

Valmir Lauro Ferraz

*Este exemplar corresponde a versão final da tese defendida  
pelo candidato Valmir Lauro Ferraz aprovada pela comissão  
Julgadora*

*Alf. de laus*  
*04/04/88*

ALTERAÇÕES DA PERMEABILIDADE  
DA MEMBRANA MITOCONDRIAL DEPENDENTES DE CÁLCIO  
E OXIDANTES DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA ENDÓGENOS

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas, para a obtenção do  
título de Mestre em Biologia, área  
Fisiologia e Biofísica.

ORIENTADOR

Prof. Dr. ANÍBAL EUGÊNIO VERCESI

CAMPINAS

1988

"Não raro o mais importante se  
encontra nas menores coisas"

À minha família e em particu-  
lar à memória de meu irmão  
Arnaldo.

dedico

## AGRADECIMENTOS

À minha família pela eterna amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi pelo exemplo proporcionado de dedicação e seriedade à pesquisa científica, bem como pela vivência e ensinamentos transmitidos.

À Dra. Lúcia Pereira-da-Silva do laboratório de bioenergética do Departamento de Bioquímica - IB - UNICAMP, pelas sugestões e colaboração dadas ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores, colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo apoio, cooperação e incentivo ao curso de mestrado em Fisiologia e Biofísica.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo apoio e cooperação que proporcionou durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Dra. Lúcia Pereira-da-Silva do Departamento de Bioquímica-IB-UNICAMP, Dr. Antônio Ari Gonçalves e Dra. Marta Helena Krieger Azzoline do Departamento de Fisiologia e Biofísica-IB-UNICAMP, Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Paraná, e ao Professor de língua portuguesa Paulo Fernando de Paiva, pelas correções e sugestões feitas a esta dissertação.

Aos colegas do laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela aprendizagem do convívio e pelo espírito comunitário.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, especialmente à colega Márcia M. Fagian e Regina C. Rosseto pela colaboração técnica.

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

Finalmente, a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ABREVIATURAS                                                                                                                                     | 01 |
| INTRODUÇÃO                                                                                                                                       | 02 |
| Fluxo de cálcio através da membrana mitocondrial interna                                                                                         | 04 |
| Bioenergética do fluxo de cálcio através da membrana mitocondrial interna                                                                        | 06 |
| Regulação das vias de transporte mitocondrial de cálcio                                                                                          | 07 |
| Papel fisiológico do transporte mitocondrial de cálcio                                                                                           | 09 |
| Liberação de cálcio mitocondrial induzida pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina                                                       | 10 |
| Aumento da permeabilidade não específica da membrana mitocondrial induzida pelos oxidantes de NAD(P)H mais cálcio em mitocôndrias desenergizadas | 12 |
| MATERIAIS E MÉTODOS                                                                                                                              | 16 |
| Obtenção de mitocôndrias hepáticas                                                                                                               | 16 |
| Isolamento de mitocôndrias de cérebro                                                                                                            | 16 |
| Dosagem de proteína mitocondrial                                                                                                                 | 17 |
| Meios de incubação                                                                                                                               | 17 |
| Medida da variação do volume mitocondrial                                                                                                        | 18 |
| Determinação do potencial de membrana                                                                                                            | 19 |
| Determinação de ácidos graxos                                                                                                                    | 21 |
| RESULTADOS                                                                                                                                       | 23 |
| Inchamento mitocondrial induzido por oxidantes de NAD(P)H mitocondriais                                                                          | 23 |
| Inchamento mitocondrial induzido por diamida em diferentes suportes osmóticos                                                                    | 23 |
| Efeito da concentração de cálcio e fosfato sobre a velocidade e extensão do inchamento mitocondrial                                              | 25 |

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Efeito da temperatura sobre o inchamento mitocondrial induzido por cálcio e diamida                                                   | 28 |
| Determinação do potencial elétrico da membrana nas condições controle e após o inchamento mitocondrial dependente de cálcio e diamida | 28 |
| Inibição do inchamento mitocondrial por dibucaína e ATP + magnésio                                                                    | 31 |
| Efeito de vermelho de rutênio sobre o inchamento mitocondrial                                                                         | 31 |
| Correlação entre as concentrações de cálcio e dibucaína sobre o inchamento mitocondrial                                               | 34 |
| Determinação de ácidos graxos livres em mitocôndrias pré-incubadas na presença de cálcio e acetoacetato                               | 36 |
| Características do inchamento em mitocôndrias de cérebro de rato                                                                      | 36 |
| Efeito do fosfato sobre o inchamento de mitocôndrias de cérebro de rato                                                               | 39 |
| Comparação dos efeitos de diamida e fosfato sobre o inchamento de mitocôndrias de cérebro                                             | 39 |
| DISCUSSÃO                                                                                                                             | 43 |
| RESUMO                                                                                                                                | 51 |
| SUMMARY                                                                                                                               | 52 |
| BIBLIOGRAFIA                                                                                                                          | 53 |

## ABREVIATURAS

|                |                                                                     |
|----------------|---------------------------------------------------------------------|
| AMP, ADP e ATP | Adenosina-5'-mono, di e trifosfato                                  |
| AcAc           | Acetoacetato                                                        |
| BSA            | Albumina de soro bovino                                             |
| CCD            | Cromatografia de camada delgada                                     |
| CR             | Cadeia respiratória                                                 |
| EGTA           | Ácido etileno glicol ( $\beta$ -aminoetil éter)<br>N-N'-tetracético |
| "et alii"      | do latin "e outras pessoas"                                         |
| GP             | Glutationala peroxidase                                             |
| GR             | Glutationala redutase                                               |
| GSH            | Glutationala reduzida                                               |
| GSSG           | Glutationala oxidada                                                |
| HEPES          | Ácido 4-(2 hidroxietil-1-piperazina-etano-<br>sulfônico)            |
| NAD            | Nicotinamida adenina dinucleotídeo                                  |
| NADP           | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato                          |
| p/v            | Peso/volume                                                         |
| PVC            | Cloreto de polivinila                                               |
| t-but.00H      | t-butil hidroperóxido                                               |
| TH             | Transidrogenase                                                     |
| TPB            | Tetrafenilborato                                                    |
| TPP            | Tetrafeilfosfônio                                                   |
| VR             | Vermelho de rutênio                                                 |
| v/v            | Volume/volume                                                       |
| LS             | "Light Scattering" (espalhamento de luz)                            |
| $\Delta$ LS    | Variação do espalhamento de luz                                     |

## INTRODUÇÃO

Os dados da literatura não fazem claramente registro de quem descobriu a organela citoplasmática denominada mitocôndria. Mencionam, entretanto, que no período de 1850-1890 muitos citologistas observaram elementos granulares no citoplasma de diferentes células. De acordo com LEHNINGER (1964), KÖLLIKER em 1888 tenha sido talvez o primeiro a descrever a existência destes grânulos caracteristicamente arranjados em sarcoplasma de músculo estriado de insetos, onde são bastante numerosos. KÖLLIKER verificou que esses grânulos inchavam em água, demonstrando que possuíam uma membrana e que, portanto, formavam um compartimento isolado. Ainda segundo LEHNINGER (1964), BENDA em 1898 introduziu o cristal violeta como um corante para estes grânulos e foi quem primeiro os chamou "mitocôndria" (do grego "mitos" = filamento e "chondros" = grão).

LEWIS & LEWIS em 1914 (apud LEHNINGER, 1964) estudaram o comportamento de mitocôndrias em células vivas de cultura de tecido, e descobriram que, com o tempo, sofriam mudanças no seu formato, tamanho e localização. Essas observações sugeriam que as mitocôndrias exerciam um papel fisiológico dinâmico e possuíam plasticidade na sua estrutura. O passo significativo seguinte no estudo das mitocôndrias, foi na década de 1930 quando BENSLEY (apud LEHNINGER, 1964) tentou isolá-las de homogeneizado de células de tecido hepático, por meio de centrifugação diferencial. Embora não tenha conseguido, BENSLEY deixou registradas muitas informações. Um grande progresso foi feito por HOGEBLOOM, SCHNEIDER e PALADE (1948) do Instituto Rockefeller, os quais observaram que núcleo, mitocôndrias e microssomos são facilmente

separáveis de lisados de células de fígado de rato por centrifugação diferencial quando em meio de sacarose 0,88M. Estes pesquisadores puderam, então, obter organelas com a forma alongada característica, como vistas em células intactas. Variando o meio de isolamento, no entanto, com soluções de NaCl contendo baixas concentrações de sacarose, observaram que o formato das organelas obtidas era esférico e pareciam inchadas. Na mesma época KENNEDY & LEHNINGER (1948) estudando o sistema multienzimático que cataliza a oxidação de ácidos graxos, mostraram que a atividade deste sistema era dependente da concentração de certos solutos orgânicos e inorgânicos no meio, indicando, por sua vez, que a atividade estava presente em alguma estrutura osmoticamente ativa. Em seguida aplicaram a metodologia de centrifugação fracionada de HOGEBOOM et alii (1948) e verificaram que este sistema multienzimático estava contido nas mitocôndrias.

Vários pesquisadores, estudando o processo de respiração celular na década de 50, já observavam que mitocôndrias sofriam mudanças no volume associado à respiração (RAAFLAUB, 1953; MACFARLANE & SPENCER, 1953). Embora o objetivo principal nesses estudos fosse a elucidação do processo de respiração, algumas observações de fluxo iônico em mitocôndrias respirando já eram feitas. MACFARLANE & SPENCER (1953), STANBURY & MUDGE (1953) e BARTLEY & DAVIES (1954), estudando o fluxo de íons através da membrana mitocondrial interna, observaram que mitocôndrias isoladas podiam reter certos íons, como  $K^+$  e  $Mg^{2+}$ . Quando a respiração era bloqueada, contudo,  $K^+$  e  $Mg^{2+}$  fluíam rapidamente para o meio de suspensão, sugerindo que o acúmulo desses íons envolvesse um processo dependente da respiração.

Os estudos de fluxo iônico através da membrana interna de mitocôndrias isoladas revelaram que o íon  $Ca^{2+}$  causava um inchamento de grande amplitude em organelas respirando (RAAFLAUB, 1953; SLATER & CLELAND, 1953; HUNTER & FORD, 1955; TAPLEY, 1956). Os mesmos pesquisadores relacionaram este

efeito com a liberação de um fator denominado "fator U" ligado a um precursor presente na matriz mitocondrial. O cálcio causaria a liberação do fator U através da ativação de uma enzima cálcio-dependente. Essa hipótese começou a ser rejeitada quando foi observado que mitocôndrias podiam acumular grandes quantidades de cálcio (DeLUCA et alii, 1962; VASINGTON & MURPHY, 1962). Com base neste fato, CHAPPELL et alii (1963) levantaram a hipótese de que o inchamento induzido por cálcio fosse de origem osmótica e não envolvesse necessariamente o fator U, como proposto por outros.

## II. FLUXO DE CÁLCIO ATRAVÉS DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

Os níveis intracelulares e a distribuição do cálcio são extremamente importantes na regulação de muitos aspectos da função celular, incluindo proliferação, estímulo da motilidade e sistema contrátil, excitação-contração de células musculares, controle e secreção hormonal e a regulação do metabolismo celular, para citar alguns. Visto que o íon é capaz de interagir com um número muito grande de eventos fisiológicos e bioquímicos, existe uma crescente concordância de que a regulação iônica do meio intracelular é fundamental para se entender a regulação da função e metabolismo em células normais (BYGRAVE, 1978).

A despeito de sua grande importância, os mecanismos de regulação do cálcio intracelular carecem de muito estudo. A fim de manter a homeostase do cálcio nas células, a membrana plasmática, o retículo endoplasmático e as mitocôndrias devem operar de forma integrada para permitir uma distribuição adequada do íon nas organelas ou nos eventos intracelulares sujeitos à sua regulação. Dos mecanismos fisiológicos de fluxo celular de cálcio, a captação pelo retículo sarcoplasmático (DE MEIS & VIANNA, 1979) e o bombeamento para fora da célula, particularmente em membrana de eritrócitos (HOLMES, 1985), ambos mediados por ATPases específicas, são os mais

bem elucidados. Em mitocôndrias, no entanto, apesar de muito estudo, existe grande controvérsia sobre o seu mecanismo.

Embora não possuam uma ATPase específica para cálcio em suas membranas, mitocôndrias isoladas de vários tecidos animais possuem um sistema de transporte de cálcio que se acredita participar da homeostase intracelular do íon (McCORMACK & DENTON, 1986). Quando observado que a adição do corante vermelho de rutênio a mitocôndrias carregadas com cálcio produzia efluxo líquido do cátion acumulado (MELA, 1968), pensou-se num sistema de transporte constituído por duas vias distintas: uma de entrada, que pode ser bloqueada por vermelho de rutênio, e uma de saída, independente da presença do corante. Intensos estudos acabaram revelando que a entrada de cálcio em mitocôndrias energizadas ocorre por um transportador de alta afinidade pelo cátion ( $K_m$  3-10 $\mu$ M), sensível a vermelho de rutênio e com velocidade máxima de transporte em torno de 900nmoles/mg/min (BRAGADIN et alii, 1979). O carreador de cálcio age em resposta a um potencial de membrana negativo dentro, desenvolvido pela respiração ou hidrólise de ATP (SELWYN et alii, 1970). Paralelamente à captação do cálcio adicionado a mitocôndrias energizadas, observa-se um estímulo da respiração e saída líquida de prótons da matriz mitocondrial confirmando seu caráter eletroforético (VERCESI et alii, 1978).

Evidências experimentais indicam que o efluxo de cálcio da matriz mitocondrial ocorre por uma via independente (distinta da via de influxo) que troca  $Ca^{2+}$  por  $Na^+$  externo em mitocôndrias de tecidos excitáveis (CARAFOLI et alii, 1974; CROMPTON et alii, 1976), ou por  $H^+$  em mitocôndrias de outros tecidos como fígado, por exemplo (ÅKERMAN, 1978; NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1979). De acordo com este modelo, a distribuição do cálcio entre a matriz mitocondrial e o citosol pode ser alterada pelo estímulo ou inibição de uma ou das duas vias (NICHOLLS e ÅKERMAN, 1982). A operação simultânea das duas vias gera um movimento cíclico do íon

através da membrana, até que uma situação de equilíbrio dinâmico seja atingida quando, então, as duas velocidades de transporte se igualam (POSSAN et alii, 1977; ÅKERMAN, 1978).

Com mitocôndrias isoladas suspensas em meio de reação que simula as condições intracelulares, as concentrações de cálcio livre extramitocondriais, na situação de equilíbrio, é da ordem de 0,5 a 0,8  $\mu\text{M}$  (NICHOLLS, 1978; BECKER et alii, 1980). Esta capacidade das mitocôndrias, particularmente na presença de  $\text{Mg}^{2+}$  e ATP, de tamponar concentrações de cálcio livre externo próximas daquelas no citosol "in vivo", motivou estes pesquisadores a propor que as mitocôndrias devem agir como um reservatório de cálcio, regulando as concentrações citoplasmáticas do íon.

### III. BIOENERGÉTICA DO FLUXO DE CÁLCIO ATRAVÉS DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

A teoria quimiosmótica de PETER MITCHELL (1961) fornece subsídios para explicar as propriedades do transporte mitocondrial de cálcio. Segundo MITCHELL, o único transporte ativo em mitocôndrias é o de  $\text{H}^+$ . Portanto, todos os demais transportes iônicos estão acoplados química ou eletricamente a este. O fluxo de  $\text{H}^+$  em mitocôndrias se dá através de duas bombas principais: a cadeia respiratória ejetando prótons da matriz mitocondrial, e a ATP-sintetase bombeando-os para dentro. A função da primeira é gerar e manter um potencial eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) em torno de 230mV. A segunda utiliza este potencial para a síntese de ATP.

O  $\Delta\mu\text{H}^+$  é definido como sendo a variação líquida da energia de GIBBS ( $\Delta G$ ), quando 1 mol de  $\text{H}^+$  é transportado através de uma membrana com um potencial elétrico ( $\Delta\psi$ ) em mV, de uma concentração de prótons (1) para uma concentração de prótons (2), conforme equacionado a seguir:

$$\Delta G = -F\Delta\psi + 2,3RT\log\frac{[H^+]_2}{[H^+]_1}$$

$$\frac{\Delta G}{F} = \Delta\tilde{\mu}H^+ = \Delta\psi - \frac{2,3RT}{F}\Delta pH$$

que em mV a 30 °C fornece,

$$\Delta\tilde{\mu}H^+ = \Delta\psi - 60\Delta pH$$

onde, F é a constante de Faraday, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta e  $\Delta pH$ , a variação de pH através da membrana.

Portanto, a distribuição iônica através da membrana mitocondrial está sujeita a uma força eletromotriz, composta pelo potencial elétrico e pelo gradiente de  $H^+$  através da membrana. A distribuição do cálcio através da membrana mitocondrial, por sua vez, estaria sujeita ao potencial eletroquímico de cálcio ( $\Delta\tilde{\mu}Ca^{2+}$ ) dado por:

$\Delta\tilde{\mu}Ca^{2+} = 2\Delta\psi - 60\Delta pCa^{2+}$ , onde,  $\Delta pCa^{2+}$  é a variação de  $-\log [Ca^{2+}]$  através da membrana.

Se o transporte eletroforético de cálcio fosse o único sistema de transporte presente nas mitocôndrias, os cálculos termodinâmicos, nas condições de equilíbrio, forneceriam valores para o gradiente de concentração de cálcio através da membrana, da ordem de  $10^6$  para valores de  $\Delta\psi$  de aproximadamente 180mV (MITCHELL & MOYLE, 1969; NICHOLLS, 1974; ROTTENBERG, 1975). Porém, os valores experimentais encontrados são muito inferiores à distribuição termodinâmica calculada (DRAHOTA et alii, 1965; POZZAN et alii, 1977) e, portanto, compatíveis com a existência de vias distintas (dependendo do tecido) para o efluxo eletroneutro do íon (NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982; RIZZUTO et alii, 1987).

#### IV. REGULAÇÃO DAS VIAS DE TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CÁLCIO

Dos fatores que podem influir no equilíbrio dinâmico do transporte mitocondrial de cálcio, podemos apontar: os dois componentes ( $\Delta\psi$  e  $\Delta\text{pH}$ ) do potencial eletroquímico de prótons (que afetam a distribuição do íon, conforme já descrito), os ânions permeantes, e o  $\text{Mg}^{2+}$ , que não é normalmente transportado em membranas mitocondriais, exceto em mitocôndrias cardíacas. Nestas, o  $\text{Mg}^{2+}$  inibe competitivamente o transporte do cálcio resultando no aumento de sua concentração extramitocondrial nas condições de equilíbrio (SCARPA & AZZI, 1961; HUTSON et alii, 1976).

Os ânions permeantes, assim considerados porque estimulam o transporte de cálcio para o interior da mitocôndria, são íons de ácidos fracos lipofílicos, como o acetato, o propionato, o butirato e o  $\beta$ -hidroxibutirato. Estes, atravessam a membrana mitocondrial na forma protonada, fornecendo  $\text{H}^+$  para a neutralização da matriz mitocondrial (LEHNINGER, 1974).

Dos íons permeantes, podemos destacar como exemplo o íon  $\text{H}_3\text{PO}_4^-$  que acompanha a entrada de cálcio em mitocôndrias e dissipa o gradiente de pH, por entrar em cotransporte com  $\text{H}^+$  (COTY & PEDERSEN, 1975). Quando isso ocorre, a membrana, numa tentativa de reconstituir o valor de  $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$ , devido à queda de  $\Delta\text{pH}$ , aumenta  $\Delta\psi$  ( $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+ = \Delta\psi + 60\Delta\text{pH} = 210$  a  $230\text{mV}$  em organelas energizadas). Com a entrada simultânea de fosfato, a captação de cálcio se torna praticamente ilimitada. Até  $2\text{ }\mu\text{moles}$  de  $\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$  de proteína mitocondrial têm sido observados em condições experimentais em que a integridade mitocondrial é preservada pela presença de  $\text{Mg}^{2+}$  e ATP (LEHNINGER et alii, 1974). Em tais condições o fosfato pode reagir com cálcio intramitocondrial e formar o complexo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . De fato, hidroxapatita de cálcio ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) é encontrada em sedimentos de mitocôndrias que acumularam muito cálcio em presença de fosfato (WEINBACK & VAN BRAND, 1965).

Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$  também afetam a distribuição de cálcio através da membrana mitocondrial, conforme já descrito. A participação dos íons  $\text{Na}^+$  no efluxo eletroneutro de  $\text{Ca}^{2+}$ , em

mitocôndrias de tecidos excitáveis, tem inclusive estimulado os pesquisadores a correlacioná-la com o processo de despolarização da membrana citoplasmática quando o citosol recebe grandes quantidades de  $\text{Na}^+$  (SCARPA & AZZONE, 1970 e ÅKERMAN & NICHOLLS, 1981). No caso do  $\text{H}^+$ , todavia, trabalhos recentes questionam duramente a existência do transportador que cataliza a troca  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$  (GUNTER et alii, 1983).

Dentre os fatores celulares, de função fisiológica conhecida, implicados na regulação da via de efluxo, está o estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais que será descrito no tópico VI.

#### V. PAPEL FISIOLÓGICO DO TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CÁLCIO

Embora intensamente estudado, o papel fisiológico do transporte de cálcio em mitocôndrias tem-se mostrado difícil de ser satisfatoriamente elucidado. Muitos investigadores têm sido atraídos por uma interpretação baseada na regulação do cálcio citosólico, devido à capacidade das mitocôndrias em tamponar o cálcio extramitocondrial em concentrações próximas daquelas no citosol "in situ" (NICHOLLS, 1978). Porém, o uso de microanálises de raios X (SOMLYO, 1981), ou mesmo procedimentos de homogeneização e fracionamento, em presença de EGTA ou vermelho de rutênio para minimizar o acúmulo de cálcio, tem mostrado valores da ordem de 1 a 5 nmoles  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína para o conteúdo de cálcio mitocondrial "in situ" (HANSFORD, 1985).

Esta faixa de concentração de cálcio é incompatível com a cinética das vias de influxo e efluxo, que permitem um tamponamento do cálcio extramitocondrial entre 0,2 e 1  $\mu\text{M}$  (HANSFORD, 1985). Para isso é necessário que as organelas estejam carregadas com concentrações de cálcio acima de 10 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). Tem sido apontado que tais níveis de concentração de cálcio encontrados "in situ" seriam mais apropriados na regulação de

enzimas intramitocondriais (DENTON & McCORMACK, 1980). Entre estas enzimas estão a Piruvato desidrogenase fosfato fosfatase, a NAD-Isocitrato desidrogenase e a 2-Oxoglutarato desidrogenase (HANSFORD, 1985).

O complexo Piruvato desidrogenase cataliza a descarboxilação oxidativa do Piruvato com a formação de Acetil-CoA. Parte do controle metabólico da atividade enzimática é feito por um processo de fosforilação/defosforilação da enzima, catalizado por uma quinase e uma fosfatase respectivamente. A forma ativa é a da enzima defosforilada. Em 1972, DENTON et alii demonstraram que a atividade da fosfatase era aumentada por concentrações de cálcio mitocondrial da ordem de  $1\mu\text{M}$ .

A enzima NAD-Isocitrato desidrogenase participa, no ciclo de KREBS, da retirada de um grupamento carbonila do Isocitrato e formação do  $\alpha$ -cetoglutarato. Esta enzima é regulada pelas razões ATP/ADP e NADH/NAD<sup>+</sup>, sendo ativada pelo declínio destas razões. Na presença de  $1\mu\text{M}$  de Cálcio o  $K_{1/2}$  de ativação desta enzima pelo substrato diminui de 5 a 8 vezes (DENTON et alii, 1978).

A enzima 2-oxoglutarato desidrogenase, que cataliza a conversão do 2-oxoglutarato a malato no ciclo do ácido tricarbóxico, é ativada por cálcio em torno de  $1\mu\text{M}$ , pela queda de pH e regulada pela razão ATP/ADP na matriz mitocondrial (HANSFORD, 1972; McCORMACK & DENTON, 1979).

Uma série de trabalhos recentes têm demonstrado que, de fato, o papel fisiológico do sistema de transporte de cálcio parece estar relacionado com a regulação do metabolismo oxidativo da célula, através da regulação da atividade destas desidrogenases (apud HANSFORD, 1985).

## VI. LIBERAÇÃO DE CÁLCIO MITOCONDRIAL INDUZIDA PELO ESTADO OXIDADO DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA

Durante estudos da estequiometria entre o acúmulo de cálcio, ejeção de H<sup>+</sup> e captação de O<sub>2</sub> por mitocôndrias de

coração de rato, VERCESI et alii (1978) observaram que quando succinato era usado como substrato na presença de rotenona, a retenção de cálcio pelas mitocôndrias era maior do que quando estas estavam oxidando substratos ligados a  $\text{NAD}^+$ . Esta observação confirmava os registros de LANDRY e LEHNINGER (1976) mostrando que o acúmulo e retenção de cálcio por células tumorais de Ehrlich intactas, respirando com succinato, eram estimuladas pela presença de rotenona, a qual inibe a oxidação dos substratos ligados ao  $\text{NAD}^+$  e mantém os nucleotídeos de piridina mitocondriais na forma reduzida. Tal fato sugeria que a retenção do cálcio fosse favorecida pelo estado reduzido dos nucleotídeos de piridina mitocondriais. Estudos posteriores com mitocôndrias isoladas de fígado (LEHNINGER et alii, 1978) e coração (COELHO & VERCESI, 1980) indicavam que um forte estímulo do efluxo de cálcio da matriz ocorria quando os nucleotídeos de piridina estavam num estado mais oxidado. Visto que a liberação de cálcio induzida por  $\text{NAD(P)}^+$  ocorria por uma troca, insensível a vermelho de rutênio, de  $1\text{Ca}^{2+}$  da matriz por  $2\text{H}^+$  do meio, foi proposto que a velocidade do sistema de troca  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$  seria regulada pelo estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais (FISKUM & LEHNINGER, 1979).

A interpretação de que este processo de liberação de cálcio pudesse representar um mecanismo fisiológico, foi fortemente contestada por alguns grupos (PFEIFFER et alii, 1979; NICHOLLS & BRAND, 1980; WOLKWICZ & McMILLIN-WOOD, 1980; SILIPRANDI et alii, 1982). BEATRICE et alii (1980) e NICHOLLS & BRAND (1980) obtiveram resultados indicando que esta liberação de cálcio estava associada com aumento na permeabilização não específica da membrana interna, diminuição do potencial de membrana, inchamento mitocondrial de grande extensão e liberação de outros componentes da matriz, tais como nucleotídeos de adenina,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , etc. Tem sido, também, sugerido que a oxidação de GSH para GSSG e não a oxidação de  $\text{NAD(P)H}$  induz a liberação de cálcio (JEWELL et alii, 1982;

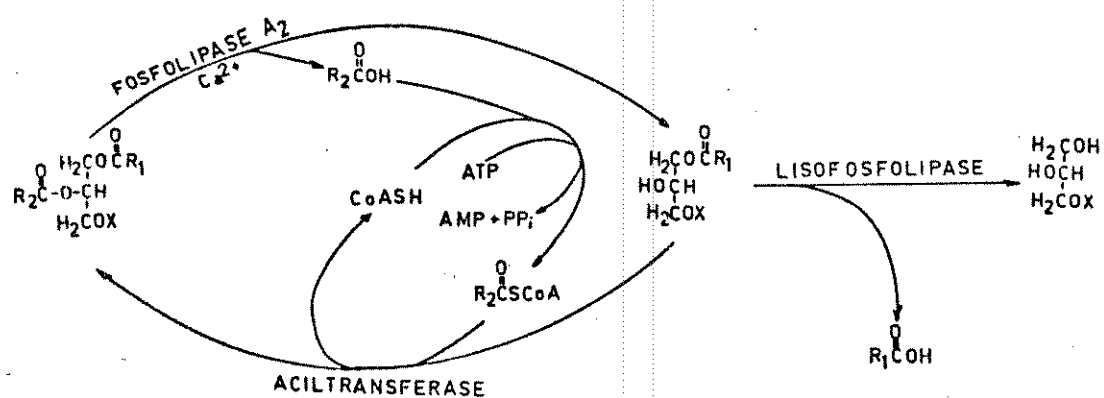
RILEY e PFEIFFER, 1985; VERCESI, 1987).

PFEIFFER et alii (1979) concluíram que a liberação de cálcio da matriz mitocondrial deveria ocorrer por uma permeabilidade inespecífica da membrana causada pela fosfolipase  $A_2$ . Esta enzima cataliza a hidrólise do ácido graxo ligado na posição do  $C_2$  do esqueleto do glicerol no fosfolípido (esquema I). A enzima estimulada pelos agentes liberadores de cálcio degradaria, a uma velocidade maior do que a da reação de reacilação (catalizada pela aciltransferase), os fosfolípidos da membrana em ácidos graxos livres, ocasionando a permeabilização.

Tem sido também mostrado que a liberação de cálcio dependente de  $NAD(P)^+$  por mitocôndrias é acompanhado por hidrólise de nucleotídeos de piridina (LÖTSCHER et alii, 1979). Segundo proposto pelo grupo de LÖTSCHER, a ADP-ribose resultante da degradação dos nucleotídeos e catalizada por uma NAD-ase ativada por cálcio, pode reagir com uma proteína na membrana mitocondrial interna, o que permitiria a liberação do cálcio (RICHTER et alii, 1983). O grupo propõe ainda que a inibição da NAD-ase mitocondrial por ATP poderia prevenir a hidrólise do  $NAD(P)^+$  e a liberação do cálcio (HOFSTETTER et alii, 1981; MOSER et alii, 1983).

#### VII. AUMENTO DA PERMEABILIDADE NÃO ESPECÍFICA DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INDUZIDA PELOS OXIDANTES DE $NAD(P)H$ MAIS CÁLCIO EM MITOCÔNDRIAS DESENERGIZADAS

Embora a proposta de um papel regulador do estado redox dos nucleotídeos de piridina sobre a distribuição de cálcio através da membrana mitocondrial tenha sido fortemente contestada, nosso laboratório estabeleceu condições experimentais que demonstram que este processo pode ser totalmente reversível. Estas condições incluem o uso de concentrações fisiológicas de ATP e  $Mg^{2+}$ , baixas concentrações de  $Ca^{2+}$ , acetato em lugar de fosfato como íon permeante e adição



ESQUEMA I

- $R_1$  = Cadeia saturada ou monoinsaturada  
 $R_2$  = Cadeia poliinsaturada  
 $X$  = Fosfatidiletanolamina (colina, etc.)

suficiente de concentrações de t-butil hidroperóxido para produzir uma oxidação transitória dos nucleotídeos de piridina pelas atividades combinadas da glutathione peroxidase, glutathione redutase e NAD(P)H-transidrogenase (veja Fig. 13). Sob tais condições observou-se que mitocôndrias de fígado de rato respirando com succinato apresentavam um aumento transitório na concentração de equilíbrio do cálcio extramitocondrial concomitante com a oxidação de NAD(P)H. Isto foi acompanhado de uma pequena diminuição no potencial de membrana, um aumento na velocidade de respiração e inchamento mitocondrial. Com exceção do inchamento, todos os demais eventos foram reversíveis. A diminuição no potencial de membrana devia-se a pelo menos três processos dissipadores de energia diferentes: (a) um movimento cíclico de cálcio mais rápido, (b) a reação dependente de energia da transidrogenase transferindo equivalentes redutores do NADH para  $\text{NADP}^+$ , e (c) possivelmente, um aumento na permeabilidade não específica da membrana, aumentando a condutância para  $\text{H}^+$ , cálcio e, mesmo, suporte osmótico do meio, o que explicaria o inchamento mitocondrial paralelo. Este último componente da diminuição do potencial de membrana associado com o aumento da permeabilidade não específica da mesma, pode ser aumentado tanto por concentrações mais elevadas de cálcio como pela omissão de ATP do meio de reação (BERNARDES et alii, 1986). Por outro lado, a adição de vermelho de rutênio e EGTA durante o estabelecimento da liberação de cálcio, diminui a extensão de ambos, o potencial de membrana e o inchamento mitocondrial.

Existe controvérsia na literatura relacionada com a propriedade do vermelho de rutênio ou EGTA diminuir o efeito deletério do cálcio na presença de agentes liberadores do íon sobre a membrana mitocondrial (MOORE et alii, 1983; VERCESI, 1984a; RILEY & PFEIFFER, 1985). Alguns autores defendem que o efeito deletério é diminuído porque estes agentes previnem: a) o movimento cíclico do cálcio através da membrana

(SILIPRANDI et alii, 1977; VERCESI, 1984a); b) a ligação do cálcio a sítios externos (MOORE et alii, 1983); ou c) a ligação a sítios internos por causa do bloqueio da recaptação do cálcio (RILEY & PFEIFFER, 1985).

Neste trabalho buscamos estudar o processo de permeabilização da membrana mitocondrial interna causado por cálcio e os oxidantes dos nucleotídeos de piridina mitocondriais, com o propósito de esclarecer a possível participação de uma série de fatores no seu mecanismo, tais como: a) movimento cíclico de cálcio através da membrana, b) energização mitocondrial, c) influência do meio de reação, d) participação da fosfolipase  $A_2$ , e) efeito dos anestésicos locais, f) localização dos sítios de ligação do cálcio para induzir seu efeito sobre a membrana e g) efeito da temperatura.

A detecção de aumento da permeabilidade da membrana foi estudada usando-se a técnica clássica do inchamento mitocondrial para acompanhar o influxo líquido de suporte osmótico, associado com o aumento da permeabilidade não específica da membrana.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### I. OBTENÇÃO DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS

A obtenção de mitocôndrias de fígado de rato foi baseada no método de SCHNEIDER & HOGEBROOM (1950).

Ratos de 4 a 6 meses pesando entre 200-250 g e mantidos em jejum por 12 horas foram decapitados, sem injeção prévia de drogas, e o fígado retirado o mais rápido possível e depositado em solução de sacarose 0,25M a 0°C. Após ter sido picado e lavado duas vezes com a mesma solução, procedia-se à homogeneização em meio de sacarose 0,25M/Hepes 2,0mM(pH 7,2), com EGTA 0,5mM para quelar o cálcio contaminante do meio e evitar os efeitos nocivos do íon durante o isolamento. O homogeneizado (obtido com um homogeneizador Potter-Elvehjen) foi centrifugado por 5 min a 2.500xg (0°C). O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o sedimento novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. A mistura dos dois sobrenadantes foi centrifugada durante 10 min a 11.500xg (0°C). Nesta etapa aparece uma fina camada lipídica por cima do sobrenadante que é removida com o uso de uma pipeta Pasteur. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em sacarose 0,25M/Hepes 2,0mM(pH 7,2) com EGTA 0,5mM e novamente centrifugado a 11.500xg (0°C) durante 10 min.

O sedimento resultante foi suspenso em meio de sacarose 0,25M/Hepes 2,0mM(pH 7,2), mantido em banho de gelo e utilizado dentro das 6 horas subseqüentes para se evitar a inclusão, nos resultados, de fatores ligados ao envelhecimento da preparação.

### II. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO

Isolamos as mitocôndrias de cérebro usando o procedimento de CLARK-NICKLAS (1970).

O tecido cerebral foi depositado em banho de gelo em meio "MS + EGTA" contendo manitol 225mM, sacarose 75mM, Hepes 5mM (pH 7,2), BSA 0,2% e EGTA 1mM. O tecido foi picado com tesoura e lavado duas vezes com MS + EGTA. O tecido picado e suspenso em 10ml de MS + EGTA contendo 5mg de Nagarse foi homogeneizado e seu volume completado para 30ml com MS + EGTA, e centrifugado a 2.250rpm durante 5 min. O sedimento foi suspenso em 10ml de MS + EGTA e centrifugado a 2.000rpm durante 5 min. A fração do sobrenadante foi centrifugada a 12.000rpm durante 10 min. O sedimento resultante, contendo mitocôndrias e sinaptosomas, foi ressuspenso em 20ml de MS + EGTA e dividido em 2 tubos (10ml cada). A cada tubo adicionou-se 10µl de digitonina 10% para romper a membrana dos sinaptosomas e liberar as mitocôndrias retidas dentro. Os tubos foram centrifugados a 12.000rpm durante 10 min. Uma última centrifugação foi feita com MS sem EGTA nas mesmas condições da anterior. O sedimento resultante foi suspenso em 0,1-0,2ml de MS sem EGTA.

### III. DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

A quantificação de organelas na suspensão obtida foi estabelecida em relação ao conteúdo total de proteínas, identificado segundo o método de MURPHY & KIES (1960). O método é baseado na determinação da concentração de ligações peptídicas através de leituras espectrofotométricas em 215 e 225nm da solução proteica, obtida com a diluição de 10µl de suspensão mitocondrial em 25ml de NaOH 5mM. Com a diferença entre as leituras pode-se, então, obter a concentração por comparação com uma curva-padrão feita em iguais condições com albumina de soro bovino.

### IV. MEIOS DE INCUBAÇÃO

Os meios de reação usados nas incubações para as

diferentes determinações em mitocôndrias de fígado e cérebro, foram compostos basicamente de: (1) meio de KCl - KCl 130mM, tampão Hepes 5,0mM (pH 7,2), rotenona 5,0 $\mu$ M, oligomicina 5,0 $\mu$ g/mg de proteína mitocondrial. (2) meio de sacarose - sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 5,0mM (pH 7,2), rotenona 5,0 $\mu$ M e oligomicina 5,0 $\mu$ g/mg de proteína mitocondrial. (3) meio de manitol - manitol 200mM, sacarose 75mM, tampão Hepes 5,0mM (pH 7,2), rotenona 5,0 $\mu$ M e oligomicina 5,0 $\mu$ g/mg de proteína mitocondrial. A presença de rotenona e oligomicina sem substratos respiratórios no meio, caracteriza uma condição de desenergização para mitocôndrias. Outras adições feitas aos meios de reação estão especificadas nas legendas de cada figura.

#### V. MEDIDA DA VARIAÇÃO DO VOLUME MITOCONDRIAL

Suspensões mitocondriais são turvas e espalham a 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, 1982). Um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e o do meio com conseqüente diminuição do espalhamento de luz. Esta propriedade das mitocôndrias "in vitro" fornece tanto um método qualitativo quanto quantitativo simples para se estudar fluxos de solutos através da membrana mitocondrial interna. Mitocôndrias se prestam bem para esta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes mudanças de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramento de seus pregueamentos. O acompanhamento deste processo pode ser feito tanto em função da diminuição da luz transmitida em um espectrofotômetro normal, como, de forma mais sensível, usando-se um fluorímetro ajustado para medir a luz espalhada pela suspensão (LS = "Light Scattering"), diretamente num ângulo de 90° entre a incidência do feixe de luz e a célula fotoelétrica. Esta

técnica tem sido bastante usada porque é um método simples, bastante sensível, rápido e fornece um registro contínuo da cinética do inchamento (BEAVIS et alii, 1985).

Em nossos experimentos usamos um espectrofotofluorímetro Aminco Bowman ajustado para um comprimento de onda de 520nm para a excitação e a emissão conforme HUNTER & HAWORTH (1979). Foi conectado um registrador ao fluorímetro para registrar as variações de volume mitocondrial induzidas pelos seguintes oxidantes de NAD(P)H: a) t-butil hidroperóxido (t-but.OOH), b) Acetoacetato (AcAc) e b) Diamida.

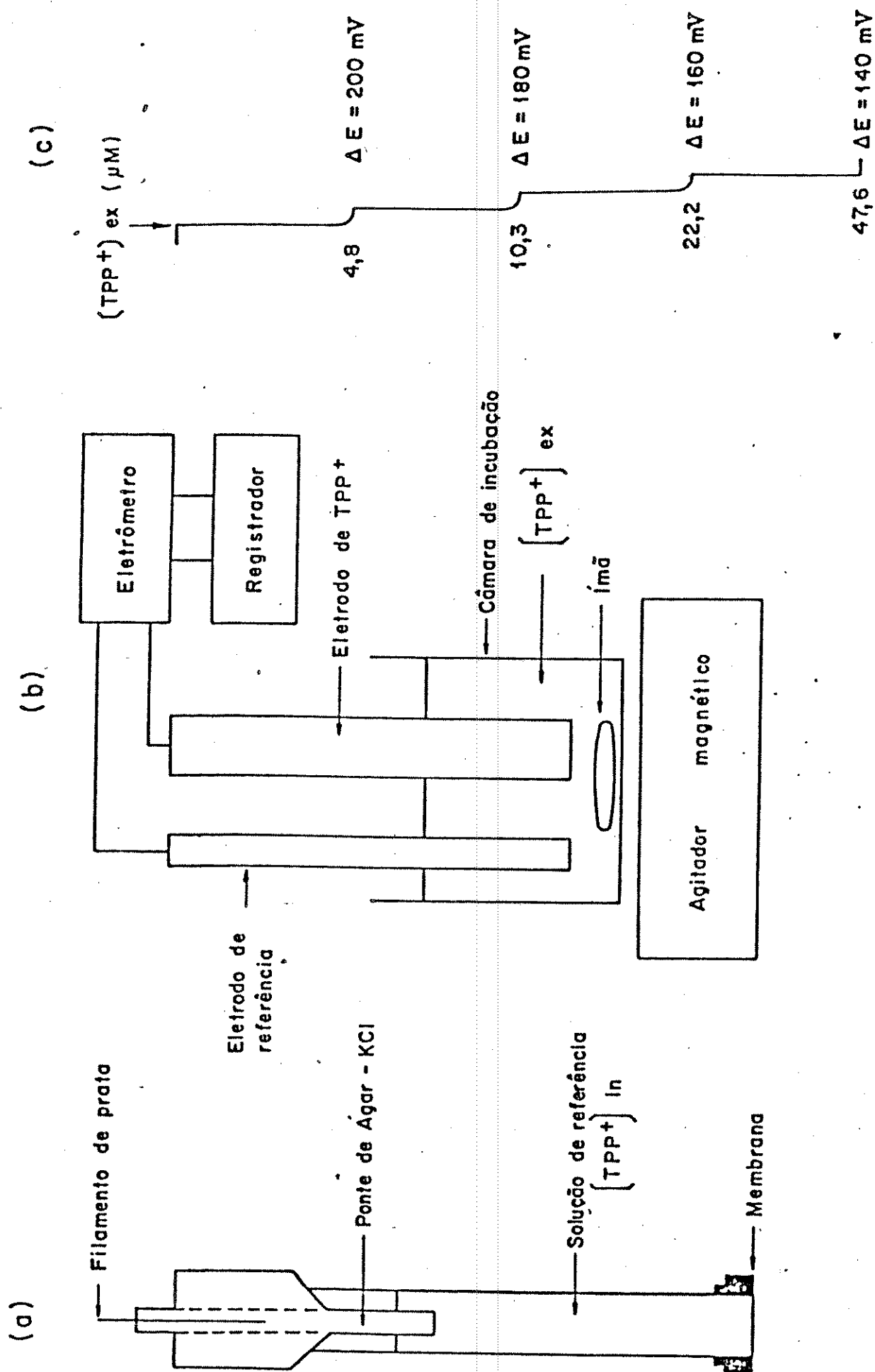
## VI. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA

Determinou-se o potencial de membrana a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio ( $\text{TPP}^+$ ) entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, usando-se um eletrodo específico construído em nosso laboratório de acordo com KAMO et alii (1979). Neste eletrodo utiliza-se uma membrana de cloreto de polivinila (PVC), contendo tetrafenilborato (TPB) como trocador de íons. A membrana é preparada com a mistura de 3ml de tetrafenilborato de sódio 10mM, dissolvido em tetrahidrofurano, com 10ml de uma solução de cloreto de polivinila 5%(p/v) contendo dioctilftalato 15%(v/v). A solução é colocada em uma placa de Petri (60cm<sup>2</sup> de área) e deixada à temperatura ambiente para permitir a evaporação do solvente (tetrahidrofurano).

A membrana assim obtida é transparente e tem 0,15 a 0,2mm de espessura. Com auxílio do mesmo solvente empregado na obtenção da membrana, cola-se um fragmento da mesma à extremidade de um tubo de PVC (7cm de comprimento/0,3cm de diâmetro). Preenche-se o tubo com solução de  $\text{TPP}^+$  0,2M, que servirá como solução de referência interna ( $[\text{TPP}^+]_{\text{in}}$ ). Pela extremidade aberta do tubo introduz-se um outro tubo mais fino contendo em seu interior um fio de Ag/AgCl em contato com uma solução de ágar 1,5%(p/v) em KCl saturado, para viabilizar a captação do sinal produzido pelo eletrodo, conforme mostra o painel (a) do

## ESQUEMA II

Esquema ilustrativo da montagem de um eletrodo de  $\text{TPP}^+$  (a), diagrama da aparelhagem usada para medir o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias (b) e curva de calibração do eletrodo (c).  $\Delta E$  = diferença de força eletromotriz.



esquema II. Antes do uso, porém, é necessário que a membrana seja ativada, mantendo-se o eletrodo por uma noite em solução de  $\text{TPP}^+$  10mM. A diferença de força eletromotriz ( $\Delta E$ ) entre o eletrodo de  $\text{TPP}^+$  e um eletrodo de referência (painel (b) do esquema II) foi medida por um potenciômetro (Beckman Expando-matic SS-2) com um registrador conectado (Linear Instruments Corp.). As concentrações de  $\text{TPP}^+$  no meio de reação podem, então, ser monitoradas continuamente, e os valores de  $\Delta\psi$  calculados usando-se a equação abaixo:

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

onde  $v$ ,  $V$  e  $\Delta E$  representam respectivamente o volume mitocondrial, volume do meio de reação e potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de  $\text{TPP}^+$  através da membrana do próprio eletrodo. Os valores de  $\Delta E$  foram calculados pela equação:

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

onde,  $[\text{TPP}^+]_{\text{ex}}$  refere-se à concentração de  $\text{TPP}^+$  no meio de reação. Os sinais do eletrodo ( $\Delta E$ ) foram quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de  $\text{TPP}^+$  ao meio de reação (painel (c) do esquema II). O volume mitocondrial considerado foi de 1,4  $\mu\text{l}$  por mg de proteína mitocondrial segundo KAMO et alii (1979).

## VII. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A solubilidade de moléculas de fosfolipídeos em solventes orgânicos depende da natureza da cadeia do ácido graxo (comprimento e saturação) e da presença, no mesmo solvente, de outras moléculas de lipídeos com diferente solubilidade. Fosfolipídeos naturais são geralmente considerados insolúveis em acetona gelada e solúveis em outros solventes orgânicos como clorofórmio, por exemplo. Uma extração eficiente de

lipídeos de membranas pode ser obtida pela homogeneização em mistura de clorofórmio/metanol em um sistema de uma fase. Com base nestes princípios, seguimos o método de FOLCH et alii (1957), modificado e adaptado para membranas mitocondriais, conforme descrito por BROEKEMEIER (1985).

Suspensões mitocondriais submetidas ao inchamento com cálcio + AcAc ("amostra") por um período de 3 min, foram centrifugadas a 11.500xg (30 °C) e separado o sobrenadante do sedimento. Suspensões-"controle" (sem cálcio, sem AcAc e com EGTA 0,5mM) foram submetidas ao mesmo procedimento para obtenção das "amostras".

Alíquotas da "amostra" e do "controle" foram misturadas com metanol (3:4 de volume), e clorofórmio (3:8 de volume da incubação original) num passo posterior, para evitar a formação de grumos. As amostras resultantes do processo de extração foram então submetidas ao método de separação por Cromatografia de Camada Delgada (CCD).

Uma camada bem fina de sílica gel é o mais comum adsorvente usado em CCD; deve conter sulfato de cálcio como um ligante, para proporcionar uma melhor aderência da camada à placa de vidro. Com auxílio de uma seringa aplicam-se as amostras, em pequenos pontos alinhados e separados uns dos outros por espaços de aproximadamente 0,5cm, numa das extremidades da placa. Esta é, então, depositada verticalmente, com a base contendo as amostras, num tanque com solvente eluente bastante para cobrir a placa ligeiramente abaixo da altura da linha de aplicação das amostras. O solvente move-se em direção ao topo da placa por capilaridade carreando os componentes da amostra em velocidades diferentes, de acordo com o grau de retenção pelo adsorvente. Quando o solvente se aproxima do topo da placa, esta deve ser removida do tanque e posta para secar, após o que são reveladas com ácido sulfúrico em chapa quente. Foi feita uma curva-padrão com ácido cis-9-Octadecanóico nas mesmas condições das amostras para se estimar o grau de retenção dos géis.

## RESULTADOS

### INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR OXIDANTES DE NAD(P)H MITOCONDRIAIS

A Fig. 1A mostra o padrão de inchamento mitocondrial induzido por oxidantes dos nucleotídeos de piridina mitocondriais. A diamida é referida na literatura como um oxidante de grupos -SH vicinais de cadeias polipeptídicas de membrana (KURANTSIN-MILLS & LESSIN, 1981). Contudo, a diamida, a exemplo do t-butil hidroperóxido e o acetoacetato, também oxida NAD(P)H, conforme mostra o grau de fluorescência emitido pelos nucleotídeos de piridina em presença dos oxidantes (Fig. 1B). t-butil Hidroperóxido oxida NAD(P)H através do sistema glutathione peroxidase-glutathione reductase (Figura 13), enquanto o acetoacetato, através da  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase.

A Fig. 1A mostra que mitocôndrias não energizadas, incubadas em presença de fosfato, sofrem inchamento induzido pelos oxidantes de NAD(P)H, t-but.00H (traçado b), diamida (traçado c) e AcAc (traçado d), se for adicionado cálcio logo após a adição do oxidante. Se tiver EGTA presente no meio ( $[Ca^{2+}] < 10^{-8}M$ ) as organelas não incham (traçado a).

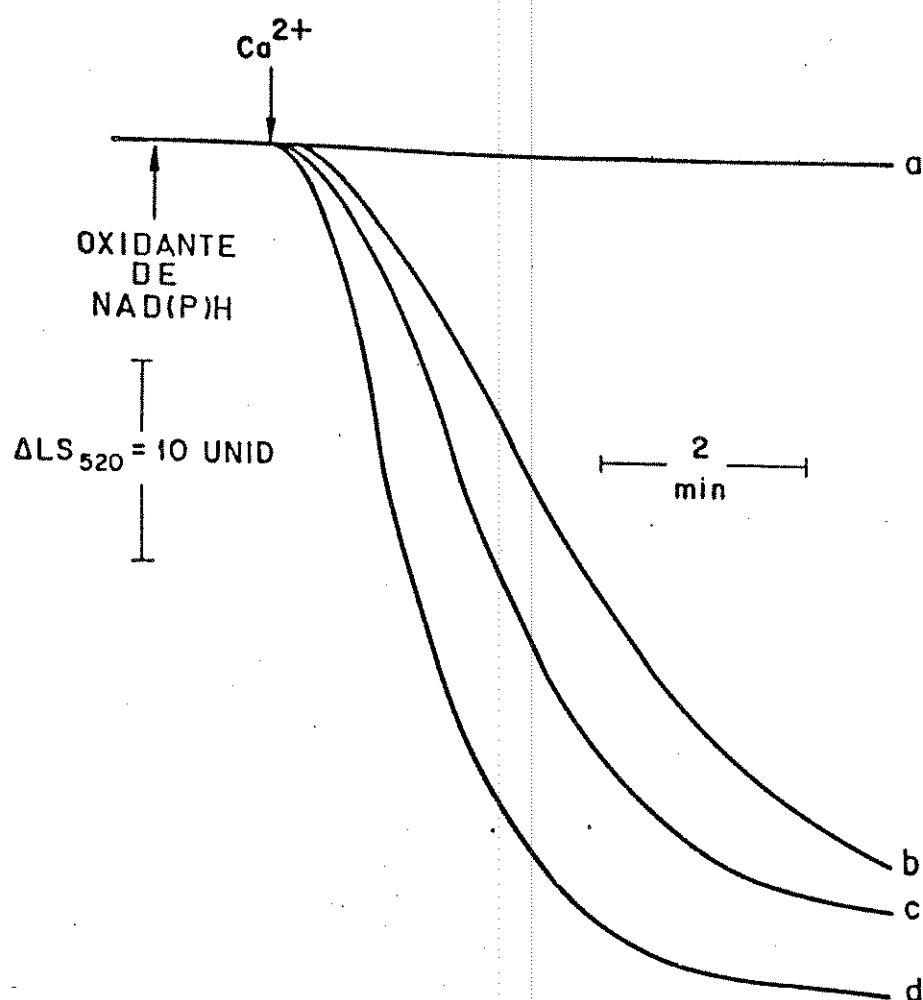
### INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR DIAMIDA EM DIFERENTES SUPORTES OSMÓTICOS

Existem evidências de que a oxidação de grupos sulfidri-  
las podem aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial

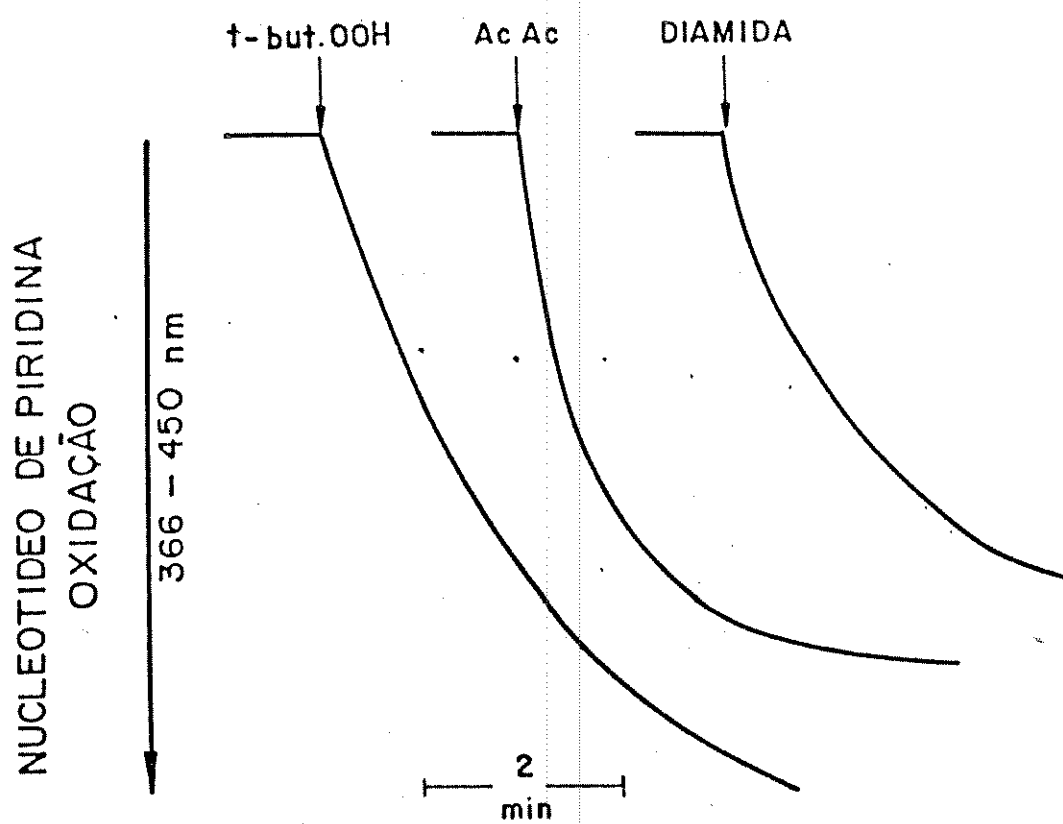
FIGURA 1 - Efeito de t-butil hidroperóxido, acetoacetato e diamida sobre o inchamento e oxidação de NAD(P)H em mitocôndrias de fígado de rato.

0,5mg de proteína mitocondrial foram incubadas em 1,0ml de meio de sacarose (30°C) - "Materiais e Métodos" - item III (2) em presença de fosfato 2,0mM. Experimentos-controle foram feitos com as mesmas concentrações dos respectivos oxidantes de NAD(P)H em presença de EGTA 0,5mM. Painel A, a) controle.  $\text{Ca}^{2+}$  250µM e oxidantes de NAD(P)H adicionados onde indicado em b) t-but.OOH 30µM, c) diamida 0,3mM e d) AcAc 0,5mM. Painel B, fluorimetria de NAD(P)H acompanhada a 366-450nm. As concentrações dos oxidantes de NAD(P)H foram as mesmas do painel A.

(A)



(B)



interna (VERCESI, 1984b; LÊ-QUÔC & LÊ-QUÔC, 1985). Tais evidências são ainda reforçadas por experimentos mostrando que diamida causa hemólise devido à formação de agregados proteicos ("cross-linking proteins") na membrana de eritrócitos (KOSOWER et alii, 1982). A agregação das unidades proteicas na matriz lipídica da membrana do eritrócito, sob efeito da diamida, deve-se a ligações entre grupos sulfidrilas de cadeias polipeptídicas vizinhas que foram oxidados pela diamida (KURANTSIN-MILLS & LESSIN, 1981). Com apoio dessas observações traçamos os experimentos da Fig. 2 que mostram o efeito da diamida sobre a velocidade e a extensão do inchamento de mitocôndrias incubadas em meio contendo KCl 130mM na presença de cálcio 250 $\mu$ M e fosfato 2,0mM. O traçado "a" indica que a presença do oxidante não induz inchamento se o meio contiver EGTA 0,5mM ( $[Ca^{2+}] < 10^{-8}M$ ), ao passo que, a presença de cálcio (traçado b) induz um inchamento de pequena amplitude. Acrescentando-se, então, diamida ao meio contendo cálcio (traçado c), observa-se um inchamento rápido e extenso.

A Fig. 2B mostra resultados semelhantes aos da Fig. 2A na condição em que as mitocôndrias foram suspensas em meio contendo manitol e sacarose, e em ambos os casos a osmolaridade final do meio era de 270 mOsm. Nestas condições o inchamento também é extenso, mas a velocidade é retardada, sugerindo que a velocidade com que o soluto penetra a matriz mitocondrial, devido à permeabilização da membrana, é mais lenta para manitol e sacarose.

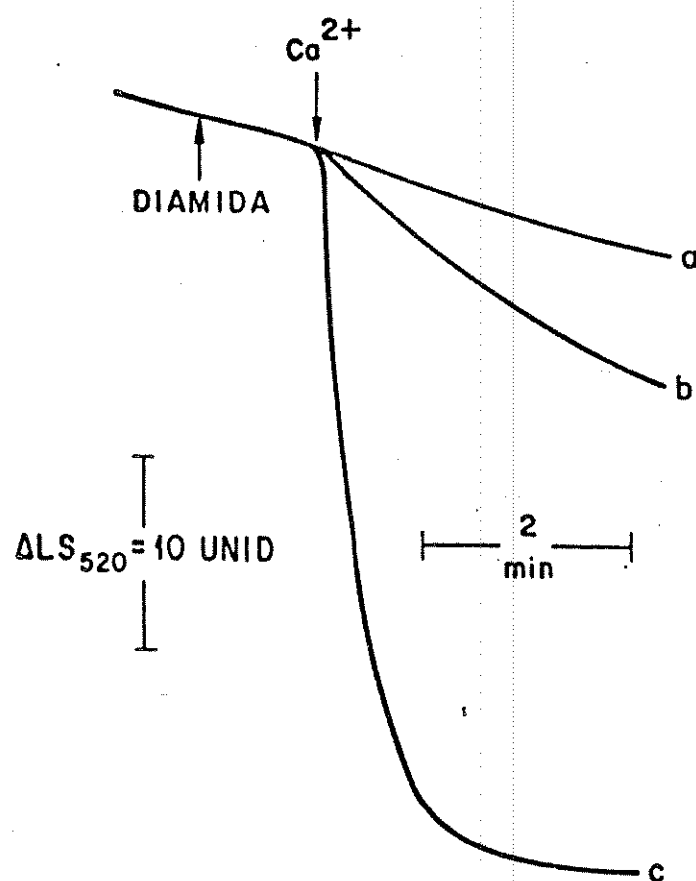
#### EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO E FOSFATO SOBRE A VELOCIDADE E EXTENSÃO DO INCHAMENTO MITOCONDRIAL

Os experimentos da Fig. 3 foram planejados para se verificar a extensão do efeito de agentes indutores de inchamento em condições passivas. A Fig. 3A mostra o efeito da concentração de cálcio, a uma concentração constante de

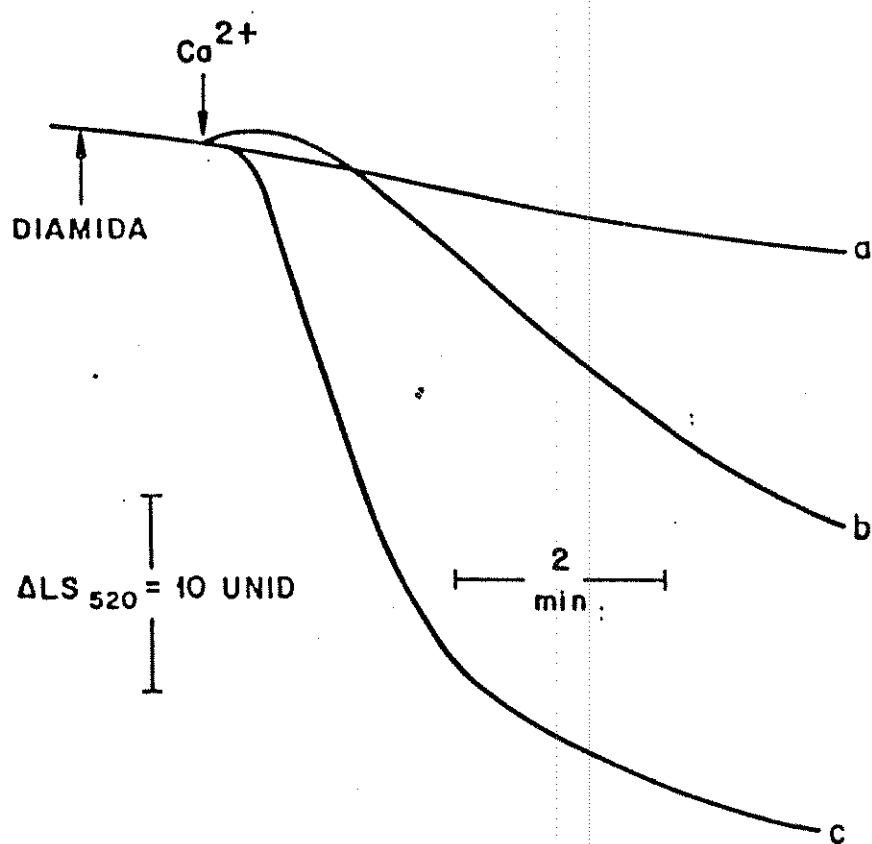
FIGURA 2 - Influência da composição osmótica do meio de reação sobre o inchamento de mitocôndrias de fígado de rato.

0,5 mg de proteína mitocondrial foram incubadas em 1,0ml de (A) meio de KCl (30°C) e (B) meio de sacarose (30 °C) - "Materiais e Métodos" - item III (1) e (2) respectivamente, em presença de fosfato 2,0mM (osmolaridade resultante de 270mOsm). Experimentos-controle foram feitos sem cálcio adicionado e com diamida 0,3mM + EGTA 0,5mM. a) controle, b)  $\text{Ca}^{2+}$  250 $\mu\text{M}$  e c)  $\text{Ca}^{2+}$  250 $\mu\text{M}$  + diamida 0,3mM.

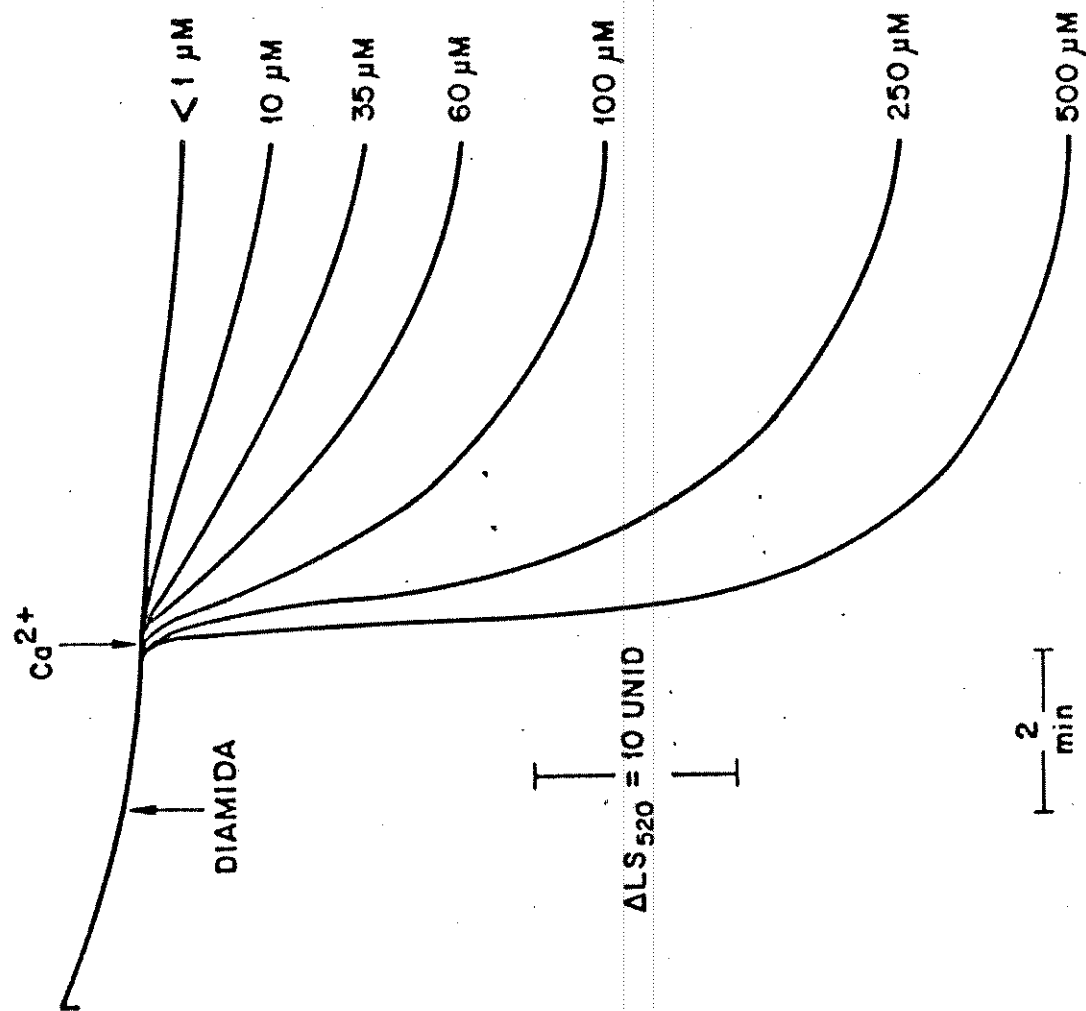
(A)



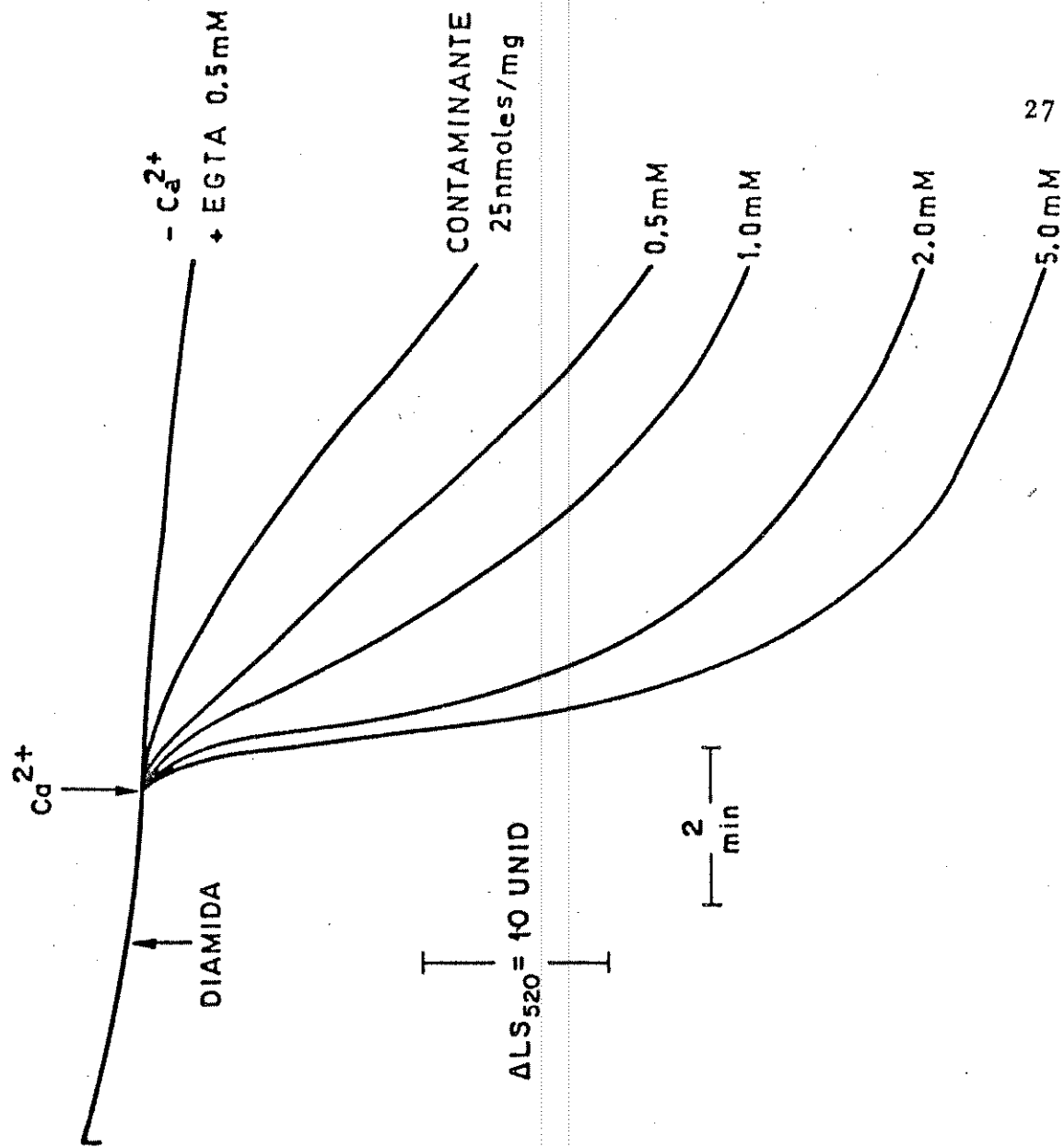
(B)



(A)



(B)



fosfato, sobre a velocidade e a extensão do inchamento mitocondrial induzido por diamida. Na Fig. 3B a concentração de cálcio foi mantida constante e variou-se a de fosfato. Pode ser observado pela figura que o aumento na concentração de cálcio estimula a velocidade e a extensão do inchamento, enquanto o aumento na concentração de fosfato aumenta predominantemente a velocidade do inchamento.

#### EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR CÁLCIO E DIAMIDA

A Fig. 4A mostra o inchamento de mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas e na presença de cálcio, fosfato e diamida. A uma temperatura de  $17,5^{\circ}\text{C}$  as organelas não incham (traçado a), porém, sofrem inchamento rápido e de grande extensão quando incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  (traçado d). A  $25^{\circ}\text{C}$  (traçado b) ocorre um inchamento lento e de pequena extensão, mas a  $30^{\circ}\text{C}$  a velocidade e a extensão do inchamento já são consideráveis.

Na Fig. 4B está destacado um ponto de transição que ocorre no desenvolvimento da permeabilização da membrana mitocondrial interna dependente da temperatura. O ponto de transição se encontra entre  $25^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$ , em torno de  $26^{\circ}\text{C}$ .

#### DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DA MEMBRANA NAS CONDIÇÕES CONTROLE E APÓS O INCHAMENTO MITOCONDRIAL DEPENDENTE DE CÁLCIO E DIAMIDA

Há várias formas de se observar o grau de integridade e/ou permeabilização da membrana mitocondrial interna de preparações de mitocôndrias "in vitro" como, por exemplo, o controle respiratório (acoplamento), o inchamento e o potencial de membrana. Assim, alguns autores sugerem que o desaco-

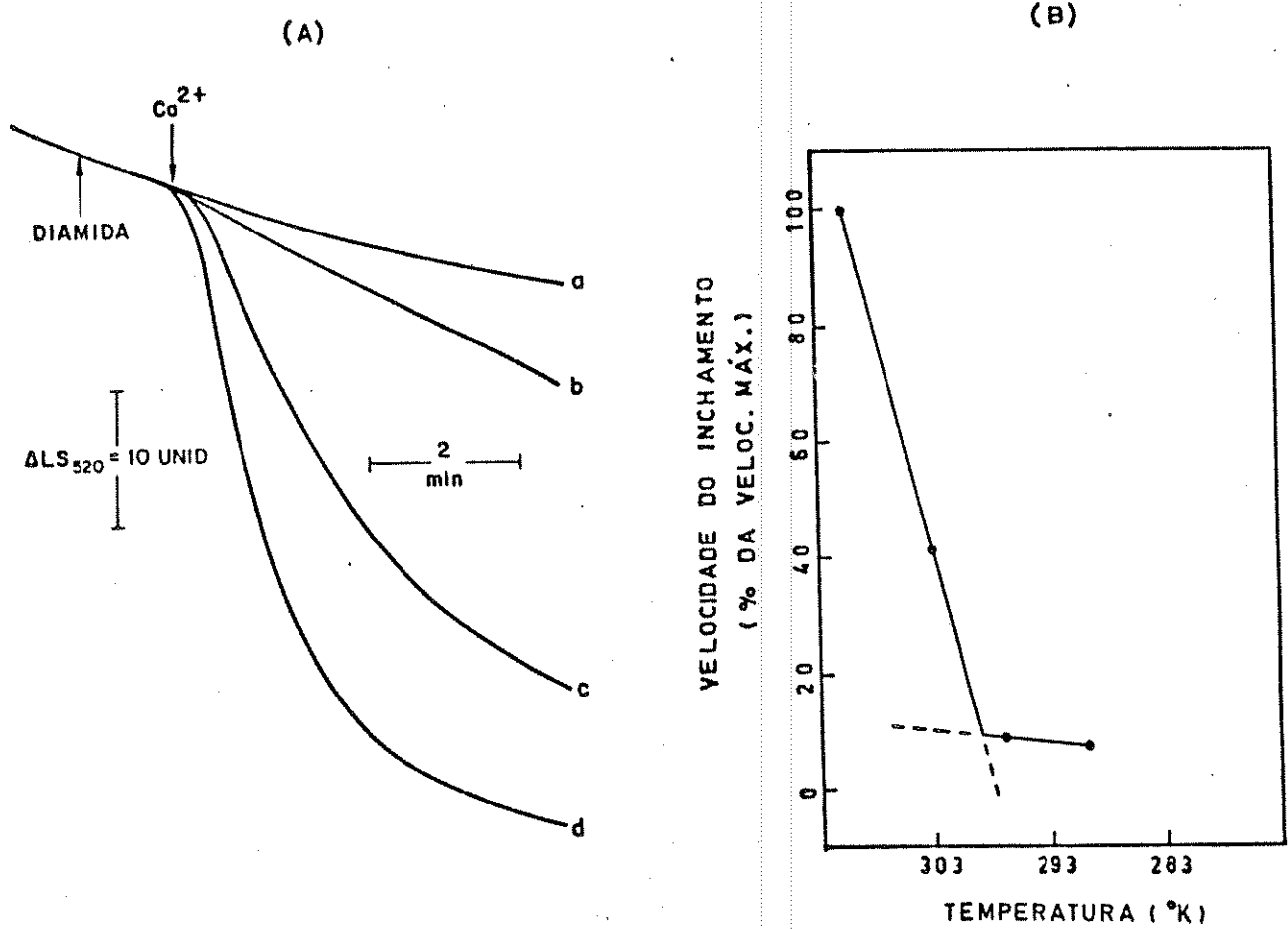


FIGURA 4 - Efeito da temperatura sobre o inchamento passivo em mitocôndrias de fígado de rato.

As condições experimentais foram idênticas às da Fig. 2A. Todos os experimentos continham diamida 0,3mM e  $\text{Ca}^{2+}$  250 $\mu\text{M}$ . Paine'l A, a) 17,5 $^{\circ}\text{C}$ , b) 25 $^{\circ}\text{C}$ , c) 30 $^{\circ}\text{C}$  e d) 37  $^{\circ}\text{C}$ . Paine'l B, porcentagens relativas à velocidade máxima do inchamento, nas temperaturas absolutas correspondentes, do painel A.

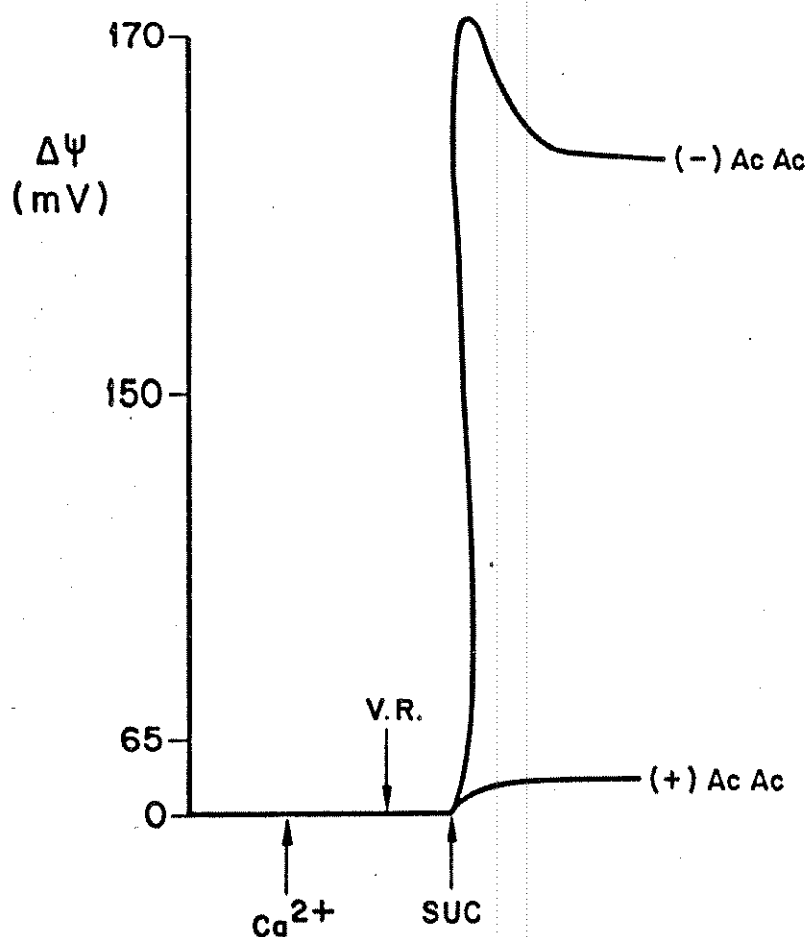


FIGURA 5 - Determinação do potencial de membrana em mitocôndrias de fígado de rato.

Mitocôndrias (0,5mg de proteína) foram incubadas em meio de sacarose (30°C) - "Materiais e Métodos" - item III (2) em presença ou ausência de acetoacetato 0,5mM, acrescido de  $\text{TPP}^+$  30 $\mu\text{M}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  250 $\mu\text{M}$  e vermelho de rutênio (VR) 0,83 $\mu\text{M}$  foram adicionados onde indicado pelas respectivas setas, e a reação iniciada com succinato (suc) 2,0mM. O potencial foi medido com eletrodo específico e determinado conforme descrito em "Materiais e Métodos" - item V.

plamento e a dissipação do potencial de membrana sejam parâmetros indicativos de permeabilização da membrana mitocondrial interna (HUNTER et alii, 1976; AL-NASSER & CROMPTON, 1986).

Na Fig. 5 investigamos a capacidade de mitocôndrias formarem potencial de membrana quando submetidas ao inchamento induzido pelo oxidante de nucleotídeos de piridina - acetoacetato. Esta figura mostra que mitocôndrias de fígado de rato incubadas em meio contendo substrato respiratório e vermelho de rutênio para impedir a captação eletroforética de cálcio, são capazes de formar potencial de membrana em torno de 170mV. Todavia, quando a pré-incubação é feita na presença de cálcio e acetoacetato, a capacidade de formar potencial é eliminada.

#### INIBIÇÃO DO INCHAMENTO MITOCONDRIAL POR DIBUCAÍNA E $\text{ATP} + \text{Mg}^{2+}$

Os experimentos da Fig. 6 mostram o inchamento mitocondrial de uma suspensão de mitocôndrias de fígado de rato incubadas num meio contendo 250  $\mu\text{M}$  de cálcio. O traçado "a" da Fig. 6 mostra que nenhum inchamento ocorre quando NAD(P)H mitocondrial são oxidados por diamida, se EGTA estiver presente no meio. O traçado "b" ilustra a ocorrência de um inchamento rápido e extenso quando os nucleotídeos de piridina foram oxidados por diamida antes da adição de cálcio. A presença de ATP e  $\text{Mg}^{2+}$  (traçado c) ou dibucaína (traçado d), diminui significativamente a velocidade do inchamento observado no traçado "b".

#### EFEITO DE VERMELHO DE RUTÊNIO SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL

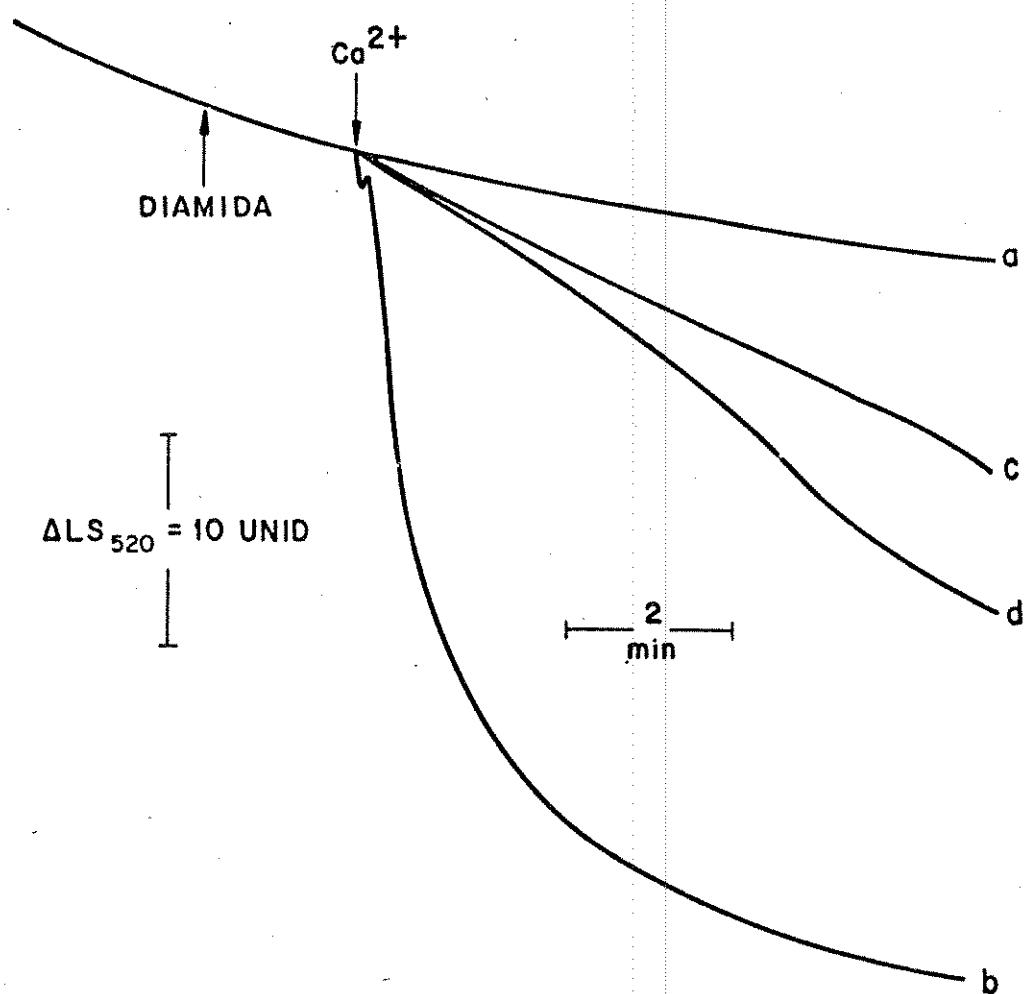


FIGURA 6 - Efeito de ATP+Mg<sup>2+</sup> e dibucaína sobre o inchamento em mitocôndrias de fígado de rato.

Mitocôndrias foram incubadas nas mesmas condições da Fig. 2A. Todos os experimentos continham diamida 0,3mM e Ca<sup>2+</sup> 250μM (exceto no controle). a) controle com EGTA 0,5mM, b) sem outras adições, c) ATP 3,0mM + MgCl<sub>2</sub> 4,0mM e d) dibucaína 0,2mM.

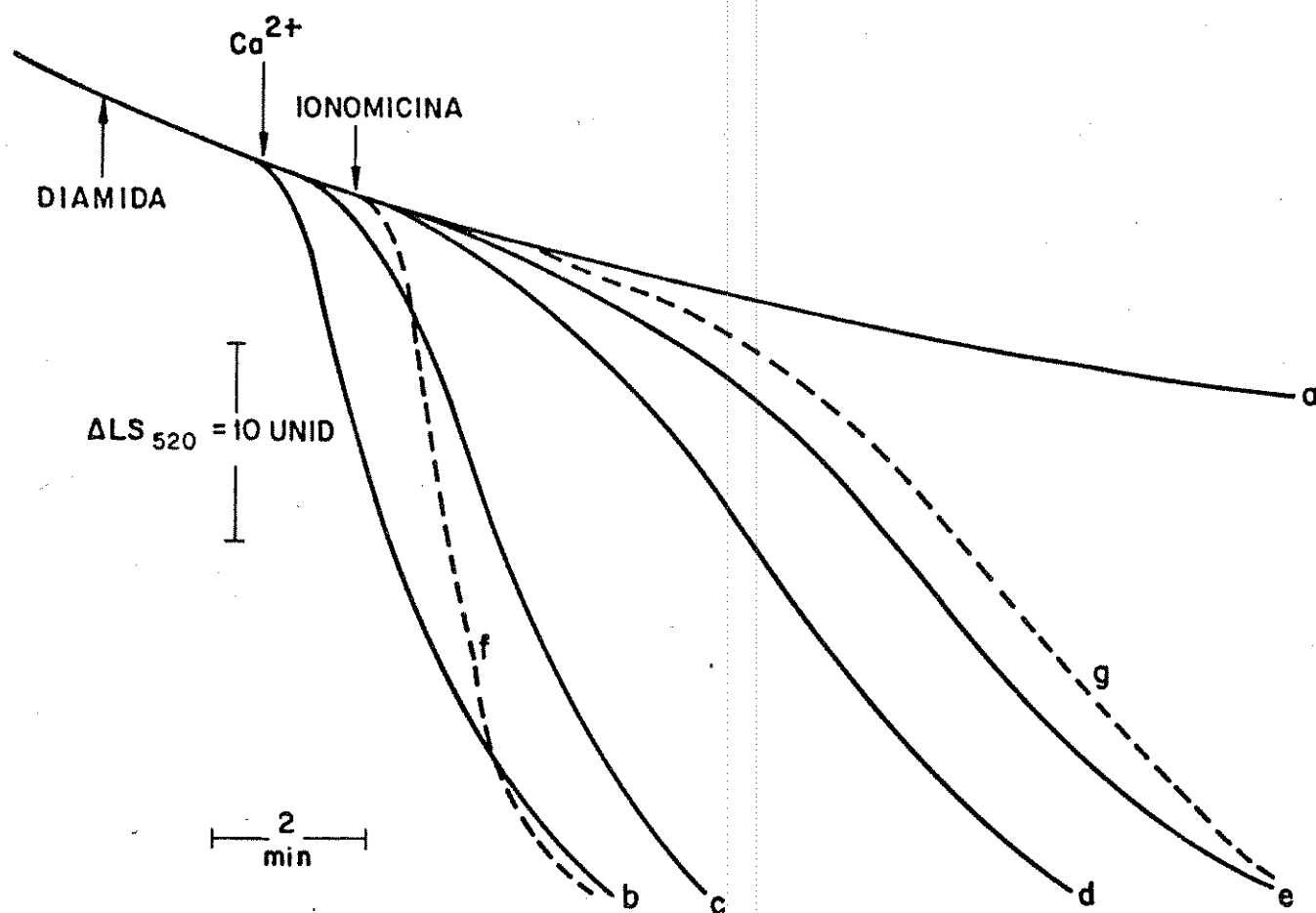


FIGURA 7 - Efeito de vermelho de rutênio sobre o inchamento em mitocôndrias de fígado de rato.

Mitocôndrias foram incubadas nas mesmas condições da Fig. 2A. Todos os experimentos continham diamida 0,3mM (exceto o do traçado g) e  $Ca^{2+}$  500 $\mu$ M (exceto no controle). a) controle com EGTA 0,5mM, b) sem outras adições. Nas condições do traçado "b" foi acrescentado vermelho de rutênio nas seguintes concentrações: c) 1nmol/mg, d) 2,5nmoles/mg e e) 6,0 nmoles/mg; f) vermelho de rutênio 6,0nmoles /mg + ionomina 0,2 $\mu$ g/mg; g) ionomina 0,2 $\mu$ g/mg.

Os experimentos da Fig. 7 foram planejados para esclarecer se o inchamento mitocondrial observado em nossos experimentos foi induzido pelo cálcio dentro ou fora da matriz. Embora as mitocôndrias estivessem completamente desenergizadas, a entrada de cálcio na matriz poderia ser conduzida pela diferença de atividade do cátion entre o meio e a matriz. Pode ser visto na Fig. 7 que concentrações crescentes de vermelho de rutênio (que inibe a captação do cálcio mediada pelo carreador) diminui progressivamente a velocidade do inchamento mitocondrial (traçados "c", "d" e "e"). Contudo, a adição do ionóforo de cálcio - ionomicina (linha pontilhada - traçado f) aboliu completamente a inibição causada por vermelho de rutênio 6 $\mu$ M, indicando que o efeito do cálcio sobre a permeabilização da membrana é mediado por sítios internos de ligação do íon. O traçado "g" (linha pontilhada) indica que na ausência de diamida, a ionomicina é capaz de induzir inchamento mitocondrial após um intervalo de tempo de aproximadamente 8 minutos.

#### CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE $\text{Ca}^{2+}$ E DIBUCAÍNA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL

Durante nossos estudos observamos que o grau de inibição do inchamento mitocondrial causado por dibucaína, como mostra o traçado "d" da Fig. 6, variava em diferentes protocolos, possivelmente, como uma função da concentração de cálcio empregada. A fim de avaliar essas relações, foram planejados experimentos para se estudar as velocidades do inchamento na presença de uma concentração constante de dibucaína em diferentes concentrações de cálcio (Fig. 8A). Pode ser visto que a inibição causada pela droga diminui progressivamente em concentrações crescentes de cálcio. Um antagonismo similar entre a concentração de dibucaína e cálcio pode ser observado na Fig. 8B, onde o efeito da concentração de dibucaína foi

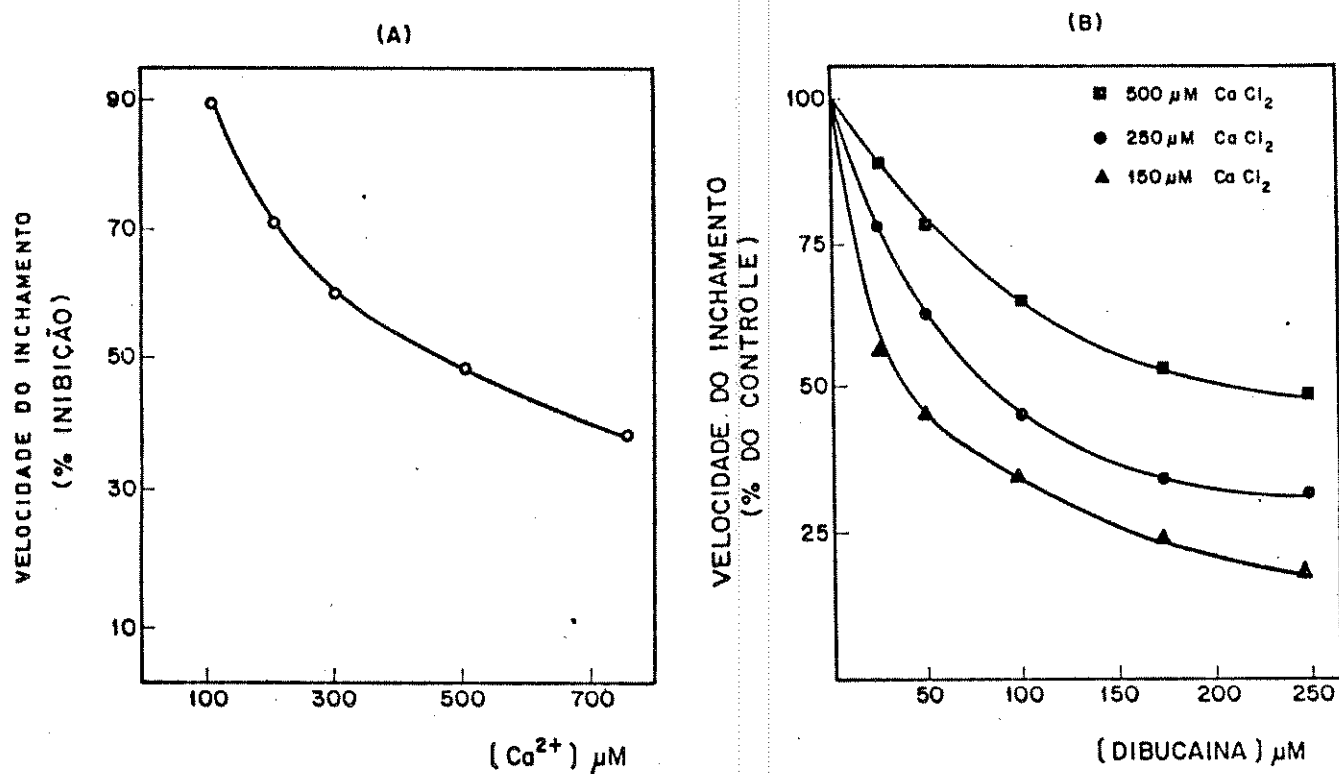


FIGURA 8 - Efeito da concentração de cálcio na inibição causada por dibucaína sobre o inchamento de mitocôndrias de fígado de rato.

Painel A, as condições experimentais são as mesmas da Fig. 6 traçado "d" nas quais se variou a concentração de Ca<sup>2+</sup> no intervalo 100-700μM com a concentração de dibucaína fixa em 0,2mM. Painel B, as condições experimentais foram as mesmas da Fig. 6 traçado "d" onde se variou a concentração de dibucaína no intervalo de 50-250μM em concentrações fixas de Ca<sup>2+</sup> 150, 250 e 500μM.

estudado em concentrações constantes de cálcio.

#### DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM MITOCÔNDRIAS PRÉ-INCUBADAS NA PRESENÇA DE CÁLCIO E ACETOACETATO

Alguns autores têm insistido em que a permeabilidade não específica da membrana mitocondrial interna sob efeito dos agentes liberadores de cálcio (neste trabalho, os oxidantes de nucleotídeos de piridina e fosfato), é devida à perturbação no ciclo de deacilação-reacilação (veja esquema I) dos fosfolipídeos da membrana com ácidos graxos livres resultantes do processo (RILEY & PFEIFFER, 1985). A fotografia da Fig. 9A mostra o resultado da cromatografia de camada delgada, do extrato mitocondrial, nas condições do inchamento passivo em meio de sacarose e KCl. Tanto na situação "controle" (sem acetoacetato) como na "amostra" (com acetoacetato) não foi detectada a presença de ácidos graxos livres nas alíquotas analisadas.

#### CARACTERÍSTICAS DO INCHAMENTO EM MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO DE RATO

Embora haja evidências consideráveis de que a permeabilização da membrana mitocondrial interna induzida por cálcio esteja associada com uma perturbação do ciclo de deacilação-reacilação de fosfolipídeos, estimulada pelos agentes liberadores de cálcio, há registros que indicam que este parece não ser o caso pelo menos da permeabilização causada por fosfato e oxidantes de NAD(P)H (CROMPTON et alii, 1987; MACEDO et alii, 1988).

Na Fig. 10A demonstramos que mitocôndrias de cérebro de rato, cuja atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> é muito inferior à de mitocôndrias de fígado (FISKUM et alii, 1985), também sofrem

FIGURA 3 - Curva dose-resposta dos íons cálcio e fosfato sobre o inchamento em mitocôndrias de fígado de rato.

0,5mg de proteína mitocondrial foram incubadas em 1,0ml de (A) meio de KCl (30 °C) em presença de fosfato 2,0mM, diamida 0,3mM e as concentrações de cálcio indicadas ao lado de cada traçado, e (B) meio de manitol (30°C) em presença de diamida 0,3mM,  $\text{Ca}^{2+}$  250µM e as concentrações de fosfato indicadas ao lado de cada traçado. Meios de reação conforme "Materiais e Métodos" - item III (1) e (3) respectivamente.

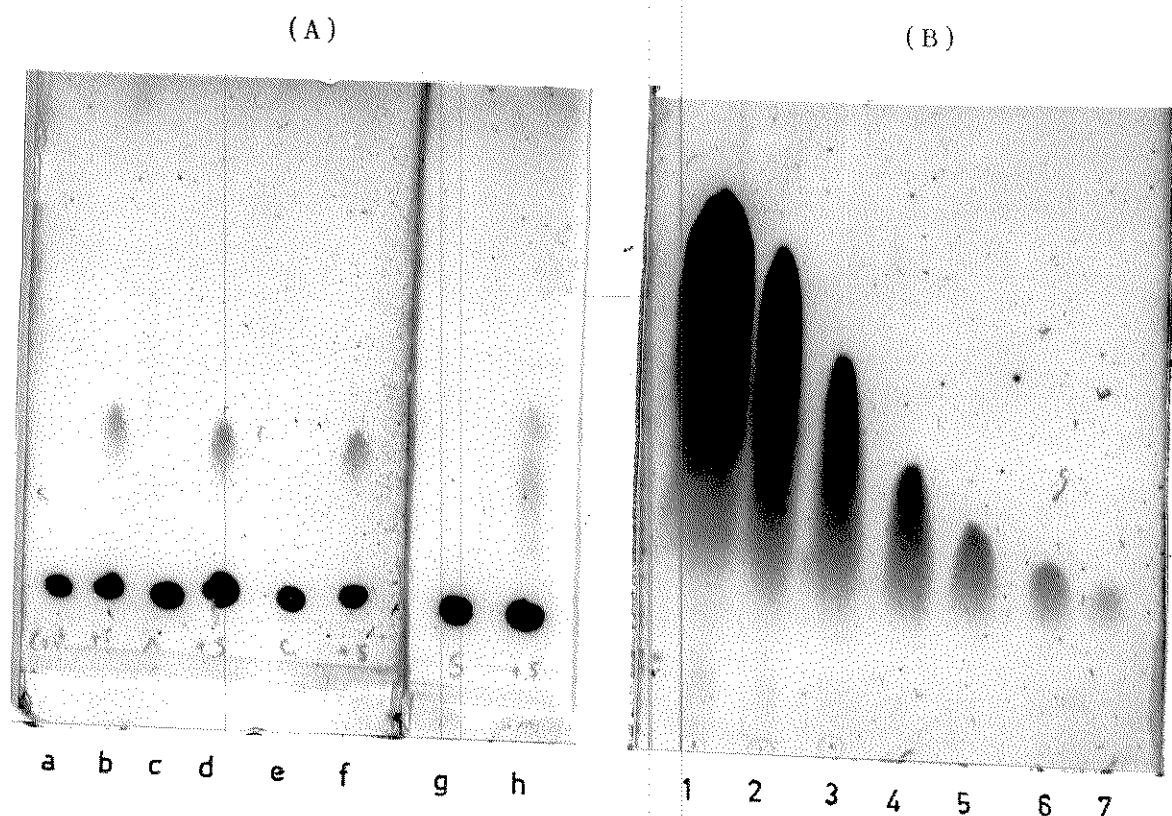


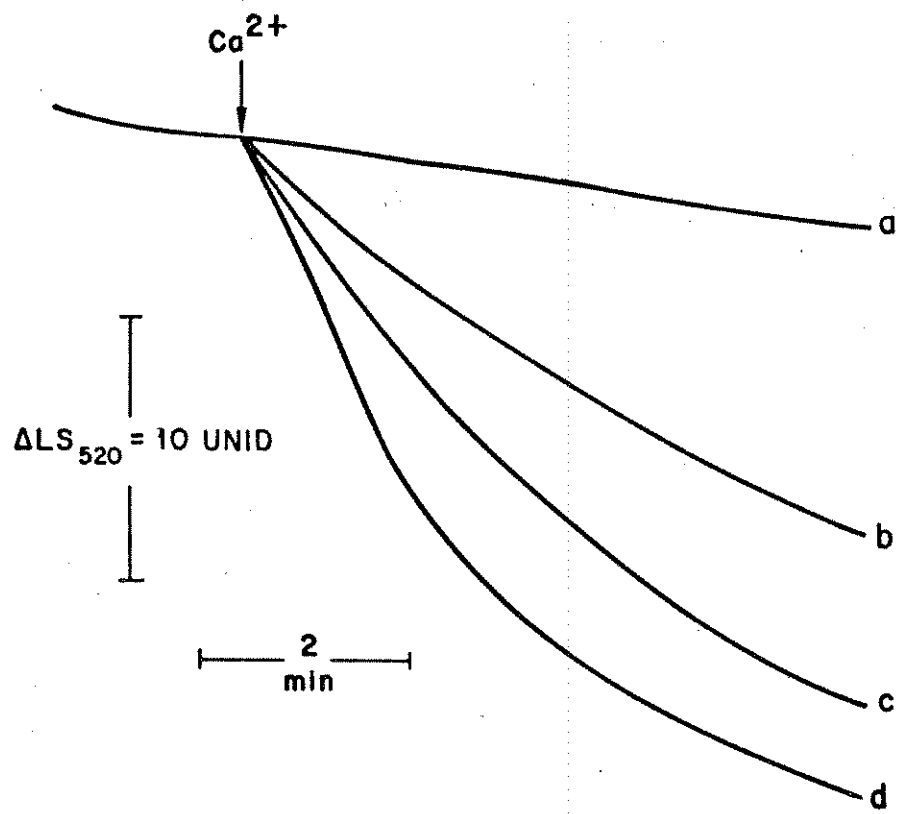
FIGURA 9 - Determinação de ácidos graxos livres em camada fina de sílica gel de suspensões mitocôndrias de fígado de rato.

3mg/ml de proteína mitocondrial foram incubadas em meio de sacarose (30°C) - "Materiais e Métodos" - item III (2) em presença de fosfato 2,0mM. Após 3min de incubação na presença ("amostra") ou ausência ("controle") de  $\text{Ca}^{2+}$  250 $\mu\text{M}$  + AcAc 0,5mM a suspensão mitocondrial foi tratada para análise do conteúdo de ácidos graxos livres totais conforme "Material e Métodos" - item VI. Fotografia A, a) sedimento - "controle", b) idem "a", c) sedimento - "amostra", d) idem "c", e) sobrenadante - "controle", f) idem "e", g) sobrenadante - "amostra", h) idem "g". 0,006nmoles do padrão (ácido oleico) foram adicionados às alíquotas b, d, f e h. Fotografia B, alíquotas do padrão (ácido cis-9-octadecanóico - oleico) submetidas ao procedimento para extração de ácidos graxos - "Materiais e Métodos" - item VI, nas quantidades conhecidas: 1) 0,13, 2) 0,04, 3) 0,013, 4) 0,004, 5) 0,0013, 6) 0,0004 e 7) 0,00013 nmoles.

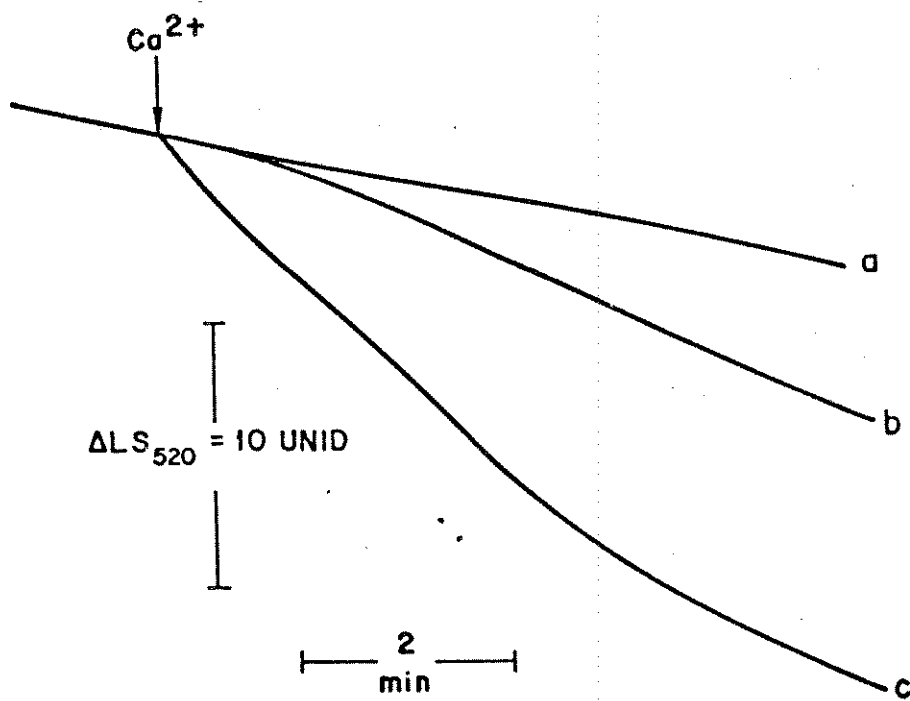
FIGURA 10 - Sensibilidade de mitocôndrias de cérebro de rato aos efeitos deletérios do cálcio em presença de fosfato e protetor de ATP+Mg<sup>2+</sup> e dibucaína.

0,5mg de proteína mitocondrial foram incubadas em 2,0ml de meio de KCl (30°C) - "Materiais e Métodos" - item III (1) em presença de fosfato 2,0mM. Experimentos-controle foram feitos sem cálcio adicionado e com EGTA 0,5mM. Painei A, a) controle, b) Ca<sup>2+</sup> 100µM, c) Ca<sup>2+</sup> 250µM e d) Ca<sup>2+</sup> 500µM. Painei B, condições experimentais idênticas às do painei A traçado "b" com as seguintes adições: a) ATP 3,0mM e MgCl<sub>2</sub> 4,0mM, b) dibucaína 100µM e c) sem outras adições.

(A)



(B)



inchamento quando incubadas na presença de cálcio e fosfato. A Fig. 10B mostra que na condição de cálcio 100 $\mu$ M da Fig. 10A o inibidor da fosfolipase dibucaína tem seu efeito pronunciado com cerca de 50% de inibição sobre o inchamento. Na mesma condição, ainda, ATP e  $Mg^{2+}$  inibem aproximadamente 100% o inchamento, e, comparando-se com a Fig. 6, o efeito protetor sobre a integridade da membrana é ainda mais acentuado que em mitocôndrias hepáticas.

#### EFEITO DO FOSFATO SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO DE RATO

A Fig. 11 mostra o efeito da concentração de fosfato a uma concentração constante de cálcio sobre o inchamento de mitocôndrias de cérebro de rato na ausência de diamida. Tais mitocôndrias incubadas em meio de manitol e sacarose contendo cálcio 250 $\mu$ M não incham se não houver fosfato no meio (traçado a). Nestas condições a adição de concentrações crescentes de fosfato induz estímulo na velocidade e extensão do inchamento dentro da faixa 0,1 a 5,0mM. O aumento do espalhamento de luz observado após a adição de cálcio é de origem desconhecida.

#### COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE DIAMIDA E FOSFATO SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO

O experimento da Fig. 12 permite uma comparação dos efeitos de diamida e fosfato sobre a velocidade e extensão do inchamento de mitocôndrias de cérebro desenergizadas, na presença de cálcio 500 $\mu$ M. Pode ser observado que as adições isoladas de 0,3mM de diamida ou 0,25mM de fosfato (traçados "b" e "c" respectivamente), induzem inchamento de pequena amplitude e velocidade. O traçado "d" mostra que a associação

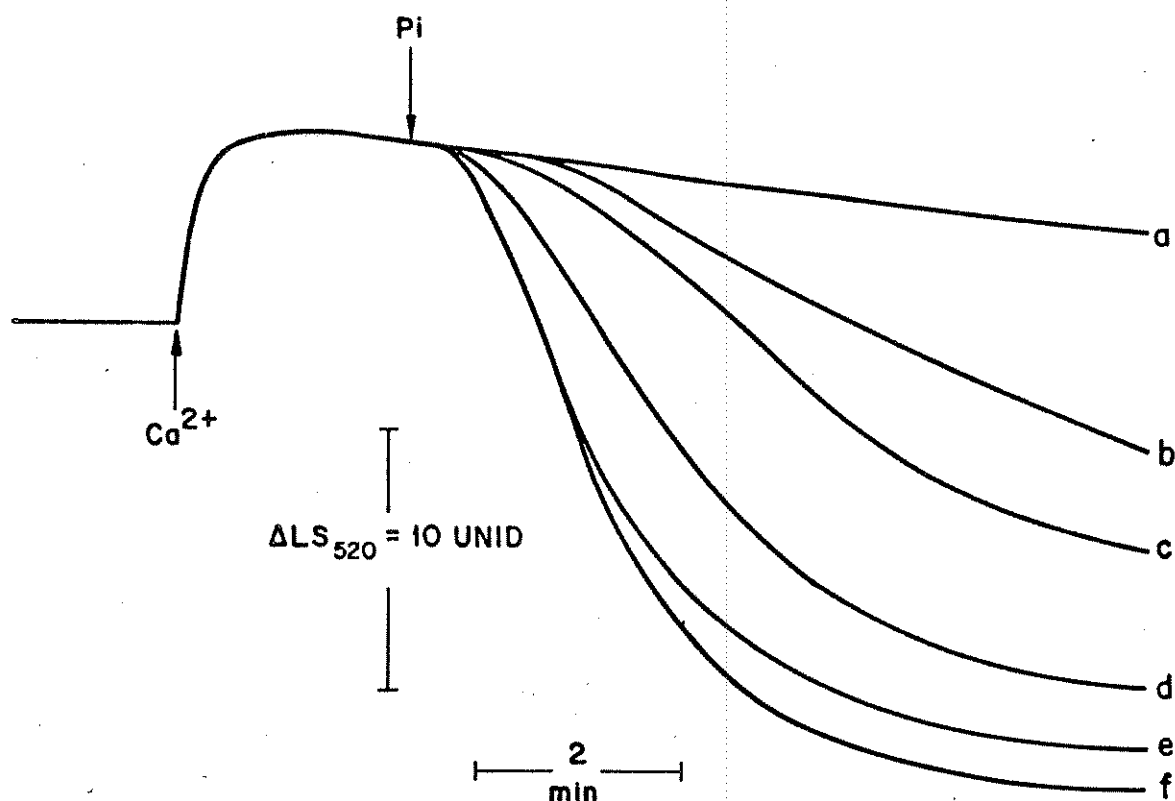


FIGURA 11 - Efeito do fosfato sobre o inchamento de mitocôndrias de cérebro de rato.

0,5mg de proteína mitocondrial foram incubadas em 2,0ml de meio de manitol (30°C) - "Materiais e Métodos" - item III (3) em presença de BSA 0,5%. Todos os experimentos continham  $\text{Ca}^{2+}$  250 $\mu\text{M}$ . Fosfato foi adicionado 2,5 min após a adição de cálcio nas seguintes concentrações finais: a) zero, b) 0,1, c) 0,25, d) 1,0 e) 3,0 e f) 5,0mM.

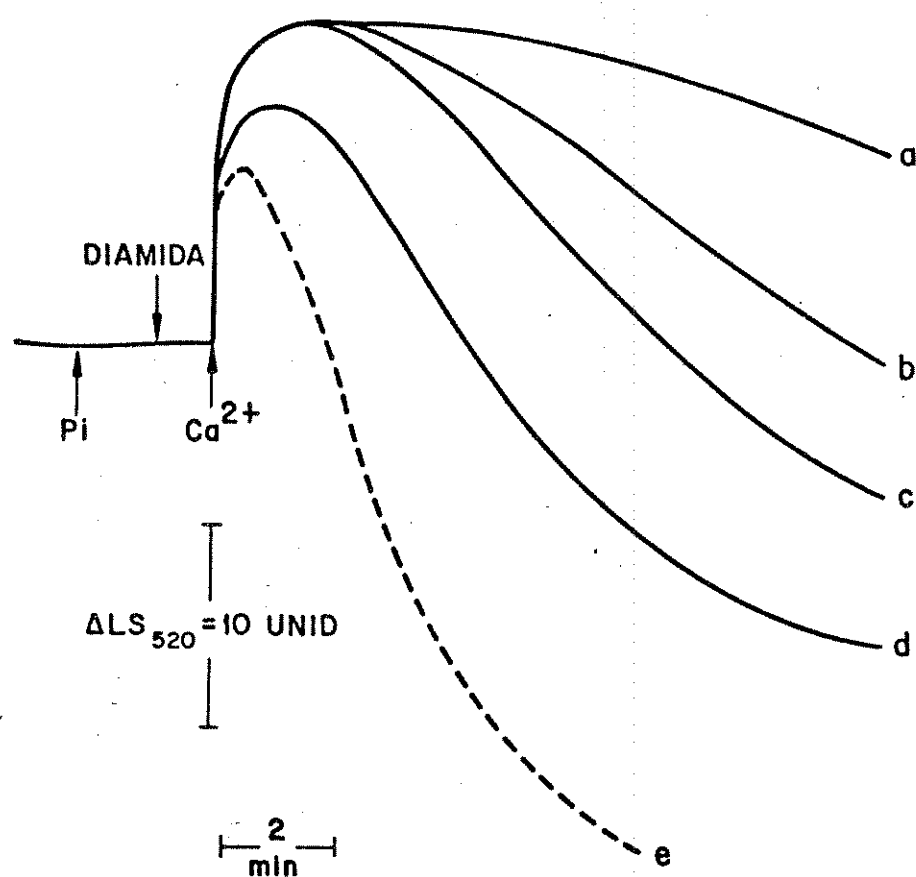


FIGURA 12 - Sensibilidade de mitocôndrias de cérebro de rato aos efeitos isolados de fosfato e diamida sobre o inchamento mitocondrial.

0,5mg de proteína mitocondrial foram incubadas em 2,0ml de meio de manitol ( $30^{\circ}\text{C}$ ) - "Materiais e Métodos" - ítem III (3). Cada experimento continha 500 $\mu\text{M}$  de cálcio e mais: a) sem mais adições, b) diamida 0,3mM, c) fosfato 0,25mM, d) diamida 0,3mM e fosfato 0,25mM, e) fosfato 2,5mM.

dos dois reagentes tem efeito somatório tanto na extensão quanto na velocidade do inchamento. Pode ainda ser observado que a adição de 2,5mM de fosfato, na ausência de diamida, induz inchamento de grande amplitude e velocidade (traçado e), demonstrando que mitocôndrias de cérebro são mais sensíveis ao fosfato que mitocôndrias hepáticas.

## DISCUSSÃO

A evolução dos estudos sobre a relação das mitocôndrias com a homeostase do cálcio intracelular começou com a idéia de uma função armazenadora do cátion, porque mitocôndrias energizadas podiam acumular grandes quantidades do íon (CHAPPELL & CROFTS, 1965). Posteriormente, a impressão era de uma estrutura com função reguladora das concentrações do cálcio citosólico, por causa de sua capacidade em tamponar a concentração de cálcio livre externo nos ensaios com organelas isoladas (NICHOLLS, 1978; BECKER et alii, 1980). Mais recentemente têm sido atribuídos ao sistema de transporte de cálcio mitocondrial um papel de regulação do íon na matriz nas condições fisiológicas (McCORMACK & DENTON, 1986), e um papel na regulação do cálcio citoplasmático em situações patológicas, quando as concentrações do cátion estariam extremamente aumentadas (NICHOLLS, 1986). Esta última função deve ser considerada vital para a célula como um mecanismo de defesa, graças à grande capacidade das mitocôndrias em acumular cálcio quando isoladas e incubadas em meio com concentrações fisiológicas de ATP,  $Mg^{2+}$  e fosfato, sugerindo que "in vivo" possam prevenir que concentrações citosólicas de cálcio subam a níveis tóxicos e ativem enzimas degradativas (NICHOLLS, 1986).

Muitos autores já reportaram que mitocôndrias isoladas sofrem perda de sua função e integridade estrutural quando carregadas com grandes quantidades de cálcio, na presença de alguns fatores geralmente referidos como agentes liberadores de cálcio, se  $Mg^{2+}$  e ATP forem omitidos do meio de incubação (NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982). A despeito de intensa investigação, não há consenso quanto à participação de alguns fatores neste mecanismo, tais como (a) energia respiratória, (b)

depleção de GSH mitocondrial, (c) movimento cíclico de cálcio através da membrana, (d) ativação da fosfolipase  $A_2$  intramitocondrial e acúmulo de ácidos graxos insaturados, (e) ativação de uma NADase e conseqüente hidrólise de nucleotídeos de piridina, (f) inchamento da matriz devido ao aumento da permeabilidade não específica da membrana a solutos, (g) abaixamento do potencial de membrana. Alguns desses pontos foram esclarecidos neste trabalho, com base em resultados obtidos com mitocôndrias desenergizadas e através da técnica clássica do inchamento mitocondrial para monitorar o influxo de suporte osmótico associado com aumento da permeabilidade não específica da membrana mitocondrial.

Um aspecto notável de nosso trabalho refere-se ao estudo de alterações na permeabilidade da membrana induzidas por cálcio, fosfato e oxidantes de NAD(P)H, com mitocôndrias desenergizadas e em presença de ionóforo de cálcio, condição sob a qual a concentração de cálcio pode ser equilibrada através da membrana. Além disso, a ausência do potencial de membrana e respiração podem eliminar o envolvimento de uma série de fatores no mecanismo que aumentaria bastante a complexidade na interpretação dos resultados obtidos. As condições acima demonstram ainda que não há necessidade de um movimento cíclico de cálcio através da membrana para que o mecanismo de permeabilização ocorra. Os resultados da Fig. 7, de experimentos com vermelho de rutênio, indicam fortemente que o cálcio precisa penetrar a matriz mitocondrial para causar seus efeitos deletérios sobre a membrana, e corroboram a não necessidade do movimento cíclico de cálcio no mecanismo.

A correlação entre a concentração de cálcio e a extensão do inchamento mitocondrial, observado na Fig. 3A, deve ser interpretada com base em observações anteriores de que preparações mitocondriais contêm subpopulações com diferentes sensibilidades ao cálcio (HUNTER et alii, 1976). Portanto, a maior conseqüência da entrada de cálcio em mitocôndrias é a indução de uma transição configuracional acompanhada pelo

aumento na extensão da queda no espalhamento de luz, o que indica que sucessivas subpopulações de mitocôndrias estão sofrendo inchamento a concentrações mais elevadas de cálcio. Esta transição induzida por cálcio não tem sido aceita como um mecanismo fisiologicamente importante, por causa da dificuldade em revertê-la (HACKENBROCK & CAPLAN, 1969), e da perda de funções mitocondriais críticas associadas com a transição (LEBLANC & CLAUSER, 1974).

Uma vez estabelecida a transição, a membrana mitocondrial pode ser restabelecida e tornar-se impermeável novamente, se for adicionado ATP ou substrato, acompanhado com alguns reagentes como EGTA ou  $Mg^{2+}$ , que irão diminuir a relação  $Ca^{2+}:Mg^{2+}$  (HUNTER et alii, 1976). A reversão da permeabilidade mantém a sacarose seqüestrada na matriz e isto explica a falha de mitocôndrias inchadas retornar ao estado agregado (LEHNINGER, 1959).

A temperatura é outro importante fator no mecanismo do inchamento mitocondrial aqui estudado, conforme demonstra a Fig. 4. Quando a dependência do inchamento mitocondrial em relação à temperatura é analisada em condições de desenergização, o que se pode destacar de mais importante é um ponto de transição entre 25 e 30°C, o que certamente reflete as transições térmicas reversíveis entre os estados cristalino e fluido das cadeias hidrocarbonadas dos lipídeos da membrana, conforme foi postulado para membranas de Mycoplasma laidlawii, segundo STEIM et alii (1969) em estudos de calorimetria diferencial. É bastante provável, portanto, que nossos resultados identifiquem uma subordinação dos processos de inchamento de mitocôndrias à fluidez da membrana mitocondrial interna.

A eliminação da capacidade da mitocôndria em formar potencial de membrana causada por oxidante de NAD(P)H, como demonstra a Fig. 5, confirma os registros da literatura de que o inchamento mitocondrial de grande amplitude causado por agentes liberadores de cálcio, é acompanhado de colapso no potencial, justificando a interpretação de uma permeabiliza-

ção inespecífica da membrana mitocondrial interna, em tais condições.

O antagonismo entre cálcio e dibucaína, observado nos experimentos da Fig. 8A e B, indica que deve ser tomado muito cuidado quando estes agentes são usados neste tipo de estudo. Em relação a este comportamento é importante lembrar os resultados de LOW et alii (1970) mostrando que todos os anestésicos locais, independente da carga ou da geometria molecular, deslocam cálcio ligado à superfície da membrana. Acredita-se que isto se deva à propriedade dos anestésicos locais se dissolverem na matriz lipídica da membrana e aumentarem a distância de separação entre proteínas adjacentes e/ou entre sítios de ligação de cálcio em componentes fosfolipídicos (LOW et alii, 1970). Em nossa opinião, duas conclusões importantes podem ser tiradas destes resultados: (a) a inibição do inchamento causada pelos anestésicos locais está associada com a diminuição do cálcio ligado na face interna da membrana interna, com conseqüente aumento no cálcio livre da matriz. Isto indica que os sítios de ligação responsáveis pelos efeitos do cálcio estão localizados na membrana e não no espaço da matriz mitocondrial. (b) Com base nos comentários acima, o efeito da dibucaína não deve necessariamente ser mediado pela inibição da fosfolipase  $A_2$  mitocondrial.

As conclusões acima nos motivaram a investigar o inchamento em mitocôndrias de cérebro. Embora com uma atividade mais baixa da fosfolipase  $A_2$ , comparando-se com mitocôndrias de fígado (FISKUM et alii, 1985), mitocôndrias de cérebro de rato são mais sensíveis aos efeitos deletérios do cálcio, fosfato e oxidantes de NAD(P)H, conforme mostram as Figuras 10, 11 e 12. Nessas mitocôndrias, mesmo na ausência de oxidantes de NAD(P)H, concentrações de cálcio na faixa 100 a 500  $\mu$ M já induzem inchamento de grandes proporções, se o meio contiver fosfato 2,0mM (Fig. 10A). Efeito semelhante pode ser observado com fosfato na faixa 0,1 a 5,0mM, se for adicionado

cálcio 250 $\mu$ M ao meio (Fig. 11). A Fig. 12 mostra que este efeito do fosfato é potencializado pela diamida. A ausência de ácidos graxos livres nos ensaios com mitocôndrias de fígado, nas condições de nossos experimentos, como bem mostra a Fig. 9, confirma ainda mais nossas convicções.

O efeito inibidor do ATP e  $Mg^{2+}$  sobre o inchamento de mitocôndrias de fígado (Fig. 6) e de cérebro (Fig. 10, traçado a), e a alta capacidade de mitocôndrias de cérebro em reter o cálcio acumulado quando em presença de ATP e  $Mg^{2+}$  (ROSENTHAL et alii, 1987), indicam fortemente que os efeitos do cálcio observados em experimentos para medição de fluxos de cálcio e em experimentos de inchamento em mitocôndrias desenergizadas, são a expressão de um mesmo fenômeno.

Os oxidantes de NAD(P)H, acetoacetato, t-butil hidropéroxido e diamida, agem sobre o "pool" mitocondrial dos nucleotídeos de piridina (Fig. 1B) e causam inchamento mitocondrial (Fig. 1A), como já reportado anteriormente. O inchamento induzido por esses agentes indica a ocorrência de um mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial interna dependente do estado redox dos nucleotídeos de piridina. Há postulações de que esta alteração na permeabilidade é devida à remoção de lipídeos da membrana neste mecanismo (RILEY & PFEIFFER, 1985). De acordo com esta hipótese, o equilíbrio da reação envolvendo o ciclo de deacilação-reacilação (Esquema I) dos fosfolipídeos da membrana seria desestabilizado quando a atividade da fosfolipase  $A_2$  ligada à membrana interna estivesse aumentada pelo cálcio da matriz. Paralelamente, a atividade da Acil-CoA-lisofosfolipídeo acil transferase estaria inibida. A inibição da aciltransferase, quando NAD(P)H são oxidados, deveria ser causada pela diminuição da disponibilidade de GSH necessária para manter a atividade da enzima (RILEY & PFEIFFER, 1985).

Alternativamente, nosso grupo tem proposto que o acúmulo de GSSG associado com a oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais (Figura 13), podem induzir a oxidação de grupos

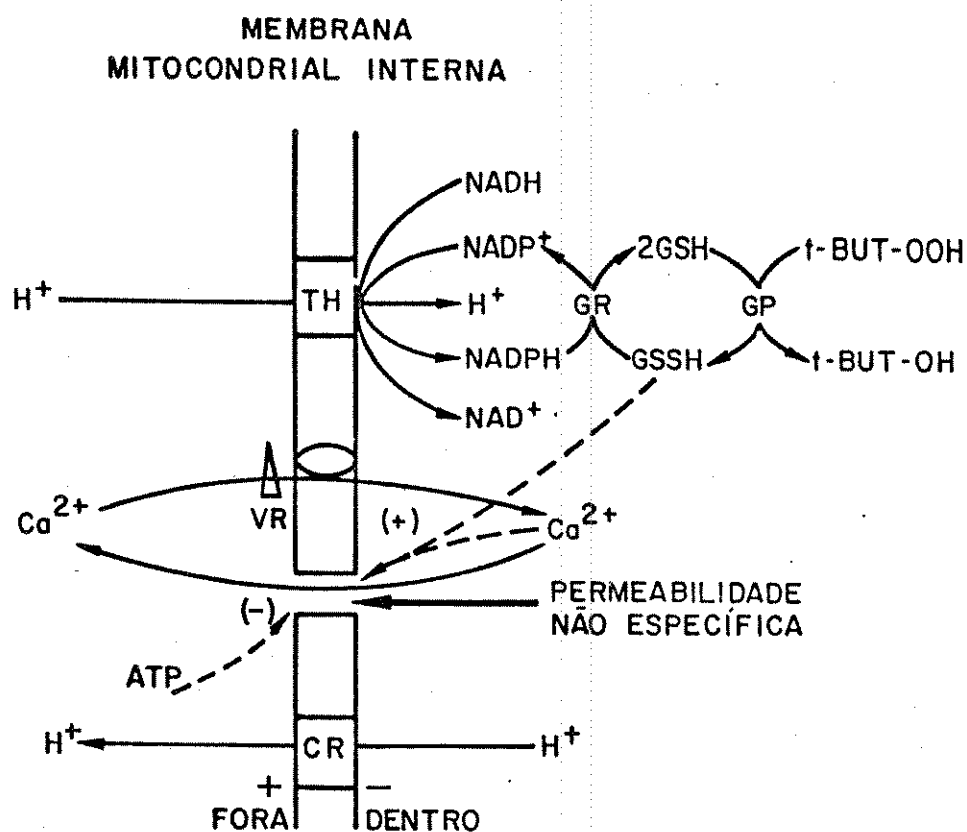


FIGURA 13 - Permeabilização induzida por cálcio na membrana interna de mitocôndrias de fígado de rato durante a redução de t-butil hidroperóxido.

GP, glutathiona peroxidase; GR, glutathiona redutase; TH, transhidrogenase; CR, cadeia respiratória; t-BUT-OOH, t-butil hidroperóxido; GSH, glutathiona reduzida; GSSG, glutathiona oxidada; VR, vermelho de rutênio.

tiólicos envolvidos com a manutenção de sua integridade (VERCESI, 1984b). Esta proposição foi baseada na similaridade de efeitos (Fig. 1A e B) dos oxidantes diretos de NAD(P)H (como o acetoacetato, por exemplo) e da diamida, que é um oxidante de grupos -SH vicinais de membrana (KURANTSIN-MILLS & LESSIN, 1981), sobre a conformação mitocondrial e fluxos de cálcio (VERCESI, 1984b).

Este mecanismo proposto é também reforçado por experimentos mostrando que diamida causa hemólise devido à formação de pontes dissulfeto na membrana de eritrócitos (KOSOWER et alii, 1982). Neste caso, agregados proteicos, formados pela produção de pontes -S-S- entre cadeias polipeptídicas vizinhas, foram detectados através de eletroforese com gel SDS-poliacrilamida (KOSOWER et alii, 1982). De fato, existem evidências consideráveis de que grupos sulfidrilas estejam envolvidos no controle da permeabilidade seletiva da membrana mitocondrial interna (LÊ-QUÔC e LÊ-QUÔC, 1985), e que NAD(P)H mantêm a glutathione no estado reduzido (HARRIS, 1979). Experimentos estão em curso em nosso laboratório a fim de examinar se realmente a liberação transitória de cálcio, induzida pela oxidação transitória de NAD(P)H, é acompanhada por transições sulfidrilas-dissulfeto proteicos na membrana.

Os resultados apresentados neste trabalho podem ainda ser relevantes com relação ao entendimento do mecanismo de desenvolvimento de danos celulares associados com o aumento do cálcio citosólico, que ocorre sob algumas situações patológicas como a anoxia, por exemplo. É sabido que períodos prolongados de anoxia celular conduzem ao colapso do potencial da membrana mitocondrial, depleção de ATP e glutathione reduzida (FARBER, 1987; MANDEL et alii, 1987). Neste trabalho essas condições foram simuladas pelos experimentos com mitocôndrias desenergizadas na presença de cálcio e oxidantes de NAD(P)H. Por exemplo, a Fig. 3A mostra que, na ausência de ATP adicionado, a presença de cálcio extramitocondrial em concentrações maiores que 10 $\mu$ M, induz aumento na permeabili-

dade da membrana, a julgar pelo inchamento mitocondrial. Isto deve ser um evento chave no desenvolvimento da injúria celular causada por isquemia ou por algumas toxinas químicas.

## RESUMO

Mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas sofrem inchamento quando incubadas na presença de cálcio e um oxidante de nucleotídeos de piridina mitocondriais. Este inchamento é estimulado por fosfato e aumento da temperatura de incubação, e inibido por vermelho de rutênio,  $\text{ATP} + \text{Mg}^{2+}$  e dibucaína. O grau de inibição pela dibucaína varia inversamente com a concentração de cálcio. A inibição causada por vermelho de rutênio é eliminada completamente pela adição do ionóforo de cálcio ionomicina, indicando que o efeito do cátion é mediado por sítios internos de ligação. Visto que as mitocôndrias foram desenergizadas, os resultados indicam que não há necessidade de movimento cíclico de cálcio através da membrana neste mecanismo. Além disso, os resultados mostram que mitocôndrias de cérebro de rato, cuja atividade da fosfolipase  $\text{A}_2$  dependente de cálcio, é menor que 20% da de mitocôndrias de fígado, são bastante sensíveis aos efeitos deletérios do cálcio + fosfato ou oxidantes de  $\text{NAD(P)H}$ , sugerindo que a remoção de fosfolípidos da membrana, por esta enzima, não representa o fator mais significativo no mecanismo do inchamento. Um ponto de transição da temperatura em torno de  $26^\circ\text{C}$  deve indicar ainda uma subordinação do mecanismo do inchamento à fluidez da membrana.

## SUMMARY

Deenergized rat liver mitochondria undergo extensive swelling when incubated in the presence of calcium plus an oxidant of mitochondrial pyridine nucleotide. This swelling is stimulated by phosphate and increasing incubation temperature, and is inhibited by ruthenium red, ATP plus  $Mg^{2+}$  and dibucaine. The degree of inhibition by dibucaine varies inversely with the calcium concentration. The inhibition caused by ruthenium red is completely eliminated by the addition of the calcium ionophore ionomycin indicating that the effect of the cation is mediated by internal binding sites. Since the mitochondria were deenergized the data definitely rule out the requirement for calcium cycling across the membrane in this mechanism. Furthermore, rat brain mitochondria whose  $Ca^{2+}$ -dependent phospholipase  $A_2$  activity is less than 20% of that from liver, are very sensitive to the deleterious effects of calcium plus phosphate or NAD(P)H oxidants suggesting that the withdrawal of membrane phospholipids by this enzyme may not be the major factor in the swelling mechanism. A temperature transition value of 26 °C may still indicate a swelling mechanism-dependence of the membrane fluidity.

## BIBLIOGRAFIA

- ÅKERMAN, K. E. O. Effect of pH and  $\text{Ca}^{2+}$  on the retention of  $\text{Ca}^{2+}$  by rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. 189: 256-62, 1978.
- ÅKERMAN, K. E. O. & NICHOLLS, D. G. Calcium transport by intact synaptosomes. Eur. J. Biochem., 115: 67-73, 1981a.
- ÅKERMAN, K. E. O. & NICHOLLS, D. G. Calcium transport by intact synaptosomes; the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel and a re-evaluation of the role of sodium calcium exchange. Eur. J. Biochem., 117: 491-7, 1981b.
- AL-NASSER, I. & CROMPTON, M. The reversible  $\text{Ca}^{2+}$  -induced permeabilization of rat liver mitochondria. Biochem. J., 239: 19-29, 1986.
- BARTLEY, W. & DAVIES, R. E. Active transport of ions by subcellular particles. Biochem. J., 57: 39, 1954.
- BEATRICE, M. C.; PALMER, J. W. & PFEIFFER, E. R. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential and the retention of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria. J. Biol. Chem., 255: 8663-71, 1980.
- BEAVIS, A. E.; BRANNAN, R. D. & GARLID, K. Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. J. Biol. Chem., 260: 13424-33, 1985.
- BECKER, G. L.; FISKUM, G. & LEHNINGER, A. L. Regulation of

- free  $\text{Ca}^{2+}$  by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 255: 9009-12, 1980.
- BENSLEY, R. R. & HOERR, N. Studies on cell structure by the freezing-drying method. VI. The preparation and properties of mitochondria. Anat. Record, 60: 449, 1934.
- BERNARDES, C. F.; PEREIRA-DA-SILVA, L. & VERCESI, A. E. t-butylhydroperoxide-induced  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP. Biochim. Biophys. Acta, 850: 41-8, 1986.
- BRAGADIN, M.; POZZAN, T. & AZZONE, G. F. Kinetics of calcium carrier in rat liver mitochondria. Biochemistry, 18: 5972-8, 1979.
- BROEKEMEIER, K. M.; SCHMID, P. C.; SCHMID, H. H. O. & PFEIFFER D. R. Effects of phospholipase  $\text{A}_2$  inhibitors on ruthenium red-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from mitochondria. J. Biol. Chem. 260: 105-13, 1985.
- BYGRAVE, F. L. Mitochondria and the control of intracellular calcium. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 53: 43-79, 1978b.
- CARAFOLI, E.; TIOZZO, R.; LUGLI, G.; CROVETTI, F. & KRATZING, C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J. Mol. Cell. Cardiol., 6: 361-71, 1974.
- CHAPPELL, J. B.; COHN, M. & GREVILLE, G. D. In: Energy-linked functions of mitochondria, Ed. by Chance, B., Academic Press Inc., New York. P. 219, 1963.
- CHAPPELL, J. B. & CROFTS, A. R. Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria-calcium-ion-

induced swelling. Biochem. J., 95: 378-86, 1965.

CLARK, J. B. & NICKLAS, W. J. The metabolism of rat brain mitochondria. J. Biol. Chem., 245: 4724-31, 1970.

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

COTY, W. A. & PEDERSEN, P. L. Phosphate transport in rat liver mitochondria: kinetics, inhibitor sensitivity, energy requirements and labelled components. Mol. Cell. Biochem., 9: 109-24, 1975.

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

CROMPTON, M.; COSTI, A. & HAYAT, L. Evidence for the presence of a reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. Biochem. J., 245: 915-18, 1987.

DeLUCA, H. F.; ENGSTROM, G. W. & RASMUSSEN, H. The action of vitamin D and parathyroid hormone in vitro on calcium uptake and release by kidney mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48: 1604, 1962.

DE MEIS, L. & VIANNA, A. L. Energy interconversion by the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Ann. Rev. Biochem., 48: 275-92, 1979.

DENTON, R. M.; RANDLE, P. J. & MARTINS, B. R. Stimulation by  $\text{Ca}^{2+}$  of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. Biochem. J., 128: 161-63, 1972.

- DENTON, R. M.; RICHARDS, D. A. & CHING, J. G. Calcium ions and the regulation of  $\text{NAD}^+$ -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. Biochem. J., 176: 899-906, 1978.
- DENTON, R. M. & McCORMACK, J. G. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. FEBS LETT., 119: 1-8, 1980.
- DRAHOTA, Z.; CARAFOLI, E.; ROSSI, C. G.; GAMBLE, R. L. & LEHNINGER, A. L. The steady-state maintenance of accumulated  $\text{Ca}^{2+}$  in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 240: 2712-20, 1965.
- FARBER, J. L. Seventh International Washington Spring Symposium, Washington, D.C., Abstract 15, 1987.
- FISKUM, G. & LEHNINGER, A. L. Regulated release of  $\text{Ca}^{2+}$  from respiring mitochondria by  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$  antiport. J. Biol. Chem., 254: 6236-39, 1979.
- FISKUM, G.; PFEIFFER, D. R.; BROEKEMEIER, K. M. and BAROODY, B. Calcium buffering characteristics and phospholipase activities of rat brain mitochondria. Biophys. J., 47:413a, 1985.
- FOLCH, J.; LEES, M. & STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509, 1957.
- GUNTER, T. E.; CHACE, H. H.; PUSKIN, J. S. & GUNTER, K. K. Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. Biochemistry, 22: 6341-51, 1983.
- JEWELL, S. A.; BELLOMO, G.; THOR, H. & ORRENIUS, S. Bleb

formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. Science, 217: 1257-9, 1982.

HACKENBROCK, C. R. & CAPLAN, A. I. Ion-induced ultrastructural transformations in isolated mitochondria. The energized uptake of calcium. J. Cell. Biol., 42: 221-34, 1969.

HANSFORD, R. G. The effect of adenine nucleotides upon the 2-oxoglutarate dehydrogenase of blowfly flight muscle. FEBS LETT., 21: 139-41, 1972.

HANSFORD, R. G. Relation between mitochondrial calcium transport and total of energy metabolism. Rev. Physiol. Pharmacol., 102: 1-72, 1985.

HOFSTETTER, W.; MUHLEBACH, T.; LÖTSCHER, H. R.; WINTERHALTER, K. H. & RICHTER, C. ATP prevents both hydroperoxide-induced hydrolysis of pyridine nucleotides and release of calcium in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 117: 361-7, 1981.

HOGEBROOM, G. H.; SCHNEIDER, W. C. & PALADE, G. H. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J. Biol. Chem., 172: 619, 1948.

HOLMES, R. P. The influence of membrane lipids on the permeability of membrane to  $\text{Ca}^{2+}$ . In: Benga, G., ed. Structure and properties of cell membranes. Boca Raton, F. L., CRC, V.Z., pp. 53-76, 1985.

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

1976.

HUNTER, E. R. & HAWORTH, R. A. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional  $\text{Ca}^{2+}$  release. Arch. Biochem. Biophys., 195: 468-77, 1979.

HUTSON, S. M.; PFEIFFER, E. R. & LARDY, H. A. Effect of cations and anions on the steady state kinetics of energy dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 251: 5251-8, 1976.

KAMO, N.; MURATSUGU, M.; RUJI, H. & KOBATAKE, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady-state. J. Membr. Biol., 49: 105-21, 1979.

KENNEDY, E. P. & LEHNINGER, A. L. Intracellular structure and the fatty acid oxidase system of rat liver. J. Biol. Chem. 172: 847, 1948.

KOSOWER, N. S.; ZIPSER, Y. & FALTIN, Z. Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: Relationship to cellular glutathione. Biochim. Biophys. Acta, 692(2): 354-52, 1982.

KURANTSIN-MILLS, J. & LESSIN, L. S. Aggregation of intramembrane particles in erythrocyte membranes treated with diamide. Biochim. Biophys. Acta, 641: 129-37, 1981.

LANDRY, Y. & LEHNINGER, A. L. Transport of calcium ions by Ehrlich ascites tumor cells. Biochem. J., 158: 427-38, 1976.

- LEBLANC, P. & CLAUSER, H. Study of the mitochondrial phosphate carrier in the course of calcium phosphate accumulation: a requirement for  $Mg^{2+}$  and ADP of its sensitivity to thiol reagents. Biochim. Biophys. Acta, 347: 193-201, 1974.
- LEHNINGER, A. L. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 234(9): 2465-71, 1959.
- LEHNINGER, A. L. The mitochondrion-molecular basis of structure and function. W. A. Benjamin, Inc. ed., New York, 1964.
- LEHNINGER, A. L. Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration coupled transport of calcium by mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71: 1520-4, 1974.
- LEHNINGER, A. L., VERCESI, A. E. & BABABUNMI, E. A. Regulation of  $Ca^{2+}$  release from mitochondria by the oxidation reduction state of pyridine nucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1690-4, 1978.
- LÊ-QUÔC, K. & LÊ-QUÔC, D. Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. J. Biol. Chem., 260(13): 7422-8, 1985.
- LÖTSCHER, H. R.; WINTERHALTER, K. H.; CARAFOLI, E. & RICHTER, C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4340-4, 1979.
- LOW, P. S.; LLOYD, D. H.; STEIM, T. M. & ROGERS, J. A. Calcium displacement by local anesthetics; dependence on pH and anesthetic charge. J. Biol. Chem., 254: 4119-25, 1978.

- MACEDO, D. V.; FERRAZ, V. L.; PEREIRA-DA-SILVA, L. and VERCE-SI, A. E. In: Integration of mitochondrial function (J.J. Lemasters et alii, eds.), 1987. Plenum Press
- MacFARLANE, M. G. & SPENCER, A. G. Changes in the water, sodium, and potassium content of rat liver mitochondria during metabolism. Biochem. J., 54: 569, 1953.
- MANDEL, L. J.; JACOBS, W. R.; SCHNELLMANN, R.; SGAMBATI, M.; LEFURGEY, A. and INGRAM, P. Seventh International Washington Spring Symposium, Washington, D.C., Abstract 16, 1987.
- MCCORMACK, J. G. & DENTON, R. M. The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. Biochem. J., 180: 533-44, 1979.
- MCCORMACK, J. G. & DENTON, R. M.  $\text{Ca}^{2+}$  as a second messenger within mitochondria. Trends Biochem. Sci., 11: 258-62, 1986.
- MELA, L. Interactions of  $\text{La}^{3+}$  and local anesthetic drugs with mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  uptake. Arch. Biochem. Biophys. 123(2): 286-93, 1968.
- MELA, L. Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria; effects of lanthanides and local anesthetic drugs. Biochemistry, 8: 2481-6, 1969.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, Lond., 191: 144-8, 1961.
- MITCHELL, P. & MOYLE, J. Estimation of membrane potential on

- pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 7: 471-84, 1969.
- MOORE, G. A.; JEWELL, S. A.; BELLOMO, G. & ORRENIUS, S. On the relationship between  $\text{Ca}^{2+}$  efflux and membrane damage during t-butyl hydroperoxide metabolism by liver mitochondria. FEBS LETT., 153(2): 289-92, 1983.
- MOSER, B.; WINTERHALTER, K. H. & RICHTER, C. Purification and properties of a mitochondrial NAD glycohydrolase. Arch. Biochem. Biophys., 224(1): 358-64, 1983.
- MURPHY, J. B. & KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. Biochim. Biophys. Acta. 45: 382-4, 1960.
- NICHOLLS, D. G. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton electrochemical gradient across the inner membrane of rat liver mitochondria as determined by ion distribution. Eur. J. Biochem., 50: 305-15, 1974.
- NICHOLLS, D. G. The regulation of extra-mitochondrial free calcium in liver mitochondria. Biochem. J., 176: 463-74, 1978.
- NICHOLLS, E. G. & BRAND, M. D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. Biochem. J., 188: 113-8, 1980.
- NICHOLLS, D. G. & ÅKERMAN, D. E. O. Mitochondrial calcium transport. Biochem. Biophys. Acta. 683: 57-88, 1982.
- NICHOLLS, D. G. Bioenergetics. An introduction to the chemiosmotic theory. Academic Press, N.Y., 1982.

- NICHOLLS, D. G. Intracellular calcium homeostasis. British Medical Bulletin, 42(4): 353-8, 1986.
- PFEIFFER, D. R.; SCHMID, P. C.; BEATRICE, M. C. & SCHMID, H. H. O. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. J. Biol. Chem., 254: 11485-94, 1979.
- POZZAN, T.; BRAGADIN, M. & AZZONE, G. F. Disequilibrium between steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation ratio and membrane potential in mitochondria; Pathway and role of  $\text{Ca}^{2+}$  efflux. Biochemistry, 16: 5618-25, 1977.
- RAAFLAUB, J. Die schwellung isolierter leberzell mitochondrien und ihre physikalisch-chemische beeinflussbarkeit; uber den wirkungsmechanismus von adenosintriphosphat als cofaktor isolierter mitochondrien. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 11: 142, 1953.
- RICHTER, C.; WINTERHALTER, K. H.; BAUMHUTER, S.; LÖTSCHER, H. R. & MOSER, B. ADP-ribosylation in inner membrane of rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 3188-92, 1983.
- RILEY, W. W., JR. & PFEIFFER, D. Relationships between  $\text{Ca}^{2+}$  release,  $\text{Ca}^{2+}$  cycling, and  $\text{Ca}^{2+}$  -mediated permeability changes in mitochondria. J. Biol. Chem., 260: 12416-25, 1985.
- RIZZUTO, R.; BERNARDI, P.; SAVARON, M. & AZZONE, G. F. Pathways for  $\text{Ca}^{2+}$  efflux in heart and liver mitochondria. Biochem. J., 246: 271-7, 1987.
- ROSENTHAL, R. E.; HAMUD, F.; FISKUM, G.; VARGHESE, P. J. and

- SHARPE, S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine, 1987, in press
- ROTTENBERG, H. The measurements of transmembrane electrochemical proton gradients. Bioenergetics, 7: 61-74, 1975.
- SCARPA, A. & AZZI, A. Cation binding to submitochondrial particles. Biochem. Biophys. Acta, 150: 473-81, 1961.
- SCARPA, A. & AZZONE, G. F. The mechanism of ion translocation in mitochondria. IV. Coupling of  $K^+$  efflux with  $Ca^{2+}$  uptake. Eur. J. Biochem., 12: 328-35, 1970.
- SCHNEIDER, W. C. & HOGEBOM, G. H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. J. Biol. Chem., 183: 123-8, 1950.
- SELWYN, M. J.; DAWSON, A. P. & DUNNETT, S. J. Calcium transport in mitochondria. FEBS LETT., 10: 1-5, 1970.
- SILIPRANDI, D.; TONINELLO, A.; ZOCCARATO, F. & SILIPRANDI, N. A possible mechanism for respiration-dependent efflux of  $Mg^{2+}$  ions from liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 78(1): 23-7, 1977.
- SILIPRANDI, D.; RUGOLO, M.; SILIPRANDI, N. & TONINELLO, A. Phosphate dependent  $Ca^{2+}$  efflux from liver mitochondria. Second European bioenergetics conference, L.B.T.M., C.N.R.S. éditeur, Villeurbanne, 1982.
- SLATER, E. C. & CLELAND, K. W. The effects of  $Ca^{2+}$  on the respiration and phosphorylative activities of heart muscle sarcosomes. Biochem. J., 55: 566-72, 1953.

- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A.V.; SHUMAN, H.; SCARPA, A.; ENDO, M. & INESI, G. Mitochondria do not accumulate significant  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in normal cells. In: Bronner, F. & Peterlik, M., eds. Calcium and phosphate transport across biomembranes. New York, Academic Press, p. 87-93, 1981.
- STEIM, J. M.; TOURTELLOTT, M. E.; REINERT, J. C.; McELHANEY, R. N. & RADER, R. L. Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane. Biochemistry, 63: 104-9, 1969.
- TAPLEY, E. F. The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 222: 325-39, 1956.
- VASINGTON, F. D. & MURPHY, J. V.  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem., 237: 2670-6, 1962.
- VERCESI, A. E.; REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of  $\text{H}^+$  ejection and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem., 253: 6379-85, 1978.
- VERCESI, A. E. Dissociation of  $\text{NAD(P)}^+$ -stimulated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -efflux from swelling and membrane damage. Arch. Biochem. Biophys., 232(1): 86-91, 1984a.
- VERCESI, A. E. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of  $\text{NAD(P)}^+$ -stimulated  $\text{Ca}^{2+}$ -efflux from mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 119(1): 305-10, 1984b.
- VERCESI, A. E. The participation of  $\text{NAD(P)}$ , the transmembrane potential and the energy-linked  $\text{NAD(P)}$  transhydrogenase in

the process of  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from rat liver mitochondria.  
Arch. Biochem. Biophys., 252(1): 171-8, 1987.

WOLKOWIKZ, P. E. & McMILLIN-WOOD, J. Dissociation between  
mitochondrial calcium ion release and pyridine nucleotide  
oxidation. J. Biol. Chem., 255: 10348-53, 1980.