

JORGE LUIZ CAVALCANTE COELHO

TRANSPORTE DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS CARDÍACAS E HEPÁTICAS.
EFEITOS DE Mg^{2+} , FOSFATO E ESTADO DE OXIDAÇÃO DO NAD(P).

Tese de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biologia da Univer
sidade Estadual de Campinas.

Orientador

Prof.Dr. ANIBAL EUGÊNIO VERCESI

Campinas

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi pelo exemplo proporcionado de seriedade e dedicação ao trabalho, nossos sinceros agradecimentos.

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

Ao Prof. Dr. José Walter Martins do Instituto de Química da UNICAMP, pela colaboração durante a realização das dosagens de magnésio efetuadas naquele Instituto.

Aos Profs. Drs. Nilce Corrêa Meirelles, Aldo Focesi Jr., Antonio Carlos Boschero, Hiroshi Aoyama e Nelson Duran Caballero pelas correções e sugestões dadas ao presente trabalho.

Aos meus amigos Ecy, Lau, Osmar, Édson, Shirlei, Romário, Tereza, Arita, Neuza, Fred, Eliane, Antônia e Flávio que por diversas maneiras colaboraram neste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	13
MATERIAL	13
MÉTODOS	14
Isolamento de mitocôndria hepática	14
Isolamento de mitocôndria cardíaca	15
Dosagem de proteína	15
Determinação do consumo de oxigênio	16
Determinação do movimento de Ca^{2+}	18
Determinação de Mg^{2+} endógeno mitocondrial	20
Medida da variação de volume mitocondrial	22
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	45
RESUMO	51
SUMMARY	52
BIBLIOGRAFIA	53

ABREVIATURAS

Ac	=	Acetato
ADP	=	Adenosina-5'-difosfato
ATP	=	Adenosina-5'-trifosfato
DTNB	=	Ácido 5,5'-ditio bis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	=	Ácido Etileno-diamino-tetra-acético
EGTA	=	Ácido Etileno-glicol bis-(aminoetil) tetra-acético
HEPES	=	Ácido N-2'-hidroxietyl piperazina-N'-2-etanosulfônico
NAD(P)	=	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato)
NEM	=	N-etil maleimida
Pi	=	Fosfato inorgânico
RHM	=	Mitocôndria de coração de rato ("rat heart mitochondria")
RLM	=	Mitocôndria de fígado de rato ("rat liver mitochondria")
Rot	=	Rotenona
Suc	=	Succinato

INTRODUÇÃO

O íon cálcio apresenta grande importância fisiológica em diversos processos metabólicos. Entre outros, participa como fator de acoplamento entre a excitação e a contração muscular (EBASHI e ENDO, 1968); entre a excitação e a secreção em tecido nervoso (ECCLES, 1964), glândulas endócrinas e exócrinas (BIRMINGHAM e col., 1953; HOKIN, 1966; VALE e col., 1967 ; ZOR e col., 1968; SAMLI e GESCHWIND, 1968). Além disso, é importante na regulação da glicogenólise (MEYER e col., 1964) e como intermediário na ação dos hormônios melanotrófico (DIKSTEIN e col., 1963), vasopressina (THORN, 1961) e paratormônio (NAGATA e RASMUSSEN, 1970). A regulação da concentração de Ca^{2+} no citoplasma e líquido tissular, é fundamental para a integração de todos estes processos metabólicos. As estruturas celulares envolvidas na regulação da concentração do cátion, são a ATPase-dependente de Ca^{2+} da membrana plasmática, o retículo endoplasmático e a mitocôndria. A seguir, discutiremos alguns aspectos do transporte de Ca^{2+} por mitocôndria, relacionados com o presente trabalho.

As mitocôndrias da maioria dos tecidos de vertebrados, bem como de alguns invertebrados estudados, captam Ca^{2+} a partir do meio de suspensão, às expensas de energia respiratória ou de hidrólise de ATP (CARAFOLI e LEHNINGER, 1971). Este processo é capaz de gerar um gradiente de concentração 10^4 vezes

maior na matriz mitocondrial ($[Ca^{2+}] = 10^{-3}M$), que no citoplasma ($[Ca^{2+}] = 10^{-7}$) (AZZI e CHANGE, 1969; RASMUSSEN, 1970; BYGRAVE, 1977). O transporte de Ca^{2+} precede a fosforilação oxidativa na utilização da energia respiratória, o que foi observado com mitocôndria hepática (ROSSI e LEHNINGER, 1964), mitocôndria de células tumorais de Erlich (REYNAFARJE e LEHNINGER, 1973) e mitocôndria cardíaca (VERCESI e col., 1978). Tal fenômeno foi comprovado com a adição simultânea de Ca^{2+} e ADP em concentrações saturantes. Nestas condições primeiro a mitocôndria capta todo o Ca^{2+} e somente após fosforila o ADP. Este fato, aliado a capacidade de acumular o íon com alta velocidade ($800 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), sugerem que a mitocôndria pode ter um papel na regulação da distribuição do Ca^{2+} celular (LEHNINGER, 1970; LEHNINGER e col., 1978 a, b). O transporte de Ca^{2+} em mitocôndria por ser acoplado aos mecanismos conservadores de energia, tem sido utilizado como modelo de estudo do mecanismo de fosforilação oxidativa, o qual apresenta vários aspectos ainda não compreendidos (REYNAFARJE e LEHNINGER, 1977; ALEXANDRE e col., 1978; VERCESI e col., 1978). Todas estas observações tornam o mecanismo de regulação e transporte de Ca^{2+} por mitocôndria objeto de permanente interesse.

A captação de Ca^{2+} por mitocôndria induz ejeção de prótons (ENGSTROM e DE LUCA, 1964) à semelhança da hidrólise de ATP pela ATPase mitocondrial. Esta observação experimental permitiu que a teoria químico-osmótica da fosfori-

lação oxidativa, proposta por MITCHEL (1961), também explicasse o mecanismo de captação de Ca^{2+} pela organela. O transporte de elétrons na cadeia respiratória induz ejeção de prótons para a face externa da mitocôndria, com consequente alcalinização da matriz. Deste modo, forma-se através da membrana mitocondrial interna um gradiente protônico (Δp), composto por dois componentes:

$$\Delta p = \Delta \psi - Z \Delta p H$$

onde Z é uma constante, $\Delta \psi$ é a diferença de potencial elétrico através da membrana, sendo o interior negativo e o exterior positivo, e $\Delta p H$ é o gradiente de H^+ entre a matriz alcalina e o citoplasma ácido. O potencial protônico, que também pode ser gerado pela hidrólise de ATP, é a fonte de energia tanto para a fosforilação oxidativa quanto para o transporte ativo em geral (MITCHELL, 1969; ALEXANDRE e col., 1978). O Ca^{2+} seria assim, transportado eletroforéticamente para a matriz mitocondrial em resposta à diferença de potencial entre esta e o exterior (SELWYN e col., 1970; PUSKIN e col., 1976; HEATON e NICHOLLS, 1976).

A velocidade respiratória depende da amplitude do potencial protônico. Quando este último não é utilizado, a respiração se processa lentamente, em velocidade suficiente para manter a mitocôndria energizada. Esta condição é conhecida como estado respiratório-4 (CHANCE, 1959). Qualquer fenômeno que utilize o potencial protônico leva a um estímulo imediato da respiração, condição conhecida como estado respiratório-3 (CHANCE, 1959). Durante a fosforilação oxidativa ocorre a volta

de próton para o interior da mitocôndria, via enzima ATP-sintetase, e a respiração é estimulada (MITCHELL, 1961,1969). No caso do transporte de Ca^{2+} , com a entrada do íon para a matriz, a diferença de potencial elétrico é neutralizada, pois entra um Ca^{2+} para cada dois prótons ejetados (ALEXANDRE e col., 1978 e VERCESI e col., 1978). O colapso do potencial elétrico pela entrada de Ca^{2+} estimula a respiração, a qual aumenta a amplitude do gradiente de pH até que ocorre inibição da saída de mais prótons, cessando assim a captação de Ca^{2+} . Esta inibição ocorre quando são acumulados cerca de 80 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína mitocondrial (LEHNINGER e col., 1978 a). Neste ponto a adição de um ânion de ácido permeante provoca o reinício da captação de Ca^{2+} .

Os ânions permeantes são de três categorias (LEHNINGER, 1974): (a) os ânions de ácidos lipofílicos fracos como acetato, propionato, lactato e beta-hidroxibutirato, que passam pela membrana mitocondrial na forma protonada e ao atingirem a matriz, devido ao pH mais alcalino desta, dissociam-se produzindo H^+ que colapsam o gradiente de pH (MITCHELL e MOYLE, 1969 ; LEHNINGER, 1974); (b) bicarbonato, ao qual a membrana mitocondrial é impermeável. Este, no entanto, está em equilíbrio com o CO_2 dissolvido no meio, o qual penetra na mitocôndria e pode ser hidratado pela anidrase carbônica, produzindo H_2CO_3 na matriz, que se dissocia em $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ (ELDER e LEHNINGER, 1973); (c) o fosfato, que é transportado por meio do sistema " symporter "

de $H^+/H_2PO_4^-$ ou um sistema equivalente que troca OH^- da matriz por $H_2PO_4^-$ (MITCHELL e MOYLE, 1969 ; LA NOUE e TISCHLER, 1976). Os ânions permeantes são capazes de aumentar sobremaneira a capacidade da mitocôndria acumular Ca^{2+} . Na presença de fosfato, que é o mais eficiente deles, a mitocôndria capta até 3000 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, processo chamado carregamento maciço da mitocôndria (LEHNINGER e col., 1978 a).

Todos os ânions capazes de acompanhar o Ca^{2+} durante o transporte-dependente de energia, apresentam a característica de produzirem, direta ou indiretamente, prótons na matriz alcalinizada pela respiração, colapsando o gradiente de pH, que é a causa da inibição do transporte de Ca^{2+} (LEHNINGER, 1974). Esta hipótese é reforçada através de experimentos usando ânions como nitrato, tiocianato, clorato e perclorato, que são solúveis na membrana, porém incapazes de favorecer a captação de Ca^{2+} justamente por atravessarem a membrana na forma de ânion, não liberando prótons na matriz (LEHNINGER, 1974).

O Ca^{2+} pode se ligar à membrana mitocondrial em um processo independente de energia, isto é, com inibidores de respiração e hidrólise de ATP presentes no meio de suspensão (ROSSI e col., 1967; SCARPA e AZZI, 1968). Estes sítios de ligação na membrana são relativamente abundantes (ligam cerca de 30 nmoles Ca^{2+} /mg de proteína) porém, tem baixa afinidade ($K_m > 40 \mu M$) e são inespecíficos, uma vez que também ligam outros cátions mono e divalentes com diversas constantes de afinidade

(SCARPA e AZZI, 1968). Por outro lado, a partir de "plots de Scatchard" da ligação de Ca^{2+} a membrana de mitocôndria com respiração inibida, foi observado por REYNAFARJE e LEHNINGER (1969) com mitocôndria hepática e JACOBUS e col. (1975) com mitocôndria cardíaca, gráficos tipo bifásico, indicando que os sítios de ligação são de dois tipos. Foi demonstrado que além dos sítios de baixa afinidade, existe outro tipo em pequeno número (cerca de 1 nmol/mg de proteína), porém com alta afinidade por Ca^{2+} ($K_M = 0,025 \mu\text{M}$). Segundo os autores, estes sítios estariam envolvidos com o transporte ativo do íon. Entretanto, AKERMAN e col. (1974) e SOUTHARD e GREEN (1974), afirmam que os sítios de alta afinidade são consequência da inibição incompleta da respiração, resultando na captação de pequenas quantidades de Ca^{2+} pela mitocôndria. Usando outro tipo de abordagem, com mitocôndria desacoplada e respiração inibida, condição na qual é impossível haver transporte de Ca^{2+} , TEW (1977) estudou a inibição por íons da série dos lantanídeos, da ligação do Ca^{2+} - independente de energia e do transporte de Ca^{2+} - dependente de energia por mitocôndria, e confirmou a existência de sítios de alta afinidade.

Os sítios de alta afinidade tem sido associados à molécula transportadora de Ca^{2+} . Entre os fatores que sugerem a existência desta molécula estão:

(a) especificidade para Ca^{2+} (LEHNINGER e col., 1967),

(b) cinética com comportamento de saturação (SCARPA e AZZONE, 1970),

(c) inibidores específicos como vermelho de rutênio e lantanídeos (REED e BYGRAVE, 1974) e

(d) ausência de transporte em mitocôndrias de vegetais e fungos, o que pode significar falta de codificação genética para a molécula translocadora nestes organismos (MOORE e BONNER Jr., 1977).

Várias tentativas feitas no sentido de isolar a molécula translocadora de Ca^{2+} indicam que esta deve ser uma glicoproteína, que liga vermelho de rutênio e lantanídeos especificamente (CARAFOLI, 1976). Alguns grupos de pesquisadores afirmam ter conseguido isolá-la (LEHNINGER, 1971; GÓMEZ-PUYOU e col., 1972; SANDRI e col., 1976). No entanto, ainda permanece por ser definitivamente esclarecida sua relação com o sistema transportador de Ca^{2+} (LEHNINGER e col., 1978 b).

O Ca^{2+} participa de muitas reações físicas e bioquímicas celulares. A concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma e velocidade de fluxo pelos diversos compartimentos celulares, são dados importantes no esclarecimento de qual, ou quais organelas participam na regulação da concentração do cátion no citoplasma. Os dados da literatura sobre a cinética do transporte de Ca^{2+} por mitocôndria apresentam uma grande variação. Esta discrepância deve-se principalmente à dificuldade de se medir com precisão a concentração de Ca^{2+} livre do sistema, porque diver-

sas substâncias presentes no meio de incubação tem capacidade de complexar o íon. Várias técnicas foram desenvolvidas especialmente para tentar superar este problema. Entretanto, nenhuma delas mostrou-se claramente superior às demais, de modo que a questão da afinidade da mitocôndria por Ca^{2+} continua em discussão.

Os valores da literatura para a K_M aparente do transporte de Ca^{2+} , podem ser reunidos em dois grupos distintos, um com valores relativamente baixos, $K_M < 15 \mu\text{M}$ (CARAFOLI e AZZI, 1972; REED e BYGRAVE, 1975; JACOBUS e col., 1975; CROMPTON e col., 1976 b; HUTSON e col., 1976; NOACK e HEINEN, 1977; WILLIAMS e BARRIE, 1978) e outro com valores relativamente altos, $K_M > 40 \mu\text{M}$ (VINOGRADOV e SCARPA, 1973; SCARPA e GRAZIOTTI, 1973; SORDAHL, 1974; VIAL e col. 1978).

A velocidade de transporte de Ca^{2+} por mitocôndria, guarda uma relação sigmoideal com o aumento da concentração do íon no meio de suspensão, tendo coeficiente de HILL entre 1,6 e 2 (AKERMAN e col., 1977; WILLIAMS e BARRIE, 1978). Isto significa que o transporte de Ca^{2+} apresenta cooperatividade, ou seja, é necessário que mais de um íon cálcio se ligue ao sistema translocador para que o transporte se processe à velocidade máxima. Os valores para V_{MAX} do transporte de Ca^{2+} variam entre 1 e 15 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína /seg, dependendo do método utilizado para medir a concentração de Ca^{2+} livre (VINOGRADOV e SCARPA, 1973; SCARPA e GRAZIOTTI, 1973; SORDAHL, 1974; HUTSON e

col., 1976; CROMPTON e col., 1976 b, 1978).

O transporte de Ca^{2+} por mitocôndria é influenciado por diversos cátions mono e divalentes, entre os quais o magnésio é o principal. Este, é um potente inibidor competitivo do transporte de Ca^{2+} , principalmente em mitocôndria cardíaca (VERCESI, 1977; VERCESI e col., 1978), aumentando a K_M (HUTSON, 1977) e acentuando o caráter sigmoidal da relação entre a velocidade inicial de captação e concentração de Ca^{2+} do meio (AKERMAN e col., 1977). Apesar destes efeitos do Mg^{2+} sobre o transporte de Ca^{2+} , existe controvérsia na literatura a respeito do seu transporte ou não por mitocôndria. BRIERLEY e col., (1963) e CROMPTON e col., (1976 a), relatam que mitocôndria cardíaca é capaz de transportar Mg^{2+} por um sistema diferente daquele do Ca^{2+} . Independente de ser transportado ou não, o Mg^{2+} compete com o Ca^{2+} pelos mesmos sítios de ligação na membrana, tanto dependentes quanto independentes de energia, e o deslocamento de um ou outro cátion depende exclusivamente da concentração relativa dos dois (SCARPA e AZZI, 1968; AKERMAN e col., 1977).

O magnésio endógeno mitocondrial encontra-se distribuído pelo espaço intermembranas (50%), matriz (41%), membrana interna (5%) e membrana externa (4%) (BOGUCKA e WOJTCZAK, 1971; KUN, 1976). Alguns aspectos da interação entre o Mg^{2+} ligado à membrana e as propriedades funcionais das mitocôndrias, foram estudados por diversos autores. SETTLEMIRE e col., (1968) verificaram que o EDTA incrementa grandemente o acúmulo de Na^+ e Li^+ ,

assim como a turgescência de mitocôndria cardíaca. Como o EDTA não penetra na mitocôndria, é lícito atribuir este efeito a uma ação direta sobre a membrana, como a retirada do íon Mg^{2+} , já que o EDTA é um poderoso quelante deste íon. LEE e col. (1971), demonstraram que durante a captação de Ca^{2+} ocorre liberação do Mg^{2+} endógeno seguida pela extrusão de K^+ da matriz, evidenciando que a perda de Mg^{2+} permeabiliza a membrana à K^+ . LIGETI e FONYÓ (1977) trabalhando com valinomicina, que é um ionóforo para K^+ , observaram que a adição de Mg^{2+} inibe a captação de K^+ , provavelmente através de mudança na conformação da membrana mitocondrial. A liberação de Mg^{2+} endógeno, induzida por fosfato em alta concentração, foi correlacionada por HOSER e col. (1976) com o aumento de volume verificado em mitocôndria hepática. Além destes aspectos ligados à permeabilidade da membrana, também o papel do Mg^{2+} na fosforilação oxidativa foi estudado. LEE e col. (1970), verificaram que a concentração de desacoplador necessária para induzir máxima ejeção de Mg^{2+} endógeno coincide com a que desacopla a fosforilação oxidativa.

Apesar de ser atribuído à mitocôndria um papel fisiológico na regulação da distribuição do Ca^{2+} celular (LEHNINGER, 1970; LEHNINGER e col., 1978 a,b; NICHOLLS, 1978), existe em algumas situações da captação de Ca^{2+} "in vitro" pela organela, uma série de eventos associados (desacoplamento, entumescimento mitocondrial, perda de substratos endógenos e alterações conformacionais) que são relacionados à liberação de Mg^{2+} endóge

no mitocondrial, com conseqüente permeabilização da membrana. Esta foi demonstrada ocorrer, quando são liberados 80% do Mg^{2+} mitocondrial total (HOSER e col., 1976).

O efluxo de Mg^{2+} mitocondrial induzido pela captação de Ca^{2+} é aumentado por fosfato (HOSER e col., 1976; SILLIPRANDI e col., 1977), diamida (SILLIPRANDI e col., 1975, 1977), oxidação de NAD(P) mitocondrial (VERCESI, 1979) e é diminuído por Mg^{2+} exógeno (BINET e VOLFIN, 1975), vermelho de rutênio (SILLIPRANDI e col., 1977; VERCESI, 1979) e por um fator citoplasmático mais ADP (BINET e VOLFIN, 1974). Os primeiros fatores potencializam a deterioração mitocondrial por Ca^{2+} . Por outro lado, os últimos desempenham um papel protetor contra a ação deletéria do transporte de Ca^{2+} sobre mitocôndria, e como consequência promovem retenção do Ca^{2+} pela organela.

Recentemente, VERCESI e col. (1978) obtiveram uma preparação de mitocôndria cardíaca, que quando energizada por succinato na presença de rotenona, apresenta capacidade de captar quantidades muito maiores de Ca^{2+} na presença de fosfato, que mitocôndria hepática. Entretanto, quando energizadas por substratos dependentes de NAD ou por succinato na ausência de rotenona, a capacidade desta preparação de mitocôndria cardíaca reter Ca^{2+} na presença de fosfato é comparável à de mitocôndria hepática.

O objetivo do presente trabalho, foi investigar os fatores envolvidos nas diferentes capacidades de mitocôndrias

cardíacas e hepáticas em reter o Ca^{2+} captado, quando energizadas por succinato ou substrato dependentes de nucleotídeos de piridina. Assim nossos experimentos visaram comparar as alterações ocorridas durante o transporte de Ca^{2+} (perda de Mg^{2+} endógeno, inchamento mitocondrial, desacoplamento) em ambos os tipos de mitocôndria. Os dados assim obtidos poderiam nos indicar a razão da maior resistência desta preparação de mitocôndria cardíaca em ser desacoplada por Ca^{2+} e fosfato, bem como a sequência de eventos responsáveis pela deterioração mitocondrial durante os movimentos de Ca^{2+} .

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Para a execução das técnicas descritas foram utilizados os seguintes equipamentos:

Homogeneizador de POTTER-ELVEHJEM, THOMAS CO. Centrífuga refrigerada SORVALL, tipo RC2-B, com rotor SORVALL, tipo SS-34. Centrífuga EPPENDORF, modelo 3200. Espectrofotômetro BECKMAN, tipo DU-2. Espectrofotômetro de absorção atômica CARL ZEISS, modelo FMD 3. Eletrodo de oxigênio YELLOW-SPRINGS INST. CO. modelo 4004. Oxígrafo GILSON, modelo K-IC. Eletrodo específico de cálcio RADIOMETER, modelo F2112. Eletrodo de pH THOMAS CO. Registrador BECKMAN, modelo 10". Potenciômetro CORNING, modelo 10. Microseringas HAMILTON CO. Micropipetas EPPENDORF.

A enzima Nagarse era de procedência da ENZYME DEVELOPMENT CORP., New York, N.Y. Os demais reagentes utilizados eram produtos pré-análise obtidos da SIGMA, MERCK, BAKER ou MANN. As soluções eram sempre preparadas com água desionizada. Quando não explicitamente indicado, os sais utilizados eram do tipo XCl_n ou K_nY .

Os eletrodos de Ca^{2+} e de pH e os reagentes Nagarse, EGTA, HEPES e vermelho de rutênio, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Albert L. Lehninger da Johns Hopkins University, Estados Unidos da América.

MÉTODOS

Isolamento de mitocôndria hepática

Mitocôndria de rato adulto em jejum por 24 horas, era isolada de acordo com o método de SCHNEIDER e HOGEBROOM(1950). Todos os passos da preparação eram processados entre 0-2°C e para isso, todo o material utilizado era mantido em banho de gelo.

Dois animais eram sacrificados por concussão cerebral, os fígados pesando entre 12-16 g eram imediatamente retirados, lavados várias vezes em solução de sacarose 250 mM e picados com tesoura. A seguir eram homogeneizados adicionando-se solução contendo sacarose 250 mM e EGTA 0,5 mM, na proporção de 2 ml/g de tecido. O homogeneizado era distribuído em dois tubos de centrífuga e o volume completado para 80 ml com solução de sacarose. A seguir era centrifugado a 800 Xg por 10 min. a 0°C. O sedimento era descartado e o sobrenadante centrifugado a 10000 Xg por 10 min. O sedimento mitocondrial era lavado com 20 ml de solução de sacarose sem EGTA e finalmente centrifugado a 12000 Xg por 10 min. Este último sedimento era ressuspensão no menor volume possível de solução de sacarose. A concentração de proteína mitocondrial era determinada pelo método de MURPHY e KIES(1960) e posteriormente diluída para 100 mg de proteína por ml. Os experimentos eram realizados em intervalo de até 6 horas após a obtenção da mitocôndria.

Isolamento da mitocôndria cardíaca

Mitocôndria cardíaca era isolada de acordo com o método de VERCESTI e col. (1978). Os corações, pesando entre 0,5 - 0,7 g cada, de quatro ratos eram extraídos como descrito anteriormente. Após várias lavagens com solução de sacarose 250 mM eram picados finamente com tesoura e tratados com enzima proteolítica (Nagarse) 0,1 mg/ml durante 15 minutos, em meio contendo sacarose 250 mM, Hepes 3 mM, pH 7,2 e EGTA 0,5 mM. Em seguida eram lavados duas vezes em solução de sacarose afim de remover a Nagarse e homogeneizados manualmente em homogeneizador de vidro. O homogeneizado era diluído em solução de sacarose para um volume de 20 ml/coração e centrifugado a 700 Xg por 8 minutos a 0°C. O sobrenadante era centrifugado a 10000 Xg por 10 minutos. O sedimento era ressuspensão em 10 ml de solução de sacarose por coração e centrifugado a 12000 Xg por 10 minutos. Este último sedimento era ressuspensão no menor volume possível de solução de sacarose. A proteína mitocondrial era dosada pelo método de MURPHY e KIES (1960) e diluída para a concentração de 100 mg/ml.

Dosagem de proteína

A concentração de proteína da suspensão de mitocôndria era determinada de acordo com o método de MURPHY e KIES (1960). Este método baseia-se essencialmente na determinação da concentração de ligações peptídicas, através de medida da dife-

rença de absorvância da solução de proteína em NaOH 5 mM, nos comprimentos de onda de 215 e 225 nanômetros. Esta diferença é diretamente proporcional à concentração de proteína na solução. Albumina de soro bovina foi utilizada como padrão.

Determinação do consumo de oxigênio

A velocidade respiratória das mitocôndrias era medida polarograficamente, usando-se um eletrodo de CLARK acoplado a um oxígrafo. A reação se processava em câmara de vidro com agitação magnética e circulação de água termostatzada à 25°C. Nos experimentos realizados com mitocôndria hepática, o meio de incubação básico era constituído por sacarose 125 mM, KCl 65 mM e Hepes 3 mM, pH 7,2. Nos experimentos com mitocôndria cardíaca, o meio de incubação básico era constituído por KCl 130 mM e Hepes 3 mM, pH 7,2. As demais adições, peculiares a cada experimento, estão indicadas nas legendas das figuras.

A qualidade das mitocôndrias preparadas pelos métodos anteriormente descritos, era testada em função da atividade de fosforilação oxidativa, com a adição de ADP e determinação do controle respiratório, definido como a relação entre a velocidade de consumo de oxigênio no estado-3 e estado-4.

As mitocôndrias hepáticas utilizadas, apresentavam controle respiratório entre 7-11, enquanto que as mitocôndrias cardíacas entre 4-6.

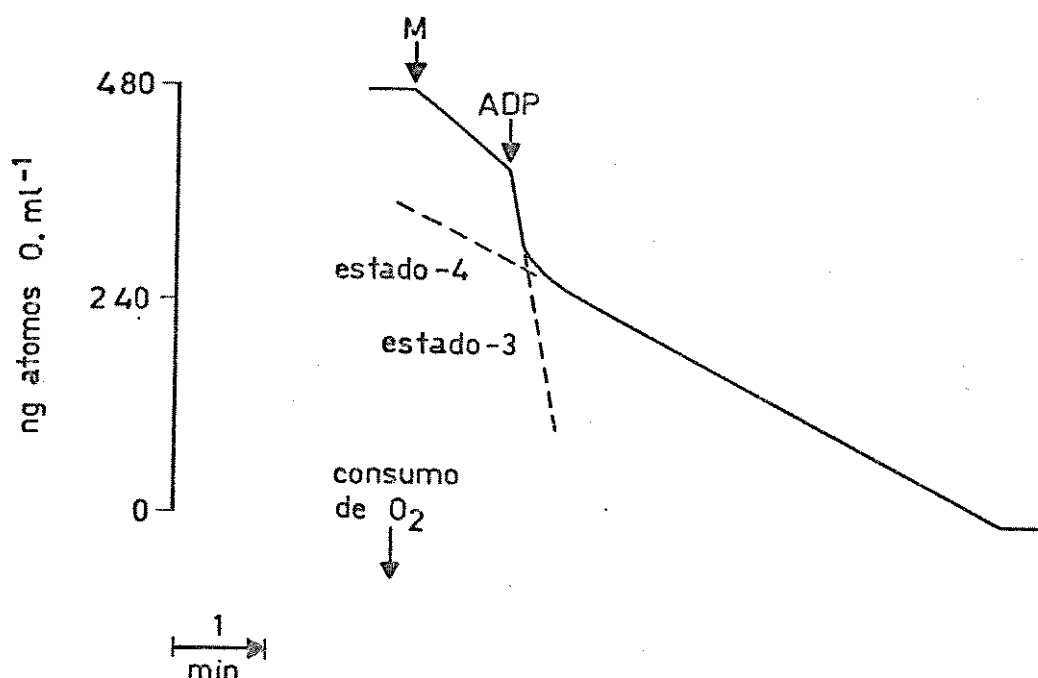


FIGURA 1 - Experimento para determinação do controle respiratório mitocondrial. O meio de incubação era o descrito no texto com a adição de rotenona $5 \mu\text{M}$, succinato 1 mM , fosfato 1 mM , 1 mg de mitocôndria hepática/ ml de meio de incubação e 200 nmoles de ADP. A velocidade de consumo de oxigênio é medida em função da inclinação da reta que tangencia o traçado nos diferentes estados respiratórios.

Determinação do movimento de Ca^{2+}

O movimento de Ca^{2+} através da membrana mitocôndrial era medido por dois métodos diferentes, de acordo com os objetivos do experimento.

A - Medida direta do movimento de Ca^{2+}

O transporte de Ca^{2+} por mitocôndria, era medido diretamente, por um eletrodo específico à Ca^{2+} livre no meio de suspensão. O eletrodo era conectado ao registrador através de um potenciômetro com escala expandida, para ampliar as diferenças de concentração de Ca^{2+} no meio. Devido a resposta do eletrodo ser logarítmica, fazia-se previamente uma titulação com a adição de quantidades conhecidas de CaCl_2 .

A reação se processava em câmara de vidro com agitação magnética e circulação de água termostatizada. A câmara possuía entradas independentes para os eletrodos de Ca^{2+} e de referência.

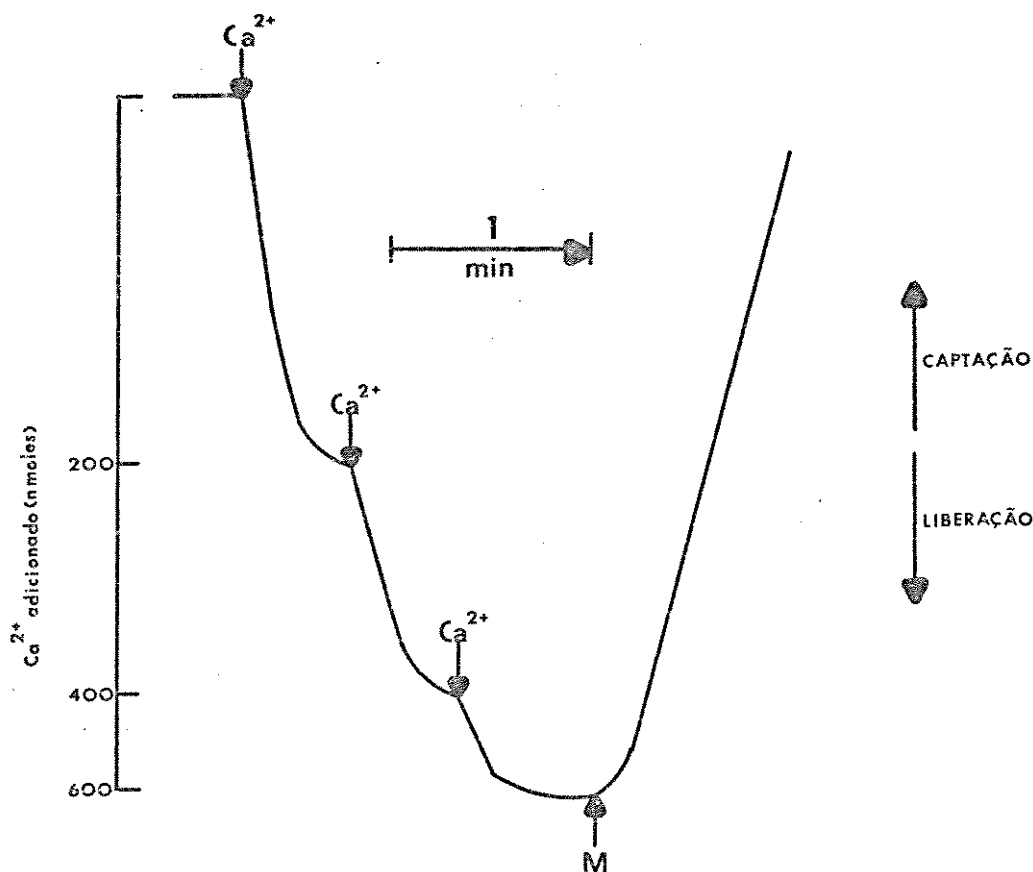


FIGURA 2 - Calibração do eletrodo de Ca^{2+} . O meio de incubação era o mesmo da Figura 1 acrescido de rotenona 5 μM , fosfato 1 mM, succinato 1 mM, CaCl_2 era adicionado em pulsos de 200 nmoles onde indicado por Ca^{2+} e 5 mg de mitocôndria hepática onde assinalado por M.

B - Medida indireta do movimento de Ca^{2+}

Devido ao fato da sensibilidade do eletrodo de Ca^{2+} , ser ligeiramente alterada por Mg^{2+} , Sr^{2+} e Mn^{2+} , nos experimentos onde tais cátions eram usados, fazia-se a medida da captação de Ca^{2+} por método indireto. Como mencionado anteriormente, existe acidificação do meio de suspensão durante captação de Ca^{2+} . Dois íons Ca^{2+} são captados e quatro H^+ ejetados por par de elétrons passando por sítio de fosforilação oxidativa, levando a uma relação estequiométrica de 2H^+ ejetados/ Ca^{2+} captado (AZZONE e col. 1977; VERCESI e col., 1978). Entretanto, quando fosfato está presente no meio de suspensão, ocorre a volta de 1H^+ por fosfato transportado, resultando em uma relação estequiométrica de aproximadamente 1H^+ ejetado/ Ca^{2+} captado (REYNAFARJE e LEHNINGER, 1977).

A ejeção de H^+ era medida através de eletrodo de vidro conectado a um potenciômetro, em câmara de vidro com agitação magnética e circulação de água termostatizada. O meio de incubação era o mesmo utilizado nos experimentos de consumo de oxigênio (vide: Determinação do consumo de oxigênio)

Determinação do Mg^{2+} endógeno mitocondrial

As variações de conteúdo de Mg^{2+} endógeno eram determinadas como se segue: alíquotas da suspensão mitocondrial contendo 0,5 mg de proteína eram centrifugadas por 20 segundos, em tubos de centrífuga EPPENDORF. O sobrenadante era descartado e o sedimento dissolvido em 1 ml de água desionizada. A seguir

adicionava-se 0,2 ml da solução de diluente recomendado para a dosagem de Mg^{2+} pelo método de absorção atômica, o qual continha: 585 mg de La_2O_3 , 2,5 ml de HCl 36 N, 4 ml de n-butanol e completado a 100 ml com água desionizada. As dosagens eram precedidas pela confecção de uma curva padrão, utilizando-se $MgCl_2$.

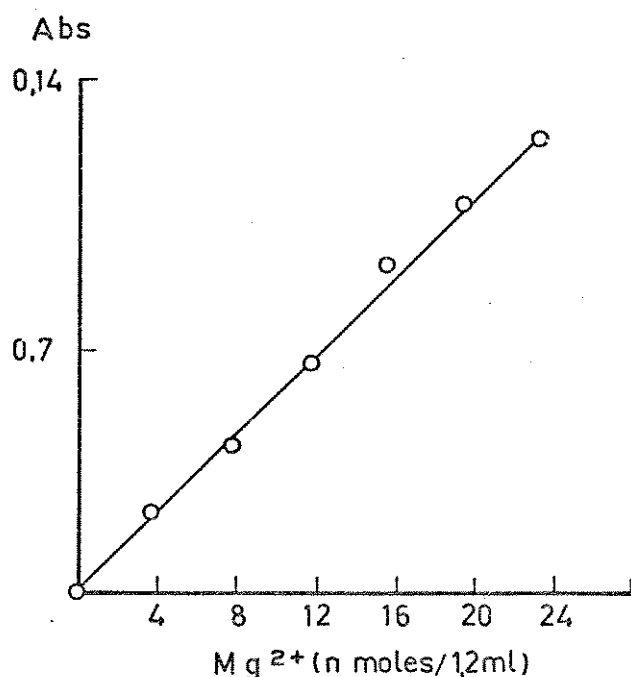


FIGURA 3 - Curva padrão típica de um experimento de dosagem de Mg^{2+} por espectrofotometria de absorção atômica.

A reação se processava em câmara de vidro com agitação magnética e circulação de água termostatzada. O meio de incubação era o mesmo do experimento de consumo de oxigênio (vide: Determinação do consumo de oxigênio).

Medida da variação de volume mitocondrial

O aumento de volume mitocondrial era medido espectrofotometricamente através da diminuição da absorbância a 700 nm da suspensão mitocondrial (LEHNINGER, 1974). Uma variação no volume mitocondrial determina uma variação proporcional na absorbância da suspensão. O comprimento de onda de 700 nm foi utilizado porque nenhuma substância normalmente encontrada na mitocôndria tem absorbância específica neste comprimento de onda. Assim, as variações observadas são o reflexo de alterações do volume mitocondrial total e não de um fator específico qualquer.

A reação se processava em cubeta de vidro de 3,0 ml e 1,0 cm de caminho óptico. O meio de incubação era o mesmo dos experimentos de consumo de oxigênio (vide: Determinação do consumo de oxigênio).

RESULTADOS

Captação de Ca^{2+} por mitocôndrias cardíacas e hepáticas

Mitocôndrias cardíacas e hepáticas comportam-se de maneira diferente quanto à capacidade de reter o Ca^{2+} captado (Figura 4). Os experimentos foram realizados na presença de fosfato 1 mM, condição na qual há transporte efetivo de Ca^{2+} para a matriz e não apenas ligação a sítios da membrana (LEHNINGER, 1970).

Mitocôndria hepática inicialmente capta Ca^{2+} com grande velocidade, porém rapidamente o libera, antes mesmo de ser totalmente acumulado (traçado a). Ao contrário desta, mitocôndria cardíaca incubada nas mesmas condições capta e retém na matriz todo o Ca^{2+} adicionado, cerca de 120 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína mitocondrial (traçado b). Na presença de baixas concentrações de fosfato, mitocôndria hepática capta e retém todo Ca^{2+} presente no meio (traçado c).

Desacoplamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e fosfato

O Ca^{2+} tem efeitos marcadamente diferentes sobre a respiração de mitocôndrias cardíacas e hepáticas, quando na presença de fosfato 1 mM (figura 5). Como foi discutido anteriormente, a velocidade de consumo de oxigênio depende da utilização do potencial protônico gerado durante o transporte de elê

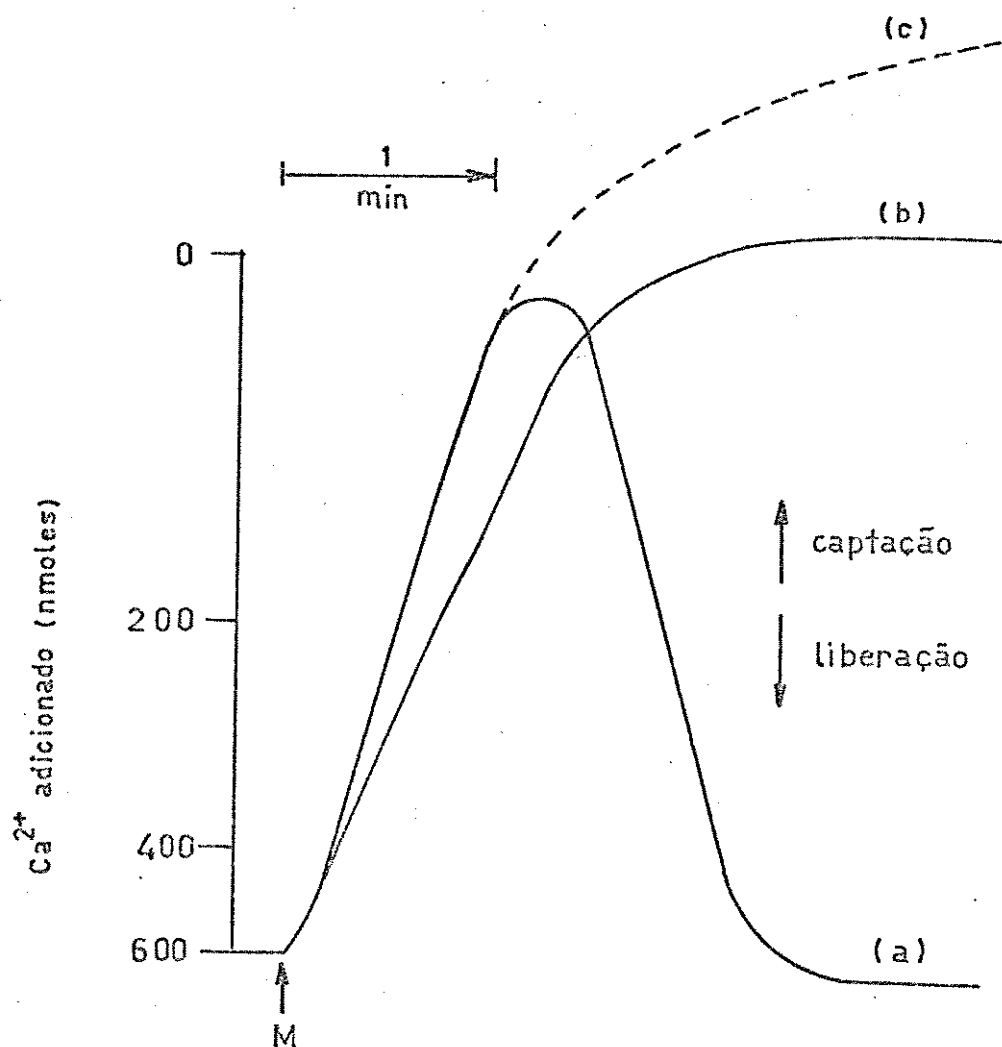


FIGURA 4 - Captação de Ca^{2+} por mitocôndrias hepáticas e cardíacas. O meio de incubação (5 ml) era o definido em Material e Método acrescido de rotenona 5 μM , succinato 1 mM e CaCl_2 600 nmoles. Em (a) mitocôndria de fígado e fosfato 1 mM; (b) mitocôndria de coração e fosfato 1 mM; (c) mitocôndria de fígado e fosfato 0,1 mM. Os experimentos eram iniciados com a adição de 5 mg de mitocôndria, assinalada pela letra M.

trons. Com a adição de Ca^{2+} a uma suspensão de mitocôndria respirando em estado-4, observa-se uma brusca transição no estado respiratório. No experimento com mitocôndria cardíaca (Figura 5A), pode ser verificado que a velocidade respiratória retorna ao estado anterior, após a captação de Ca^{2+} . Por outro lado, mitocôndria hepática (Figura 5B) apenas transitoriamente retorna ao estado respiratório-4, para em seguida ter sua velocidade respiratória incrementada sucessivamente com o tempo, até atingir a anaerobiose. Tal fato indica desacoplamento mitocondrial. A linha tracejada, representa um experimento realizado com mitocôndria hepática na ausência de fosfato exógeno. Neste caso pode ser observada a transição respiratória característica.

O aumento de volume mitocondrial é outro parâmetro útil na análise do grau de acoplamento das mitocôndrias. Também neste caso, o Ca^{2+} na presença de fosfato induz respostas diferentes por mitocôndrias cardíacas e hepáticas (Figura 6). A captação de Ca^{2+} por mitocôndria hepática na presença de fosfato, induz aumento de 70% no volume mitocondrial. Se entretanto acetato for usado como ânion permeante, a variação de volume é reduzida em 60%. O aumento de volume em mitocôndria cardíaca induzido pela captação de Ca^{2+} , mesmo na presença de fosfato, é praticamente desprezível quando comparado com mitocôndria hepática. Tal fato não indica desacoplamento mitocondrial, mas sim uma pequena variação de volume, devido à entrada de H_2O como consequência do aumento de pressão osmótica na matriz.

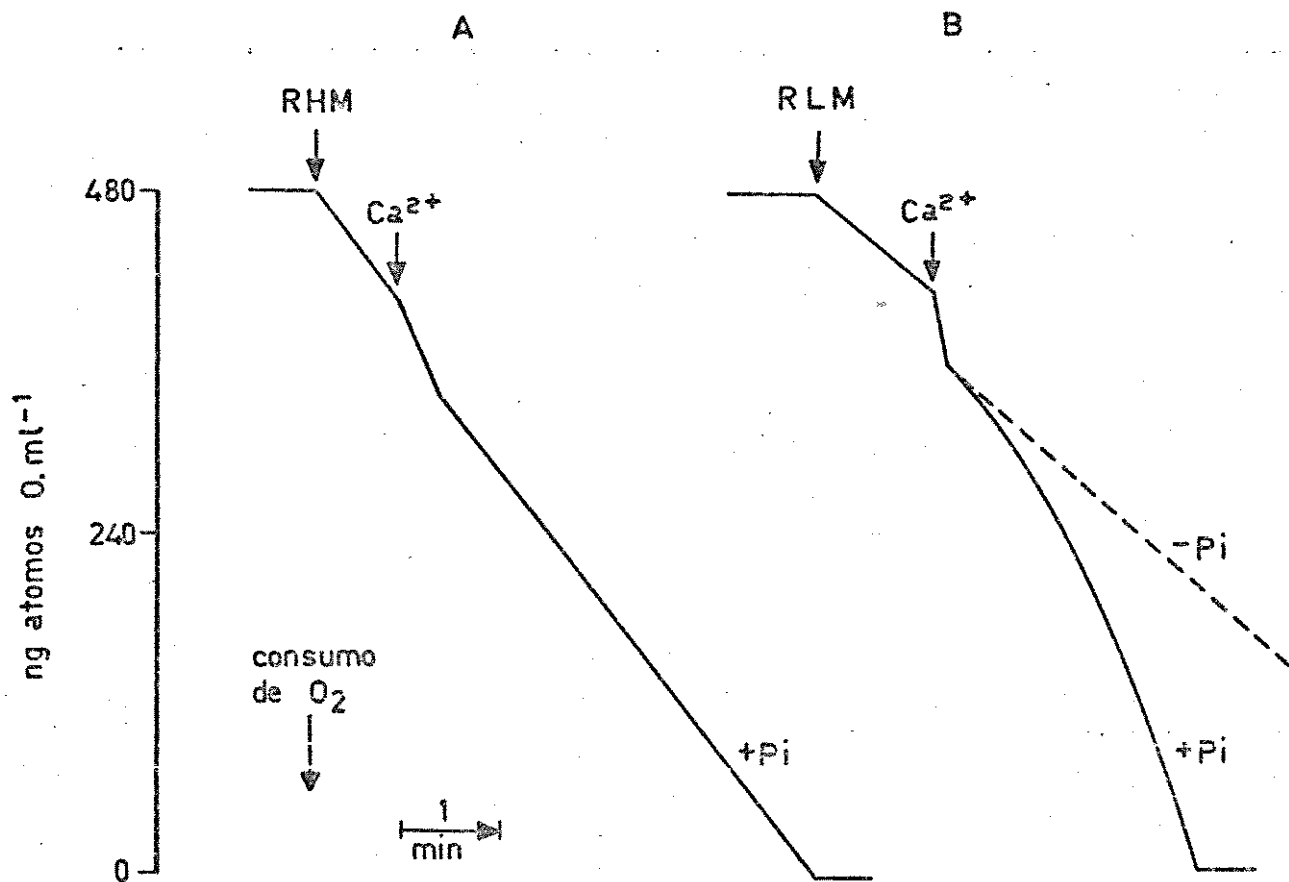


FIGURA 5 - Efeito da adição de Ca^{2+} sobre a respiração de mitocôndrias cardíacas e hepáticas. O meio de incubação (2 ml) era o padrão, definido em Material e Métodos, acrescido de rotenona 5 μM , succinato 1 mM, fosfato 1 mM e 2 mg de mitocôndria. (A) mitocôndria cardíaca (RHM); (B) mitocôndria hepática (RLM). $CaCl_2$ 160 nmoles era adicionado onde indicado.

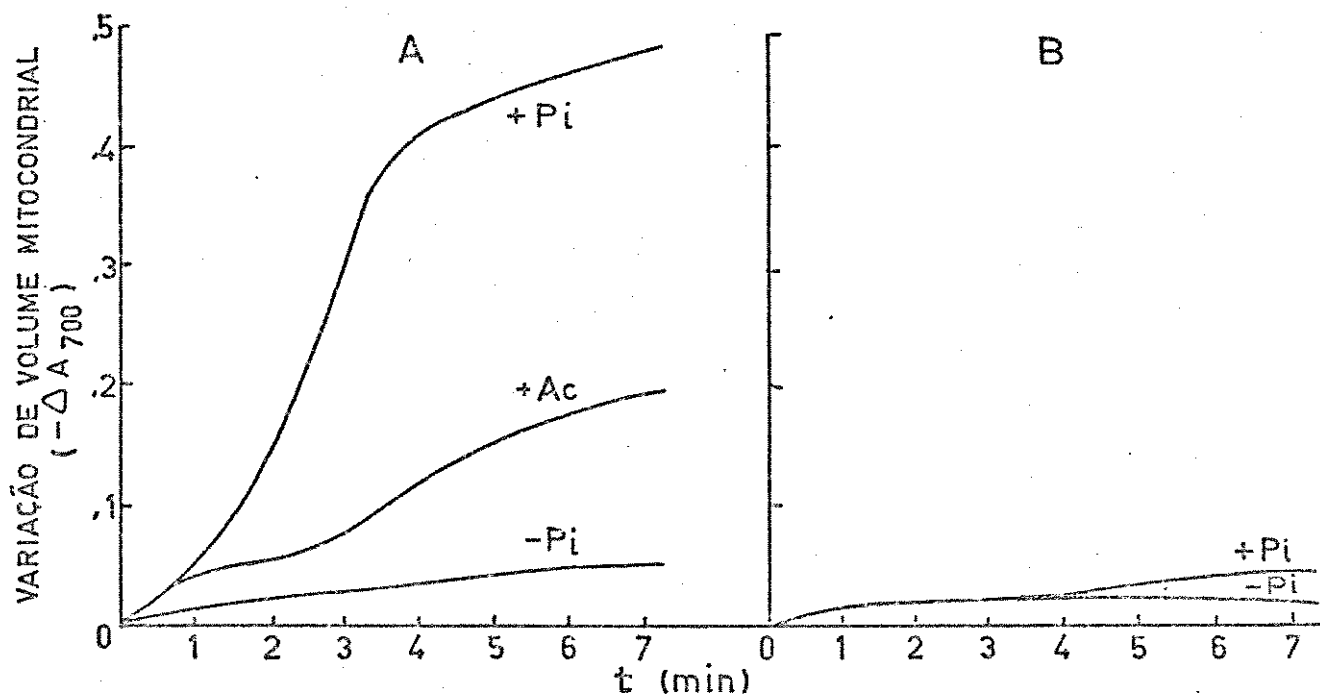


FIGURA 6 - Variação de volume de mitocôndrias hepáticas e cardíacas, induzida por Ca^{2+} e fosfato. O aumento de volume mitocondrial está expresso como diferença de absorvância em 700 nm. O meio de incubação (1 ml) era o padrão, acrescido de rotenona 10 μM e fosfato 1 mM ou acetato 10 mM, conforme indicado por (+Pi) ou (+Ac) respectivamente. (A) mitocôndria hepática 1 mg e CaCl_2 80 nmoles; (B) mitocôndria cardíaca 0,7 mg e CaCl_2 100 nmoles. A reação era iniciada com a adição de succinato 1 mM.

Liberação de Mg^{2+} endógeno por mitocôndrias cardíacas e hepáticas.

A análise da cinética de liberação do Mg^{2+} endógeno mitocondrial foi realizada, considerando-se o reconhecido papel deste cátion como estabilizador de membranas biológicas em geral (SETTLEMIRE e col., 1968; LEE e col., 1970; BINET e VOLFIN, 1975; REED, 1976; LIGET e FONYÖ, 1977; DUSZYŃSKI E WOJTCZAK, 1977).

Mitocôndria de fígado isolada pelo método anteriormente descrito, apresentava de 18 a 22 nmoles de Mg^{2+} /mg de proteína, enquanto mitocôndria cardíaca continha 16 a 18 nmoles de Mg^{2+} /mg de proteína.

Existe uma acentuada diferença na cinética de liberação de Mg^{2+} por mitocôndria hepática, dependendo da composição do meio de incubação (Figura 7A). A curva a apresenta um experimento típico realizado na presença de Ca^{2+} e fosfato 1 mM. Nesta condição é liberado cerca de 85% do Mg^{2+} endógeno. A reação é muito rápida e 40% do Mg^{2+} total é perdido no primeiro minuto. Este fenômeno é dependente de fosfato, que mesmo em concentração relativamente baixa como 0,3 mM, induz rápida liberação de Mg^{2+} (resultado não apresentado). Entretanto, com fosfato endógeno, curva c, a liberação é significativamente mais lenta e apenas 45% do Mg^{2+} total é liberado. Na presença de acetato como ânion permeante e NEM para inibir o transporte de fosfa

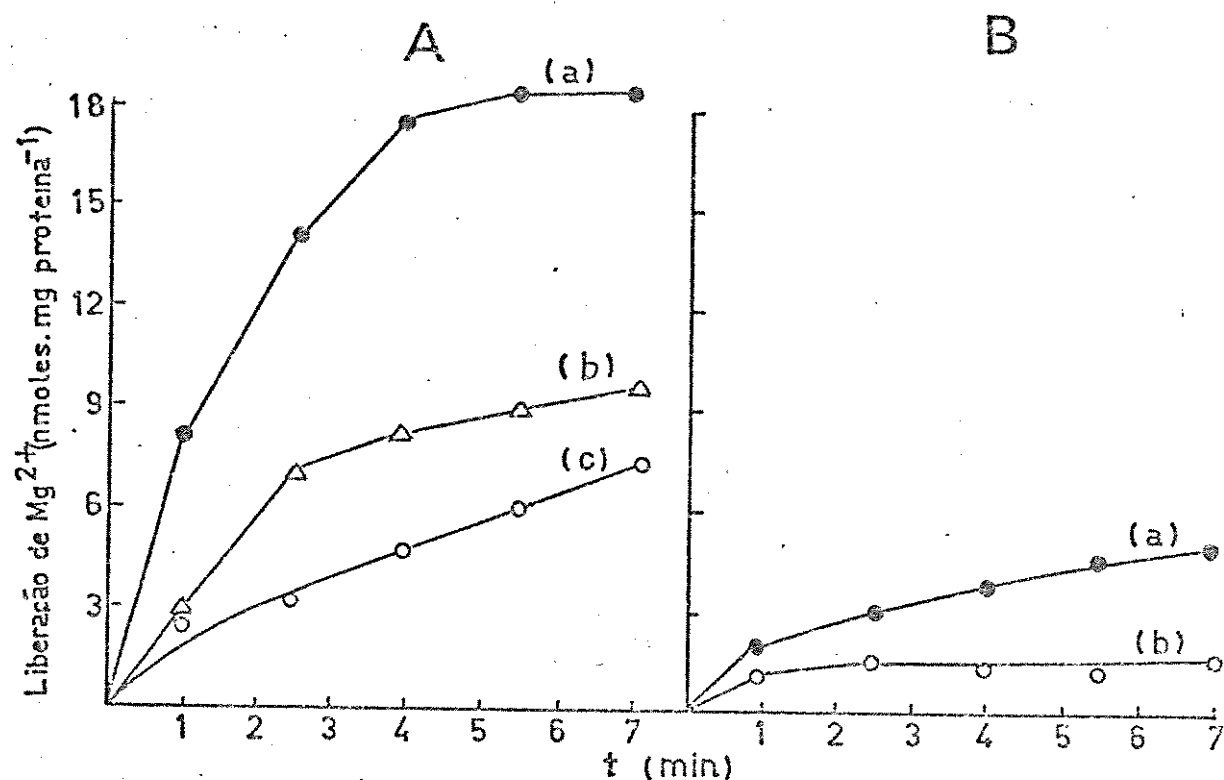


FIGURA 7 - Liberação de Mg^{2+} endôgeno mitocondrial, induzida por Ca^{2+} e fosfato. O meio de incubação (3 ml) era o padrão, acrescido de rotenona 5 μM , $CaCl_2$ 240 nmoles e mitocôndria 3 mg. Em (A) mitocôndria hepática na presença de fosfato 1 mM (●—●); acetato 10 mM e NEM 40 nmoles/mg de proteína (△—△); sem a adição de ânion permeante (○—○). Em (B) mitocôndria cardíaca na presença de fosfato 1 mM (●—●); sem a adição de ânion permeante (○—○).

to (JOHNSON e CHAPPELL, 1973; COTY e PEDERSEN, 1974) a liberação de Mg^{2+} endógeno é reduzida a metade daquela induzida por fosfato, curva b.

A cinética de liberação de Mg^{2+} endógeno durante a captação de Ca^{2+} por mitocôndria cardíaca, mostra-se profundamente diferente (Figura 7B). Nesta mitocôndria, apesar do conteúdo de Mg^{2+} ser ligeiramente menor que em mitocôndria hepática, este parece ser menos lábil à ação do Ca^{2+} e fosfato. Na presença de 80 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína e fosfato 1 mM, curva a, condição na qual mitocôndria hepática libera praticamente todo o Mg^{2+} endógeno, mitocôndria cardíaca tem o seu conteúdo diminuído em apenas 25%. O fosfato neste caso, induz apenas uma pequena alteração na quantidade de Mg^{2+} liberado, como evidenciado pela comparação com a curva b.

Efeito de Mg^{2+} sobre a retenção de Ca^{2+} por mitocôndria hepática

Os experimentos da Figura 8 mostram que o efluxo de Ca^{2+} -dependente de fosfato em mitocôndria hepática, pode ser prevenido por Mg^{2+} . Neste experimento, devido à interferência do Mg^{2+} na sensibilidade do eletrodo de Ca^{2+} , os movimentos deste último no meio de suspensão, foram seguidos indiretamente com eletrodo de hidrogênio. Assim a captação de Ca^{2+} era indicada pela acidificação do meio, enquanto a liberação do cátion, pela alcalinização do mesmo. O experimento controle, realizado

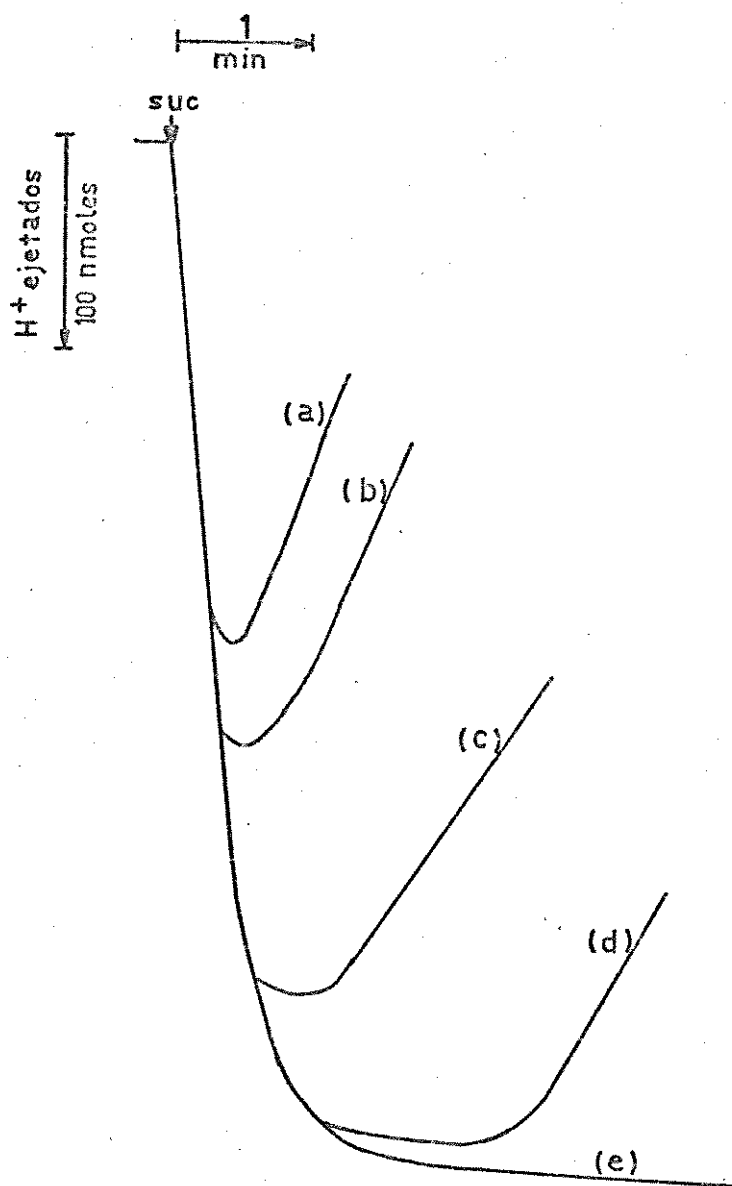


FIGURA 8 - Efeito de Mg^{2+} exógeno sobre a retenção de Ca^{2+} por mitocôndria hepática. O meio de incubação (5 ml) era o padrão, com as seguintes adições: rotenona 5 μM , fosfato 1 mM, CaCl_2 500 nmoles e mitocôndria hepática 2,8 mg. (a) controle, sem MgCl_2 ; (b) MgCl_2 1 mM; (c) MgCl_2 2 mM; (d) MgCl_2 2 mM; (e) MgCl_2 5 mM. A reação era iniciada com a adição de succinato 1 mM.

na ausência de Mg^{2+} exógeno, reproduz o resultado da Figura 4 . Como anteriormente, após a mitocôndria captar uma fração do Ca^{2+} adicionado, começa um efluxo do íon para o meio de suspensão evidenciado pelo movimento de H^+ em sentido contrário. Nos demais experimentos, $MgCl_2$ era adicionado em concentrações progressivamente maiores, até que na presença de $MgCl_2$ 5 mM, todo o Ca^{2+} adicionado (180 nmoles/mg de proteína) era acumulado por mitocôndria hepática, sem ocorrer efluxo.

Prevenção do desacoplamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e fosfato pela presença de Mg^{2+} exógeno.

O efeito de Mg^{2+} na preservação de capacidade fosforilativa de mitocôndria hepática, após a captação de Ca^{2+} era determinado pela adição de ADP ao meio de reação contendo diferentes concentrações de Mg^{2+} exógeno. Como pode ser observado na Figura 9, o magnésio previne o desacoplamento induzido por Ca^{2+} e fosfato. Comparando-se os traçados (a), (b), (c) e (d), observa-se que a diminuição da concentração de Mg^{2+} exógeno , acarreta perda pela mitocôndria hepática após a captação de Ca^{2+} , da capacidade de fosforilar ADP. No traçado a é visível o estímulo respiratório induzido tanto por Ca^{2+} quanto ADP. Entretanto, nos demais, com a diminuição progressiva da concentração de $MgCl_2$, a mitocôndria perde a capacidade de fosforilar o ADP, ou seja, é necessário a presença de Mg^{2+} exógeno para que a

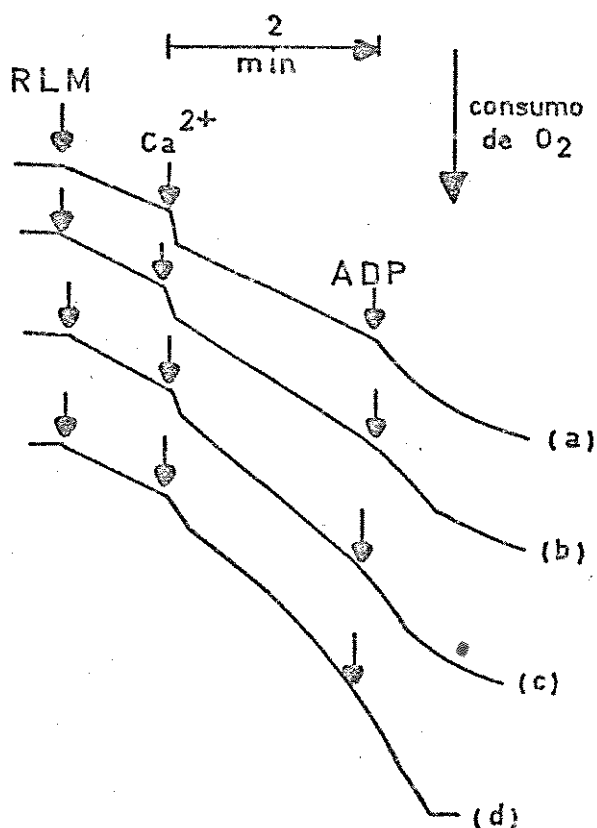


FIGURA 9 - Prevenção do desacoplamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e fosfato por Mg^{2+} exógeno. O meio de incubação (2 ml) era o padrão, acrescido de rotenona 5 μM , succinato 1 mM, fosfato 1 mM e mitocôndria hepática 4 mg. CaCl_2 320 nmoles e ADP 400 nmoles eram adicionados onde indicado pelas setas. Em (a) MgCl_2 5 mM, (b) MgCl_2 2 mM, (c) MgCl_2 1 mM e (d) sem MgCl_2 .

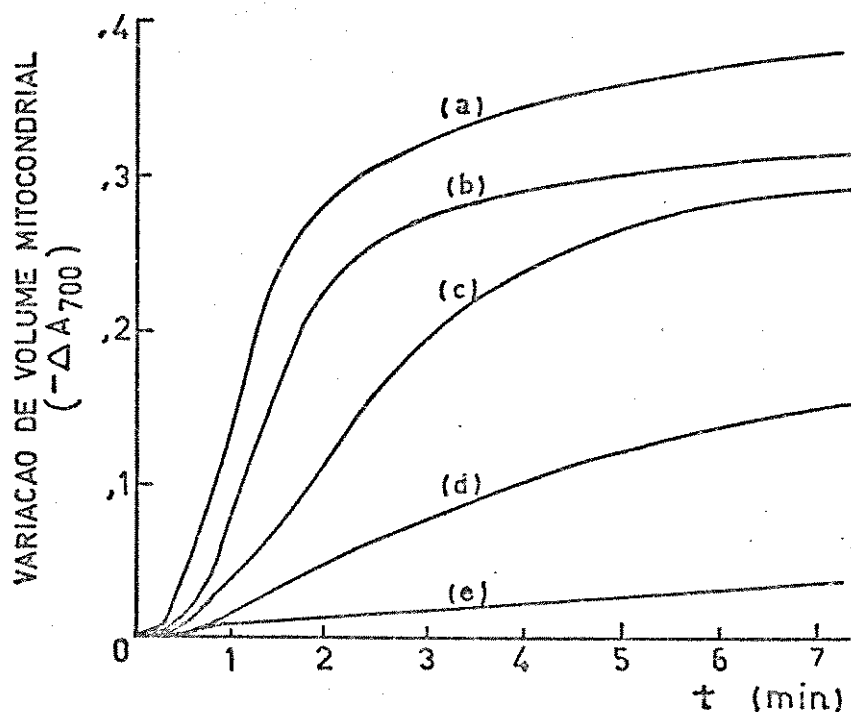


FIGURA 10 - Inibição por Mg^{2+} do aumento de volume mitocondrial induzido por Ca^{2+} e fosfato. O meio de incubação (1 ml) era o padrão, acrescido de rotenona 10 μM , fosfato 1 mM, $CaCl_2$ 40 nmoles e mitocôndria hepática 0,5 mg. Em (a) controle sem $MgCl_2$, (b) $MgCl_2$ 1 mM, (c) $MgCl_2$ 2 mM, (d) $MgCl_2$ 5 mM e (e) $MgCl_2$ 10 mM. O experimento era iniciado com a adição de succinato 1 mM.

mitocôndria hepática permaneça acoplada após a captação de Ca^{2+} .

O aumento de volume mitocondrial induzido por Ca^{2+} e fosfato é prevenido igualmente por Mg^{2+} (Figura 10). Quando MgCl_2 era adicionado à suspensão mitocondrial em concentração de 1, 2, 5 e 10 mM ocorria inibição de 20, 30, 55 e 90% respectivamente, do aumento de volume de mitocôndria hepática.

Prevenção por vermelho de rutênio do desacoplamento induzido por Ca^{2+} e fosfato.

O vermelho de rutênio é um conhecido inibidor não competitivo da captação de Ca^{2+} em mitocôndria, cujo modo de ação acredita-se ser através de ligação covalente com a molécula translocadora de Ca^{2+} (REED e BYGRAVE, 1974 e SANDRI e col., 1976).

O efeito do fosfato quando adicionado após o término da captação de Ca^{2+} por mitocôndria hepática, com ou sem adição anterior de vermelho de rutênio, é mostrado na Figura 11. Neste experimento, mitocôndria era adicionada ao meio contendo Ca^{2+} na presença ou ausência de Mg^{2+} . Fosfato era adicionado somente após a captação de Ca^{2+} ter ocorrido, como mostrado pelo traçado de Ca^{2+} e pelo retorno da respiração a estado-4. Pode ser notado que o fosfato induz, aumento imediato na velocidade da respiração, efluxo de Mg^{2+} e entumescimento mitocondrial, enquanto apenas uma pequena liberação de Ca^{2+} ocorre (Figura 11A).

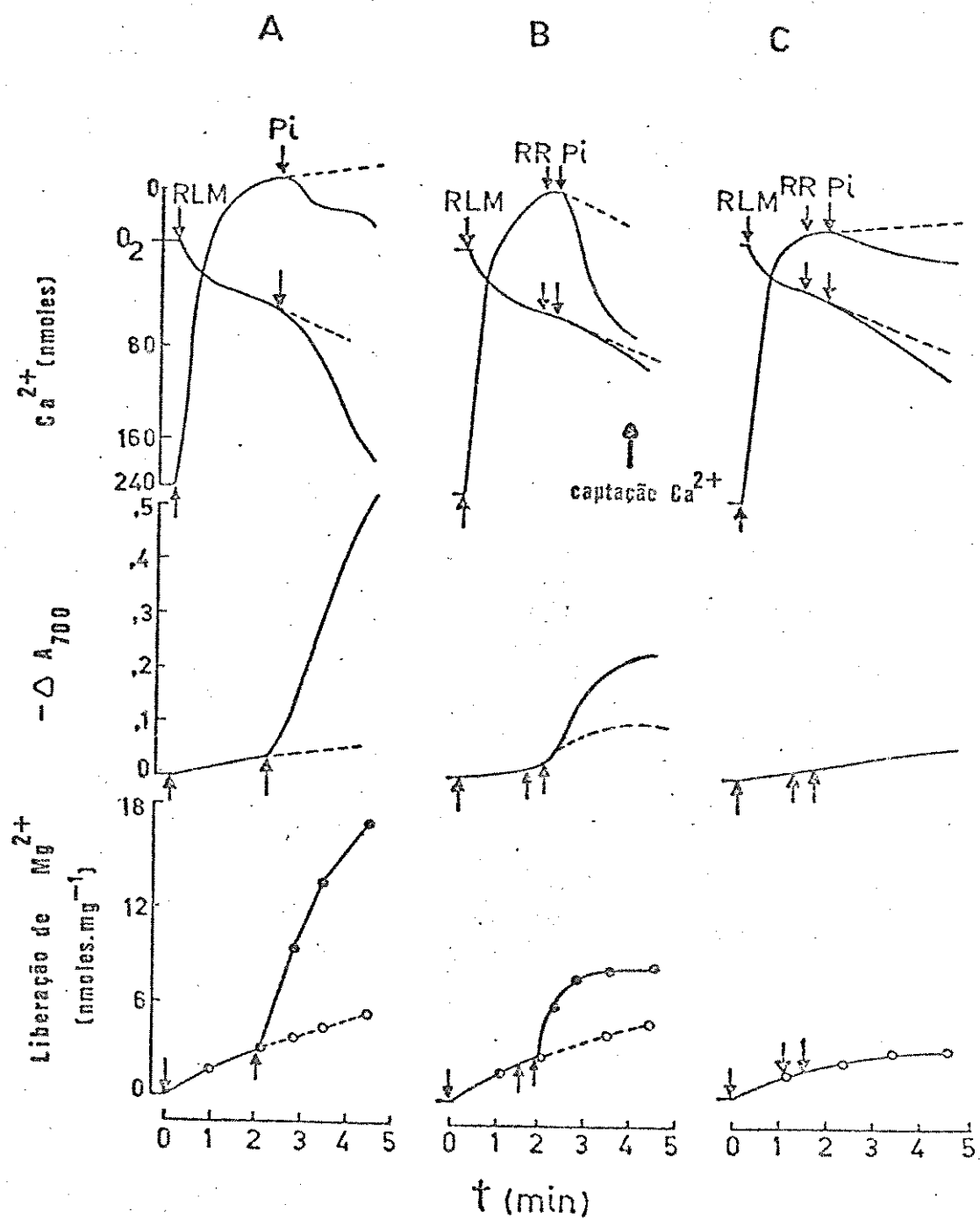


FIGURA 11

FIGURA 11 - Efeito do fosfato quando adicionado após a captação de Ca^{2+} sobre a respiração, retenção de Ca^{2+} , aumento de volume e liberação de Mg^{2+} por mitocôndria hepática. O meio de incubação (3 ml) era o padrão, acrescido de rotenona 5 μM , succinato 1 mM, CaCl_2 240 nmoles e mitocôndria hepática (RLM) 4 mg. Onde indicado, fosfato 1 mM, MgCl_2 5 mM e vermelho de rutênio, em quantidade suficiente para inibir completamente a captação de Ca^{2+} , eram adicionados. Em (A) fosfato; (B) vermelho de rutênio (RR) e fosfato; (C) vermelho de rutênio e fosfato, na presença de Mg^{2+} . As linhas tracejadas indicam experimentos nos quais fosfato foi omitido.

Por outro lado, a adição de vermelho de rutênio anteriormente ao fosfato, Figura 11B, previne o aumento na velocidade de consumo de oxigênio por mitocôndria hepática, enquanto uma quantidade apreciável de Ca^{2+} acumulado era rapidamente liberado. Entretanto, a amplitude do efluxo de Mg^{2+} e do entumescimento mitocondrial eram significativamente diminuídos por vermelho de rutênio. A presença de MgCl_2 5 mM no meio de incubação, bloqueia completamente o efluxo de Ca^{2+} induzido por fosfato, como pode ser visto quando fosfato era adicionado após vermelho de rutênio (Figura 11C). Além disso, o efluxo de Mg^{2+} e o entumescimento mitocondrial eram praticamente ausentes na presença de Mg^{2+} exógeno.

No experimento com mitocôndria cardíaca (Figura 12), a adição de fosfato não alterava significativamente a velocidade respiratória nem induzia o efluxo de Ca^{2+} . Também a liberação de Mg^{2+} e entumescimento mitocondrial, após a adição de fosfato ocorriam com pouca amplitude, tanto na presença quanto ausência de vermelho de rutênio. Estes fatos demonstram que Ca^{2+} e fosfato nestas concentrações não tem efeitos deletérios sobre a estabilidade da membrana de mitocôndria cardíaca.

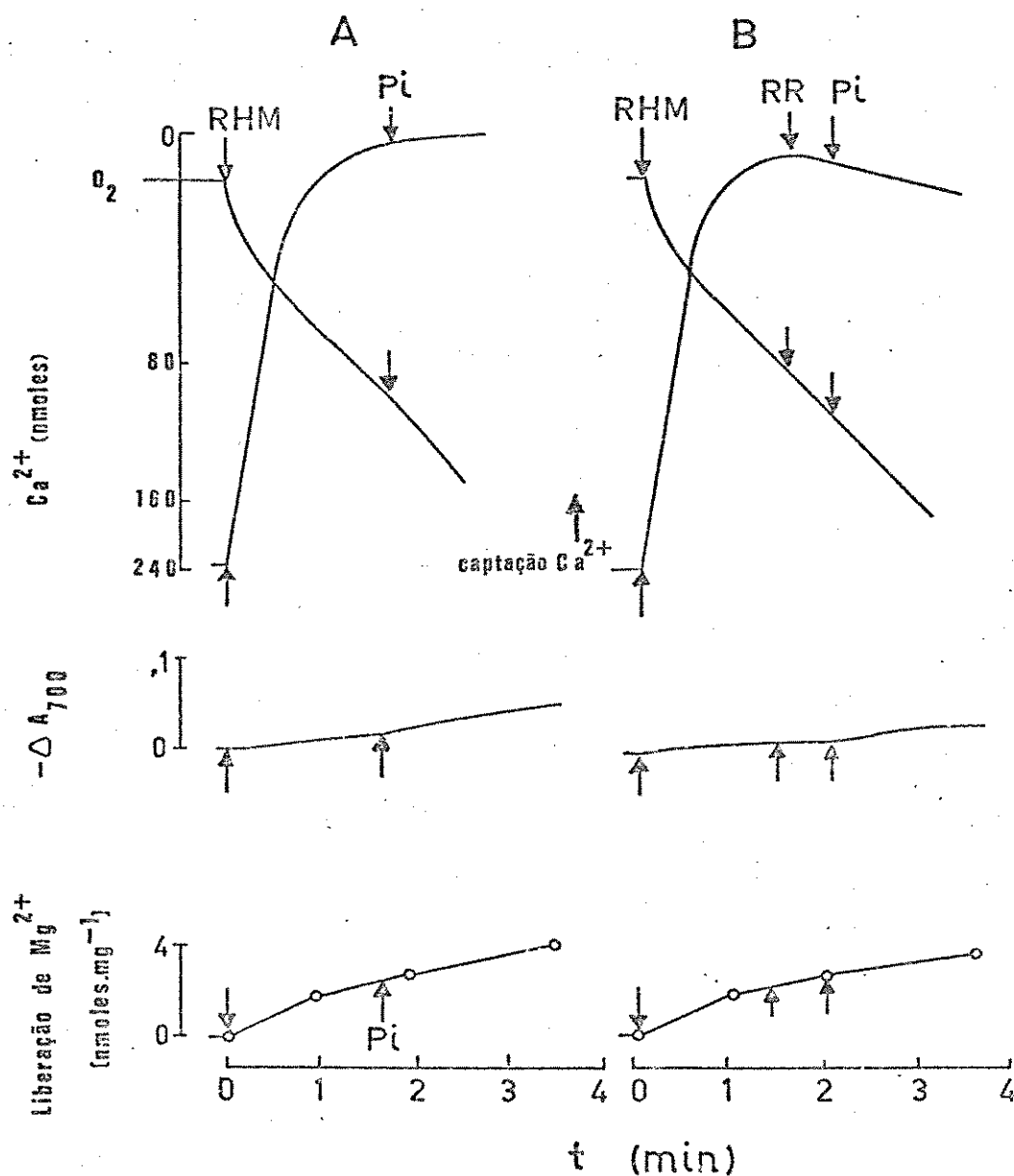


FIGURA 12 - Efeito do fosfato quando adicionado após a captação de Ca^{2+} sobre a respiração, retenção de Ca^{2+} , aumento de volume e liberação de Mg^{2+} por mitocôndria cardíaca. Meio de incubação e condições experimentais idênticas às da figura 11. Em (A) fosfato; (B) vermelho de rutênio e fosfato.

Efeito do estado de óxido-redução do NAD(P) sobre a capacidade de mitocôndria acumular Ca^{2+} .

O estado de óxido-redução do NAD(P), modifica a capacidade de retenção de Ca^{2+} e Mg^{2+} por mitocôndria, como mostrado na Figura 13. Quando na presença de rotenona, o NAD(P) é mantido no estado reduzido (LEHNINGER e col., 1978 c), às custas de substratos endógenos. Na Figura 13A, succinato era fornecido como substrato respiratório na presença de rotenona. Nesta situação não era observada liberação de Mg^{2+} , nem entumescimento mitocondrial. Além disto Ca^{2+} era retido no interior da mitocôndria. Entretanto, quando rotenona era omitida, o Ca^{2+} era apenas parcialmente captado e uma rápida liberação de Mg^{2+} com aumento de volume mitocondrial verificado.

O efeito da concentração de substratos-dependentes de NAD sobre a retenção de Ca^{2+} por mitocôndria cardíaca está expresso na Figura 13B. Com piruvato-malato em concentração elevada, igual ou maior que 2 mM, a captação de Ca^{2+} ocorria normalmente, à despeito do ligeiro entumescimento e liberação de metade do Mg^{2+} endógeno. Ao contrário, quando a concentração desses substratos era diminuída para 0,3 mM, o Ca^{2+} não era retido, o Mg^{2+} endógeno era completamente perdido e um grande aumento de volume era observado. É importante considerar que a liberação de Ca^{2+} ocorre antes da respiração ser interrompida pela perda de nucleotídeos de piridina, como descrito por

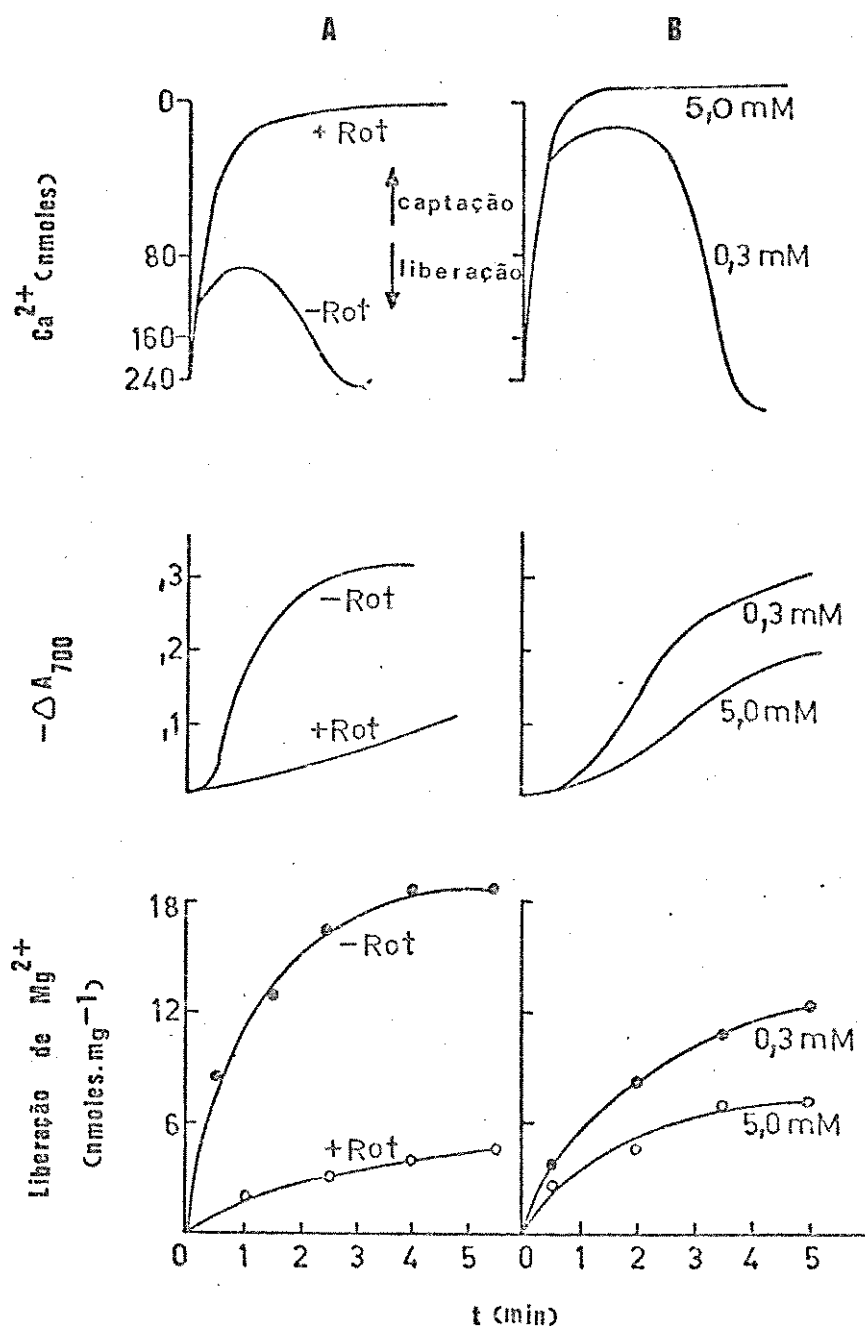


FIGURA 13 - Retenção de Ca^{2+} , aumento de volume e liberação de Mg^{2+} por mitocôndria cardíaca, quando na ausência de rotenona. O meio de incubação (3 ml) era o padrão, acrescido de fosfato 1 mM, mitocôndria cardíaca (RHM) 3 mg e como substrato respiratório, em (A) succinato 1 mM na presença ou ausência de rotenona 5 μM e em (B) piruvato 5 mM e malato 5 mM ou piruvato 0,3 mM e malato 0,3 mM.

VINOGRADOV e col. (1972). Estes resultados estão de acordo com o trabalho de LEHNINGER e col. (1978 c), mostrando que a retenção de Ca^{2+} por mitocôndria é fortemente favorecida, pelo estado reduzido dos nucleotídeos de piridina endógenos da mitocôndria.

Efeito do estrôncio sobre o desacoplamento induzido por Ca^{2+} e fosfato.

O estrôncio é transportado por mitocôndria, utilizando o mesmo sistema carreador de Ca^{2+} . Entretanto, não tem efeito deletério sobre a fisiologia da organela, mesmo na presença de fosfato. Isto pode ser inferido, a partir da Figura 14A, pelo retorno da respiração à velocidade normal característica de estado-4, após o término da captação de Sr^{2+} por mitocôndria hepática. Mesmo concentrações de Sr^{2+} bastante elevadas, podem ser captadas sem ocorrer desacoplamento da respiração, liberação de Mg^{2+} endógeno ou entumescimento mitocondrial (Figura 14B). Nestes experimentos, o movimento de Sr^{2+} era medido indiretamente por um eletrodo de pH.

Um aspecto interessante era o efeito do Sr^{2+} e Mg^{2+} , quando adicionado após a captação de Ca^{2+} (Figura 15). Ambos reacoplavam a respiração, à qual seguiria em alta velocidade devido à ação desestabilizadora do Ca^{2+} e fosfato sobre a membrana mitocondrial. Entretanto, o Sr^{2+} e Mg^{2+} tem efeitos dis

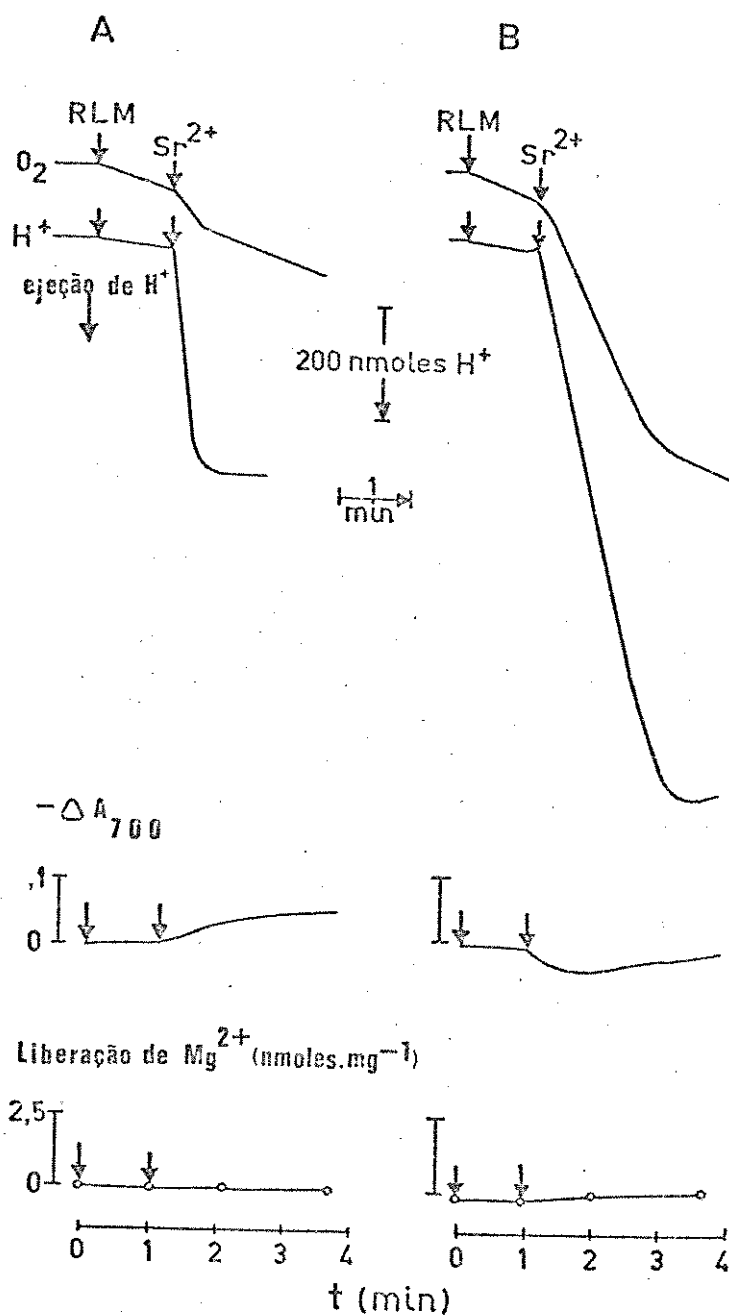


FIGURA 14 - Captação de Sr^{2+} , efeito sobre a respiração, variação de volume e liberação de Mg^{2+} por mitocôndria hepática. O meio de incubação (2 ml) era o padrão acrescido de rotenona 5 μM , succinato 1 mM e mitocôndria (RLM) 4 mg. Em (A) SrCl_2 320 nmoles; (B) SrCl_2 2400 nmoles.

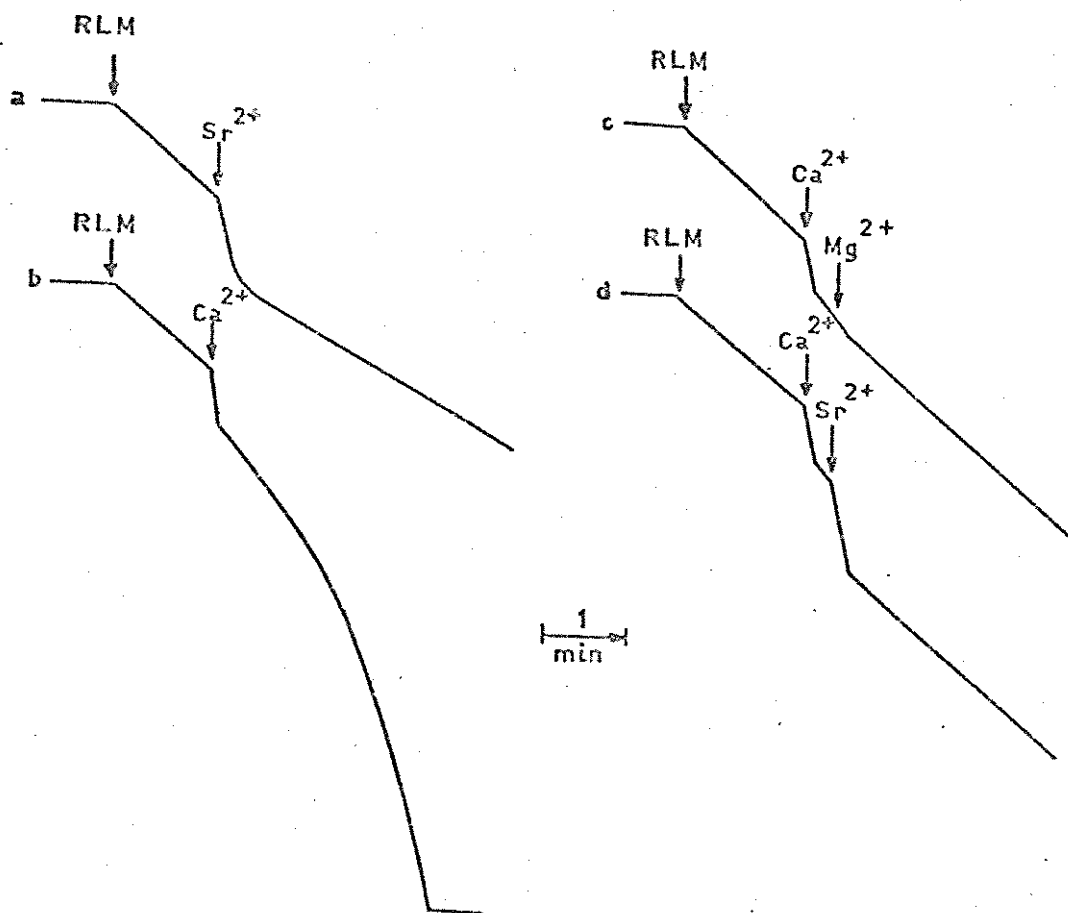


FIGURA 15 - Comparação entre os efeitos de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+} sobre a respiração mitocondrial. O meio de incubação (2 ml) era o padrão, acrescido de rotenona 5 μM , succinato 1 mM, fosfato 1 mM e mitocôndria hepática 2 mg. CaCl_2 160 nmoles, MgCl_2 400 nmoles e SrCl_2 400 nmoles eram adicionados onde indicado.

tintos em um aspecto. Enquanto Mg^{2+} não era transportado por mitocondria hepática e por este motivo um novo estímulo respiratório não era observado, o Sr^{2+} determina uma nova transição respiratória após a induzida por Ca^{2+} , seguida da volta ao estado-4.

DISCUSSÃO

O efeito desacoplador do fosfato sobre mitocôndria hepática, quando adicionado após a captação de Ca^{2+} , foi demonstrado alguns anos atrás por ROSSI e LEHNINGER (1964). O mesmo efeito foi verificado posteriormente por DARGEL (1974), quando da adição de Ca^{2+} a uma suspensão de mitocôndria hepática respirando com substrato endógeno. Outros fenômenos associados ao transporte de Ca^{2+} por mitocôndria hepática são a perda de substrato endógeno, principalmente NAD(P) (VINOGRADOV e col., 1972), o aumento de volume mitocondrial e a mudança de configuração do estado condensado para ortodoxo (HUNTER e col., 1976). Todos esses fenômenos são verificados com a captação de quantidades relativamente moderadas de Ca^{2+} . Por outro lado, mitocôndria cardíaca quando comparada com mitocôndria hepática "in vitro", mostra-se mais resistente ao desacoplamento causado por Ca^{2+} . Esta mitocôndria é capaz de captar e reter na matriz em presença de fosfato, rotenona e succinato, quantidades de Ca^{2+} bastante elevadas, cerca de 2500 nmoles/mg de proteína, sem a ocorrência de qualquer dano à fisiologia da organela (VERGESI e col., 1978).

Nossos resultados demonstram que, o aumento inespecífico de permeabilidade da membrana interna, causado pela liberação de Mg^{2+} -induzida por Ca^{2+} e fosfato, é o fator preponderante no desacoplamento de mitocôndria hepática, como discutido por SILIPRANDI e col. (1977). Segundo esses autores, a libera-

ção de Mg^{2+} é o resultado de sucessivos ciclos de captação-liberação de Ca^{2+} , induzido por fosfato. Esta reciclagem de Ca^{2+} através da membrana, desloca o Mg^{2+} de seus sítios de ligação e em consequência ocorre desestabilização da membrana, com aumento de permeabilidade. Em mitocôndria cardíaca, nossos resultados indicam que não ocorre reciclagem de Ca^{2+} através da membrana, daí a maior habilidade desta, em reter o Ca^{2+} acumulado (Figuras 4-7). A especificidade do fosfato em induzir a reciclagem de Ca^{2+} pode ser avaliada a partir da comparação com acetato na indução de aumento de volume mitocondrial (Figura 6). Ambos os ânions formam com o Ca^{2+} em baixas concentrações, sais solúveis na matriz mitocondrial (acetato e fosfato de Ca^{2+}). Entretanto, enquanto a turgescência moderada induzida por acetato é consequência da entrada de água, em resposta ao aumento de osmolaridade da matriz, a turgescência induzida por fosfato é fruto da permeabilidade da membrana a K^+ e Cl^- e sacarose, como sugerido por HUNTER e col. (1976).

O efeito protetor do Mg^{2+} exógeno sobre a estabilidade de mitocôndria hepática (Figuras 8-10), segundo nossos dados, parece não ser consequência direta da inibição da liberação de Mg^{2+} , mas sim inibição da liberação de Ca^{2+} , o que corrobora os dados de BINET e VOLFIN (1974). Nós atribuímos este fenômeno à inibição por Mg^{2+} de uma das etapas da reciclagem de Ca^{2+} , especificamente a supressão da etapa de efluxo-insensível a vermelho de rutênio. Testamos esta hipótese, verificando se a

ação de outros inibidores da reciclagem de Ca^{2+} teria o mesmo efeito do Mg^{2+} . Sua comprovação é fornecida pelo experimento da Figura 11, na qual fica evidente que o vermelho de rutênio previne o desacoplamento induzido por Ca^{2+} e fosfato, através da inibição da reciclagem de Ca^{2+} na etapa de captação. Concluindo, a inibição de qualquer das etapas da reciclagem de Ca^{2+} , liberação ou captação, tem efeito estabilizador sobre a membrana, por que inibe o deslocamento do Mg^{2+} por Ca^{2+} .

Foi demonstrado por BINET e VOLFIN (1975), através de um elegante trabalho usando o ionóforo A23187 e clorotetraciclina (a qual é fluorescente unicamente quando ligada a Mg^{2+} ou Ca^{2+} em um ambiente apolar), que apenas com a liberação da fração de Mg^{2+} ligada à membrana, ocorre a permeabilização da mesma. Nossos experimentos (Figura 11) confirmam este resultado através de outra abordagem. Os efeitos do vermelho de rutênio, sobre as cinéticas de liberação de Mg^{2+} endógeno e aumento de volume, guardam íntima correlação e a inibição da liberação de uma pequena fração de Mg^{2+} endógeno, presumivelmente daquele ligado a membrana, basta para que ocorra inibição do aumento de volume mitocondrial.

O estado de óxido-redução dos nucleotídeos de piridina, foi demonstrado por LEHNINGER e col. (1978 c) regular a liberação de Ca^{2+} por mitocôndria. Nossos resultados demonstram que a oxidação dos referidos nucleotídeos induz à liberação de Ca^{2+} mitocondrial por uma via insensível a vermelho de

rutênio. A reciclagem deste Ca^{2+} , causa também liberação do Mg^{2+} ligado à membrana. Os experimentos realizados com mitocôndria cardíaca quando energizada por succinato na ausência de rotenona, ou por substratos dependentes de NAD, mostram nesta mitocôndria os mesmos tipos de alterações causadas pelo transporte de Ca^{2+} por mitocôndria hepática (Figura 13). O efluxo de Ca^{2+} neste caso, é devido ao estado predominantemente oxidado do NAD. Tal fato é evidenciado pelo aumento na velocidade de liberação de Ca^{2+} , quando a concentração de substrato era reduzida, o que desloca o equilíbrio para NAD oxidado.

O título de grupamentos -SH de membrana de mitocôndria varia tanto em mitocôndria isolada quanto partícula submitocondrial (HATASE e col., 1977). Esses autores observaram que a energização da mitocôndria resulta em decréscimo do título de -SH da membrana, dosados por DTNB. A amplitude deste decréscimo depende do substrato utilizado e é aumentado por substratos dependentes de NAD. Além disso, fosfato induz posterior diminuição no título de sulfidríla. Outros reagentes de grupamentos -SH como NEM (PFEIFFER e col., 1977) e diamida (SILIPRANDI e col., 1974) induzem liberação de Ca^{2+} e aumento de volume em mitocôndria hepática, possivelmente, através da oxidação dos grupos sulfidrílas da membrana, o que resulta em alteração da estrutura da mesma. Estas observações coadunam-se perfeitamente com nossos resultados (Figura 11-13) e sugerem um envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos da membrana, no controle das pro-

priedades de permeabilidade da organela.

Os experimentos sobre captação de Sr^{2+} por mitocôndria de fígado apresentados neste trabalho, são relevantes no sentido de esclarecer quais vias estão envolvidos nos movimentos de Ca^{2+} através da membrana, e também indicam que a presença dos cátions (Ca^{2+} ou Sr^{2+}) no interior da mitocôndria, não induz deterioração mitocondrial aparente, o que é evidenciado pela ausência de turgescência ou liberação de Mg^{2+} .

Os dados apresentados na figura 14 mostram que o Sr^{2+} é acumulado de maneira quase quantitativa por mitocôndria de fígado incubada com concentrações relativamente altas de fosfato. Além disso, o Sr^{2+} é retido no interior da mitocôndria por tempo indeterminado, sendo este comportamento contrastante com o do Ca^{2+} , o qual sofre reciclagem através da membrana. Tal fato indica que embora o Sr^{2+} seja captado por mitocôndria através do sistema transportador de Ca^{2+} , sensível a vermelho de rutênio, é incapaz de "sair" através da via de liberação de Ca^{2+} induzida por fosfato. Esta observação, é uma forte evidência de que a via de efluxo é muito mais específica para Ca^{2+} , que o sistema de influxo sensível à vermelho de rutênio. Outra observação extraída da figura 14, é o fato de que mesmo quando incubada com quantidades relativamente altas de Sr^{2+} , quanto 600 nmoles por mg de proteína, mitocôndria hepática não apresenta alterações drásticas na sua fisiologia, indicando que a presença de Sr^{2+} na matriz não é detrimental. Como o Sr^{2+} não recicla através da mem

brana, tal fato reforça o argumento de que é a reciclagem, e não a captação de cátion "per se", o fator determinante da deterioração mitocondrial. Outro resultado que corrobora esta hipótese é apresentado na figura 15, onde é visível que a adição de Mg^{2+} ou Sr^{2+} , imediatamente após a captação de Ca^{2+} , reacopla a respiração mitocondrial. Tal efeito pode ser atribuído em ambos os casos à inibição da reciclagem de Ca^{2+} .

Finalmente, deve ser ressaltado que as diferentes habilidades de mitocôndrias cardíacas e hepáticas quanto a captação e reciclagem de Ca^{2+} , pode ser dependente de características diferentes do sistema de transporte de fosfato, nestes dois tipos de mitocôndria.

RESUMO

Medidas simultâneas da captação de Ca^{2+} , consumo de oxigênio, efluxo de Mg^{2+} endógeno e aumento de volume em mitocôndrias cardíacas e hepáticas, energizadas por succinato na presença de rotenona, mostraram que mitocôndria cardíaca é mais resistente ao desacoplamento induzido por Ca^{2+} e fosfato, que mitocôndria hepática. A extensão do efluxo de Mg^{2+} e entumescimento mitocondrial, induzidos pelo acúmulo de Ca^{2+} , são também muito menos pronunciados em mitocôndria cardíaca. O desacoplamento e aumento de volume em mitocôndria hepática, foi demonstrado ser resultado da perda de Mg^{2+} ligado à membrana, em consequência da reciclagem de Ca^{2+} induzida por fosfato através da membrana. Mg^{2+} exógeno protege a mitocôndria hepática contra o efeito deletério do Ca^{2+} , através da inibição do efluxo de Ca^{2+} insensível à vermelho de rutênio induzido por fosfato. Este último não induz reciclagem de Ca^{2+} em mitocôndria cardíaca. Por outro lado, quando mitocôndria cardíaca é energizada com substratos-dependentes de NAD ou com succinato na ausência de rotenona, comporta-se como mitocôndria hepática quanto às alterações induzidas pelo movimento de Ca^{2+} . Neste caso, a reciclagem de Ca^{2+} é consequência do estado mais oxidado dos nucleotídeos de piridina mitocondrial.

SUMMARY

Parallel measurements of Ca^{2+} uptake, oxygen consumption, endogenous Mg^{2+} efflux and swelling in rotenone poisoned rat liver and rat heart mitochondria, showed that heart mitochondria is much more resistant to uncoupling by Ca^{2+} in the presence of phosphate than rat liver mitochondria. The extents of Mg^{2+} efflux and swelling induced by Ca^{2+} accumulation are also much less pronounced in heart mitochondria. Uncoupling and swelling in liver mitochondria seems to be a result of the loss of membrane bound Mg^{2+} as a consequence of Ca^{2+} recycling across the membrane induced by phosphate. Exogenous Mg^{2+} protects liver mitochondria against the deleterious effects of Ca^{2+} by inhibiting a ruthenium red-insensitive Ca^{2+} efflux induced by phosphate. Phosphate does not induce recycling of Ca^{2+} in heart mitochondria. On the other hand when respiring on NAD-linked substrates or with succinate in the absence of rotenone heart mitochondria behave like liver mitochondria with respect to the alterations caused by Ca^{2+} movements. In this case the recycling of Ca^{2+} is a consequence of the more oxidized state of mitochondrial Pyridine Nucleotides.

BIBLIOGRAFIA

- AKERMAN, K.E.; SARIS, N.E.L. and JARVISALO, J.O. Mitochondrial "High-affinity" binding sites for Ca^{2+} -fact or artefact ? Biochem.Biophys.Res.Comm., 58(3):801-807, 1974.
- AKERMAN, K.E.O.; WIKSTROM, M.K.F. and SARIS, N.E. Effect of inhibitors on the sigmoidicity of the calcium ion transport kinetics in rat liver mitochondria. Biochim.Biophys.Acta, 464: 287-294, 1977.
- ALEXANDRE, A.; REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of vectorial H^+ movements coupled to electron transport and to ATP synthesis in mitochondria. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75(11):5296-5300, 1978.
- AZZI, A. and CHANCE, B. The "energized state" of mitochondria: lifetime and ATP equivalence. Biochim.Biophys.Acta, 189:141-151, 1969.
- AZZONE, G.F.; POZZAN, T.; MASSARI, S.; BRAGADIN, M. and DELL'ANTONE, P. H^+ /site ratio and steady state distribution of divalent cations in mitochondria. FEBS Letters, 78(1):21-24, 1977.
- BINET, A. and VOLFIN, P. ADP requirement for prevention by a cytosolic factor of Mg^{2+} and Ca^{2+} release from rat liver mitochondria. Arch.Biochem.and Biophys., 164: 756-764, 1974

- BINET, A. and VOLFIN, P. Effect of the A23187 ionophore on mitochondrial membrane Mg^{2+} and Ca^{2+} . FEBS Letters, 49(3): 400-403, 1975.
- BIRMINGHAM, M.K.; ELLIOTT, F.A. and VALÈRE, P.H.L. The need for the presence of calcium for the stimulation in vitro of rat adrenal glands by adrenocorticotrophic hormone. Endocrinology, 53:687-689, 1953.
- BOGUCKA, K. and WOJTCZAK, L. Intramitochondrial distribution of magnesium. Biochem.Biophys.Res.Comm., 44(6):1330-1337, 1971.
- BRIERLEY, G.P.; BACHMANN, E. and GREEN, D.E. Active transport of inorganic phosphate and magnesium ions by beef heart mitochondria. Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 48: 1928-1935, 1962.
- BRIERLEY, G.; MURER, E.; BACHMANN, E. and GREEN, D.E. Studies on ion transport. II. The accumulation of inorganic phosphate and magnesium ions by heart mitochondria. J.Biol.Chem., 238(10): 3482-3489, 1963.
- BYGRAVE, F.L. Mitochondrial calcium transport. Curr.Topics in Bioenergetics, 6:260-318, 1977.
- CARAFOLI, E. Active accumulation of Sr^{2+} by rat-liver mitochondria. III. Stimulation of respiration by Sr^{2+} and its stoichiometry. Biochim.Biophys.Acta, 97: 107-117, 1965.

- CARAFOLI, E. Mitochondrial calcium transport and calcium binding proteins. In: PACKER, L. and GÓMEZ-PUYOU, A. Mitochondria: Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure. New York, Academic Press, 1976.
- CARAFOLI, E. and AZZI, A. The affinity of mitochondria for Ca^{2+} . Experientia, 28:906-908, 1972.
- CARAFOLI, E. and LEHNINGER, A.L. A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. Biochem.J., 122:681-690, 1971
- CARAFOLI, E.; WEILAND, S. and LEHNINGER, A.L. Active accumulation of Sr^{2+} by rat-liver mitochondria. I. General features. Biochim.Biophys.Acta, 97:88-98, 1965
- CHANCE, B. Quantitative aspects of the control of oxygen utilization. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. and O'CONNOR, C.M. Regulation of cell metabolism. CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM, Boston, Little Brow and Company, 1959.
- COTY, W.A. and PEDERSEN, P.L. Phosphate transport in rat liver mitochondria. Kinetics and energy requirements. J.Biol.Chem., 249:2593-2598, 1974.
- CROMPTON, M.; CAPANO, M. and CARAFOLI, E. Respiration-dependent efflux of magnesium ions from heart mitochondria. Biochem.J., 154:735-742, 1976 a.

- CROMPTON, M.; HEDIGER, M. and CARAFOLI, E. The effect of inorganic phosphate on calcium influx into rat heart mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Comm., 80(3):540-546, 1978.
- CROMPTON, M.; SIGEL, E.; SALZMANN, M. and CARAFOLI, E. A kinetic study of the energy-linked influx of Ca^{2+} into heart mitochondria. Eur.J.Biochem., 69:429-434, 1976 b.
- DARGEL, R. Effect of Ca^{2+} on coupling of rat liver mitochondria. FEBS Letters, 42(1):57-60, 1974.
- DIKSTEIN, S.; WELLER, C.P. and SULMAN, F.G. Effect of calcium ions on Melanophore dispersal. Nature, 200:1106, 1963
- DUSZYŃSKI, J. and WOJTCZAK, L. Effect of Mg^{2+} depletion of mitochondria on their permeability to K^{+} : The mechanism by which inophore A23187 increases K^{+} permeability. Biochem.Biophys.Res.Comm., 74(2):417-424, 1977.
- EBASHI, S. and ENDO, M. Calcium ion and muscle contraction. Progr.Biophys.Mol.Biol., 18:123-183, 1968.
- ECCLES, J.C. The physiology of synapses. Berlin, Springs, 1964.
- ELDER, J.A. and LEHNINGER, A.L. Respiration-dependent transport of carbon dioxide into rat liver mitochondria. Biochemistry, 12(5):976-982, 1973.

- ENGSTROM, G.W. and DE LUCA, H.F. The nature of Ca^{2+} binding by kidney mitochondria. Biochemistry, 3(3):379-383, 1964.
- GÓMEZ-PUYOU, A.; TUENA de GÓMEZ-PUYOU, M.; BECKER, G. and LEHNINGER, A.L. An insoluble Ca^{2+} -binding factor from rat liver mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Comm., 47(4): 814-819, 1972.
- HATASE, O.; TSUTSUI, K. and ODA, T. Mitochondrial sulfhydryl groups. A possible endogenous probe of conformational changes in the mitochondrial membrane. J.Biochem., 82:359-363, 1977.
- HEATON, G.M. and NICHOLLS, D.G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. Biochem.J., 156: 635-646, 1976.
- HOKIN, L. Effects of calcium omission on acetylcholine-stimulated amylase secretion and phospholipid synthesis in pigeon pancreas slices. Biochim.Biophys.Acta, 115:219-221, 1966.
- HÜSER, N.; DARGEL, N.; DAWCZYNSKI, H. and WINNEFELD, K. Respiration-dependent stimulation by inorganic phosphate of Mg^{2+} release from rat liver mitochondria. FEBES Letters, 72(1): 193-196, 1976.
- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. and SOUTHARD, J.M. Relationship between configuration, function and permeability in calcium treated mitochondria. J.Biol.Chem., 251(16):5069-5077, 1976.

- HUTSON, S.M. Steady state kinetics of energy-dependent Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria. J.Biol.Chem., 252(13): 4539-4545, 1977.
- HUTSON, S.M.; PFEIFFER, D.R. and LARDY, H.A. Effect of cations and anions on the steady state kinetics of energy-dependent Ca^{2+} transport in rat liver mitochondria. J.Biol.Chem., 251(17): 5251-5258, 1976.
- JACOBUS, W.E.; TIOZZO, R.; LUGLI, G.; LEHNINGER, A.L. and CARAFOLI, E. Aspects of energy-linked calcium accumulation by rat heart mitochondria. J.Biol.Chem., 250(19): 7863-7870, 1975.
- JOHNSON, R.N. and CHAPPELL, J.B. The transport of inorganic phosphate by the mitochondrial dicarboxylate carrier. Biochem.J., 134:769-774, 1973.
- KUN, E. Kinetics of ATP-dependent Mg^{2+} flux in mitochondria. Biochemistry, 15(11):2328-2335, 1976.
- KUN, E.; KEARNEY, E.B.; WIEDEMANN, I. and LEE, N.M. Regulation of mitochondrial metabolism by specific cellular substances. II. The nature of stimulation of mitochondrial glutamate metabolism by a cytoplasmic component. Biochemistry, 8(11) 4443-4449, 1969.

- LA NOUE, K.F. and TISCHLER, M.E. Comparison of electroneutral and electrogenic anion transport in mitochondria. In: PACKER, L. and GÓMEZ-PUYOU, A. Mitochondria: Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure. New York, Academic Press, 1976.
- LEE, N.M.; WIEDEMANN, I.; JOHNSON, K.L.; SKILLETER, D.N. and KUN, E. The dependence of oxidative phosphorylation and ATP-ase of liver mitochondria on bound Mg^{2+} . Biochem.Biophys. Res.Comm., 40(5):1058-1062, 1970.
- LEE, N.M.; WIEDEMANN, I. and KUN, E. Control of cation movements in liver mitochondria by a cytoplasmic factor. Biochem. Biophys.Res.Comm., 42(6): 1030-1034, 1971.
- LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport. Biochem.J., 119:129-138, 1970.
- LEHNINGER, A.L. A soluble heat-labile, high-affinity Ca^{2+} -binding factor extracted from rat liver mitochondria. Biochem. Biophys.Res.Comm., 42:312-318, 1971.
- LEHNINGER, A.L. Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of Ca^{2+} by mitochondria. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 71(4): 1520-1524, 1974.
- LEHNINGER, A.L.; CARAFOLI, E. and ROSSI, C.S. Energy-linked ion movements in mitochondrial systems. In: NORD, F.F. Advances in Enzymology, 29: 259-320, New York, John Wiley e Sons, Inc., 1967.

LEHNINGER, A. L.; REYNAFARJE, B.; VERCESI, A. and TEW, W.P.

Transport and accumulation of calcium in mitochondria. In: SCARPA A. and CARAFOLI, E. Calcium transport and cell function. New York, The New York Academy of Science, 1978 a, 307: 160-176.

LEHNINGER, A.L.; REYNAFARJE, B.; VERCESI, A. and TEW, W.P.

Characteristics of energy-dependent calcium influx and efflux systems of mitochondria. In: AZZONE, G.F. et al., The proton and calcium pumps. Amsterdam, Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1978 b.

LEHNINGER, A.L.; VERCESI, A. and BABABUNMI, E.A. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. Proc.Natl.Acad.Aci.USA, 75(4): 1690-1694, 1978 c.

LIGET, E. and FONYÓ, A. Competitive inhibition of valinomycin-induced K^+ transport by Mg^{2+} ions in liver mitochondria. FEBS Letters, 79(1): 33-36, 1977.

MEYER, W.L.; FISCHER, E.H. and KREBS, E.G. Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca^{2+} . Biochemistry, 3: 1033-1039, 1964.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191: 144-148, 1961.

- MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol.Rev., 41: 445-502, 1969.
- MITCHELL, P. and MOYLE, J. Translocation of some anions, cations and acids in rat liver mitochondria. Eur.J.Biochem., 9: 149-155, 1969.
- MURPHY , J.B. and KIES, M.W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. Biochim. Biophys.Acta, 45: 382-384, 1960.
- NAGATA, N. and RASMUSSEN, H. Parathyroid hormone, 3'5'AMP, Ca^{2+} , and renal gliconeogenesis. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 65: 368-374, 1970.
- NICHOLLS, D.G. Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. Biochem.J., 170: 511-522, 1978.
- NOACK, E.A. and HEINEN, E.M. A kinetic study of calcium transport by heart mitochondria. Eur.J.Biochem., 79: 245-250, 1977.
- PFEIFFER, D.R.; KAUFFMAN, R.F. and LARDY, H.A. Effects of N-Ethylmaleimide on the limited uptake of Ca^{2+} , Mn^{2+} and Sr^{2+} by rat liver mitochondria. J.Biol.Chem., 252(12): 4165-4171, 1978.

PUSKIN, S.S.; GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K. and RUSSEL, P.R.

Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria. Biochemistry, 15: 3834-3842, 1976.

RASMUSSEN, H. Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. Science, 170: 404-412, 1970

REED, P.W. Effects of the divalent cation ionophore A23187 on potassium permeability of rat erythrocytes. J.Biol.Chem., 251(11): 3489-3494, 1976.

REED, K.C. and BYGRAVE, F.L. The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. Biochem. J., 140:143-155, 1974.

REED, K.C. and BYGRAVE, F.L. A kinetic study of mitochondrial calcium transport. Eur.J.Biochem., 55:497-504, 1975.

REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A.L. High affinity and low affinity binding of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. J.Biol.Chem., 244: 584-593, 1969.

REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A.L. Ca^{2+} transport by mitochondria from L1210 mouse ascites tumor cells. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 70: 1744-1748, 1973.

REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A.L. Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. Biochem.Biophys.Res. Commun., 77(4): 1273-1279, 1977.

- ROSSI, C.; AZZI, A. and AZZONE, G.F. Ion transport in liver mitochondria. I. Metabolism-independent Ca^{2+} binding and H^+ release. J.Biol.Chem., 242: 951-957, 1967.
- ROSSI, C.S. and LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca^{2+} and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J.Biol.Chem., 239(11): 3971-3980, 1964.
- SAMLI, M. and GESCHWIND, I.I. Some effects of energy-transport inhibitors and of Ca^{2+} -free or K^+ -enhanced media on the release of luteinizing hormone (LH) from the rat pituitary gland "in vitro". Endocrinology, 82:225-231, 1968.
- SANDRI, G.; PANFILI, E. and SOTTOCASA, G.L. The calcium-binding glycoprotein and mitochondrial calcium movements. Biochem. Biophys.Res.Commun., 68(4): 1272-1279, 1976.
- SCARPA, A. and AZZI, A. Cation binding to submitochondrial particles. Biochim.Biophys.Acta, 150:473-481, 1968.
- SCARPA, A. and AZZONE, G.F. The mechanism of ion translocation in mitochondria. 4. Coupling of K efflux with Ca^{2+} uptake. Eur.J.Biochem., 12:328-335, 1970.
- SCARPA, A. and GRAZIOTTI, P. Mechanisms for intracellular calcium regulation in heart. I. Stopped-flow measurements of Ca^{2+} uptake by cardiac mitochondria. J.Gen.Physiol., 62: 756-772, 1973.

- SCHNEIDER, W.C. and HOGEBOOM, G.M. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. J.Biol.Chem., 183: 123-128, 1950.
- SELWIN, M.J.; DAWSON, A.P. and DUNNETT, S.J. Calcium transport in mitochondria. FEBS Letters, 10: 1-5, 1970.
- SETTLEMIRE, C.T.; HUNTER, G.R. and BRIERLEY, G.P. Ion transport in heart mitochondria. XIII. The effect of EDTA on monovalent ion uptake. Biochim.Biophys.Acta, 162: 487-499, 1968.
- SILIPRANDI, D.; SCUTARI, G.; ZOCCARATO, F. and SILIPRANDI, N. Action of "Diamide" on some energy linked processes of rat liver mitochondria. FEBS Letters, 42: 197-199, 1974.
- SILIPRANDI, D.; TONINELLO, A.; ZOCCARATO, F.; RUGOLO, M. and SILIPRANDI, N. Synergic action of calcium ions and diamide on mitochondrial swelling. Biochem. Biophys.Res.Comm., 56(3):956-961, 1975.
- SILIPRANDI, D.; TONINELLO, A.; ZOCCARATO, F. and SILIPRANDI, N. A possible mechanism for respiration-dependent efflux of Mg ions from liver mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Comm., 78(1): 23-27, 1977.
- SORDAHL, L.A. Effects of magnesium, ruthenium red and the antibiotic ionophore A23187 on initial rates of calcium uptake and release by heart mitochondria. Arch.Biochem.Biophys., 167: 104-115, 1974.

SOUTHARD, J.H. and GREEN, D.E. High affinity binding of Ca^{2+} in mitochondria: A reappraisal. Biochem.Biophys.Res.Comm., 59(1): 30-37, 1974.

TEW, W.P. Use of the Coulombic interactions of the lanthanide series to identify two classes of Ca^{2+} binding sites in mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Comm., 78(2):624-630, 1977.

VALE, W.; BURGUS, R. and GUILLEMIN, R. Presence of calcium ions as a requisite for the in vitro stimulation of TSM-release by hypothalamic TRF. Experientia, 23: 853-855, 1967.

VERCESI, A.E. Calcium transport in rat heart mitochondria. Fed.Proc., 36: 826, 1977.

VERCESI, A.E. Release of endogenous Ca^{2+} from mitochondria by the oxidation of Pyridine Nucleotides. XIth International Congress of Biochemistry, Toronto, Canada, 1979.

VERCESI, A., REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of H^+ ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J.Biol.Chem., 253(18): 6379-6385, 1978.

VIAL, C.; OTOKORE, A.; GOLDSCHMIDT, D. and GAUTHERON, D.C. Studies on the energy-linked Ca^{2+} accumulation in pig heart mitochondria. Role of Mg^{2+} ions. Biochimie, 60: 159-169, 1978.

- VINOGRADOV, A. and SCARPA, A. The initial velocities of Ca^{2+} uptake by rat liver mitochondria. J.Biol.Chem., 248: 5527-5531, 1973.
- VINOGRADOV, A.; SCARPA, A. and CHANCE, B. Calcium and pyridine nucleotide interaction in mitochondrial membranes. Arch. Biochem.Biophys., 152: 646-654, 1972.
- WILLIAMS, A.J. and BARRIE, S.E. Temperature effects on the kinetics of calcium transport by cardiac mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Comm., 84(1): 89-94, 1978.
- ZOR, U.; LOWE, I.P.; BLOOM, G. and FIELD, J.B. The role of calcium (Ca^{2+}) in TSM and dibutyryl 3'5'cyclic AMP stimulation of thyroid glucose oxidation and phospholipid synthesis. Biochem.Biophys.Res.Comm., 33(4): 649-658, 1968.