôndrias incubadas na presença de Ca^{2+} e agentes que levam à abertura do poro de transição de permeabilidade como Pi e hidroperóxidos orgânicos como o t-BuOOH, conhecido por oxidar o NADPH através do sistema glutational peroxidase/glutational redutase e também apontado por alguns grupos como um gerador de espécies ativas.

Vários agentes protetores tanto da lipoperoxidação quanto da abertura do poro foram utilizados, na tentativa de se estabelecer a relação entre os dois processos aqui estudados.

Procuramos também correlacionar a ocorrência de três eventos: inchamento mitocondrial, consequência de alterações na permeabilidade da membrana interna das mitocôndrias, com a determinação dos produtos de peroxidação lipídica e detecção de mudanças na fluidez da membrana mitocondrial.

M A T E R I A I S E M E T O D O S

1. ISOLAMENTO DE MITOCONDRIAS DE FIGADO DE RATO

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo Scheneider & Hogeboom (1950), utilizando-se ratos adultos Wistar pesando 180 a 250 g, mantidos em jejum por 12 horas.

O fígado retirado após a morte do animal por concussão cerebral, foi lavado em solução de sacarose 250 mM, contendo EGTA 0,5 mM e tampão HEPES 2,0 mM, pH 7,2, mantido em banho de gelo durante todo o procedimento experimental. Em seguida foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. Este material foi então centrifugado a 2500 x g, por 5 minutos, o sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o sedimento novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante obtido foi centrifugado durante 10 minutos a 11500 x g, sendo retirada a fase lipídica superior com uma pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em sacarose 250 mM contendo EGTA 0,3 mM, tamponada com HEPES 1,0 mM em pH 7,2 e novamente centrifugado nas condições anteriores. A seguir, as mitocôndrias foram ressuspensas em solução sacarose 250 mM contendo HEPES 1,0 mM pH 7,2 obtendo-se uma preparação de concentração de proteínas de aproximadamente 100 mg de proteína por mL.

2. PREPARAÇÃO DE MITOPLASTOS (membrana interna + matriz)

Os mitoplastos foram preparados segundo Pedersen et alii (1978) de uma suspensão mitocondrial de fígado com concentração aproximada de 100 mg de proteína por mL de meio.

Foi adicionado 1,0 mL da suspensão mitocondrial a 1,0 mL de meio H (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, BSA 0,2% tamponado com HEPES 5,0 mM, pH 7,2 contendo digitonina 1%). Este material mantido em banho de gelo, foi agitado lentamente por 10 minutos, diluído por adição de 5,0 mL de meio H e centrifugado a 12100 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 3,0 mL de meio H e novamente centrifugado a 12100 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em meio H, obtendo-se uma fração de mitoplastos de concentração aproximada de 75 a 85 mg de proteína por mL de meio.

3. DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método do biureto (Gornall et alii, 1949), modificado pela adição de colato 1% (p/v) (Kaplan e Pedersen, 1983).

Uma solução de BSA a 1% (p/v) foi utilizada como padrão.

4. MEIOS DE REAÇÃO E CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO.

Os experimentos foram realizados no seguinte meio básico de reação que corresponde ao meio padrão.

Sacarose 125 mM; KCl 65 mM, Hepes 3mM pH 7,2, rotenona 4 uM, succinato 5mM.

Nos experimentos realizados para detecção de TBARS (substâncias reativas de oxigênio) através da técnica fluorimétrica o equilíbrio osmótico foi mantido com KCl 130 mM e Hepes 20 mM, pH 7,2. O meio é isento de sacarose para evitar a interferência da mesma no passo de aquecimento a 100°C por 45 minutos.

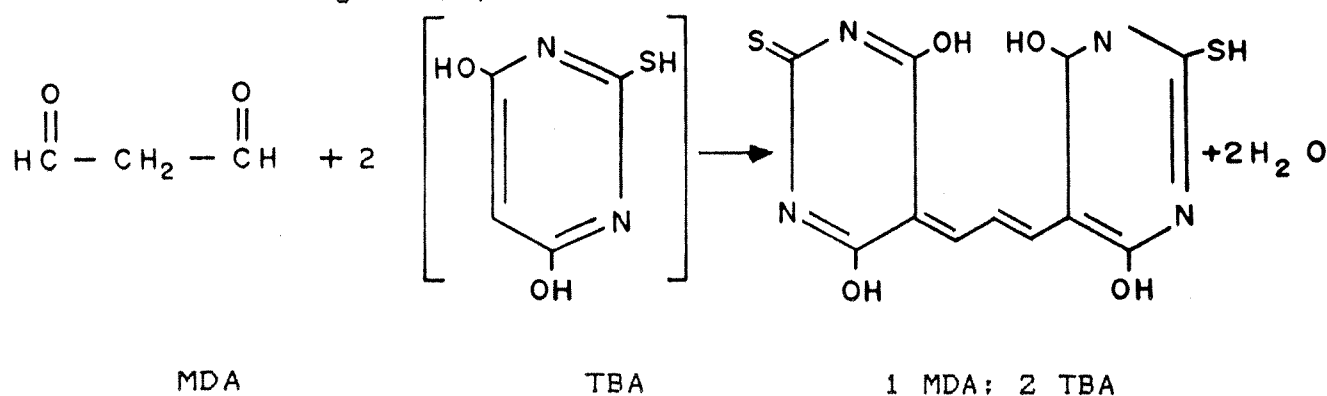
As adições feitas durante os diferentes experimentos estão especificadas nas legendas de cada figura. Os resultados são representativos de uma série de 4 a 5 experimentos. Nos experimentos de determinação de TBARS, as análises foram feitas em duplicatas. Mesmo sem indicarmos os desvios padrões nas figuras para não sobrecarrega-las, todas as vezes que comparações entre os dados experimentais foram efetuadas estas foram baseadas em análises de variância de confiabilidade de 95 %.

5. DETERMINAÇÃO ESPECTROFLUORIMETRICA DA OCORRENCIA DE LIPOPEROXIDAÇÃO PELA FORMAÇÃO DE TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

O ácido tiobarbitúrico forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular que são produtos finais da cadeia de lipoperoxidação, entre estes o malondialdeído (MDA).

Estes complexos podem ser detectados por espectrofotometria (Buege e Aust, 1979) ou por espectrofluorimetria (Yagi, 1976; Ohkawa et alii, 1979).

A reação é a seguinte :



A determinação fluorimétrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) consiste em metodologia mais precisa com sensibilidade dez vezes maior do que a técnica espectrofotométrica (Yagi, 1976; Ohkawa et alii, 1979).

As mitocôndrias foram isoladas da mesma forma que descrito anteriormente, porém o precipitado final foi ressuspenso na ausência de sacarose, em meio de KCl 130 mM e Hepes 20 mM, pH 7,2

para evitar a interferência de sacarose no passo de aquecimento a 100°C por 45 minutos.

A suspensão mitocondrial (1mg de proteína/1 mL de meio) foi incubada em meio básico isento de sacarose, e após a adição de oxidante, amostras foram retiradas em diferentes tempos de incubação, conforme especificado nas figuras. Nos experimentos onde houve variações na concentração de oxidantes, o tempo de incubação foi de 15 minutos.

Após a incubação, o meio foi acidificado com 3,5 mL de H₂SO₄ a 0,08 N e em seguida adicionados a suspensão TBA a 0,8%, dissolvido em NaOH 0,1 N em ácido acético glacial (1:1 v/v). Finalmente adição de 0,1 mL de cloreto férrico (50 µM) para completar a reação e 0,1 mL de BHT (50 µM) para evitar o aparecimento de novos radicais durante o período de aquecimento (Asakawa e Matsushita, 1980). O aquecimento foi feito a 100°C por 45 minutos. Após o resfriamento, 3 mL de n.butanol foram adicionados e após vigorosa agitação as amostras foram centrifugadas a 900 g. por 10 minutos. Tomou-se a camada orgânica sobrenadante e a leitura foi realizada em um espectrofluorímetro com excitação em 515 nm e emissão em 553 nm. A concentração de TBARS foi determinada usando uma curva padrão de tetraetoxipropano que se converte linearmente em malondialdeído (0,2 - 20 µM), um produto final da cadeia lipoperoxidativa. (Yagi, 1976; Ohkawa et alii, 1979, Erdhal et alii, 1991).

6. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE VOLUME MITOCONDRIAL

Suspensões mitocondriais são turvas e espalham luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença no índice de refração entre o conteúdo da matriz e o meio, e qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada (Nicholls e Akerman, 1982).

Um aumento no volume da matriz mitocondrial associada com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio, com consequente diminuição no espalhamento de luz. Esta propriedade das mitocôndrias "in vitro" fornece um método qualitativo e quantitativo simples para se estudar fluxos de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias prestam-se bem para a aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes mudanças de volume, já que apenas a membrana interna sofre desdobramento de seus pregueamentos.

O acompanhamento deste processo pode ser feito tanto em função da diminuição de luz transmitida em um espectrofotômetro normal, ou de uma forma mais sensível, usando-se um fluorímetro ajustado para medir a luz espalhada pela suspensão (light scattering), diretamente num ângulo de 90° entre a incidência do feixe da luz e a célula fotoelétrica. Esta técnica tem sido bastante usada porque é um método simples, bastante sensível, rápido e que fornece um registro contínuo da cinética do inchamento (Beavis et alii, 1985).

Mitocôndrias hepáticas (0,5 mg de proteínas) foram incubadas em 1,0 mL de meio básico e as variações do volume mitocondrial foram acompanhadas espectrofluorimetricamente através de um registrador conectado ao espectrofluorímetro ajustado a um comprimento de onda de 520 nm para excitação e emissão.

As adições e tempo das incubações estão indicadas nas legendas das figuras.

7. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

O consumo de oxigênio foi determinado polarograficamente, através de um eletrodo tipo Clark, acoplado a um registrador gráfico.

A incubação se processou em uma cela de vidro, vedada e termostatizada (30°C), com agitação magnética.

A qualidade das mitocôndrias foi 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.

A suspensão mitocondrial foi considerada adequada para uso, quando esta relação era igual ou maior que 5,0.

O aumento no consumo de oxigênio em condições onde as mitocôndrias foram mantidas desenergizadas, inibindo-se a cadeia respiratória, foi também utilizado para a determinação do processo de peroxidação.

8. DETERMINAÇÃO DA FLUIDEZ DA MEMBRANA MITOCONDRIAL PELO MÉTODO DO MARCADOR DE SPIN. TÉCNICA EM RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA - RPE)

Fluidez de membrana de forma geral resulta da combinação de diferentes tipos de movimentos dos componentes da membrana, incluindo a flexibilidade das cadeias ácidas, a difusão lateral das moléculas em uma mesma monocamada, a difusão transversal de uma camada para a outra, e a separação de fase lateral, que corresponde ao afastamento de fosfolípidios e colesterol decorrente de variações de fatores externos.

Alguns desses tipos de movimento, principalmente a flexibilidade das cadeias graxas podem ser afetados por alterações sofridas pelos componentes da membrana.

Um marcador de spin estável que é incorporado ao sistema, detecta estas alterações (Connel; 1976).

Marcadores de spin derivados de componentes naturais da membrana, tais como ácidos graxos, fosfolípidios e esteróis são sintetizados com um grupo nitróxido ligado o qual tem um sinal de ressonância paramagnética eletrônica muito conhecido e extremamente adequado para fornecer informações sobre a dinâmica do meio biológico em que se encontra.

Este método tem uma aplicação particularmente importante na avaliação da flexibilidade das cadeias graxas da membrana.

Uma série de marcadores derivados do ácido esteárico ou

palmitico com o radical nitróxido ligado em diferentes posições da cadeia permitem a avaliação do gradiente de flexibilidade ao longo da mesma. Este efeito pode ser visto através de um parâmetro espectral comumente usado, a separação em Gauss das linhas de ressonância extremas do espectro denominado 2A máximo, ou através de um parâmetro de ordem (S) que retrata o ordenamento das cadeias e por definição varia de zero (movimento completamente livre) a 1 (estado totalmente rígido). Através do valor de S pode-se avaliar o ângulo médio do cone e a velocidade do movimento que as cadeias descrevem (Griffith; 1976). O valor de S pode ser calculado pela fórmula de Graffney (Graffney, 1976), onde Amax. e Amin. são os parâmetros de desdobramento hiperfino paralelo e perpendicular, respectivamente a constante C é uma correção empírica para a diferença entre o verdadeiro e o aparente fator de correção da polaridade.

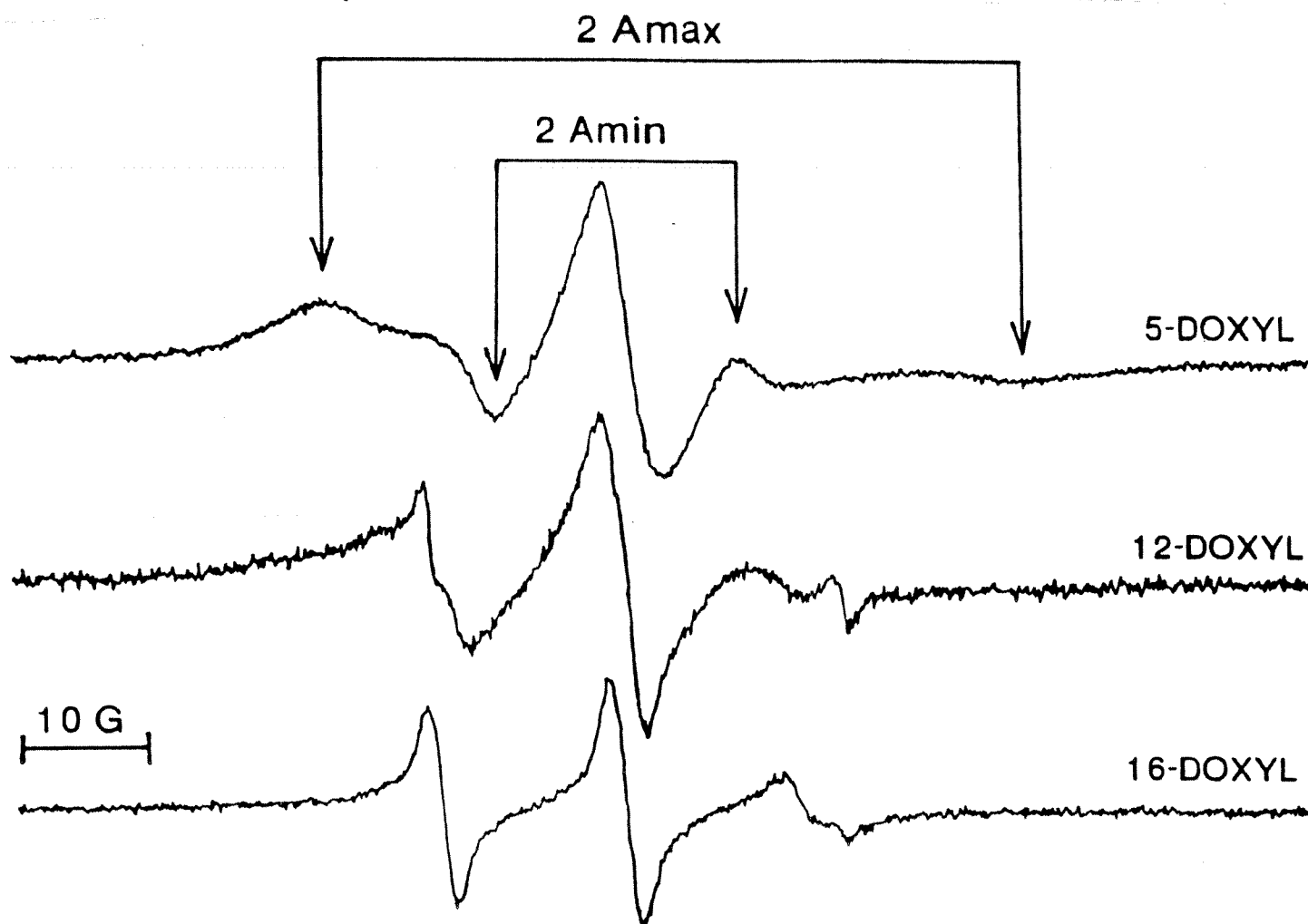
Cálculo do parâmetro de ordem :

$$S = \frac{(A_{Max} - A_{Min} - C) \times 1.723}{A_{max} + 2 A_{min} + 2C}$$

$$\text{sendo } C = 1,4 - 0,053(A_{max} - A_{min})$$

Na figura 1 estão apresentados os espectros de RPE típicos para o 5-doxyl estearato, 12-doxyl estearato e 16-doxyl estearato. Estes espectros refletem o fato de que o 5-doxyl estearato tem um menor grau de movimento (o espectro corresponde a tempo de correlação mais longo, logo o movimento é mais lento) do que o 12-doxyl estearato que por sua vez tem menos movimento que o 16-doxyl estearato.

Para se determinar as alterações na fluidez da membrana as mitocôndrias foram isoladas conforme descrito no item 1 de materiais e métodos e após o período de incubação na presença de oxidantes a suspensão foi centrifugada em 700 g por 30 segundos com objetivo de obter-se uma suspensão mais concentrada, condição necessária para as análises de RPE.



$$S = \frac{A_{\max} - A_{\min} - C \cdot 1.723}{A_{\max} + 2A_{\min} + 2C}$$

$$C = 1.4 - 0.053(A_{\max} - A_{\min})$$

Figura 1 - Espectro de RPE para 5, 12 e 16 doxyl estearato na membrana mitocondrial a 25° C e definição do parâmetro de ordem (S)

REAGENTES EMPREGADOS

ADP, HEPES, EGTA, rotenona, antimicina-A, t-BuOOH, tetraetoxipropano, succinato e BHT; foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

Butanol, etanol, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, ácido acético, ácido sulfúrico, sulfato ferroso, orto-fenantrolina, foram adquiridos da MERCK .

O 5 doxyl-ácido esteárico utilizado como marcador de spin (spin label) foi adquirido da Aldrich.

Os demais reagentes utilizados foram do máximo grau de pureza encontrados comercialmente, similares aos citados acima.

RESULTADOS

Ocorrência de peroxidação lipídica

Através dos resultados mostrados na figura 2, podemos observar que quando as mitocôndrias são incubadas somente na presença de Ca^{2+} e Pi , mesmo em concentrações muito altas do cátion, não ocorre formação significativa de TBARS. No entanto, quando t-butil hidroperóxido (t-BuOOH) foi adicionado a essas mitocôndrias energizadas com succinato constatou-se a ocorrência de lipoperoxidação, determinada pela formação de TBARS. Na ausência do hidroperóxido as altas concentrações de Ca^{2+} e Pi não levaram a formação de TBARS nem mesmo com o aumento do tempo de incubação para 30 e 60 minutos. (não mostrado na figura).

Efeitos do Ca^{2+} e fosfato sobre a peroxidação lipídica induzida por t-BuOOH.

Apesar da condição Ca^{2+} e Pi "per se" não determinar produção de TBARS a presença dos mesmos como podemos observar na figura 2, parece ser necessária na ocorrência do processo.

Nossos dados descritos na figura 3 mostram que a presença de fosfato foi fator determinante na intensidade da peroxidação

lipídica induzida por Ca^{2+} e t-BuOOH.

A possibilidade do fosfato atuar como íon permeante levou-nos a substituir o mesmo pelo acetato, que também atua como íon permeante lipofílico, porém nestas condições a formação de TBARS é pequena (traçado b) em relação à observada na presença de fosfato (traçado a).

Já o efeito do Ca^{2+} no processo pode ser observado pelos resultados mostrados na figura 4, onde a presença de EGTA (traçado c) previne a formação de TBARS, enquanto que a adição de Ca^{2+} (traçado b) eleva a sua produção quando comparada ao obtido em condições em que a concentração de Ca^{2+} presente era aquela correspondente ao contaminante do meio de reação, cerca de 10 μM (traçado a).

Através destes ensaios; estabelecemos que o nosso controle de peroxidação lipídica é determinado pela formação de TBARS na presença do oxidante (t-BuOOH) com adição de Ca^{2+} e Pi .

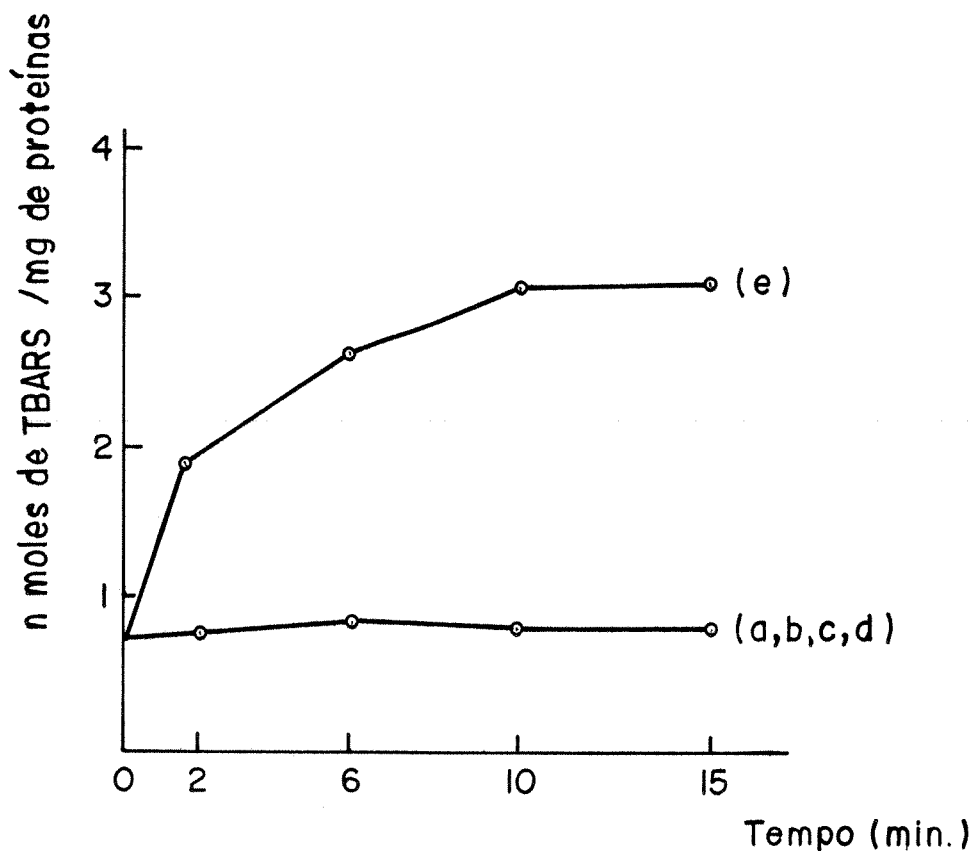


Figura 2 - Efeito do t.butil hidroperóxido no processo de peroxidação lipídica mitocondrial.

Mitocôndrias (1,0 mg /mL) foram incubadas em meio de reação segundo condições descritas em material e métodos, na presença de: (a) 30uM de Ca^{2+} e 5 mM de Pi; (b) 70uM de Ca^{2+} e 5 mM de Pi; (c) 120 uM de Ca^{2+} e 5 mM de Pi; (d) 120uM de Ca^{2+} e 10 mM de Pi; (e) mesmo que a na presença de 250uM de t-BuOOH.

Os experimentos a, b, c e d foram mostrados num único traçado devido a diferença mínima na concentração de TBARS obtidas para cada ponto.

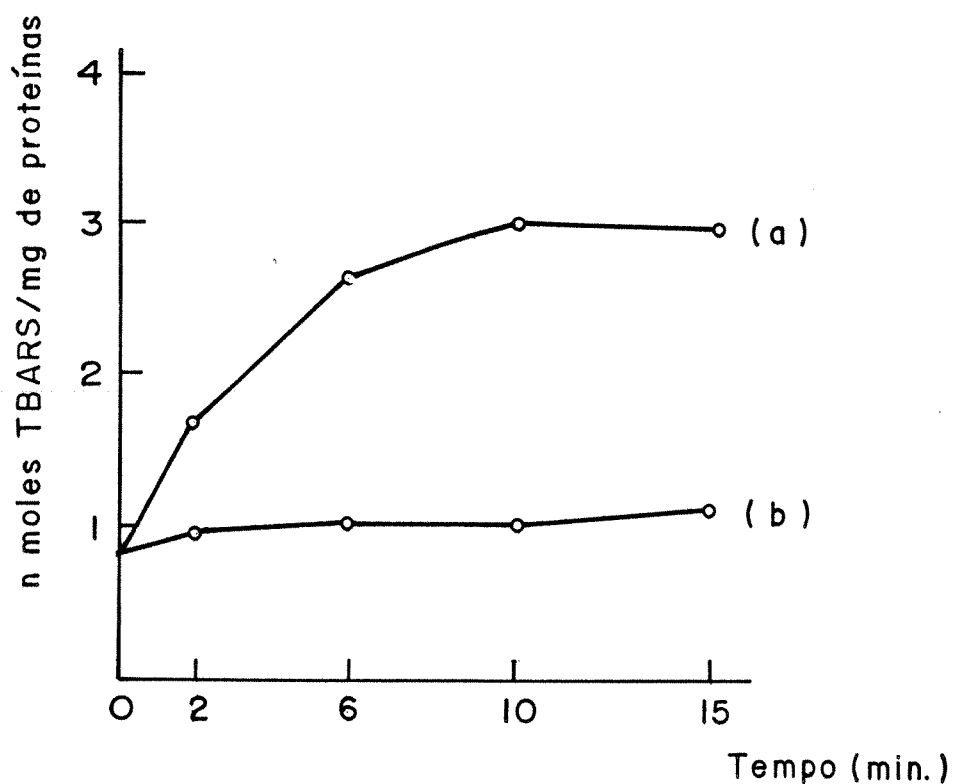


Figura 3 - Efeito do fosfato sobre o processo de peroxidação lipídica induzido por Ca^{2+} e t-BuOOH.

Mitocondrias (1 mg/mL) foram incubadas em meio de reação segundo condições descritas em materiais e métodos, na presença de :

(a) 30 μM de Ca^{2+} e 250 μM de t-BuOOH mais 5 mM de Pi adicionados dois minutos após a adição da suspensão mitocondrial; (b) 30 μM de Ca^{2+} e 250 μM de t-BuOOH mais 5 mM de acetato, adicionado 2 minutos após suspensão mitocondrial.

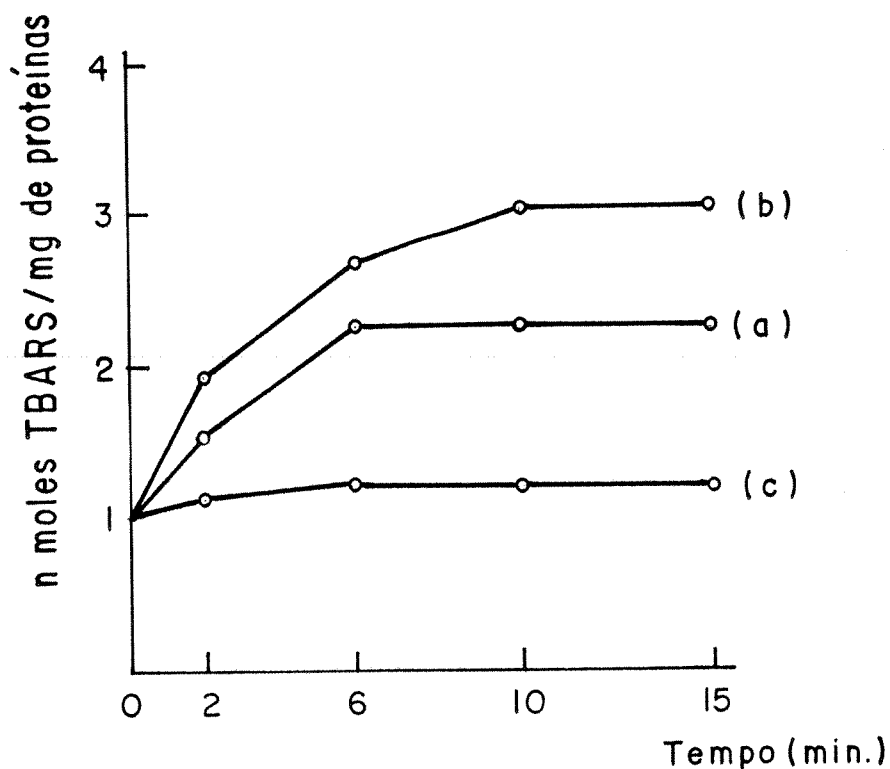


Figura 4 - Efeito do Ca^{2+} sobre o processo de peroxidação lipídica.

Mitocôndrias (1,0 mg/mL) foram incubadas em meio de reação segundo as condições descritas em materiais e métodos, na presença de :

- (a) 250 μM de t-BuOOH mais 5 mM de Pi adicionado 2 minutos após a suspensão mitocondrial; (b) mesmo que a com 30 μM de Ca^{2+} ; (c) mesmo que b com 0,5 mM de EGTA.

Correlação entre a ocorrência de peroxidação lipídica e inchamento mitocondrial.

Com a finalidade de correlacionar a ocorrência de lipoperoxidação com o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, realizamos o experimento mostrado na figura 5, onde os traçados a e b mostram o inchamento mitocondrial decorrente do aumento de permeabilidade causados por Ca^{2+} e Pi , na presença (a) e ausência (b) de t.butil hidroperóxido respectivamente, observando-se praticamente o mesmo padrão de inchamento em ambos. A adição de EGTA ao meio de reação antes da suspensão mitocondrial (traçado d), impede totalmente a ocorrência de inchamento. Na ausência de Pi (traçado c), o Ca^{2+} e o t-BuOOH ocasionam um aumento da permeabilidade pouco acentuada no início, porém atingindo a mesma amplitude obtida na presença de Pi , após 15 minutos.

É bom ressaltar que destas condições estudadas, somente na correspondente à do traçado a onde o processo foi induzido por Ca^{2+} , Pi e t-BuOOH foi detectada significativa formação de TBARS, conforme mostrado nas figuras anteriores.

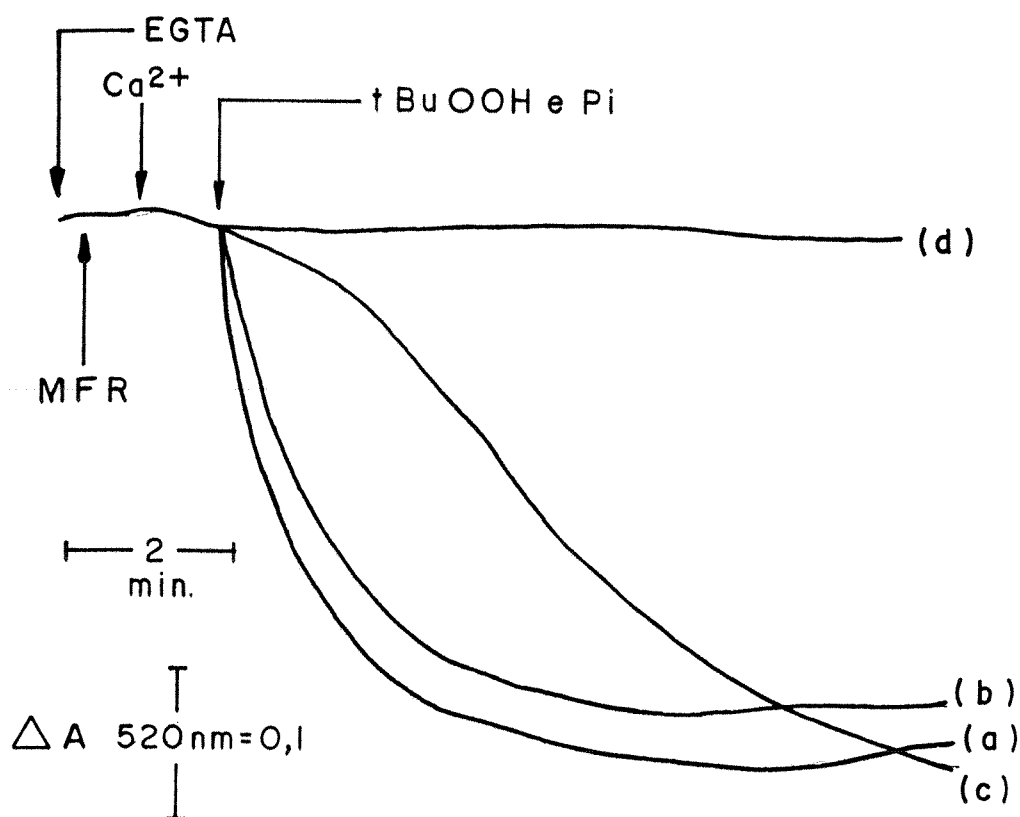


Figura 5 - Inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e Pi ou t-BuOOH.

Mitocondrias hepáticas (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação segundo condições descritas em materiais e métodos, na presença de:

- (a) 30 μM de Ca^{2+} mais 250 μM de t-BuOOH, e 5 mM de Pi;
- (b) 30 μM de Ca^{2+} e 5 mM de Pi; (c) 30 μM de Ca^{2+} e 250 μM de t-BuOOH;
- (d) mesmo que a com 0,5 mM de EGTA.

Efeito de EGTA e BHT nos processos de peroxidação lipídica e inchamento mitocondrial.

Com o objetivo de analisarmos de forma mais precisa os papéis do EGTA (quelante de Ca^{2+}) e BHT (sequestrador de radicais livres) no processo de peroxidação lipídica e no aumento de permeabilidade da membrana mitocondrial, realizamos os ensaios mostrado na figura 6, onde o EGTA e BHT foram adicionados 1 minuto após a adição do oxidante, t-BuOOH.

No painel A da Figura 6, podemos observar que o processo de peroxidação lipídica é imediatamente bloqueado após a adição de BHT (traçado b), conforme esperado. Entretanto a adição de EGTA (traçado c) não impediu a propagação do processo.

No entanto, os resultados obtidos nos experimentos de inchamento (figura 6 B) mostram que a adição de EGTA bloqueou o inchamento imediatamente após a sua adição (traçado c) enquanto que após a adição do BHT o inchamento continuou a ocorrer (traçado b), embora mais lentamente.

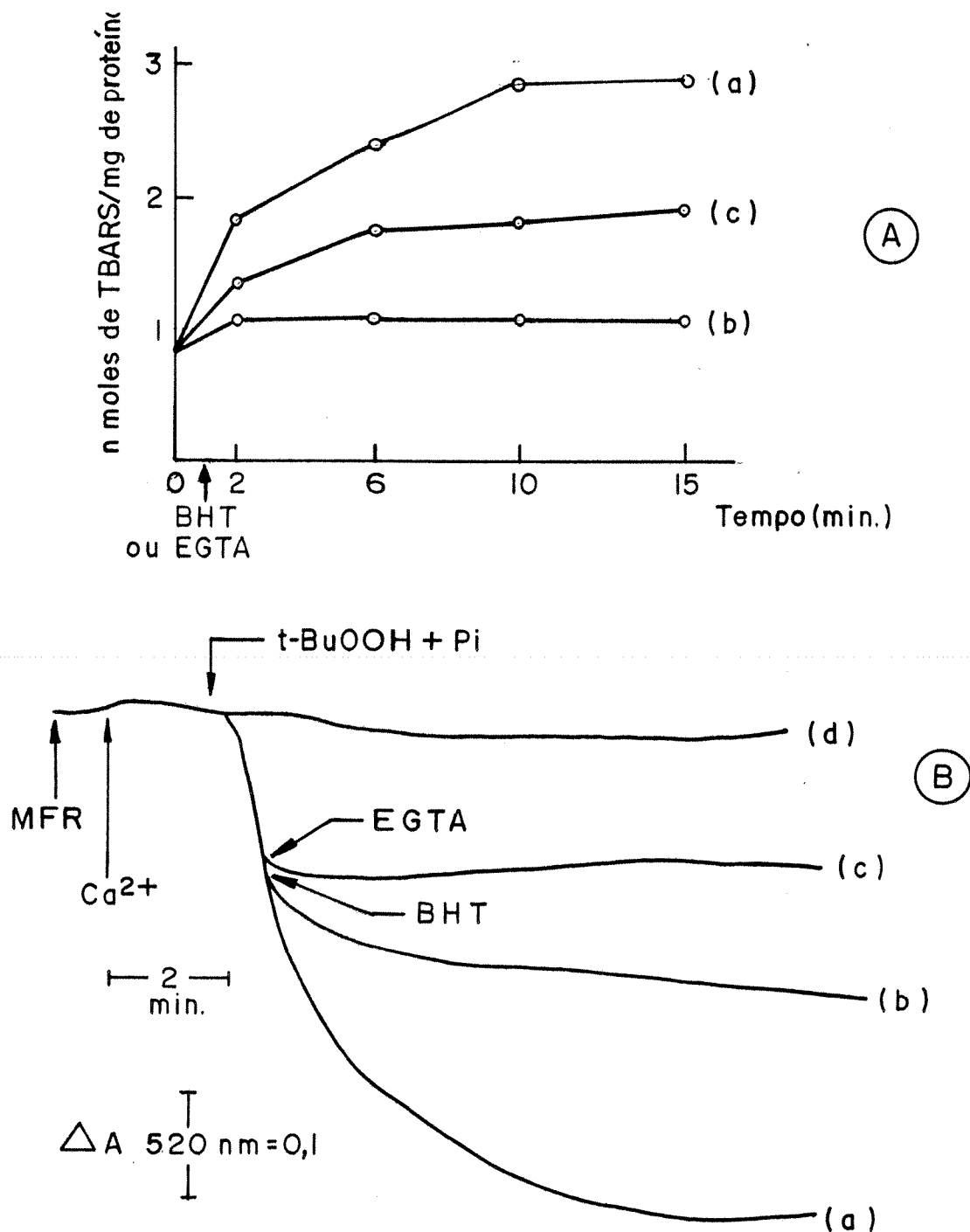


Figura 6 - Ação do EGTA e BHT nos processos de peroxidação lipídica (A) e inchamento mitocondrial (B).

Mitocôndrias hepáticas (1,0 mg e 0,5 mg/mL respectivamente) foram incubadas em meio de reação segundo as condições descritas em material e métodos, na presença de :

- (a) 30 μM de Ca^{2+} , 250 μM de $t\text{-BuOOH}$ e 5 mM de Pi; (b) idem a a com 50 μM de BHT adicionado 1 minuto após a adição do oxidante; (c) idem a a com 0,5 mM de EGTA adicionado 1 minuto após a adição de oxidante; (d) sem adições (experimento controle), somente para o painel B.

O possível papel do cálcio no processo de peroxidação lipídica

Para se compreender melhor a ação do Ca^{2+} no mecanismo de peroxidação lipídica, substituímos o Ca^{2+} pelo Sr^{2+} , um cátion captado pela mitocôndria de modo semelhante ao Ca^{2+} , embora o transportador exiba afinidade um pouco menor: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$, (Gunter e Pfeiffer, 1990).

Os resultados são mostrados na figura 7 onde podemos observar que a presença de 30 μM de Sr^{2+} (traçado b), praticamente não causou alteração em relação ao controle (traçado a). Já a presença de 30 μM de Ca^{2+} no meio de reação (traçado c) causou significativa intensificação do processo.

Da mesma forma, a presença do Sr^{2+} no lugar do Ca^{2+} nos experimentos de inchamento mitocondrial não provocou alterações quando comparados ao controle.

Com o objetivo de avaliar se o aumento na concentração de Ca^{2+} nas mitocôndrias estaria liberando Fe^{2+} antes ligado e este contribuindo de forma efetiva para a ocorrência do processo de peroxidação, 200 μM de ortofenantrolina, um quelante de Fe^{2+} , foi adicionado ao meio de reação (traçado d), porém não causou alterações em relação às observadas nas condições do traçado c.

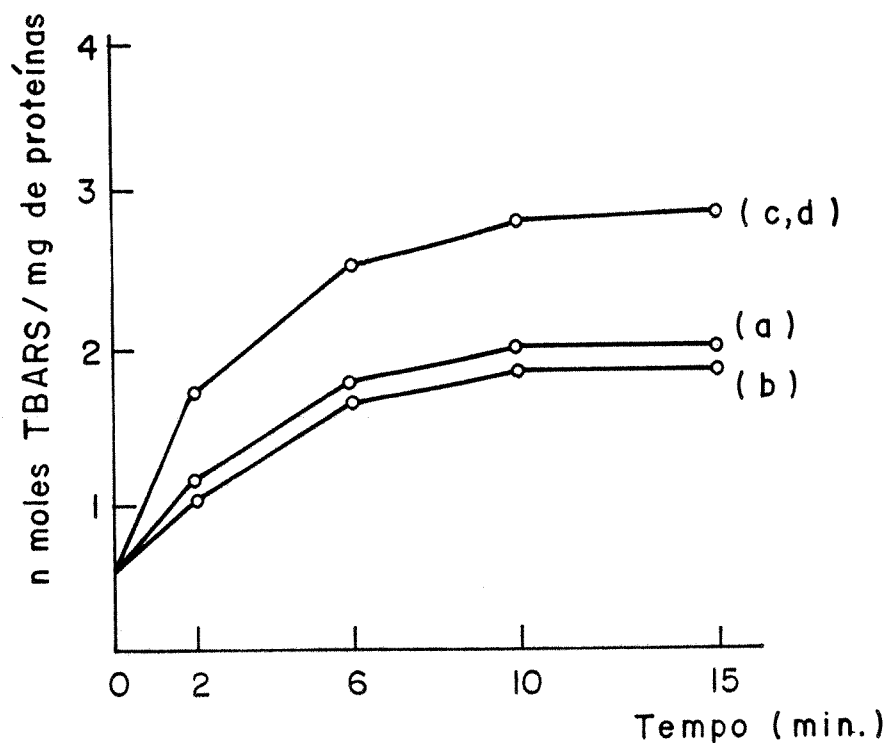


Figura 7 - Substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} no processo de peroxidação lipídica.

Mitocôndrias hepáticas (1,0 mg/mL) foram incubadas em meio de reação segundo as condições descritas em materiais e métodos, na presença de:

(a) 250 μM de t-BuOOH e 5 mM de Pi; (b) mesmo que a mais 30 μM Sr^{2+} ; (c) mesmo que a mais 30 μM Ca^{2+} ; (d) mesmo que c mais 200 μM de ortofenantrolina. Devido a diferença mínima na concentração de TBARS os traçados c e d foram representados em uma única curva.

Buscando esclarecer se a necessidade de captação de Ca^{2+} para a ocorrência de alteração na permeabilidade mitocondrial está também relacionada com o mecanismo de peroxidação lipídica, realizamos os experimentos mostrados na figura 8 onde a respiração mitocondrial foi inibida pela adição de antimicina-A, um inibidor do sítio II, da cadeia de transporte de elétrons, situação esta onde não há formação de potencial eletroquímico devido à inibição da cadeia respiratória e portanto, nestas condições, a mitocondria não capta Ca^{2+} pela via eletroforética.

É possível observar que a produção de TBARS (painel A), ainda ocorre de forma bastante significativa nestas condições (traçado b), porém aumentando-se a concentração de Ca^{2+} para 300 μM houve intensificação na produção de TBARS.

Paralelamente, o inchamento mitocondrial (painel B) só ocorreu na presença de 300 μM de Ca^{2+} (traçado c), quantidade esta passível de ser captada pela mitocondria desenergizada em função do gradiente químico de Ca^{2+} imposto à organela.

No painel C é possível observar consumo de oxigênio na presença de t-BuOOH e Ca^{2+} , uma evidência de ocorrência de peroxidação lipídica, uma vez que a respiração encontra-se totalmente inibida pela antimicina-A.

Nessa mesma figura, pode-se constatar que o aumento na produção de TBARS (A) pelo aumento da concentração de Ca^{2+} no meio de reação, corresponde exatamente a um aumento no consumo de oxigênio (C), como mostram os traçados b e c de ambos painéis.

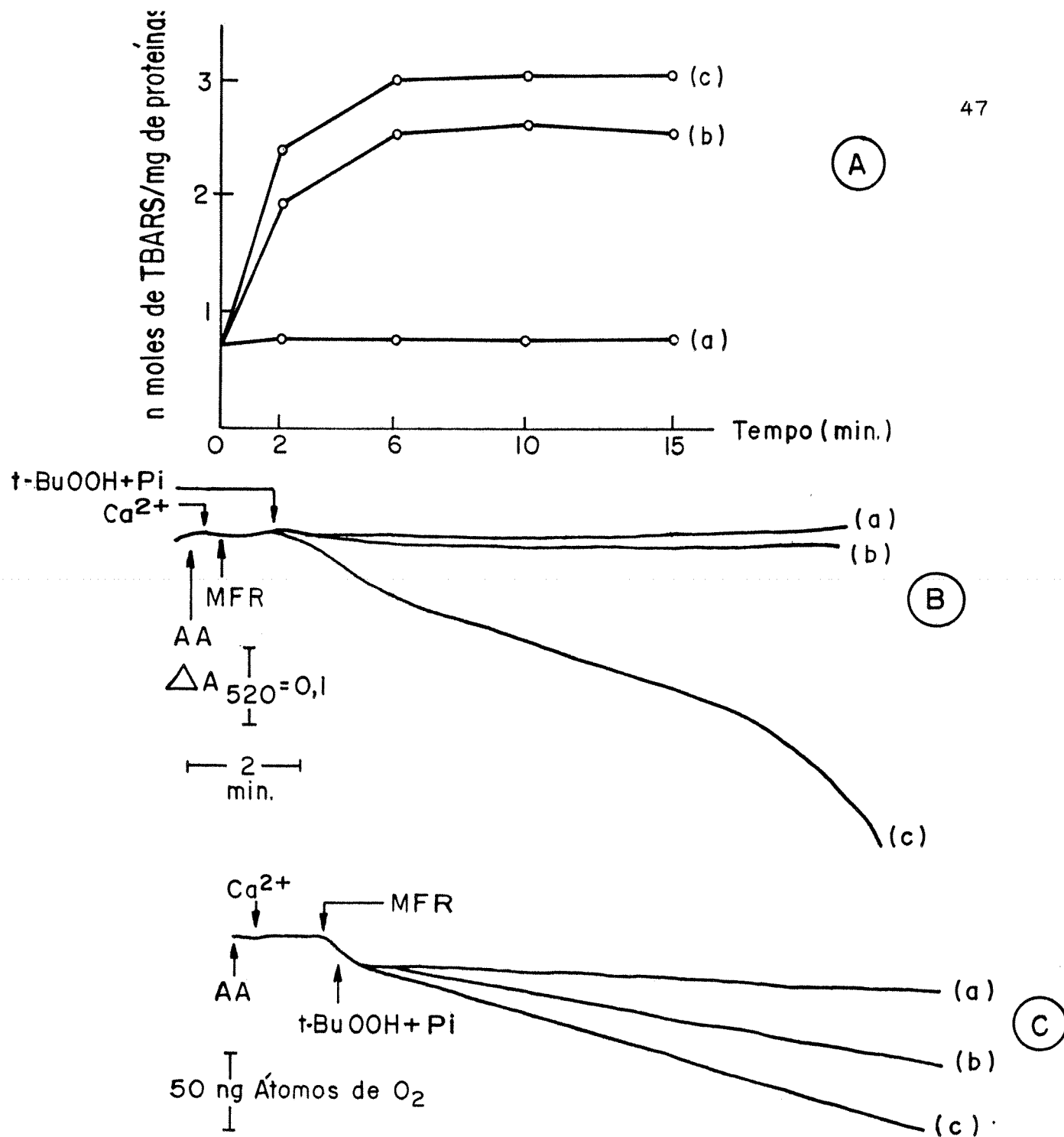


Figura 8 - Efeito do Ca^{2+} no processo de peroxidação lipídica (A), inchamento mitocondrial (B) e consumo de oxigênio (C) em mitocôndrias desenergizadas.

Mitocôndrias (1 mg/mL em A e C e 0,5 mg/mL para B) foram incubadas em meio básico de reação contendo-se 1 μM de antimicina-A, segundo condições descritas em materiais e métodos, na presença de:

(a) sem adições (experimento controle); (b) 250 μM de t-BuOOH e 5 mM de Pi; (c) mesmo que b com 300 μM de Ca^{2+} .

Efeito do vermelho de rutênio (VR), sobre a peroxidação lipídica e o aumento da permeabilidade mitocondrial, induzidos por t-BuOOH.

O vermelho de rutênio (VR) é conhecido como um inibidor específico da via de captação de Ca^{2+} , impedindo portanto sua entrada no interior da mitocôndria, porém não inibindo a via de efluxo. Desta maneira, sua presença impede que se estabeleça o ciclo de Ca^{2+} através da mitocôndria.

Assim, usou-se vermelho de rutênio com o objetivo de verificar se a inibição do ciclo do Ca^{2+} afetaria a lipoperoxidação e o inchamento mitocondrial.

Os resultados descritos na figura 9 mostram que na presença de 2 μM de VR (traçado b) ocorreu um discreto decréscimo na formação de TBARS (A) enquanto que nessa mesma concentração, o inchamento mitocondrial foi quase totalmente inibido (B).

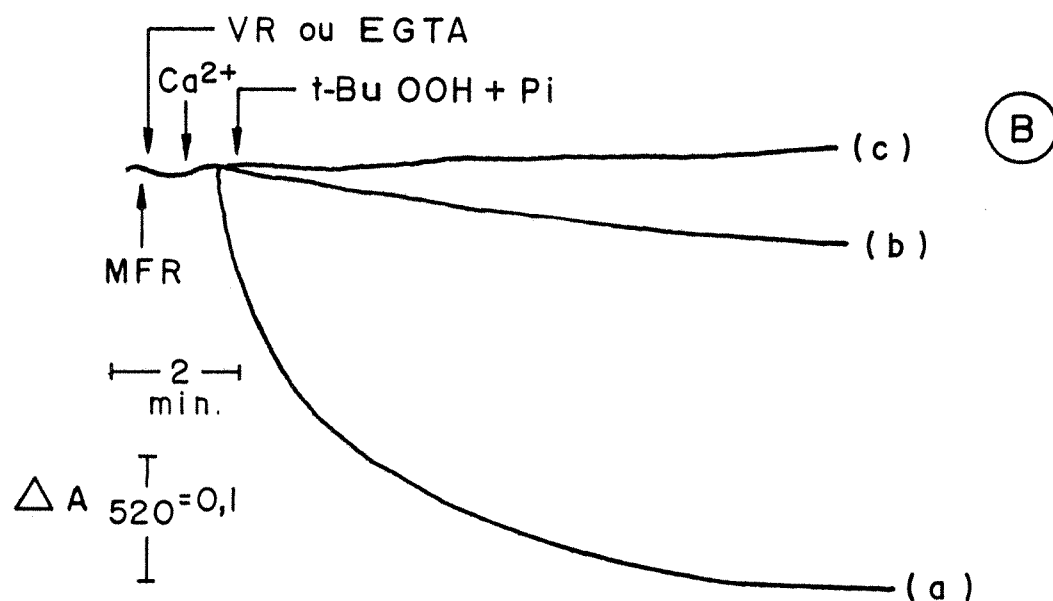
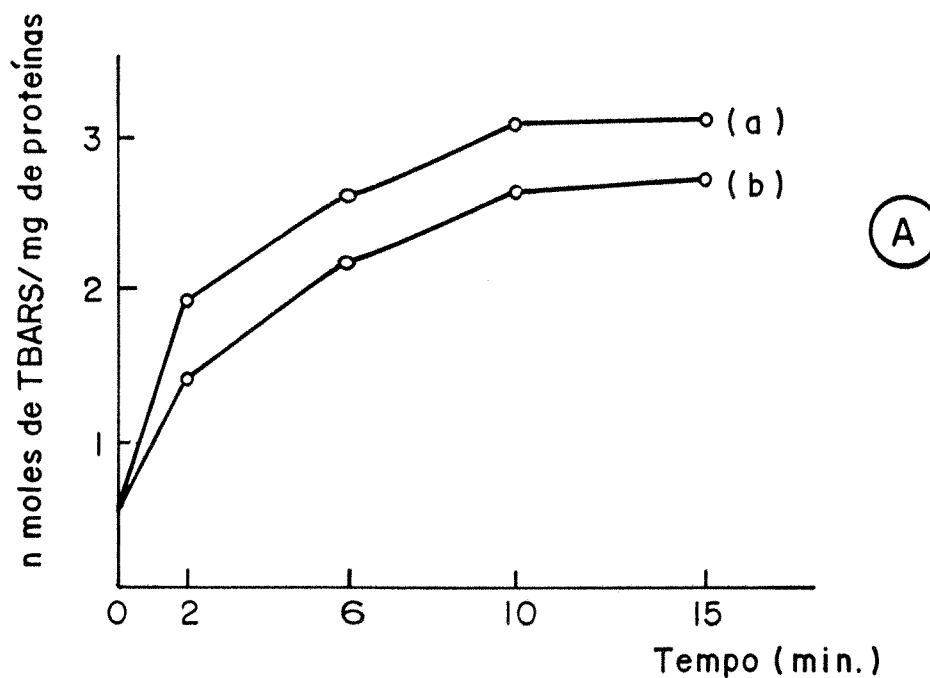


Figura 9 - Efeito do vermelho de rutênio sobre a peroxidação lipídica (A) e inchamento mitocondrial (B).

Mitocôndrias (1 mg e 0,5 mg/mL respectivamente) foram incubadas em meio de reação segundo condições descritas em materiais e métodos, na presença de :

(a) 30 μM de Ca^{2+} , 250 μM de t-BuOOH e 5 mM de Pi; (b) mesmo que a com a adição de 2 μM de vermelho de rutênio, adicionado logo após a suspensão mitocondrial; (c) sem adições, (para a figura B).

Ação do ADP e carboxiatractilato (CAT) sobre a peroxidação lipídica e o aumento da permeabilidade mitocondrial.

Nos experimentos mostrados na Figura 10, procuramos verificar a ação do ADP, um substrato da translocase de nucleotídeos de adenina, e do carboxiatractilato (CAT), um inibidor desta translocase, sobre a lipoperoxidação (A) e o inchamento mitocondrial (B).

O ADP mostrou proteção parcial tanto em relação à ocorrência de inchamento mitocondrial quanto em relação à ocorrência de lipoperoxidação (traçados b), porém esse efeito protetor do ADP foi revertido pelo inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina (traçados c).

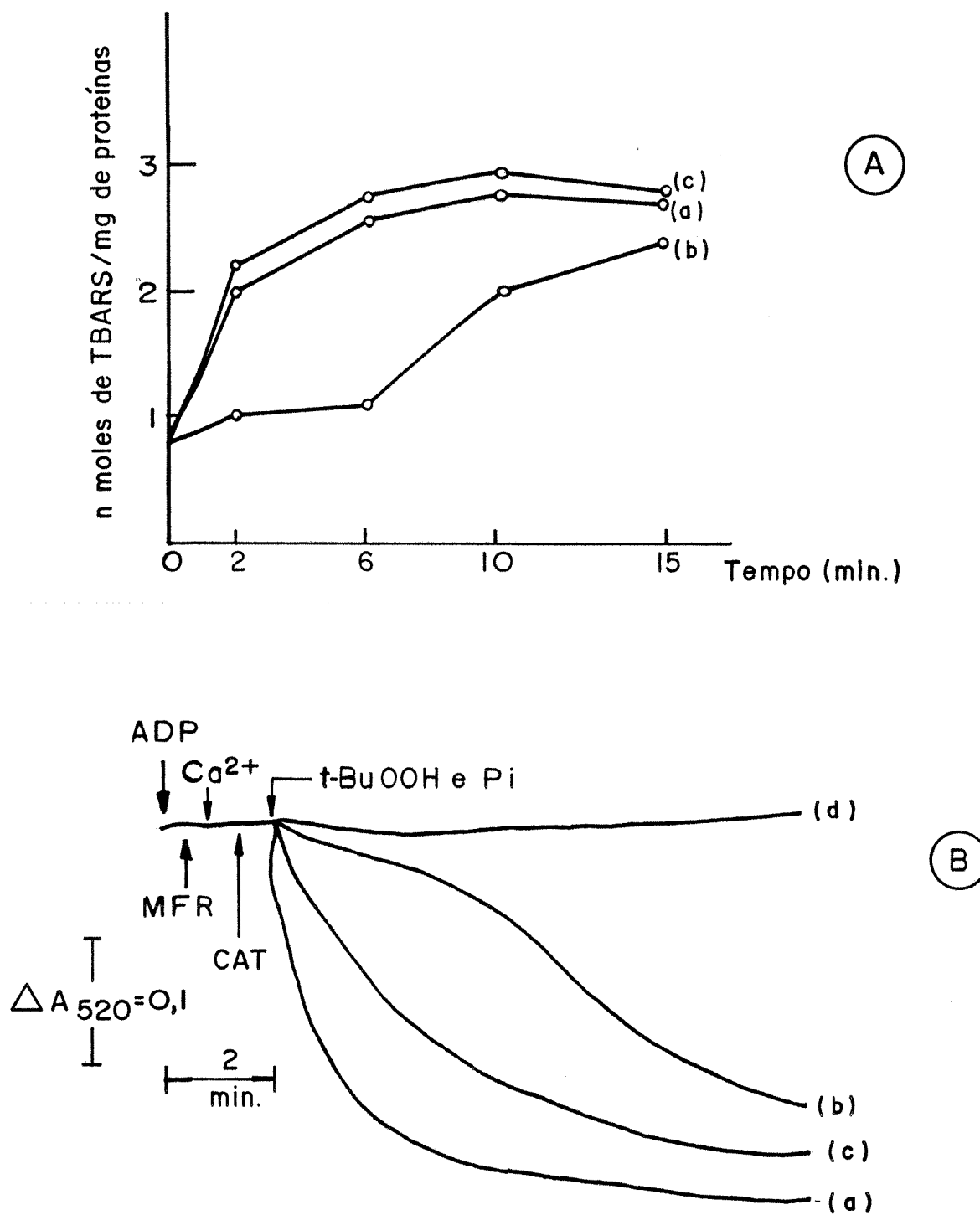


Figura 10 - Ação de ADP e CAT sobre a peroxidação lipídica (A) e inchamento mitocondrial (B) em mitocôndrias hepáticas.

Mitocôndrias (1,0 mg e 0,5 mg/mL respectivamente) foram incubadas em meio de reação segundo condições descritas em materiais e métodos, na presença de:

- (a) 30 μ M de Ca²⁺, 250 μ M de t-BuOOH e 5 mM de Pi; (b) mesmo que a com 200 μ M de ADP; (c) mesmo que b com 10 μ M de CAT; (d) sem adições, (somente para o painel B).

Ação da ciclosporina-A e trifluoperazina sobre o aumento de permeabilidade e ocorrência de lipoperoxidação.

A ciclosporina-A (CsA) é reconhecidamente potente inibidor de transição de permeabilidade pela provável reversão do poro dependente de Ca^{2+} , responsável pela transição, enquanto que a trifluoperazina (TFP), um inibidor da fosfolipase- A_2 , também apresenta efeito inibitório sobre o aumento de permeabilidade.

A ação destes inibidores do poro sobre a peroxidação lipídica e inchamento mitocondrial está mostrada na figura 11, onde pode-se observar que nenhuma das duas drogas altera significativamente a peroxidação lipídica (painel A).

Com relação ao inchamento mitocondrial (painel B), observa-se contudo que CsA (traçado b) retarda consideravelmente o aumento de volume mitocondrial, enquanto não foi observada diferença significativa na presença de TFP (traçado c).

Tendo em vista que essas drogas apresentaram efeitos bastante distintos sobre o inchamento mitocondrial apesar de nenhuma das duas alterar significativamente a formação de TBARS, foram comparadas também suas ações quando o indutor do processo de permeabilização é o Ca^{2+} na presença de P_i , ou na presença de t-BuOOH.

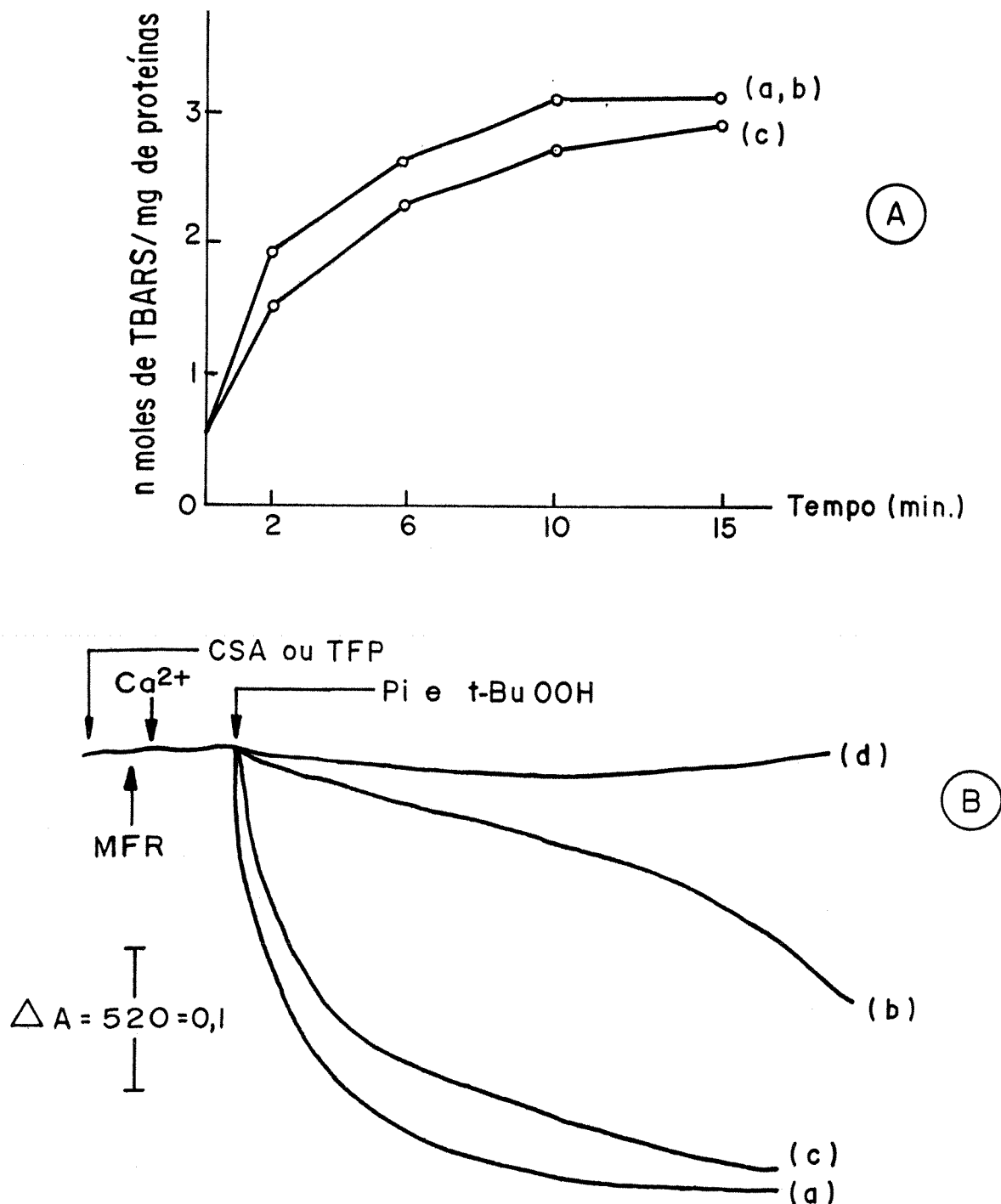


Figura 11 - Ação da ciclosporina-A e trifluoperazina na ocorrência da peroxidação lipídica (A) e inchamento mitocondrial (B). Mitocôndrias (1,0 mg e 0,5 mg/mL respectivamente) foram incubadas em meio de reação segundo as condições descritas em materiais e métodos, na presença de :

(a) 30 μ M de Ca^{2+} , 250 μ M de t-BuOOH e 5 mM de Pi; (b) mesmo que a, com de 1 μ M de ciclosporina-A (CsA); (c) mesmo que a, com 40 μ M de trifluoperazina (TFP); (d) sem adições, (somente para o painel B). Os experimentos a e b estão mostrados no mesmo traçado devido a diferença mínima na concentração de TBARS formado.

Conforme é possível verificar pela figura 12, quando o inchamento mitocondrial foi induzido por Ca^{2+} e t-BuOOH (painel A), a presença de CsA somente retardou o processo (traçado b). Já a trifluoperazina mostrou total proteção nessas condições (traçado c). No entanto, quando Pi foi adicionado ao meio, a proteção conferida pela trifluoperazina se perdeu, com início imediato de inchamento mitocondrial (traçado e).

Por outro lado, quando o inchamento ocorreu na ausência do oxidante (painel B), por indução de Ca^{2+} e Pi, TFP não apresentou proteção alguma (traçado c), ao passo que CsA previniu totalmente o processo (traçado b).

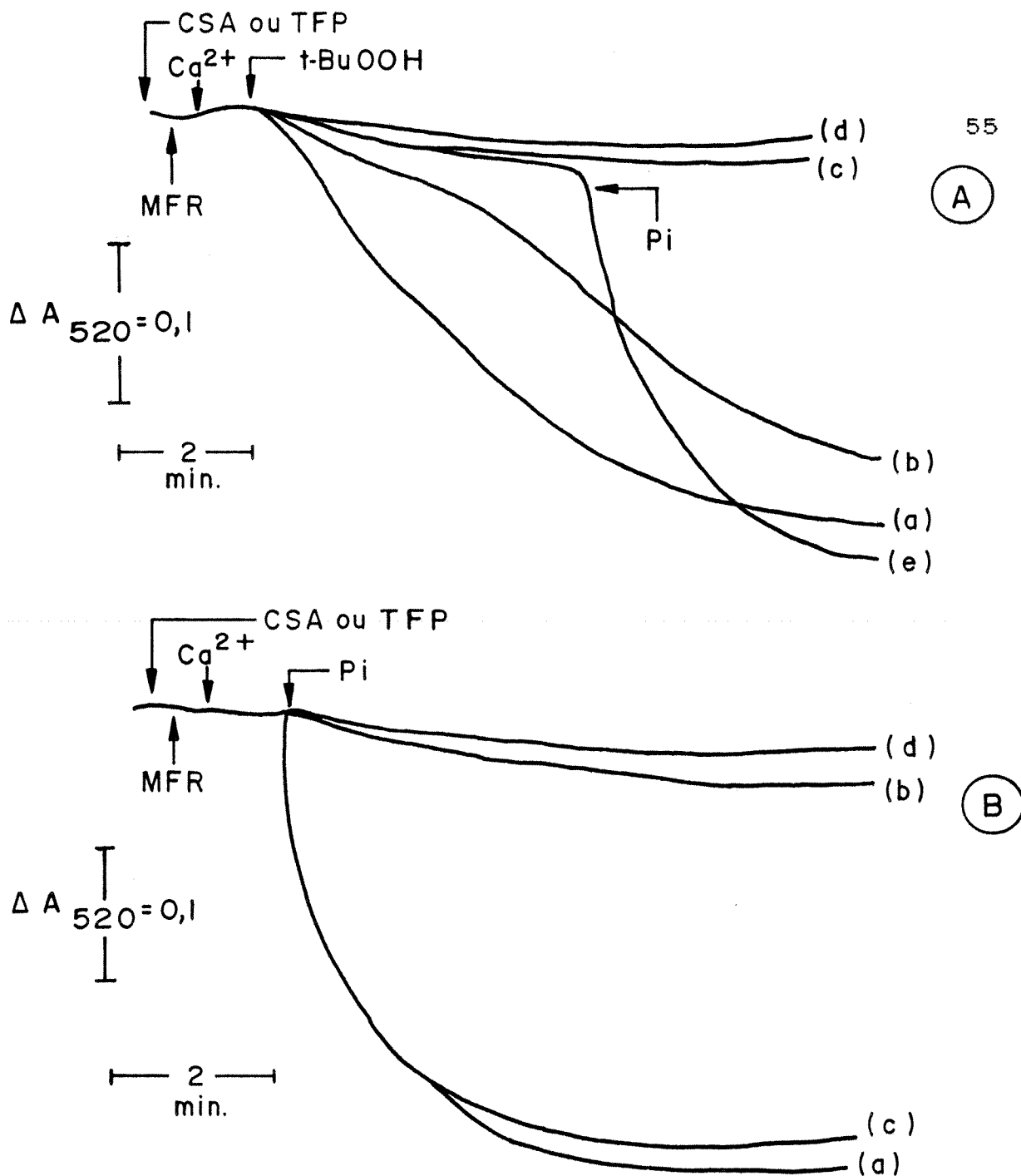


Figura 12 - Ação da ciclosporina-A e trifluoperazina nos mecanismos de inchamento mitocondrial causado por Ca^{2+} mais $t\text{-BuOOH}$ (A) ou Ca^{2+} mais Pi (B).

Mitocondrias ($0,5\text{mg/mL}$) foram incubadas em meio de reação segundo condições descritas em materiais e métodos, na presença de:

- (a) 30 uM de Ca^{2+} e 250 mM de $t\text{-BuOOH}$ (A) ou 5 mM de Pi (B);
- (b) mesmo que a, com 1 uM de ciclosporina-A (CsA);
- (c) mesmo que a, com 40 uM de trifluoperazina (TFP);
- (d) sem adições, (experimento controle);
- (e) mesmo que c, com 5 mM de Pi adicionado conforme indicado no painel A.

Alterações no estado físico das membranas mitocondriais.

Alterações no estado físico da membrana são processos decorrentes da modificação de componentes lipídicos, e a peroxidação, por oxidar os ácidos graxos poliinsaturados parece determinar mudanças na fluidez.

Nos experimentos a seguir, procuramos avaliar o grau de fluidez da membrana mitocondrial quando submetidas a condições peroxidativas.

Inicialmente comparamos mitocondrias e mitoplastos quanto às alterações do parâmetro de ordem, S , que é utilizado em experimentos de RPE, como indicador do estado de fluidez das membranas.

Nas condições oxidativas utilizadas nos experimentos anteriores, não houve modificação na fluidez de membrana, embora tivéssemos formação de TBARS. Passamos então a usar um sistema oxidante já conhecido, Fe^{2+} , e a figura 13 mostra a variação do parâmetro de ordem medido através da utilização do marcador 5-doxil estearato utilizando mitocôndrias e mitoplastos. Pode-se observar comportamento semelhante em ambos em função do aumento da concentração de Fe^{2+} , motivo pelo qual os experimentos que se seguiram foram realizados com mitocôndrias.

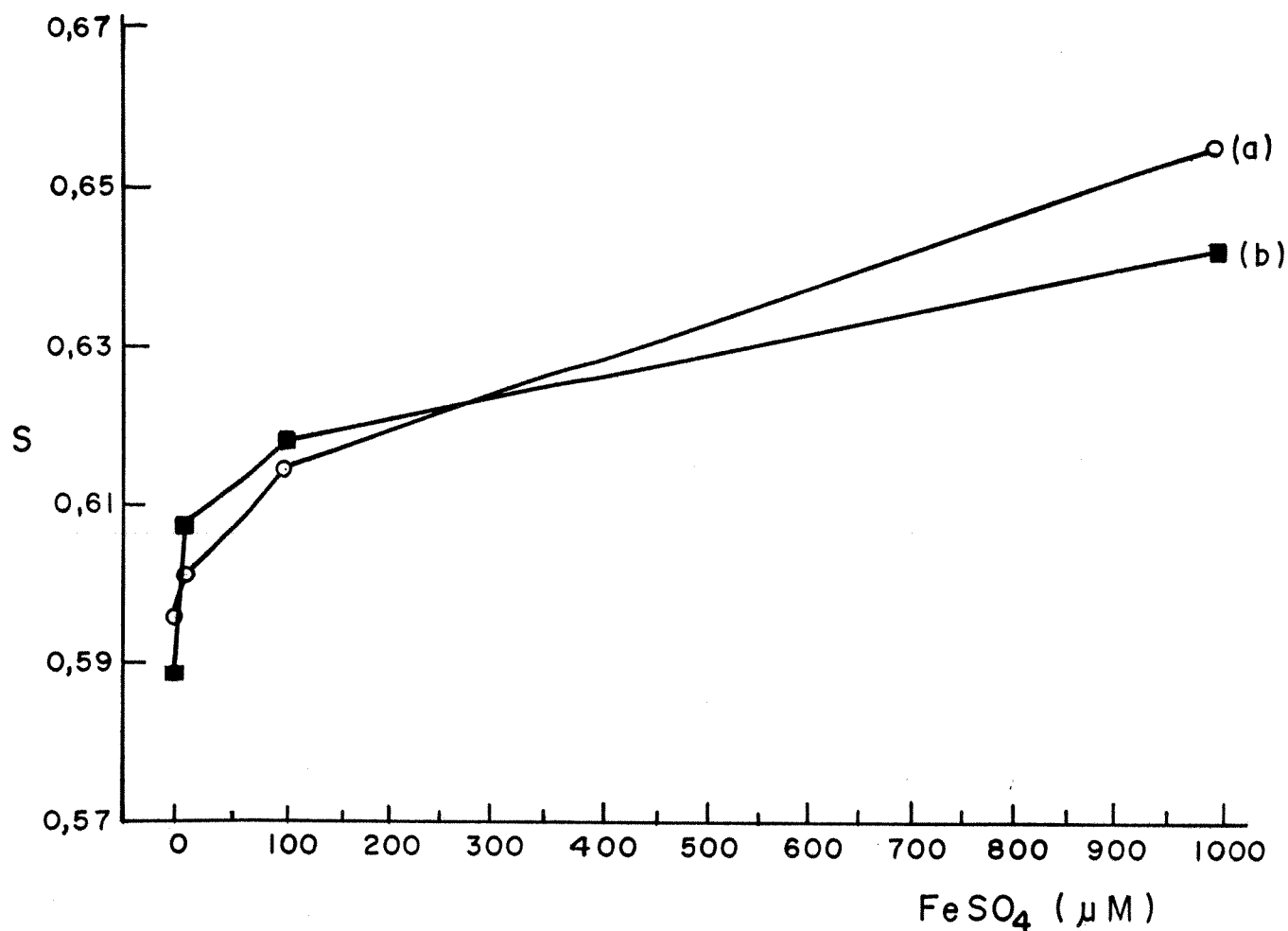


Figura 13 - Alterações sobre o parâmetro de ordem (S) na presença do marcador de spin 5-doxyl estearato em mitocôndrias e mitoplastos a 30°C.

Mitocôndrias e mitoplastos (1mg/mL) foram incubados em meio de reação por 15 minutos segundo as condições descritas em materiais e métodos, na presença de:

(a) mitocôndrias na presença de FeSO_4 em concentrações indicadas. (b.) mitoplastos na presença de FeSO_4 em concentrações indicadas. O erro experimental estimado é de $S = \pm 0,01$.

Resultados da determinação de TBARS após 15 minutos de incubação das mitocôndrias com diferentes concentrações de Fe^{2+} ou t-BuOOH, são mostrados na figura 14, (painel A).

Quando t-BuOOH foi usado como oxidante (traçados a, b e c), verifica-se que a formação de TBARS é bem menos quando comparada aos resultados obtidos ao se usar Fe^{2+} (traçado d).

Nota-se ainda, que a adição de 50 μM de Fe^{2+} quando t-BuOOH foi utilizado (traçado c), aumenta a produção de TBARS. Nesta figura mostra-se também a variação do parâmetro de ordem (painel B), nas mesmas condições experimentais.

Pode-se verificar que somente quando Fe^{2+} foi usado como oxidante (traçado d), a variação de S é significativa.

Nota-se que embora a adição de Fe^{2+} ao experimento realizado com t-BuOOH tenha aumentado a formação de TBARS, isso não foi suficiente para causar alteração na fluidez da membrana detectável pelo método utilizado.

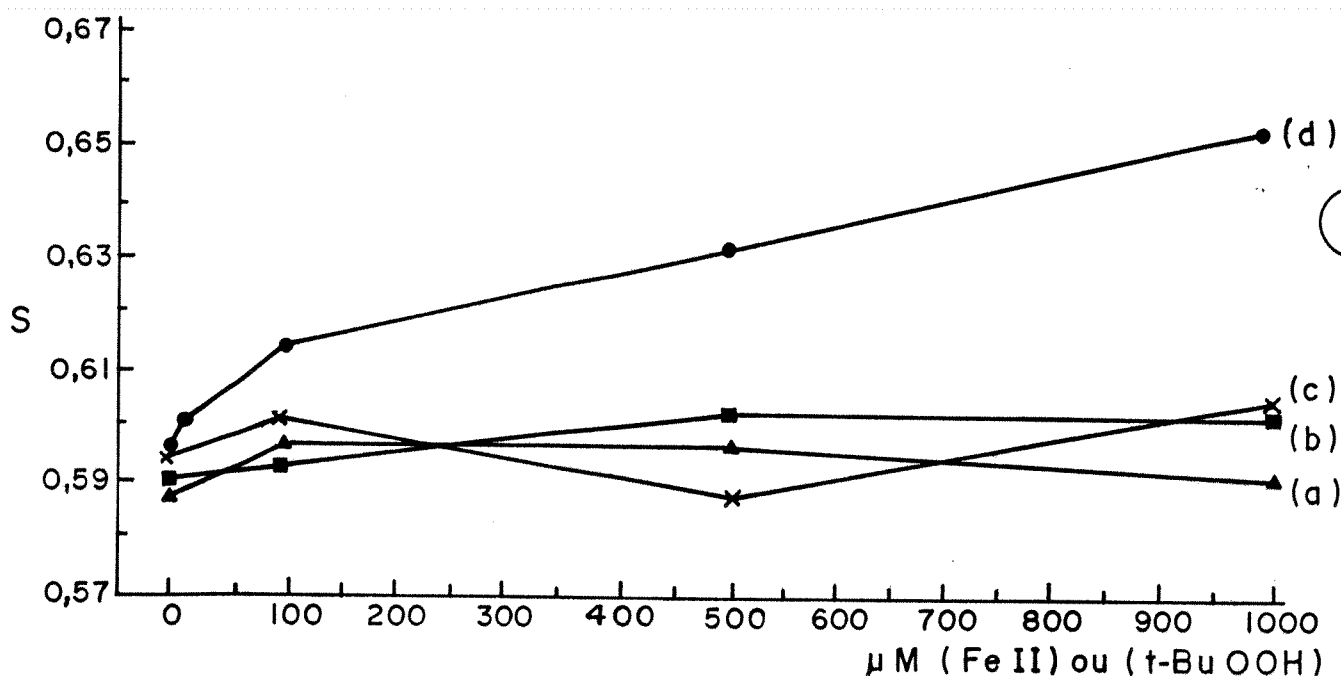
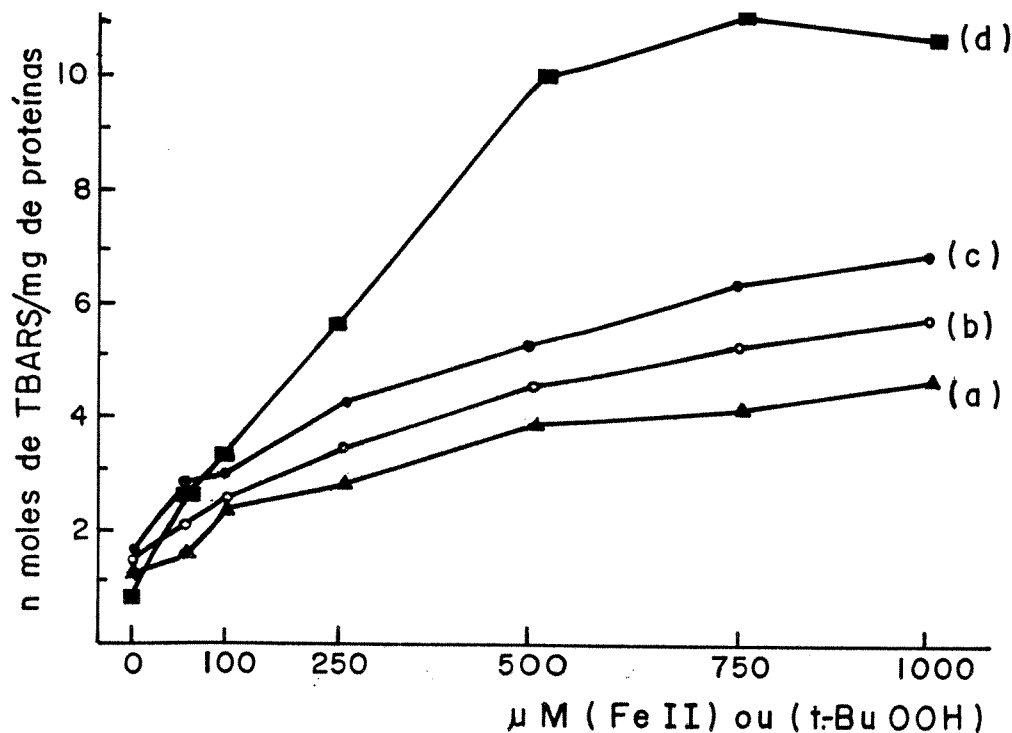


Figura 14 - Efeito de diferentes concentrações de FeSO_4 e t-BuOOH sobre o processo de peroxidação lipídica (A) e fluidez da membrana (B) através de cálculo do parâmetro de ordem (S).

Mitocôndrias (1 mg/mL) foram incubadas em meio básico por 15 minutos segundo as condições descritas em materiais e métodos, na presença de: (a) somente t-BuOOH nas concentrações indicadas e 5 mM de Pi ; (b) mesmo que a na presença de 30 μM de Ca^{2+} ; (c) mesmo que b na presença de 50 μM de FeSO_4 ; (d) somente FeSO_4 em concentrações indicadas. O erro experimental para figura B é de $S = \pm 0,01$.

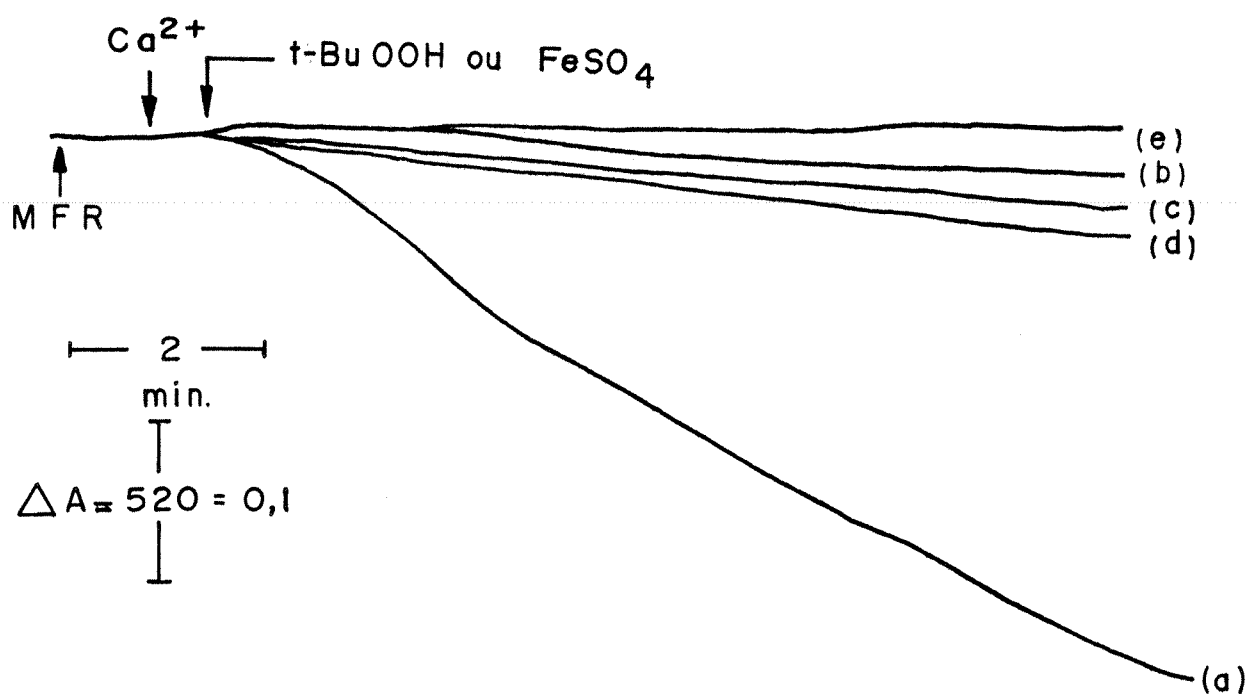


Figura 15 - Efeito da Concentração de FeSO₄ no processo de inchamento mitocondrial.

Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio básico de reação segundo as condições descritas em materiais e métodos, na presença de:

- (a) 30 uM de Ca²⁺ e 250 uM de t-BuOOH; (b) 50 uM de FeSO₄;
(c) 250 uM FeSO₄; (d) 500 uM de FeSO₄; (e) sem adições, (experimento controle).

Determinando-se o inchamento mitocondrial quando as mesmas variações na concentração de FeSO_4 foram efetuadas, pudemos perceber que a alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial interna foi praticamente insignificante conforme mostra a figura 15, traçados b, c, d e e.

Nessas mesmas condições, o sistema de membranas sofreu alterações decorrentes do processo oxidativo como mostrado na figura anterior, com alteração na fluidez de membrana e elevada produção de TBARS. Por outro lado, na presença de Ca^{2+} e $t\text{-BuOOH}$ onde o processo peroxidativo é muito menos acentuado, podemos observar um intenso inchamento mitocondrial (traçado a).

A adição de 30 μM de Ca^{2+} nos experimentos em que Fe^{2+} foi usado como indutor da lipoperoxidação, não alterou o padrão de inchamento.

D I S C U S S Ã O

Nossos resultados iniciais mostraram que para a ocorrência de lipoperoxidação é necessária a presença de um oxidante, pois somente altas concentrações de Ca^{2+} e Pi não levaram à formação de TBARS (figura 2), enquanto que a adição de hidroperóxido orgânico ao meio determinou a ocorrência do processo (Nepomuceno et alii, 1991). Esses dados estão de acordo com os trabalhos de Marshansky et alii (1983), que mostraram a necessidade de ferro e um agente redutor como o ascorbato ou hidroperóxidos orgânicos como catalizadores da lipoperoxidação. Por outro lado, considerando-se o fato de que Ca^{2+} e Pi induzem um aumento no vazamento de elétrons na cadeia respiratória, aumentando portanto a produção de espécies ativas de oxigênio, a extensão desse processo, nas nossas condições, não é suficiente para que possamos detectar a formação de TBARS. Nossos resultados portanto não permitem concordar com a proposta de Carbonera e Azzone (1988) de que a peroxidação lipídica possa ser o processo inicial no mecanismo de alteração da permeabilidade mitocondrial.

A presença de fosfato mostrou ser um fator determinante na ocorrência de lipoperoxidação indizada por t-butil hidroperóxido (Nepomuceno et alii, 1991) conforme podemos observar nos experimentos mostrados na figura 3. Esta observação está de acordo com trabalhos de Marshansky et alii, (1983). Segundo esses autores, o efeito do fosfato inorgânico na indução da lipoperoxidação é devido à habilidade do fosfato em estimular o

transporte de hidróperóxido para o interior da mitocôndria conforme sugerido por Jocelyn e Dickson (1980). Posteriormente foi mostrado que o fosfato deveria atuar no interior da matriz mitocôndrial, pois na presença de N-etilmaleimida, que inibe o carreador de P_i e portanto impede a entrada de fosfato na matriz, ocorre uma redução de 70% na produção de MDA (Marshansky e Yaguzhinsky, 1986), o que levou o grupo a propor que o processo de lipoperoxidação poderia estar sendo controlado pela ATP sintetase da qual o fosfato é um substrato. Esta hipótese foi descartada posteriormente por Novgorodov et alii, (1989-a) pois na presença de oligomicina, um inibidor da ATP sintetase, o processo de lipoperoxidação ocorria na mesma intensidade observada na ausência de oligomicina.

Como a presença de Ca^{2+} em nossos experimentos foi determinante para a ocorrência da peroxidação lipídica induzida por hidróperóxido (figura 4), consideramos a possibilidade da ação do fosfato estar relacionada com seu efeito ion permeante em relação ao Ca^{2+} ; porém nossos resultados mostraram que a substituição do fosfato pelo acetato, também um ion permeante, não determinou produção significativa de TBARS. Schubert et Wilmer (1991), propõem que a presença de fosfato retardaria a decomposição de peróxido de hidrogênio, e neste caso, poderia estar retardando a decomposição do t-BuOOH, favorecendo assim a lipoperoxidação. Entretanto o papel real do fosfato no processo de lipoperoxidação permanece ainda obscuro, sabendo-se apenas que sua presença é essencial para que o processo ocorra.

Como já citado, o Ca^{2+} mostrou ser determinante para a ocorrência de lipoperoxidação (figura 4) visto que na presença de EGTA a produção de TBARS é muito pequena, enquanto que na ausência deste quelante a lipoperoxidação ocorre a níveis significativos (Nepomuceno et alii, 1991). Deve-se ainda ressaltar que mesmo concentrações de Ca^{2+} bastante baixas, a nível de Ca^{2+} contaminante (5 a 10 μM) já são suficientes para causar um aumento no nível de TBARS, quando comparado ao controle (figura 4).

Quando o processo de lipoperoxidação foi correlacionado com mudanças no volume mitocondrial, em condições experimentais idênticas, larga amplitude de inchamento foi observada, conforme é mostrado na figura 5, sendo possível observar que o inchamento mitocondrial ocorre na presença de Ca^{2+} e t-BuOOH ou Ca^{2+} e Pi, conforme já demonstrado anteriormente em outros trabalhos (Carbonera e Azzone, 1988, Macedo et alii, 1988), enquanto que a detecção da formação de TBARS só foi possível na presença de t-BuOOH.

O grupo de Azzone tem sugerido em seus trabalhos que a transição de permeabilidade é decorrente da geração de espécies reativas de oxigênio, já que a presença de BHT no meio impede a queda de potencial elétrico de membrana em mitocôndrias energizadas e submetidas a Ca^{2+} mais Pi ou Ca^{2+} mais prooxidantes (Rizzuto et alii, 1987; Carbonera e Azzone, 1988). No

entanto, em nossas condições experimentais BHT não preveniu totalmente a ocorrência de transição de permeabilidade, apenas diminuindo sua extensão (figura 6 B). Esta diferença pode estar relacionada à maior concentração de oxidante utilizada em nossos experimentos. Já o processo de lipoperoxidação foi totalmente prevenido em condições idênticas, quando o BHT foi adicionado antes (não mostrado) ou depois do oxidante (figura 6 A).

Procurando correlacionar os dois processos, pudemos observar que a presença do Ca^{2+} é fundamental para a ocorrência de transição de permeabilidade pois a adição de EGTA impede a sua ocorrência quando adicionado a suspensão mitocondrial antes do oxidante (não mostrado) e bloqueia completamente a sequência do processo quando adicionado após o seu início (figura 6 B), porém o processo de peroxidação lipídica não é bloqueado pela adição de EGTA após o seu início (figura 6 A). Estes dados mostram que o Ca^{2+} é necessário para a ocorrência de ambos os processos, porém as evidências indicam ação diferenciada deste íon sobre a transição de permeabilidade e peroxidação lipídica.

Dados da literatura apontam que a permeabilização mitocondrial promovida por fosfato ou oxidantes só ocorre quando as mitocôndrias estão incubadas na presença de Ca^{2+} (Haworth e Hunter, 1979, Macedo et alii, 1988, Gunter e Pfeiffer, 1990), o que pode ser comprovado por nossos experimentos em que este cátion foi substituído pelo Sr^{2+} , que apesar de também ser

captado pelas mitocôndrias pela mesma via de captação do Ca^{2+} , não exibe efeitos deletérios sobre as mesmas (Fagian et alii, 1986). Assim, a presença de Sr^{2+} não determinou qualquer aumento no processo de peroxidação lipídica, analisado pelos níveis de TBARS mostrados na figura 7.

Por outro lado, o efeito do Ca^{2+} potencializando a peroxidação lipídica em membranas de eritrócitos induzida por hidroperóxidos ou xantina oxidase foi descrito por Susch et alii (1981), pois o aumento do nível de Ca^{2+} em células ciclêmicas e senescentes é um aspecto amplamente descrito e a adição de EGTA diminui a formação de malondialdeído, um produto de lipoperoxidação.

Em nossas condições experimentais o EGTA diminuiu a formação de TBARS em mitocôndrias submetidas à ação de hidroperóxidos e desde que este processo ocorre sem alterações na presença de agentes específicos que quelam o ferro livre como a o-fenantrolina utilizada no experimento descrito na figura 7, podemos descartar a possibilidade do Ca^{2+} estar promovendo a liberação do Fe^{2+} intramitocôndrial e o aumento da formação de TBARS ser induzido por Fe^{2+} e não por Ca^{2+} .

Os experimentos mostrados na figura 8, foram realizados com mitocôndrias desenergizadas, onde por inibição da respiração por antimicina-A, não há formação de potencial elétrico e portanto não ocorre a captação de Ca^{2+} pela via eletroforética. Nessas

condições de inibição da cadeia respiratória, a ocorrência de consumo de O_2 pode ser atribuída à lipoperoxidação, já que peróxidos orgânicos são pouco eficientes para conduzir uma fragmentação decorrente de oxidação em proteínas de membrana usando apenas a formação de dissulfetos (Simon et alii, 1986).

Assim, se considerarmos que na condição dos traçados b, em que as mitocôndrias desenergizadas estão na presença de baixas concentrações de Ca^{2+} (Ca^{2+} contaminante, 5 a 10 μM) e são incubadas na presença de t-BuOOH e Pi, não ocorre inchamento mitocondrial (painel B), embora a lipoperoxidação possa ser evidenciada tanto pela formação de TBARS (painel A) quanto pelo consumo de O_2 (painel C). Esses resultados sugerem que enquanto é necessário haver Ca^{2+} no interior das mitocôndrias para ocorrer a transição de permeabilidade, a peroxidação lipídica ocorre mesmo sem que tenha havido captação do cátion. No entanto, a lipoperoxidação é estimulada quando uma alta concentração de Ca^{2+} é adicionada a essas mitocôndrias desenergizadas, que passam a ter Ca^{2+} em seu interior devido ao alto gradiente de concentração formado. Nessa condição, mostrada nos traçados c, passa também a ocorrer inchamento mitocondrial, o que está de acordo com a discussão acima. Esses resultados mostram também que mesmo sem ocorrer o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória há consumo de oxigênio devido a degradação do t-BuOOH e consequente processo peroxidativo, estando de acordo com outros dados da literatura (Novgorodov et alii, 1991-c; Kennedy et alii, 1992).

De acordo com Novgorodov et alii, (1991-c) a produção acentuada de TBARS em mitocôndrias desenergizadas está relacionada à oxidação total da ubiquinona que quando reduzida tem ação anti-oxidante, e também ao estado oxidado da glutathione (GSSG) visto que o sistema regenerador da forma reduzida deste tripeptídeo se dá através da transferência de equivalentes redutores fornecidos por NADPH através da ação da transidrogenase que é dependente de energia.

Quando o movimento cíclico de Ca^{2+} foi interrompido através do bloqueio da captação pela adição do vermelho de rutênio (figura 9), o inchamento mitocondrial foi drasticamente reduzido, porém não observamos qualquer efeito protetor em relação à peroxidação lipídica, mostrando que não há necessidade de se estabelecer um movimento cíclico de Ca^{2+} para que ocorra o processo peroxidativo. Já para que se dê a transição de permeabilidade há necessidade de captação do Ca^{2+} pela mitocôndria, corroborando os experimentos realizados com as mitocôndrias desenergizadas e mais uma vez, dissociando os dois processos.

Dados recentes da literatura tem mostrado que a produção de espécies ativas de oxigênio em mitocôndrias depende diretamente do estado redox de componentes da cadeia de transporte de elétrons (Kennedy et alii, 1992, Radi et alii, 1993). Entretanto outros aspectos podem influenciar o processo sendo que a presença

de Ca^{2+} tem sido proposta como estimuladora da geração dessas espécies reativas (Carbonera et alii, 1988; Paraidathathu et alii, 1992; Valle et alii, 1993; Takeyama et alii, 1993). No entanto, nossos experimentos com BHT, conforme mostrado na figura 6, mais uma vez dissociam o processo de peroxidação lipídica da transição de permeabilidade em mitocôndrias dependente de Ca^{2+} , uma vez que enquanto a produção de TBARS é imediatamente interrompida pela adição do sequestrador, como esperado, o inchamento mitocondrial sofre somente uma inibição parcial.

Outra possibilidade para se explicar o papel do Ca^{2+} seria através da ação da fosfolipase- A_2 sobre a lipoperoxidação (Borowitz e Montgomery, 1989), pois ao catalizar a desacilação e liberação do ácido graxo este se tornaria mais disponível para a ação das espécies ativas de oxigênio, facilitando a propagação do processo. Neste caso, a ação do Ca^{2+} estaria relacionada ao seu papel de cofator da fosfolipase- A_2 .

Este aspecto da ação da fosfolipase- A_2 foi questionado por Gogvadze e Zhukova (1990), que utilizando um inibidor da fosfolipase- A_2 não observou alterações no processo de lipoperoxidação, e sugeriu portanto o inverso, ou seja, que seria a lipoperoxidação, por causar alterações na bicamada lipídica, aumentaria a susceptibilidade dos fosfolípidios para o ataque da fosfolipase A_2 . Analogamente, dados do nosso laboratório em trabalho que compara alterações na permeabilidade em diferentes tipos de mitocôndrias, sugerem a ação da

fosfolipase A_2 como um mecanismo posterior ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (Morselli e Pereira-da-Silva, 1992).

O estímulo do Ca^{2+} sobre a lipoperoxidação mostrado neste trabalho foi também observado em várias outras condições (Sush et alii, 1981; Nepomuceno et alii, 1991; Paraidathathu et alii, 1992) parece realmente ser genuíno. Entretanto não há evidências da iniciação direta da lipoperoxidação pelo Ca^{2+} , porém sua ação sinérgica no mecanismo lipoperoxidativo é considerada. (Bors et alii, 1990).

Por outro lado, uma série de trabalhos vem correlacionando o estado conformacional do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) com a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna (Lê Quoc e Lê Quoc, 1988; Rottenberg e Marbach, 1989; Klingenberg, 1989), chegando mesmo alguns autores a apontar esse carreador como um possível componente do poro (Novgorodov et alii, 1990; Hallestrap e Davidson, 1990).

Trabalho recente do nosso laboratório (Macedo et alii, 1993) também propõe que a permeabilização de mitocôndrias induzida por Ca^{2+} na presença de P_i ou $t\text{-BuOOH}$, seja devida à ativação de um poro que parece ser o próprio translocador de ADP/ATP, já que o ADP confere proteção às mitocôndrias de forma bastante eficiente enquanto que o CAT reverte a proteção em questão. Esses resultados são atribuídos ao estado conformacional do carreador,

que voltado para a matriz determinaria o estado de poro fechado, o que ocorre quando o ADP se liga ao mesmo, enquanto que o CAT, por impedir a ligação do ADP ou mesmo remover o ADP do seu sítio de ligação, determina o estado de poro aberto e voltado para o citossol (Le Quôc K.e Le Quôc D., 1988). Em nossos resultados mostrados na figura 10, pode-se notar que o ADP confere proteção parcial em relação à ocorrência de lipoperoxidação e esta proteção é revertida por CAT. Novgorodov e Gogvadze (1989-b) obtiveram resultados semelhantes com ADP diminuindo o acúmulo de produtos de lipoperoxidação e prevenindo a indução de fluxo iônico.

A possibilidade de que a mudança conformacional do carreador pela ligação de seu substrato (ADP) ou inibidor (CAT) estar protegendo ou expondo os fosfolípidios de membrana à ação de espécies ativas foi proposta por nós recentemente. Neste caso a lipoperoxidação seria um processo de ocorrência posterior à abertura do poro dependente de Ca^{2+} , especialmente nas condições onde a alta concentração de hidroperóxidos depletaria os sistemas anti-oxidantes de defesa mitocondrial (Nepomuceno et alii, 1991; Macedo et alii, 1993). Isto torna-se mais evidente quando comparamos o efeito protetor do ADP sobre o inchamento mitocondrial causado por Ca^{2+} e t-BuOOH ou Ca^{2+} e Pi. Conforme mostra a figura 10, quando o inchamento é induzido por Ca^{2+} mais t-BuOOH a proteção conferida pelo ADP foi parcial. Já na condição de inchamento provocada por Ca^{2+} e Pi, o efeito protetor do ADP é total, prevenindo completamente a ocorrência do processo

(Macedo et alii, 1993). Deve-se ressaltar no entanto, que nesta condição não ocorre peroxidação lipídica, nem mesmo com elevadas concentrações de Ca^{2+} (figura 2). Nossos resultados permitem uma clara dissociação dos dois processos, mostrando mais uma vez que substâncias que inibem o fluxo iônico não necessariamente bloqueiam a ocorrência de lipoperoxidação, o que corrobora nossas observações iniciais que apontam ação diferenciada para o Ca^{2+} nos processos aqui estudados.

Por outro lado, dados da literatura tem sugerido dois mecanismos que parecem de maior relevância para o entendimento da ocorrência de transição de permeabilidade: a abertura de um poro dependente de Ca^{2+} , sensível a ciclosporina A (CsA), a ação da fosfolipase- A_2 sobre os lipídios de membrana, que é inibida pela trifluoperazina (TFP). (Broekemeier et alii, 1989). Entretanto foi mostrado mais recentemente que mecanismos de acilação e deacilação de fosfolipídios de membrana não são responsáveis pela ocorrência de transição, descartando portanto a participação direta de fosfolipase- A_2 (Broekemeier et alii, 1991).

Quando em nossos experimentos, utilizamos CsA ou TFP, pudemos observar que as mesmas não afetaram a ocorrência de peroxidação lipídica causada por Ca^{2+} e t-BuOOH na presença de Pi (figura 11 A). Nessas mesmas condições, TFP praticamente não alterou o inchamento mitocondrial enquanto a proteção conferida pela CsA foi parcial (figura 11 B) observando-se uma diminuição significativa na velocidade inicial do processo .

Isto levou-nos a procurar estabelecer se esses efeitos distintos poderiam indicar a ocorrência de mecanismos diferenciados no inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e t-BuOOH ou Ca^{2+} e Pi. Nos resultados mostrados na figura 12, painel A, verificou-se que a adição de Ca^{2+} e t-BuOOH na ausência de Pi também causa extenso inchamento mitocondrial, completamente inibido por TFP (traçado c) mas não por CsA (traçado b). Outro dado digno de atenção é o fato da proteção conferida por TFP ser imediatamente abolida pela adição de Pi (traçado e). Nesta mesma figura, mostra-se que a adição de Ca^{2+} e Pi (painel B) também induz ao inchamento mitocondrial. Nesta condição não oxidativa, somente CsA (traçado b) previne completamente o processo, enquanto TFP (traçado c) mostrou-se totalmente ineficaz.

Na presença do oxidante t-BuOOH, a inibição conferida pela ciclosporina-A se mostrou transiente estando de acordo com as observações de Broekemeier e Pfeiffer, (1989), que mostraram que com concentrações altas deste oxidante, ocorre a perda gradativa da proteção por CsA. Novgorodov et alii, (1991-a) propuseram como explicação a possibilidade de abertura de uma segunda via não específica, pela hidrólise de fosfolípidios, ou mesmo a perda de um fator que module a sensibilidade da ciclosporina em relação ao poro, porém tais aspectos se configuram como eventos secundários.

Ja na hipótese levantada por Fagian et alii (1990), a formação de agregados proteicos através do estabelecimento de ligações cruzadas de grupos sulfidríla de proteínas de membrana, seria o mecanismo responsável pela transição. Entretanto, a formação desses agregados mostrados através de eletroforese das proteínas mitocondriais ocorreu somente na presença de Ca^{2+} e oxidantes como t-BuOOH e diamida, o que também sugere que a transição de permeabilidade causada por Ca^{2+} e oxidantes ou Ca^{2+} e Pi ocorram por mecanismos diferentes. A ação da TFP pode ser interpretada como decorrente da prevenção de oxidação de grupos tiólicos (Pereira et alii, 1992) porém não interferindo quando o processo é induzido por Ca^{2+} e Pi. Entretanto, quando mitocôndrias foram tratadas previamente com diamida e submetidas ao complexo Fe-ascorbato, a peroxidação lipídica foi amplamente aumentada (Bindoli et alii, 1977), o que levou os autores a concluir que a oxidação prévia de grupos SH de proteínas de membrana favorece a ação de espécies ativas sobre os fosfolípidios. O fato é que em nossas condições experimentais TFP não inibiu a ocorrência de peroxidação lipídica, e comparando com os dados de Bindoli et alii (1977), poderíamos esperar um efeito de inibição da TFP sobre a lipoperoxidação, se esta droga estivesse realmente impedindo a oxidação de grupos SH, contrariando portanto esta hipótese.

Por outro lado a TFP é classicamente considerada um inibidor da fosfolipase- A_2 por impedir a ligação do Ca^{2+} e consequente ativação desta enzima (Broekemeier et alii, 1985). Segundo

Bernardi et alii (1993), a inibição exercida pela TFP sobre a transição de permeabilidade é devida a um efeito direto sobre o poro, possivelmente por modificar os sítios internos aos quais o Ca^{2+} se liga, à semelhança do mecanismo inibitório exercido pela droga sobre a fosfolipase- A_2 . Desta forma, a ligação do Ca^{2+} aos sítios internos da membrana promoveria a transição de permeabilidade através da abertura do poro, porém a ação da TFP como um inibidor competitivo em relação à ligação do Ca^{2+} a esses sítios, presumivelmente interfere na regulação do poro. Já a ciclosporina não se liga ao mesmo sítio que o Ca^{2+} , mas impede a ligação deste aos sítios que estimulam a abertura do poro. De acordo com esses dados, os padrões de inibição da TFP e CsA, seriam comuns, independentemente da natureza do agente indutor, embora fossem explicados pela ação diferenciada dos mesmos em relação ao impedimento da ocorrência de transição (Bernardi et alii, 1993).

Tal hipótese entretanto não esclarece completamente os resultados por nós obtidos em relação à inibição exercida pela TFP, pois no painel 12 B da figura 12 não se observou qualquer proteção quando adicionou-se Ca^{2+} na presença desta droga (traçado c), o que era de se esperar se a competição proposta estivesse ocorrendo, pois a ocupação do Ca^{2+} no sítio regulatório interno deveria se dar gradativamente com consequente deslocamento da TFP, o que determinaria uma inibição ao menos parcial. Permanece portanto a ser esclarecido a ação inibitória da TFP, que de acordo com os nossos resultados está ocorrendo

somente em condições oxidativas, na ausência de P_i , (figura 12, painel A).

Observação semelhante foi feita recentemente por Imbert et alii (1993) em trabalho que investiga os efeitos tóxicos de t-BuOOH em hepatócitos sobre transição de permeabilidade determinada na célula intacta por fluorescência, inibição na síntese de ATP e estresse oxidativo, estudando a ação da CsA e TFP nestes mecanismos. Foi observado que a proteção conferida pela CsA foi transiente enquanto TFP determinou proteção mais efetiva e por um período maior. Em vista disto os autores sugerem que a proteção exercida pela TFP não se deve exclusivamente a sua ação direta sobre a transição de permeabilidade da membrana interna mitocondrial, como no caso da CsA. Este aspecto protetor é também observado sobre outras membranas, como a membrana plasmática e de outras organelas e em diferentes tecidos, sugerindo um mecanismo de ação mais amplo através do qual a TFP exerce seu efeito protetor sobre o sistema de membranas celular. (Imberti et alii, 1993).

Com objetivo de esclarecer melhor a extensão do dano peroxidativo sobre o sistema de membranas mitocondriais procuramos avaliar as alterações no estado físico da membrana decorrentes da peroxidação lipídica, através da determinação do parâmetro de ordem S, relacionado com o estado de fluidez de membranas.

Um aspecto importante a ser considerado ao se trabalhar com mitocôndrias intactas é a existência de duas membranas nessas organelas. Assim, procuramos inicialmente verificar se havia alguma diferença significativa nos valores do parâmetro de ordem, S , ao compararmos o comportamento de mitocôndrias e de mitoplastos incubados com concentrações crescentes de FeSO_4 . A ausência de diferenças significativas permitiu-nos o uso das mitocôndrias, como vinhamos fazendo ao longo deste trabalho.

Dados da literatura indicam que as alterações na fluidez da membrana decorrentes da peroxidação lipídica detectadas fluorimetricamente só ocorrem após um acúmulo de 10 nmoles de MDA/mg de proteínas, (Dobretsov et alii, 1977; Vladimirov et alii, 1980; Masini et alii, 1992), portanto resultante de um processo peroxidativo mais intenso do que aqueles por nós observado nas condições até então estudadas, onde a produção de TBARS em mitocôndrias incubadas na presença de Ca^{2+} e $t\text{-BuOOH}$ alcançava no máximo 35% desse valor.

Para podermos observar alterações mais intensas, passamos a induzir a peroxidação com FeSO_4 . Os resultados comparativos do efeito de concentrações de $t\text{-BuOOH}$ ou de FeSO_4 , conforme mostra a figura 14 ilustra bem o fato de que para se detectar alterações na fluidez da membrana através da determinação de S é necessário uma elevada formação de TBARS. Foi também possível observar que o inchamento mitocondrial aumenta muito lentamente quando induzido por concentrações crescentes de FeSO_4 .

Em condições onde já se verifica a formação de cerca de 10 nmoles TBARS/mg de proteína ($[Fe II] = 500 \mu M$), ocorre apenas um discreto e lento inchamento, como mostra o traçado d da figura 15, em contraste com a condição de incubação na presença de Ca^{2+} e t-BuOOH (traçado a). Nem mesmo a adição de 30 μM de Ca^{2+} intensificou a ocorrência do processo na presença de sais ferrosos, indicando mais uma vez que a abertura do poro e alterações de fluidez da membrana ocorrem independentemente.

Se o ferro é um potente indutor de espécies ativas de oxigênio e estas quando não apresentam carga atravessam velozmente a bicamada lipídica (Halliwell e Gutteridge, 1989); poderíamos esperar a ação destas espécies ativas na presença de Ca^{2+} como um mecanismo indutor de transição de permeabilidade tão intenso quanto o causado por t-BuOOH, porém isto não foi observado em nossos experimentos.

Dados recentes da literatura sugerem que lipohidroperóxidos (LOOH) gerados na cascata peroxidativa em baixas concentrações podem modular um poro fisiológico dependente de Ca^{2+} e que tal mecanismo pode regular o fluxo iônico sob condições fisiológicas (Masini et alii, 1992).

A concentração de lipohidroperóxidos em torno de 10 μM despolariza a membrana mitocondrial interna porém não causa uma permeabilização genérica nem alterações profundas na bicamada, parecendo exercer seu controle sobre um canal proteico dependente de Ca^{2+} e que este canal parece ser o translocador de nucleotídeos de adenina,

conforme proposta inicial de Hallestrap e Davidson, (1990).

Neste caso, apenas quando fatores exógenos reduzem o "pool" de GSH mitocondrial ou a concentração de hidroperóxidos é aumentada, passaria a ocorrer um processo deletério (Masini et alii, 1992).

Este aspecto, bastante interessante, é favorável mais uma vez à possibilidade de um papel fisiológico do poro, proposta inicialmente por Gunter e Pfeiffer (1990), que seria perdido em condições de grande estresse oxidativo, como mostram nossos resultados.

Uma análise global dos resultados aqui apresentados leva-nos a considerar que a lipoperoxidação é um efeito posterior à transição de permeabilidade induzida por Ca^{2+} e hidroperóxidos, quando a concentração destes depleta os sistemas de defesa mitocondrial. Porém o processo peroxidativo pode se instalar em condições onde a transição de permeabilidade esteja inibida, possivelmente pela oclusão do poro. Em baixas concentrações de t-BuOOH, onde não detectamos a formação de TBARS, a transição de permeabilidade e fluxo iônico são observados (Nepomuceno et alii, 1991). Resultado semelhante foi obtido por Gogvadze e Zhukova (1991) que utilizando pequenas concentrações de hidroperóxido (5 μM) condição onde o processo oxidativo não é detectado, observou efluxo de Ca^{2+} das mitocôndrias. A formação de TBARS só foi verificada a partir de 50 μM de CuOOH porém o efluxo de Ca^{2+} mais pronunciado foi

observado em concentrações menores do que esta. Por outro lado, a intensificação no acúmulo de TBARS em concentrações crescentes de CuOOH não alterou o efluxo de Ca^{2+} o que levou os autores a sugerir que o efluxo de Ca^{2+} está acoplado ao metabolismo do hidroperóxido por um sistema enzimático endógeno e que a lipoperoxidação ocorre apenas com um aumento na concentração do oxidante, sem entretanto induzir um aumento no efluxo do Ca^{2+} (Gogvadze e Zhukova, 1991).

Ainda nesta linha são apontados dois mecanismos que contribuem para a ação letal do t-BuOOH sobre hepatócitos, a despolarização mitocondrial com depleção de ATP e peroxidação lipídica. Quando antioxidantes impedem a ocorrência de peroxidação lipídica em condições de alta concentração de t-BuOOH, a toxidez exercida pelo mesmo acaba culminando com a morte celular, indicando que a ação deletéria do t-BuOOH pode ocorrer independente do mecanismo peroxidativo e que os efeitos deletérios parecem ser decorrentes da depleção do ATP, devido ao desacoplamento da fosforilação oxidativa causada pela despolarização da membrana interna mitocondrial (Masaki et alii, 1989).

Estes dados se constituem em um aspecto fundamental para sugerirmos que concentrações maiores de hidroperóxidos como as utilizadas em nossas condições experimentais, gerem espécies ativas de oxigênio que agiriam sobre a estrutura da membrana, porém alterações na fluidez e inviabilização total das funções da

membrana só ocorrem quando o processo peroxidativo é muito intenso, como o observado na presença de Fe^{2+} , e mostrado na figura 14-A.

Conclusão semelhante foi postulada por Biel et alii, (1993) que analisaram os efeitos cardiotóxicos da nitrofurantoina e t-BuOOH (analisados distintamente) através da perfusão de miocárdio na presença desses compostos e verificaram que estes agentes reduzem a força de contração do tecido e aumentavam a liberação de glutathione oxidada, lactato desidrogenase e creatina fosfoquinase para o fluido da perfusão sem determinar um aumento significativo na produção de dienos conjugados e malondialdeído em relação ao controle.

No entanto, um drástico aumento dessas substâncias foi observado no final da perfusão, o que levou os autores a proporem que a peroxidação lipídica é uma ocorrência posterior que obviamente deve se constituir em fator de injúria para a célula, concluindo que é preciso cautela para apontar o estresse oxidativo "per se" como causa principal do dano imposto por compostos que geram espécies ativas. Os resultados apresentados ao longo deste trabalho, utilizando um sistema experimental distinto, estão de acordo com esta observação, e levam à conclusão de que a abertura do poro dependente de Ca^{2+} pode ser responsável por facilitar eventos posteriores como a peroxidação lipídica e a formação de agregados proteicos, porém como consequência e não como causa da transição de permeabilidade.

R E S U M O

É geralmente aceito que o processo de peroxidação lipídica causa distúrbios nas funções mitocondriais (Vladimirov et alii, 1980) e que tal processo é desencadeado pelo ataque de espécies ativas de oxigênio aos lipídeos de membrana (Bindoli, 1988; Carbonera e Azzone, 1988). A geração de espécies ativas na mitocôndria a nível de cadeia respiratória, leva a formação da espécie ativa de oxigênio mais agressiva, o radical hidroxila, de vida extremamente curta e que reage praticamente com todos os compostos orgânicos, oxidando grupos sulfidrílicos, degradando DNA e causando peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge, 1988).

Por outro lado, o aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial, conhecido como transição de permeabilidade, pode ser induzido por vários agentes, entre eles Ca^{2+} e Pi ou Ca^{2+} e hidroperóxidos, sendo que estes últimos podem conduzir a um aumento na geração de espécies ativas causando danos à membrana mitocondrial interna devido ao ataque dessas espécies aos lipídios e proteínas componentes de membrana.

Neste trabalho estudamos o possível envolvimento do processo de peroxidação lipídica com alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna e subsequente liberação de íons e moléculas de baixa massa molecular. Nossos resultados mostraram claramente a independência entre esses mecanismos, pois em condições onde a transição de permeabilidade foi prevenida

pela presença de inibidores específicos, mesmo assim foi possível observar ocorrência de peroxidação lipídica. Embora ambos os processos mostrassem ser dependentes de Ca^{2+} , nossos resultados mostraram que a transição de permeabilidade pode ser revertida pela simples remoção do íon pelo quelante EGTA porém a peroxidação lipídica, uma vez iniciada, não sofreu interrupção com a remoção do Ca^{2+} . Também a trifluoperazina e a ciclosporina-A, conhecidos inibidores da transição de permeabilidade não impediram ou bloquearam ocorrência de peroxidação lipídica. Por outro lado, alterações na fluidez de membrana só foram detectada quando o processo oxidativo foi provocado por FeSO_4 , um clássico indutor da peroxidação lipídica. É interessante ressaltar que este modelo oxidativo mostrou-se ineficaz na indução de transição de permeabilidade, mesmo observando-se a formação de altos níveis de TBARS.

Este conjunto de resultados permitiu-nos descartar uma correlação direta entre a peroxidação lipídica e a transição de permeabilidade. O mecanismo do processo peroxidativo parece ocorrer após a transição de permeabilidade (decorrente da abertura de um poro proteico, dependente de Ca^{2+}) em situação onde a geração de espécies ativas de oxigênio supera a capacidade dos mecanismos de defesa.

palavras - chave:

peroxidação lipídica, transição da permeabilidade, poro dependente de Ca^{2+} , trifluoperazina, ciclosporina-A, fluidez da membrana mitocondrial interna.

SUMMARY

It is generally accepted that lipid peroxidation leads to mitochondrial disfunction (Vladimirov et alii, 1980) and that this process is triggered by oxygen reactive species on membrane lipids (Bindoli, 1988; Carbonera e Azzone, 1988). The generation of such reactive species, at the level of respiratory chain, leads to formation of radicals among which the hydroxyl radical, a short-lived but extremely reactive one. This radical reacts with nearly all organic compounds, oxidizing sulphhydryl groups, breaking DNA and causing lipid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 1988).

On the other hand, mitochondrial permeabilization can be induced by several agents, as Ca^{2+} and inorganic phosphate (Pi) or Ca^{2+} and hydroperoxides. This later condition would increase the generation of oxygen reactive species, leading to damage at the mitochondrial inner membrane level, due to the attack of these species to lipids and proteins of this membrane.

We studied the involvement of the lipid peroxidation process with alterations on the mitochondrial inner membrane permeability and, as consequence, the release of ions and low molecular mass compounds. Our results clearly showed that these two processes are independent. Since under conditions where the permeability transition process was prevented by specific inhibitors, it was observed the occurrence of lipid peroxidation.

Although both processes were dependent on the presence of Ca^{2+} , our results showed that the permeability transition could be reverted by Ca^{2+} chelation with EGTA, but the lipoperoxidation, once initiated, was not stopped by EGTA addition. Two other drugs, cyclosporin A and trifluoperazine, well known permeability transition inhibitors were inefficient in preventing or stopping the lipid peroxidation process. On the other hand, membrane fluidity alterations evaluated by changes on the S parameter order, were only detected when the oxidative process was greater, as that induced by a FeSO_4 .

Interestingly this condition did not led to permeability transition, even when very high levels of TBARS were observed. These data allowed to discard any direct correlation between lipid peroxidation and permeability transition. The first process seems to occur after the later one, and is probably consequence of the opening of a Ca^{2+} dependent pore, under conditions where the generation of oxygen reactive species exceeds the capacity of the antioxidant endogenous systems.

B I B L I O G R A F I A

- ASAKAWA, T. and MATSUSHITA, S. (1980) Coloring conditions of Thiobarbituric Acid test for detecting lipid hidroperoxides. *Lipids*, 15 (3): 137-140.
- AUGUSTIN, W. and GELLERICH, F.; (1979) Inhibition of cation efflux by antioxidants during oscillatory ion transport in mitochondria. *FEBS Lett.*, 107: 151-154.
- BEATRICE, M.C.; STIERS, D.L. and PFEIFER, D.R. (1984) - The role of glutathione in the retention of Ca^{2+} by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 259 :1279-1287.
- BEAVIS, A.E., BRANNAN, R.D. & GARLID, K., (1985) Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. *J. Biol. Chem.*, 260: 13424-13433.
- BERNARDI, P., VERONESE, P. and PETRONILLI, V. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin-A sensitive permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 268: 1005-1010.
- BIEL, B., YOUNES, M. and BRASCH, H. (1993) Cardiotoxic effects of nitrofurantoin and tertiary butylhydroperoxide in vitro: Are oxygen radicals involved *Pharmacol. Toxicol.*, 72: 50-55.
- BINDOLI, A. CAVALLINI, L., SILIPRANDI, N. (1977) Effect of thiols oxidation on lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Chem. Biol. Inter.* 19: 383-386.
- BINDOLI, A. and CAVALLINI, L. (1982) Mitochondrial lipid peroxidation by cumenehydroperoxide and its prevention by succinate. *Biochim. Biophys Acta*, 681: 494-503.

- BINDOLI, A. (1988) Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radical Biol. Med.*, 5: 247-267.
- BOROWITZ, S. and MONTGOMERY, C. (1989) The role of phospholipase A₂ in microsomal lipid peroxidation induced with t-butyl hydroperoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, (3): 1021-1028.
- BORS, S. W., BUTTNER, G. R., CHISTA, M. and SARAN, M. (1990) Calcium in lipid peroxidation: does calcium interact with superoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 278, (1): 269-272.
- BUEGE, J. and AUST, S. D. (1979) Microsomal lipid peroxidation. *Method. Enzymol.* 52: 302-310.
- BROEKEMEIER, K. M.; SCHMID, P. C.; SCHMID, H. H. O. and PFEIFFER, D. R. (1985) Effects of phospholipase-A₂ inhibitors on ruthenium red induced Ca²⁺ release from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260: 105-113.
- BROEKEMEIER, K. M.; DEMPSEY, M. E. and PFEIFFER, D. R. (1989) Cyclosporin-A sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264: 7826-7830.
- BROEKEMEIER, K. M., SCHMID, P. C., DEMPSEY, M. E. and PFEIFFER, D. R. (1991) - Generation of the mitochondria permeability transition does not involve inhibition of lysophospholipid acylation. *J. Biol. Chem.* 266: 20700-20708.
- BROEKEMEIER, K. M., CARPENTER-DEYO, L., REED, D. J. and PFEIFFER, D. R. (1992) Cyclosporin A protects hepatocytes subjected to high Ca²⁺ and oxidative stress. *FEBS Lett* 304: 192-194.

- CADENAS, E. and SIES, M.; (1982) Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by t.butyl hydroperoxide. *Eur. J. Biochem.* **124**: 349-356.
- CAVALLINI, L.; VALENTE, M. and BINDOLI, A. (1984) Comparasion of cumene hydroperoxide and NADH/Fe³⁺/ADP induced lipid peroxidation in heart and liver submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta*, **795**: 466-472.
- CARBONERA, D. and AZZONE, F. C. (1988) Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta*; **943**: 245-255.
- CONNEL, M. M. H. (1976) Molecular Motion in Biological Membranes In: **Spin Labeling Theory and Applications**, (Lawrence J. Berliner, ed) Academic Press-New York, San Francisco -London., 525-558.
- CROMPTON M. and COSTI A. e HAYAT L. (1987) Evidence of a reversible Ca²⁺ dependent pore actived by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.*, **245**: 915-918.
- CROMPTON M. and COSTI A. (1988) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial disfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur. J. Biochem.* **178**: 489-501.
- CROMPTON, M.; ELLINGER, H. and COSTI, A. (1988) Inhibition by cyclosporin-A of a Ca²⁺ depend pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255** :357-360.

- CROMPTON, M.; MC GUINNESS, O and NAZARETH, W. (1992) - The involvement of cyclosporin A binding proteins in regulating and uncoupling mitochondrial energy transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**: 214-217.
- DAUM, O. (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **822**: 1-42.
- DOBRETSOV, G. E., BORSCHEWVSKAYA, T. A., PETROV, V. A. and VLADIMIROV Y. A. (1977) The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.*, **84**: 125-128.
- ERDAHL, W. L, KREBSBACH, J. and PFEIFFER, D. R. (1991) A comparison of phospholipid degradation by oxidation and hydrolysis during the mitochondrial permeability transition. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2**: 252-260.
- FAGIAN, M. M.; PEREIRA-DA-SILVA, L. and VERCESI, A. E. (1986) Inhibition of oxidative phosphorylation by Ca^{2+} or Sr^{2+} : competition with Mg^{2+} in the formation of adenine nucleotide complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **825**: 262-268.
- FAGIAN, M. M.; PEREIRA-DA-SILVA, L; MARTINS I.S. and VERCESI A.A. (1990) Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. *J. Biol. Chem.* **265**: 19955-19960.
- FORMAN, H. J. and BOVERIS, A. (1982) Superoxide and hydrogen Peroxide in Mitochondria In: **Free Radicals in Biology**, (Pryor W.A. ed.) New York; Academic Press Inc. 5:65-90.
- FOURNIER N.; DUCET, G; and CREVAT, A; (1987) Action of ciclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J. Bioenerg. Biomembrane*, **19**, (3): 297-303.

- GOGVADZE, V. G. and ZHUKOVA, A. A. (1990) The role of lipid peroxidation products in cumene hydroperoxide induced Ca^{2+} efflux from mitochondria. *FEBS Lett.*, 287 (1,2): 139-141.
- GOGVADZE, V.G. and ZHUKOVA, A.A. (1991) The role of phospholipase - A_2 in lipid peroxidation induced fall of membrane potential of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.*, 264 (2): 168-170.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J. and DAID, M. M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction *J. Biol. Chem.* 177: 751-757.
- GRIFFITH, O. H. and JOST P. C. (1976) Lipid Spin Label in Biological Membranes In: **Spin Labeling theory and applications** (Lawrence J. Berliner, ed.) Academic Press- New York, San Francisco - London.
- GRAFFNEY, B.J. (1976) In: **Spin Labeling theory and applications** Lawrence J. Berliner, ed. Academic Press-New York, San Francisco-London, 567-571.
- GUNTER, T. E. and PFELFFER, D. R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258: 755-786.
- HALLIWELL, B. (1988-a) Tell me about free radicals doctor: a review. *J. Roy. Soc. Med.*, 82: 747-752.
- HALLIWELL, B. (1988-b) Oxidants and human disease, some new concepts. *FASEB J.* 1: 358-364.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, C. (1989) Lipid peroxidation: a radical chain reaction "In: Free Radical biology and Medicine" (B.Halliwel and J.M.C. Gutteridge eds) 139-189; Clarendon Press- Oxford

- HALESTRAP, A. P. and DAVIDSON, A. M. (1990) Inhibition of Ca^{2+} induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by ciclosporin is probably caused by inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* **268**: 153-160.
- HAWORTH, R. A. and HUNTER, D. R. (1977) "The calcium induced membrane transition nature of calcium trigger site" *Arch. Biochem. Biophys.* **195**: 460-467.
- HAWORTH, R. A.; and HUNTER, D. R. (1979) The calcium induced membrane transition. Nature of the calcium trigger site *Arch. Biochem. Biophys.* **195**: 460-467.
- HOCH, F. L.; SUBRAMANIAN, C.; DHOPESHWARKAR, G. A. and MEAD, J. F. (1981) Thyroid control over biomembranes: VI. Lipids in liver mitochondria and microsomes of hypothyroid rats. *Lipids*, **16**: 328-335.
- HUNTER, D. R. and HAWORTH, R. (1979) The Ca^{2+} induced membrane transition in mitochondria. The protective mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**: 453-459.
- IMBERTI R., NIEMINEN A.L., HERMAN B. and LEMASTERS J.J. (1993) Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by butylhydroperoxide :protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine *J.Pharmacol. Exp.Therap.* **265**: 392-400. .
- JOCELYN, P. C. and DICKSON, J. (1980) Glutathione and the mitochondrial reduction of hydroperoxides *Biochim. Biophys. Acta*; **590**: 1-12.

- KAPLAN, R. S. & PEDERSEN, P. L. (1983) Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria *Biochem. J.*, **212**: 279-288.
- KAPPUS, H. (1985) "Lipid peroxidation: Mechanism Analysis, Enzymology and Biological Relevance" In: **Oxidative Stress**, (Helmunt Sies, ed) Academic Press Inc. London (Ltd) 273-305.
- KENNEDY, C. H.; PRYOR, W. A, WINSTON G.W. and CHURCH D.F. (1986) Hydroperoxide induced radical production in liver mitochondrial". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141** (3):1123-1129.
- KENNEDY, C. H, CHURCH D.F. , WINSTON G.W. and PRYOR W.A. (1992) Terc butyl hydroperoxide induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Radical Biol. Med.*, **12**: 381-387.
- KLINGENBERG, M. (1989) Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**: 1-14.
- LAPIDUS, R. G. and SOKOLOVE, P. M. (1992) Inhibition by spermine of the inner membrane permeability transition of isolated rat heart mitochondria. *FEBS Lett.*, **313**: 314-318.
- LEHNINGER, A. L.; VERCESI A.; BABABUNMI E. A. (1978) Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 1960-1964.
- LE QUOC, K. and LE QUOC, D. (1988) Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium induced perturbations of the mitochondrial inner membrana of nucleotide binding site *Arch. Biochem. Biophys.*, **256** (2) 249-257.

- MACEDO, D. V.; FERRAZ, V. L.; PEREIRA-DA-SILVA L. and VERCESI A. E. (1988) Ca^{2+} dependent NAD(P)^+ induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria In: Integration of mitochondrial functions. (Lemasters, J. J. et al. ed): Plenum Publishing Corp.; New York: 535-542.
- MACEDO, D. V.; NEPOMUCENO, M. F.; PEREIRA-DA-SILVA, L. (1993) Involvement of the ADP/ATP carrier in permeabilization process of the inner mitochondrial membrane. *Eur. J. Biochem.*, **215**: 595-600.
- MASAKI N., KYLE, M.E., FARBER J.L. (1989) Terc-butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids *Arch. Biochem. Biophys.* **269**: 390-399.
- MARSHANSKY, V. N.; NOVGORODOV, S. A. and YAGUSHINSKY, L. S. (1983) The antioxidant effect oligomycin and dicyclohexyl carbodiimide. *FEBS Lett.*, **158**: 27-30.
- MARSHANSKY, V. YAGUSHINSKY, L. S. (1986) Regulation of lipid peroxidation by ATP syntetase substrates in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **876**: 567-571
- MASINI, A.; TRENTI, T.; CECCARELLI-STAZANI D. and VENTURA, E. (1985) The effect of ferric iron complex on isolated rat liver mitochondria respiratory and eletrochemical responses *Biochim. Biophys. Acta*, **810**: 20-26.
- MASINI, A., CECCARELLI, D. TRENTI, T., GALLESII, D., MUSCATELLO, V. (1992) Mitochondrial inner membrane permeability changes induced by acid hydroperoxide - Role of mitochondrial GSH pool. *Biochim. Biophys. Acta*, **110**: 84-89.
- MENEGUINI, R. (1987) A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*. **28**: 57-62.

- MC CAY, P. B. (1985) Vitamin E: Interaction with free radicals and ascorbate *Annu. Rev. Nutr.* 5: 323-340.
- MORSELLI, A. L. and PEREIRA-DA-SILVA L. (1992) Alterations to the permeability of plant and animal mitochondria submitted to Ca^{2+} releasing agents. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103**, (3): 569-574
- NEPOMUCENO, M. F.; MACEDO, D. V. e PEREIRA-DA-SILVA L. (1991) Lipoperoxidation associated with mitochondrial membrane permeabilization in the presence of Ca^{2+} . *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **24**: 833-836.
- NEPOMUCENO, M. F. and PEREIRA-DA-SILVA (1993) Effect of ciclosporin-A and trifluoperazine on rat liver mitochondria swelling and lipid peroxidation. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **26**: 1019-1023.
- NICHOLLS, D. G. ; AKERMAN, K. (1982) Mitochondrial calcium transport. *Biochem. Biophys. Acta* **683**: 57-88.
- NOVGORODOV, S. A., KULTAYEVA, E.V., YAGUSHINSKY, L. S. and LEMESHKOV, V. V. (1987) Ion permeability induction by the SH cross-linking reagents in rat liver mitochondria is inhibited by the free radical scavenger, butyl hydroxitoluene. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **19** (3):191-201.
- NOVGORODOV, S. A.; GUDZ, T. I.; MOHR, Y. E. (1989) ATP syntase complex: the mechanism of control of ion fluxes induced by cumene hydroperoxide in mitochondria. *FEBS Lett.*, **247** (2): 255-258.
- NOVGORODOV, S. A. and GOGVADZE, G. V. (1989) The effect of BHT inhibitor of lipid peroxidation on calcium induced uncoupling of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.*, **248** (1,2): 179-181.

- NOVGORODOV, S. A.; GUDZ, T.; KUSHANAREVA, Y.; ZOROV, D. and KUDRJASHOV Y. B. (1990) Effect of ADP/ATP antiporter conformational state on the suppression of the inner mitochondrial membrane by ciclosporine A. *FEBS Lett.*, 277 (1,2): 123-126.
- NOVGORODOV, S. A.; GUDZ, T., JUNG, D.; and BRIERLEY, G. (1991-a) The nonspecific inner pore of liver mitochondria: modulation of ciclosporin sensitivity by ADP at carboxiatractilyside-sensitive and insensitive sites. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 180: 33-38.
- NOVGORODOV, S. A., GUDZ, T., KUSHNAREVA, Y. E., (1991-b) Effects of the membrane potential upon the Ca^{2+} and cumene hydroperoxide induced permeabilization of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett.*, 295 (1, 2, 3): 77-80.
- NOVGORODOV, S. A.; GUDZ, T. I.; KUSHNAREVA, Y. E., ROGINSKY, V. A. and KUDRJASHOV, Y. B. (1991-c) Mechanism accounting for the induction of nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane by hydroperoxides *Biochim. Biophys. Acta*, 1058: 242-248.
- NOVGORODOV, S. A.; GUDZ, T.; MILGROM, Y. M. and BRIERLEY, G. P. (1992) The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* 267: 16274-16282.
- OHKAWA, H., NOBUKO, O. and YAGI, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351-358.
- PALMER, J. W.; SCHIMID, P. C.; PFEIFFER, D. R. and SHIMID, H.H.O. (1981). Lipids and lipolytic enzyme activities of rat heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 211: 674-682.

- PANFILI, E., SANDRI, G. and ERNSTER, L. (1991) Distribution of glutathione peroxides and glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS Lett.*, **290** (1,2): 35-37.
- PARAIDATHATHU, T.; GROOT, H. and KEHRER, J. P. (1992) Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radical Biol. Med.*, **13**: 298-297.
- PEDERSEN, P. L., GREENAWATJ, W., REYNAFARJS, E.B, HULLIHEN, J., DECKER, G. L., SOPER, J. W. & BUSTAMANTE E. (1978) Preparation and characterization of mitochondria and liver derived tissue. In: **Methods in cell biology**. Acad. Press. Inc. New York, **20**: 411-481, 1978.
- PEREIRA, R. S.; BERTOCHI, F. A. and VERCESI, A. E. (1992) The protective effect of trifluoroperazine on the micochondrial damage induced by Ca^{2+} plus oxidants. *Biochem. Pharmacol.*, **44**: 1795-1801.
- PETRONILLI, V.; COLA, C. and BERNARDI, P. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin-A sensitive permeability transition pore. *J. Biol. Chem.*, **268** (2): 1011-1016.
- PRYOR, W. A. and CASTLE, L. (1984) Chemical Methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Method. Enzymol.* **105**: 293-296.
- RADI, R.; TURRENS, J.; CHANG, L. Y; BUSH, K. M. CRAPO, J. D. and FREEMAN, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **266** (32): 22028-22034.
- RADI, R.; BUSH, K. FREEMAN, B. (1993-a) The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, (1): 409-415.

- RADI R., SIMS S., COSSINA A. and TURRENS J.F. (1993-b) Roles of catalase and cytochrome c in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.*, 15: 653-659.
- RICHTER, C.; FREI, B. (1985) Ca^{2+} movements induced by hydroperoxides in mitochondria In: **Oxidative Stress** (Helmunt Sies ed) Academic Press Inc. (London) Ltd, 221-241.
- RICHTER, C.; FREI, B. (1988) " Ca^{2+} release from mitochondria induced by prooxidants". *Free Radicals Biol. Med.*, 4: 365-375.
- RICHTER, C.; KASS, G. N. (1991) Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca^{2+} homeostasis cell death proliferation and differentiation. *Chem. Biol. Inter.*, 77: 1-23.
- RIZZUTO, R.; PITTON, G. and AZZONE, F. (1987) Effect of Ca^{2+} peroxides, SH reagents and aging on the permeability of mitochondrial membranes. *Eur. J. Biochem.*, 162: 239-249.
- ROTTEMBERG, H. and MARBACH, M. (1989) Adenine nucleotides regulate Ca^{2+} transport in brain mitochondria. *FEBS Lett.*, 247 (2): 483-486.
- SANDRI, G.; PANFILI, E. and ERNSTER, L. (1990) Hydrogen peroxide production by monoaminoxidase in isolated rat brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca^{2+} efflux. *Biochim. Biophys. Acta*, 1035: 300-305.
- SCHLEGEL, J.; SCHWEIZER, M. and RICHTER, C. (1992) "Pore" formation is not required for the hydroperoxide-induced Ca^{2+} release from rat liver mitochondria; *Biochem. J.* 285: 65-69.

- SCHNEIDER, W. C. & HOGEBOOM, G. H. (1950) Intracellular distribution of enzymes. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 183: 123-128.
- SCHUBERT J. and WILMER, J.W. (1991) Does hydrogen peroxide exist "free" in biological systems? *Free Rad. Biol. Med.*, 11: 545-555.
- SIES, H. and MOSS, M. K. (1983) A role of mitochondrial glutathione Peroxidase in modulating Mitochondrial Oxidations in liver. *Eur. J. Biochem.*, 4: 377-383.
- SIES, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 25: 1058-1071.
- SIMON P.N., GARNER A., DEAN R.T. (1986) Free Radicals lipids and protein degradation. *TIBS* 11: 27-31.
- STRICKLAND, E. H. and BENSON, A. A. (1960) - Paper chromatography analysis of phosphatides in mammalian cell fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 88: 344-348.
- SUSCH, H.; JAIN, K. and SHOHET, S. B. (1981) Calcium potentiates the peroxidation of erythrocyte membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 642: 46-54.
- SZABO, I. and ZORATTI, M. (1992) The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore. *J. Bioenerg. Biomembrane*, 24: 111-117.
- TAKEYAMA N.; MATSUO N. and TANAKA T. (1993) Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca^{2+} dependent inner-membrane permeability transition. *Biochim. J.*, 294: 719-725.

- TANGERAS A. (1983) Iron content and degree of lipid peroxidation in liver mitochondria isolated from iron loaded rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 59-68.
- THOMAS, J. P.; GEIGER, P. G.; MAIORINO, M.; VESIN, F.; GIROTTI, A. W. (1990) Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoprotein. *Biochim. Biophys Acta*, 10456: 252-260.
- THORSTENSEN, K. and ROMSLO, I. (1990) The role of transferrin in mechanism of cellular iron uptake. *Biochem. J.* 271: 1-10.
- VALLE V.G.R.; FAGIAN M.M.; PARENTONI, L.S.; MEINICKE A.R. and VERCESI A.E. (1993) The participation of reactive oxygen Species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants *Arch. Biochem. Biophys.*, 307 (1): 1-7.
- VAN DEN BOSCH, H. (1982) In: **Phospholipids** (Hawthorne, J. N. and ANSELL, G. B. eds.) Elsevier Biomedical Press, Amsterdam pp. 313-357.
- VERCESI, A. E. (1993) Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 26: 441-457.
- VLADIMIROV, Y. A.; OLENEV, V. A.; SUSKOVA, T. V. and CHEREMISINA, Z. P. (1980) Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Lipid Res.*, 17: 173-249.
- YAGI, K. (1976) A simple fluorimetric Assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, 15: 212-216.
- ZAMBRANO, F.; FLEISCHER, S. and FLEISCHER, B. (1975)- Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparasion with other subcelular organelles. *Biochim. Biophys Acta*, 380: 357-369.

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSO

1. Nepomuceno M.F., Macedo D.V. and Pereira-da-Silva L. (1991)
"Lipoperoxidação como parte do processo de permeabilização da membrana mitocondrial na presença de Ca^{2+} e agentes liberadores deste ion" VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu - MG.

2. Nepomuceno M.F., Macedo D.V. and Pereira-da-Silva (1992)
"Correlaction between lipoperoxidation and increase in the permeability of the mitochondrial membrane induced by Ca^{2+} and prooxidants: involvement of ADP/ATP carrier" XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu - MG.

3. Macedo D.V., Nepomuceno M.F., Costa C. and Pereira-da-Silva L. (1992) "The conformational changes of ADP/ATP carrier induced by Ca^{2+} and Ca^{2+} releasing agents favour the lipoperoxidation of the inner mitochondrial membrane" 7th European Bioenergetics Conference - Helsinki-Finlândia.

4. Nepomuceno M.F. and Pereira-da-Silva L. (1993)
"Cyclosporin-A and ruthenium red do not prevent Ca^{2+} plus hydroperoxide-induced lipoperoxidation in mitochondria" XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu - MG.

5. Nepomuceno M.F. and Pereira-da-Silva L. (1993) "Transição de Permeabilidade em mitocôndrias na presença de trifluoperazina e ciclosporina-A" VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, realizada de 25 a 28 de agosto de 1993, Caxambu - MG.

6. Nepomuceno M.F., Macedo D.V., Alonso A, Pereira-da-Silva L. (1993) "Alterations on membrane fluidity following lipid peroxidation in liver mitochondria" 2nd IUBMD Conference on Biochemistry of cell membranes, Bari - Itália.

7. Alonso A., Nepomuceno M.F., Macedo D.V., Pereira-da-Silva (1994) "Lipid peroxidation induced by t-BuOOH or H₂O₂ does not necessarily led to alterations on membrane fluidity in mitochondria" XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu - MG.

8. Pereira-da-Silva L., Macedo D.V., Nepomuceno M.F. (1994) "Involvement of the ADF/ATP carrier in permeabilization process of the inner mitochondrial membrane" XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu - MG.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

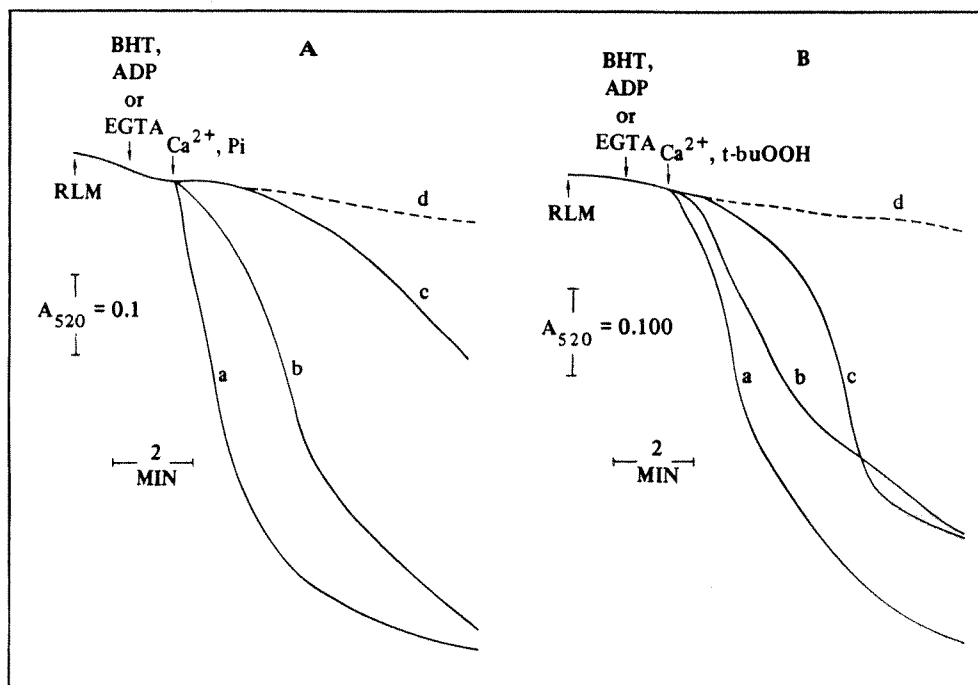


Figure 1 - Effect of ADP and butylhydroxytoluene on the swelling of rat liver mitochondria induced by Ca^{2+} plus phosphate or t-butylhydroperoxide. Mitochondria (1 mg protein/ml) were suspended in basic medium as described in the text and swelling was monitored by the decrease of absorbance at 520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

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

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

References

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

Received April 4, 1991

Accepted August 7, 1991

Effect of cyclosporin A and trifluoperazine on rat liver mitochondria swelling and lipid peroxidation

M.F. Nepomuceno²
and L. Pereira-da-Silva¹

¹*Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13084-100 Campinas, SP, Brasil*

²*Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, UNIMEP, 13400-901 Piracicaba, SP, Brasil*

The effect of cyclosporin A (CsA) or trifluoperazine (TFP) on lipid peroxidation and mitochondrial swelling was determined using liver mitochondria incubated with 30 μM Ca^{2+} and 250 μM t-butylhydroperoxide or 5 mM inorganic phosphate (Pi). Lipid peroxidation was not modified by either 1 μM CsA or 40 μM TFP. These compounds presented a distinct effect on mitochondrial permeability. Under oxidative conditions, CsA only showed a transient protective effect whereas TFP completely inhibited mitochondrial swelling. Conversely, CsA was very efficient when Ca^{2+} and Pi were used, a condition under which TFP was unable to prevent the swelling. These data are consistent with our previous results (M.F. Nepomuceno, D.V. Macedo and L. Pereira-da-Silva (1991). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 24: 833-836) showing that lipid peroxidation is one among other different components of the permeabilization process. The data suggest that lipid peroxidation is independent of swelling, occurring later than swelling, presumably when the mitochondrial reductant systems are depleted. The differential effects of CsA and TFP suggest that these compounds can be used as specific probes in the elucidation of the two distinct mechanisms responsible for mitochondrial swelling.

Key words: lipid peroxidation, membrane permeabilization, mitochondria, cyclosporin A, trifluoperazine.

Cyclosporin A (CsA) is an immunosuppressant widely used as an inhibitor of mitochondrial permeability transition (1-3) whose action is attributed to the

Presented at the VIII Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, Brasil, August 25-28, 1993.

Research supported by FAPESP.

Correspondence: L. Pereira-da-Silva, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13084-100 Campinas, SP, Brasil,

opening of a Ca^{2+} -dependent pore in the inner mitochondrial membrane (4). Trifluoperazine (TFP), a phenothiazine derivative, is known to inhibit lipid peroxidation in microsomes (5) and the permeabilization of mitochondria, acting as an inhibitor of mitochondrial phospholipase A_2 (6) or, as recently shown by Pereira et al. (7), preventing thiol cross-linking of membrane proteins. The inhibitory effect of phenothiazines on lipid peroxidation induced by t-butylhydroperoxide in microsomes is associated with their action as inhibitors of phospholipase A_2 activity (5,8). This enzyme, by releasing unsaturated fatty acids from membrane phospholipids, may promote the exposure of suitable species to the attack of reactive oxygen species and contribute to the propagation of lipid peroxidation (8). Recently, CsA and TFP were compared in terms of their ability to inhibit the Ca^{2+} and Mg^{2+} release associated with the permeability transition of mitochondria treated with Ca^{2+} and hydroperoxides (9). We observed a transient effect of CsA and a more efficient inhibition of swelling in the presence of TFP, indicating distinct mechanisms for mitochondrial permeabilization.

In the present study, we determined the effect of CsA and TFP on lipid peroxidation and swelling processes in mitochondria incubated in the presence of Ca^{2+} plus t-butylhydroperoxide or Pi . The present results corroborate our previous data supporting the suggestion that lipid peroxidation is not the primary event for the permeabilization process (10).

The isolation of overnight fasted Wistar adult female rat liver mitochondria and the determination of protein concentration were performed as previously described (10). The lipid peroxidation experiments were carried out at 30°C in an incubation medium containing 130 mM KCl, 20 mM Hepes, pH 7.2, 5 mM succinate, 4 μM rotenone and 1 mg mitochondrial protein per ml. All other additions are indicated in Figure 1 and, when used, Pi was treated with Chelex (11) prior to use. At appropriate incubation times, 1-ml samples were removed and treated with 3.5 ml of 0.08 N H_2SO_4 , and 1.5 ml of 0.8% thiobarbituric acid (TBA) in 0.1 N NaOH: glacial acetic acid (1:1 v/v), 0.1 ml of 50 μM butylhydroxytoluene (BHT) and 0.1 ml of 50 μM FeCl_3 were added. The samples were boiled for 60 min at 100°C and, after cooling, 4.0 ml of n-butanol was added, the mixture was thoroughly mixed and centrifuged at 1000 g for 10 min. The fluorescence of the organic layer was determined with a spectrofluorometer at 515 nm for the excitation and at 553 nm for the emission (12). The content of TBA-reactive substances (TBARS) was calculated from a standard curve of tetraethoxypropane as described by Yagi et al. (13). Mitochondrial swelling was monitored in the spectrofluorometer by the decrease in light scattering at 520 nm, after incubating 0.5 mg mitochondrial protein in a medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 20 mM Hepes, pH 7.2, 5 mM potassium succinate and 4 μM rotenone. Other additions are specified in Figure 2.

TBARS are generated when mitochondria are treated with Ca^{2+} and Pi in the presence of the oxidant t-butylhydroperoxide (10). The present experiments showed that neither CsA nor TFP inhibit the lipid peroxidation under these oxidative conditions. The results presented in Figure 1 show no decrease in TBARS formation in the presence of 1 μM CsA (curve b), and only a slight decrease when 40 μM TFP (curve c) was used.

In contrast, under the same conditions, the two drugs presented distinct effects on the permeability transition estimated by the mitochondrial swelling. The data in Figure 2A show that the addition of Ca^{2+} and hydroperoxide caused extensive mitochondrial swelling (trace a) which was completely inhibited by TFP (trace c) or EGTA (trace d) but not by CsA (trace b). It is interesting to note that TFP lost its inhibitory effect when Pi was added during incubation (trace e). As shown in Figure 2B, the addition of Ca^{2+} and Pi was also sufficient to promote swelling (trace a). Under these non-oxidative conditions, only CsA (trace b) and EGTA (trace d) inhibited mitochondrial swelling, whereas TFP (trace c) was completely ineffective.

The data presented here show that, although it has been recently reported that TFP protects the mitochondria from permeabilization under oxidative conditions (7), this effect is abolished in the presence of Pi. This is clear from the results shown in Figure 2A, where mitochondrial swelling started immediately after the addition of Pi to mitochondria incubated in the presence of TFP (trace e). On the other

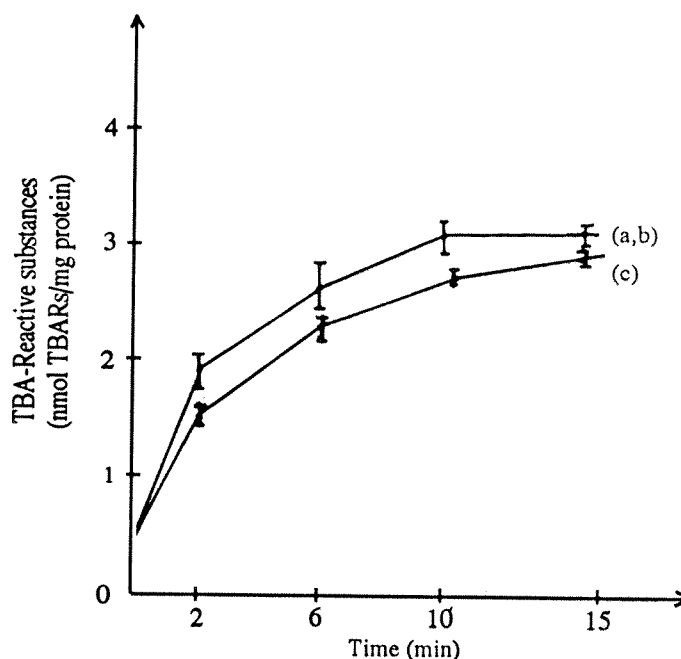


Figure 1 - Cyclosporin A and trifluoperazine do not significantly inhibit mitochondrial lipid peroxidation in the presence of Ca^{2+} and t-butylhydroperoxide. Mitochondria (1 mg protein) were incubated with 30 nmol Ca^{2+} , 5 mM Pi and 250 μM t-BuOH as described in the text. a) No addition (control); b) 1 μM CsA; c) 40 μM TFP. Data are reported as means $\pm$ SEM for four experiments.

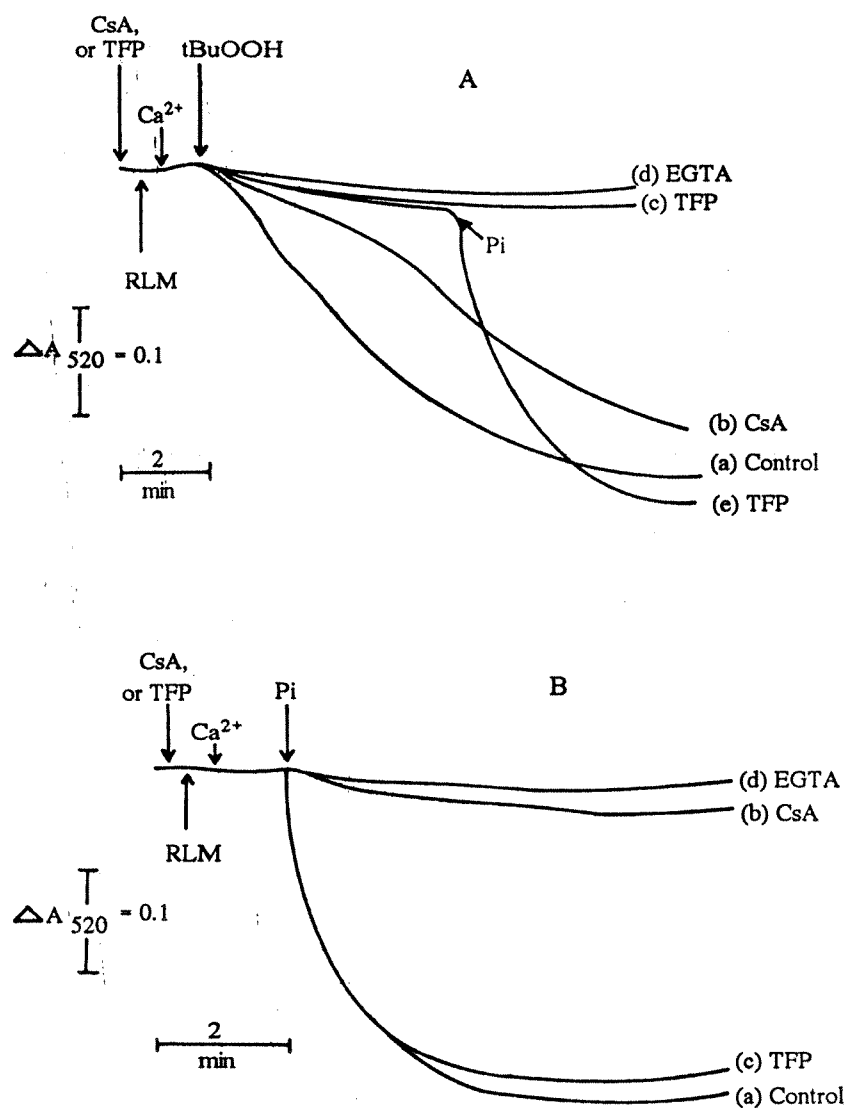


Figure 2 - The inhibition of mitochondrial swelling by cyclosporin A (CsA) and trifluoperazine (TFP) depends on how swelling is induced. Mitochondrial (0.5 mg protein) swelling was induced by: *A*, 30 nmol Ca^{2+} /mg protein and 250 μ M t-butylhydroperoxide, or *B*, 30 nmol Ca^{2+} /mg protein and 5 mM Pi as described in Methods. *a*) No addition (control); *b*) 1 μ M CsA; *c*) 40 μ M TFP; *d*) 0.5 mM EGTA; *e*) same as *c* with 5 mM Pi added when indicated by the vertical arrow. The traces are representative of results obtained in 4 independent experiments.

hand, CsA only partially inhibits permeabilization under oxidative conditions, as shown in Figure 2A (trace b). This result is in agreement with those reported by Broekemeier et al. (2) but not with Crompton and Costi (3). Previous reports (2,9) have suggested two possible mechanisms accounting for permeabilization: a CsA-sensitive Ca^{2+} -dependent pore and the action of phospholipase A_2 on membrane phospholipids, which is inhibited by TFP; recently, however, the same group discarded the latter hypothesis (14). The thiol cross-linking of membrane proteins has also been proposed to explain the permeability transition induced by Ca^{2+} and prooxidants (15). Our data do not exclude that this may occur as a later phase of the oxidative stress, when the natural antioxidant defenses are already depleted. The action of TFP can be interpreted as prevention of the oxidation of protein thiol groups, but without interference in the process triggered by Ca^{2+} and Pi. In the latter situation, no lipid peroxidation was observed, even at very high levels of both Ca^{2+} and Pi (10). The data reported in the literature and the results described in this communication give us sufficient experimental evidence to propose the existence of two distinct mechanisms for mitochondrial permeabilization, which are sensitive to CsA or TFP.

Acknowledgments

We thank Sandoz do Brasil for the generous gift of cyclosporin A.

References

1. Fournier N, Ducet G & Crevat A (1987). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 19: 297-303.
2. Broekemeier KM, Dempsey ME & Pfeiffer DR (1989). *Journal of Biological Chemistry*, 264: 7826-7830.
3. Halestrap AP & Davidson AM (1990). *Biochemical Journal*, 268: 153-160.
4. Crompton M & Costi A (1988). *European Journal of Biochemistry*, 178: 489-501.
5. Slater TF (1968). *Biochemical Journal*, 106: 155-160.
6. Broekemeier KM, Schmid PC, Schmid HHO & Pfeiffer DR (1985). *Journal of Biological Chemistry*, 260: 105-113.
7. Pereira RS, Bertocchi APF & Vercesi AE (1992). *Biochemical Pharmacology*, 44: 1795-1801.
8. Borowitz S & Montgomery C (1989). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 158: 1021-1028.
9. Broekemeier KM & Pfeiffer DR (1989). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 163: 561-566.
10. Nepomuceno MF, Macedo DV & Pereira-da-Silva L (1991). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24: 833-836.
11. Buettner GR (1986). *Free Radical Research Communications*, 1: 349-353.
12. Ohkawa H, Ohishi N & Yagi K (1979). *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
13. Yagi K (1976). *Biochemical Medicine*, 15: 212-216.
14. Broekemeier KM, Schmid PC, Dempsey ME & Pfeiffer DR (1991). *Journal of Biological Chemistry*, 266: 20700-20708.
15. Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS & Vercesi AE (1990). *Journal of Biological Chemistry*, 265: 19955-19960.

Received April 12, 1993

Accepted August 16, 1993

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Isolation of mitochondria

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

Correspondence to L. Pereira-da-Silva, Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP, CP 6109, 13084-100, Campinas, SP, Brazil
Fax: +55 192 393124.

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

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

Standard incubation conditions

The experiments were performed at 30°C, for 10–15 min, in basic medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.2, 2 mM succinate and 5 μ M rotenone. The final mitochondrial protein concentration was 1 mg/ml. To observe the maximum protective effect of ADP, the mitochondrial content of ATP was increased by prior incubation with 2 mM P_i and addition of 1 μ g oligomycin/mg mitochondrial protein. This procedure enables a higher rate of adenine-nucleotide exchange when ADP is added to the external medium, favouring the binding of ADP to the ADP/ATP carrier, and turning it to the matrix side [18]. All other additions are described in the legends of the figures.

Determination of Ca^{2+} fluxes

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

Estimation of changes in matrix volume

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

Estimation of lipid peroxidation

The mitochondria were incubated under the standard conditions and Ca^{2+} plus P_i or *t*-butylhydroperoxide were added, as described in the figure legends. P_i was treated with Chelex to remove trace metal ions [28] prior to use. After different

times of incubation at 30°C, the mitochondrial suspensions were centrifuged 2 min in an Eppendorf microcentrifuge. Samples of 0.5 ml of the supernatant were mixed with 1.0 ml 15% (mass/vol.) trichloroacetic acid, 0.375% (mass/vol.) thiobarbituric acid and 0.25 M HCl, in the presence of 90 μ M butylhydroxytoluene [29] and heated for 15 min at 80°C. After cooling, the precipitate was removed by centrifugation and the absorbance of the supernatant was measured at 535 nm [30]. The concentration of thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) was calculated using the absorption coefficient $1.56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ [31]. This measurement may include TBARS arising from non-lipid sources [32].

Titration of active ADP/ATP carrier

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

Chemicals

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

RESULTS

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

When rat liver mitochondria are loaded with 50 nmol Ca^{2+} /mg protein in the presence of 50 μ M *t*-butylhydroper-

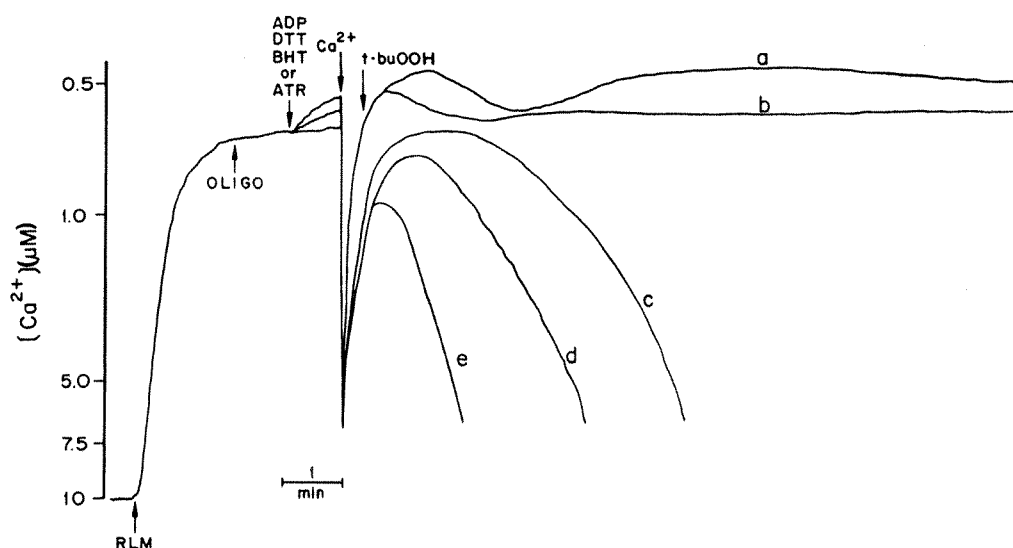


Fig. 1. Effect of ADP, dithiothreitol, butylhydroxytoluene and atractyloside on *t*-butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria (RLM). Mitochondria (1 mg/ml) were incubated under the standard conditions described in Materials and Methods, in the presence of 2.0 mM P_i . 1.0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

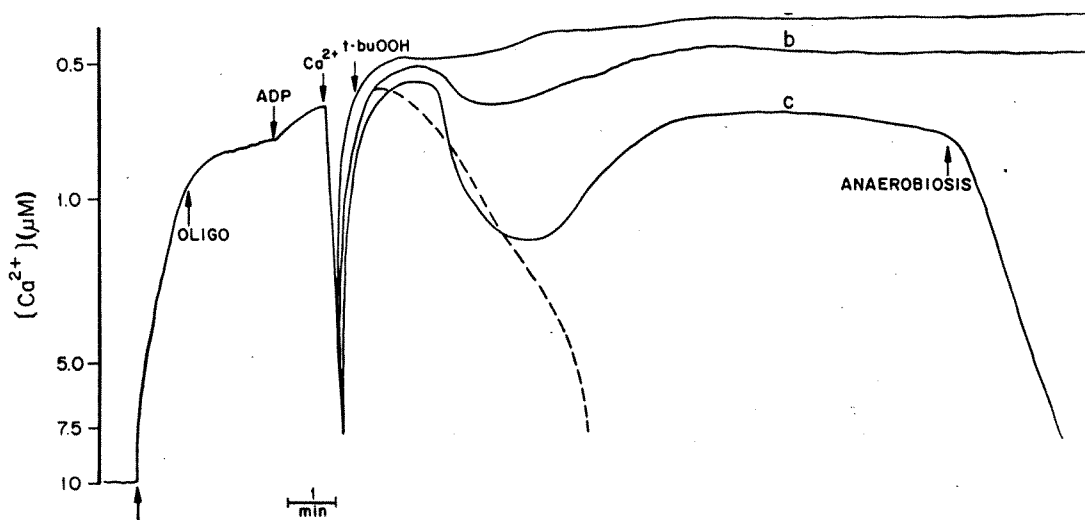


Fig. 2. The effect of ADP on *t*-butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria depends on the Ca^{2+} load. Mitochondria were incubated under the experimental conditions of Fig. 1, in the presence of 200 μM ADP, 50 μM *t*-butylhydroperoxide (*t*-buOOH) and different amounts of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

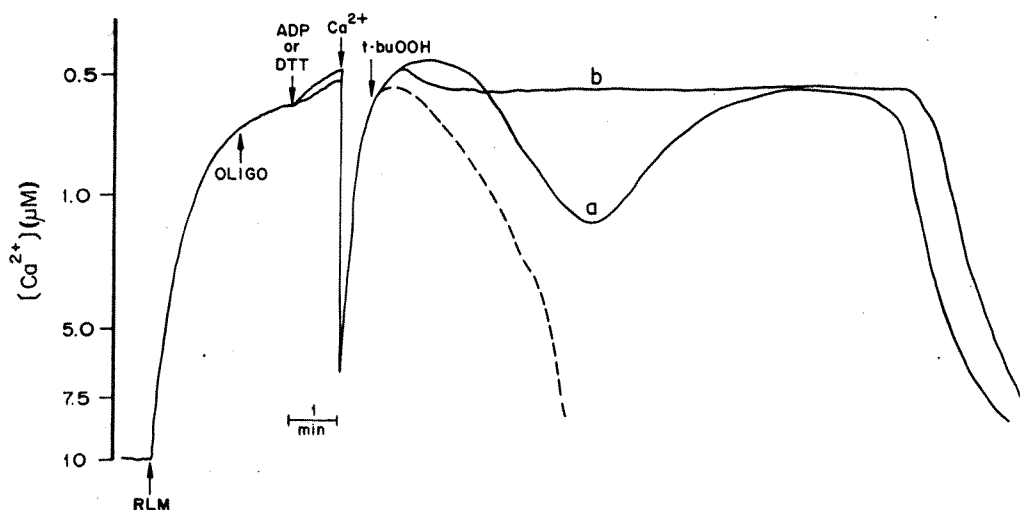


Fig. 3. Dithiothreitol is more effective than ADP in inhibiting the *t*-butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria at high concentrations of the oxidant. Mitochondria were incubated under the experimental conditions of Fig. 1, in the presence of 50 nmol Ca^{2+} /mg protein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

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

90 nmol Ca^{2+} /mg protein causes only a transient Ca^{2+} efflux. However, dithiothreitol is more effective in protecting the mitochondria from damage at higher concentrations of the oxidant, when compared to ADP, as shown in Fig. 3.

Occurrence of lipoperoxidation under oxidative conditions

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

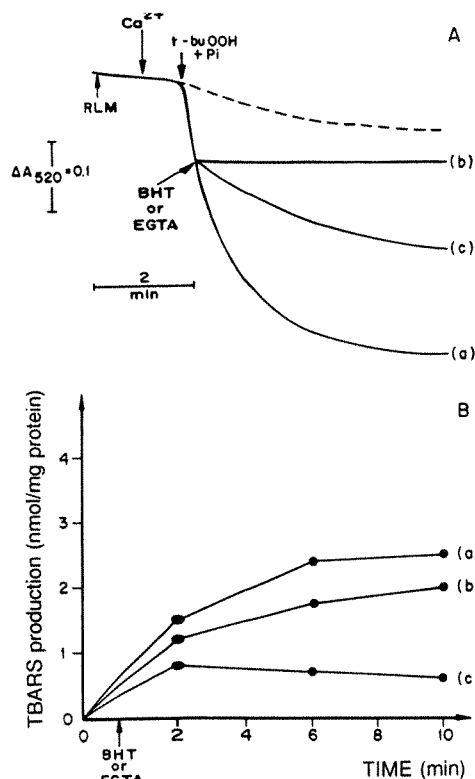


Fig. 4. Effect of EGTA and butylhydroxytoluene (BHT) on mitochondrial swelling (A) and TBARS production (B) in rat liver mitochondria (RLM). Mitochondria were incubated in the presence of 30 nmol Ca^{2+} /mg protein and 200 μ M t -butylhydroperoxide (t -BuOOH)/5 mM P_i (a) and 0.5 mM EGTA (b) or 50 μ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

inhibited (Fig. 4B) the same did not happen regarding the mitochondrial swelling (Fig. 4A). However, the addition of EGTA immediately inhibits the mitochondrial swelling (Fig. 4A) but does not prevent the lipoperoxidation

(Fig. 4B). Similar results were obtained when EGTA or butylhydroxytoluene were added to the mitochondria before the addition of Ca^{2+} and t -butylhydroperoxide (data not shown).

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

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

Carboxyatractyloside abolishes the protective effect of ADP

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

Titration of active ADP/ATP carrier in mitochondria previously incubated with Ca^{2+} under deenergized conditions

The results summarized in Table 1 show that the activity of ADP/ATP carrier was highly dependent on the amount of Ca^{2+} present in the incubation medium before energization of the mitochondria. The state-3_{ADP} respiration rate was 60%

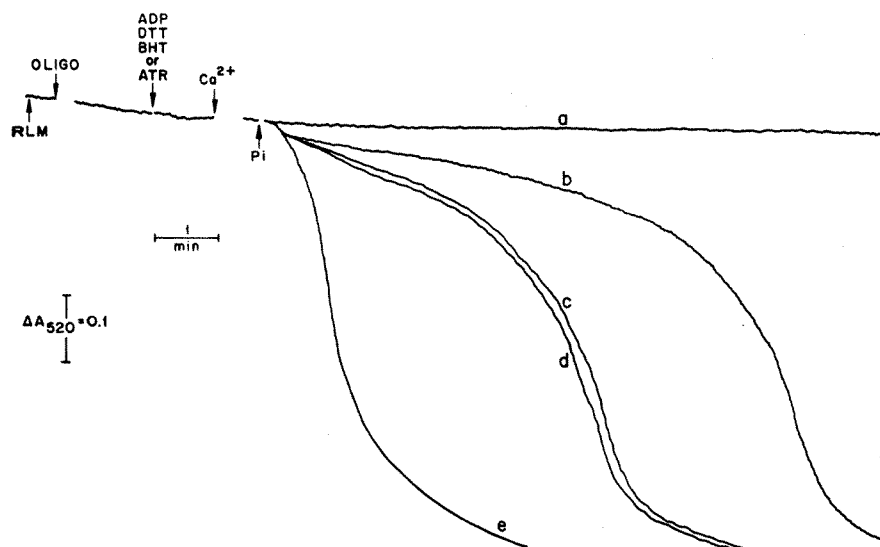


Fig. 5. Effect of ADP, dithiothreitol, butylhydroxytoluene and atractyloside on Ca^{2+} plus P_i -induced swelling in rat liver mitochondria. Mitochondria were incubated under the experimental conditions of Fig. 1. 1 min before the addition of 50 nmol Ca^{2+} /mg protein and 8 mM P_i , 200 μ M ADP (a);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

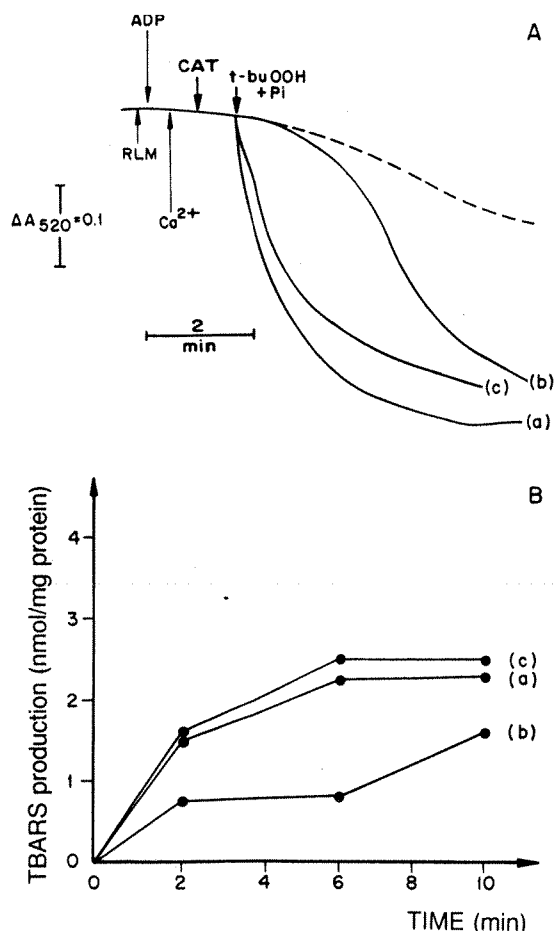


Fig. 6. Carboxyatractyloside abolishes the protective effect of ADP on mitochondrial swelling (A) and lipoperoxidation (B) in rat liver mitochondria (RLM). Mitochondria were incubated in the presence of 30 nmol Ca^{2+} /mg protein and 200 μ M *t*-butylhydroperoxide (*t*-buOOH) plus 5 mM P_i , (a) with the addition of 200 μ M ADP (b) or 200 μ M ADP and 10 μ M carboxyatractyloside (CAT; c) where indicated. The dashed line represents the experiment where only Ca^{2+} and P_i were added.

inhibited at 50 μ M Ca^{2+} in the prior incubation medium. However, the rate of O_2 consumption was restored to values very close to the control level under three distinct conditions: the addition of either Ruthenium red or cyclosporin A to the prior incubation medium, or the addition of an uncoupler carboxyl cyanide 4-trifluorophenylhydrazone (FCCP) after the ADP-induced stimulation of O_2 consumption. It is interesting to observe that the same carboxyatractyloside concentration sufficient to inhibit only about 25% of the active ADP/ATP carrier, in the presence of EGTA, inhibits almost completely the state-3_{ADP} respiration when the mitochondria were previously incubated in the presence of 50 μ M Ca^{2+} .

DISCUSSION

Our results clearly dissociate the occurrence of lipoperoxidation from the processes of mitochondrial inner-membrane permeabilization, in agreement with our previously reported observations [9]. Although Ca^{2+} is essential to the observation of mitochondrial swelling in the presence of *t*-butylhydroperoxide, in Fig. 4 we show that cation chelation by EGTA inhibits this process completely, without any significant decrease in the production of TBARS, indicating that

Table 1. Estimation of the ADP/ATP carrier activity after incubation of deenergized mitochondria under different Ca^{2+} concentrations. Deenergized mitochondria (1 mg protein) were incubated at 30°C in 1 ml of basic medium without succinate. After 3 min, 0.5 mM EGTA and 5 mM succinate were added and carboxyatractyloside (200 pmol/mg) was used to titrate the state 3_{ADP} respiration. When used, 1 mM dithiothreitol and 5 μ M Ruthenium red or 1 μ M cyclosporin A were added to the incubation medium. FCCP (0.8 μ M) was added after 1 mM ADP.

Experimental conditions	Rate of O_2 consumption in		
	state 4	state 3 _{ADP}	state 3 _{FCCP}
	ng $O_2 \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$		
0.5 mM EGTA	63.9	336.6	
0.5 mM EGTA/carboxyatractyloside		191.7	
10 μ M Ca^{2+}	70.8	340.0	
10 μ M Ca^{2+} /carboxyatractyloside		190.8	
50 μ M Ca^{2+}	71.0	142.0	
50 μ M Ca^{2+} /carboxyatractyloside		85.2	
50 μ M Ca^{2+} /dithiothreitol	70.9	128.0	
50 μ M Ca^{2+} /FCCP	71.0	142.0	338.5
50 μ M Ca^{2+} /Ruthenium red	65.8	341.2	
50 μ M Ca^{2+} /cyclosporin A	70.8	344.3	
0.5 mM EGTA/cyclosporin A	64.5	345.9	

once the lipoperoxidation starts it cannot be stopped simply by the removal of Ca^{2+} . Moreover, the addition of a radical scavenger, butylhydroxytoluene, is enough to block the lipoperoxidation process, without further production of TBARS, as expected, but its effect on mitochondrial swelling is only partial. These results suggest that lipoperoxidation is not the primary event leading to mitochondrial permeabilization, and they do not support the general mechanism proposed by Carbonera et al [5, 34]. Moreover, it seems that the observed production of TBARS under our experimental conditions is not enough to open pores in the mitochondrial membrane.

Other experiments reported here compare the ability of different agents to inhibit the mitochondrial permeability transition, as shown in Figs 1 and 5. In both experimental conditions, inducing the mitochondrial damage using either Ca^{2+} and an oxidant, *t*-butylhydroperoxide, or Ca^{2+} and P_i , ADP was shown to be the more effective with respect to protection against the observed mitochondrial permeabilization. Dithiothreitol, which acts by maintaining sulfhydryl groups in the reduced state, was able to inhibit the damage only under oxidative conditions, supporting once more the conclusion that, although in the presence of Ca^{2+} and P_i there is an increase in oxygen consumption by the mitochondria and this can be followed by an enhancement of the electron leak, this condition does not result in significant oxidation of membrane proteins. Indeed, the explanation of mitochondrial damage through oxygen-radical attack on the lipids and proteins of the membrane can be ruled out by the small effect of butylhydroxytoluene as a protectant in the experiments described in Figs 1 and 5. These findings suggest that this oxidation occurs as a second step of the permeability transition, leading to a general loss of the membrane integrity.

Our results also strongly suggest the involvement of ADP/ATP carrier in the process of pore opening, and are corroborated by the experiments shown in Fig. 6 where we demonstrate that the addition of carboxyatractyloside to the

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

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

REFERENCES

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