

EFEITOS INDESEJÁVEIS DO USO DE  
SAFRANINA COMO INDICADOR DE POTENCIAL  
ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Valderez Garcia Rodrigues Valle

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À RESERVA FISCAL DA  
+ EJE DEFENDIDA PELA ALUNA VALDEREZ GARCIA RODRIGUES  
VALLE E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA  
12/07/86

*Prof. Henri*

Valderez Garcia Rodrigues Valle

# EFEITOS INDESEJÁVEIS DO USO DE SAFRANINA COMO INDICADOR DE POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

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

Orientador  
Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi

CAMPINAS

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

1986

"A tudo e todos cujas pulsões foram  
e são as minhas: humanísticas"

dedico.

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo incentivo e ausência compreendida.

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

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

Aos Profs. Drs. Ione Salgado Martins, Lúcia Pereira-da-Silva e Regina Célia Spadari pelas correções e sugestões dadas a este trabalho.

A Marcia Marília Fagian, pós-graduanda, pela presença sempre amiga e colaboradora.

A todos os colegas do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela "aprendizagem" do convívio diário.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

Finalmente, a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização desse trabalho e com minha formação profissional, nosso muito obrigado.

## ÍNDICE

Introdução	1
Materiais e Métodos	13
Dosagem de Proteína	13
Consumo de Oxigênio	14
Transporte de Ca <sup>++</sup>	14
Quantificação do transporte de Ca <sup>++</sup> através da determinação do conteúdo de Ca <sup>++</sup> intramitocondrial	15
Determinação do Mg <sup>++</sup> endógeno	15
Determinação da variação do volume mitocondrial	16
Determinação do potencial de membrana	16
Reagentes	17
Resultados	19
Discussão	30
Resumo	40
Summary	41
Bibliografia	42

## ABREVIATURAS

ADP e ATP	adenosina - 5'- di e trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
EGTA	ácido etileno glicol bis ( $\beta$ - aminoetil eter) N-N'-tetraacético
Hepes	ácido 4-(2 hidroxietil-1-piperazina-etano-sulfônico)
$\Delta\psi$	potencial elétrico de membrana
MIT	mitocôndria
NAD(P)	nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato)
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
Pi	fosfato inorgânico
Ac.Ac.	acetoacetato
BHP	t-butil-hidroperóxido
SAF	safranina
TPP <sup>+</sup>	tetra-fenil-fosfônio

## INTRODUÇÃO

Estudos sobre a captação de  $\text{Ca}^{++}$  por mitocôndrias evidenciam que este íon entra na organela por mecanismo eletroforético em resposta ao gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$  gerado por respiração, hidrólise de ATP ou potencial de difusão de  $\text{K}^+$  ou de  $\text{SCN}^-$  (Scarpa & Azzone, 1970; Selwyn et alii, 1970; Rottemberg & Scarpa, 1974; Heaton & Nicholls; Akerman, 1978). A teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa proposta por Mitchell, 1961-1966, fornece apoio para explicar este mecanismo de captação de  $\text{Ca}^{++}$ . Assim, segundo Mitchell (1961-1966), a passagem de elétrons na cadeia respiratória induz transporte vetorial de  $\text{H}^+$  para o meio extramitocondrial com conseqüente alcalinização da matriz, gerando um gradiente protônico transmembrana. Este gradiente é formado por um componente químico -  $\Delta\text{pH}$  - e um componente elétrico -  $\Delta\psi$  - que se relacionam de acordo com a seguinte equação:  $\Delta\tilde{\mu}\text{H} = 60 \Delta\text{pH} + \Delta\psi$ . O potencial protônico  $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$  também pode ser gerado pela hidrólise de ATP e constitui a fonte de energia tanto para a fosforilação oxidativa como para o transporte de  $\text{Ca}^{++}$ .

Existe uma relação inversa entre a velocidade de respiração e  $\Delta\mu\text{H}^+$  (Mitchell, P., 1961; 1966), ou seja, a velocidade de respiração depende da amplitude do potencial protônico. Quando o potencial de membrana é alto a respiração é lenta e denominada respiração de repouso ou estado respiratório 4 (Chance, 1959). Nestas condições a respiração se processa a uma velocidade suficiente para compensar o retorno "inespecífico" de prótons à matriz mitocondrial (Nicholls, 1982). Qualquer fenômeno que dissipe o potencial protônico, causa um estímulo imediato da respiração, condição conhecida como estado respiratório 3 - (Chance, 1959). Durante a fosforilação oxidativa ocorre volta de prótons para o interior

da mitocôndria através da enzima ATP-sintetase e a respiração é estimulada, (Mitchell, 1961-1969). Estímulo semelhante é causado pela captação eletroforética de  $\text{Ca}^{++}$  que diminui  $\Delta\psi$  e acelera a respiração. O conseqüente estímulo na velocidade de ejeção de  $\text{H}^+$  aumenta a amplitude do termo  $\Delta\text{pH}$  para compensar o decréscimo de  $\Delta\psi$  e manter o valor de  $\Delta\mu\text{H}^+$ . A estequiometria entre a captação de  $\text{Ca}^{++}$ , ejeção de prótons e transporte de elétrons na cadeia respiratória mostra uma proporção de 2  $\text{Ca}^{++}$  captados para cada 4 prótons ejetados por sítio de fosforilação durante o transporte de 2 elétrons pela cadeia respiratória (Brand et alii, 1976; Reynafarje & Lehninger, 1977; Vercesi et alii, 1978; Fiskum et alii, 1979). Esta estequiometria evidencia que a entrada de  $\text{Ca}^{++}$  converte o potencial de membrana em gradiente de pH que passa a inibir a respiração e limitar a captação de  $\text{Ca}^{++}$ . (Lehninger et alii, 1978a). Nestas condições o potencial protônico através da membrana é máximo às custas do termo  $\Delta\text{pH}$  e a diferença do potencial redox entre os extremos da cadeia respiratória ( $\text{NADH} - \text{O}_2$ ) está em equilíbrio com o potencial protônico ( $\Delta E_{\text{H}} = \Delta\tilde{\mu}\text{H}$ ). (Nicholls, 1982). Como as reações redox estão estreitamente acopladas à extrusão de prótons ocorre inibição da respiração (Nicholls, 1982). Quando porém, o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  ocorre na presença de ânions permeantes, capazes de se difundir para a matriz mitocondrial na forma protonada ou capazes de trocar  $\text{H}^+$  por  $\text{OH}^-$  neutralizando assim o gradiente de pH, grandes quantidades de  $\text{Ca}^{++}$  (até 2.000 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína mitocondrial) podem ser acumuladas (Carafoli et alii, 1965). Na ausência de tais ânions permeantes ou quando o transporte destes está inibido, não mais que 20 a 30 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$  são captados por mg de proteína mitocondrial (Carafoli and Crompton, 1978). Dentre os ânions permeantes o  $\text{P}_i$  mostra-se bastante potente, uma vez que reage com o  $\text{Ca}^{++}$  na matriz mitocondrial formando o complexo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  que, por apresentar uma constante de esta-



bilidade suficientemente alta, mantém a concentração intramitocondrial de  $\text{Ca}^{++}$  livre relativamente constante independentemente do total de  $\text{Ca}^{++}$  acumulado pela mitocôndria (Åkerman and Nicholls, 1983). Em concentrações de fosfato similares às encontradas no citoplasma, a mitocôndria, na presença de ATP e  $\text{Mg}^{++}$  pode acumular até 3.000 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína num processo chamado carregamento maciço da mitocôndria (Lehninger et alii, 1978a), sem comprometimento das características de permeabilidade da membrana mitocondrial. As características do sistema de captação de  $\text{Ca}^{++}$  indicam que o mesmo é mediado por um transportador específico, sensível a vermelho de rutênio e lantanídeos (Reed & Bygrave, 1974). Quanto à via de efluxo, evidências experimentais sugerem a existência de um transportador eletroneutro, insensível a vermelho de rutênio, que em tecidos excitáveis promoveria a troca de 1  $\text{Ca}^{++}$  por 2  $\text{Na}^+$  e em tecidos não excitáveis por  $2\text{H}^+$ . Mais recentemente foi demonstrado que em algumas condições experimentais ocorre troca eletroneutra de  $\text{Ca}^{++}$  por  $\text{Na}^+$  também em tecidos não excitáveis (Nedergard, 1984).

Sendo o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  um processo estreitamente acoplado ao potencial elétrico de membrana (Åkerman, 1978b), torna-se de fundamental relevância determinar o potencial de membrana durante estudos de transporte de  $\text{Ca}^{++}$ .

### Técnicas para determinação do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ )

O potencial elétrico de membrana mitocondrial tem sido determinado por técnicas que utilizam microeletrodos, distribuição de cátions inorgânicos na presença de ionóforos apropriados, distribuição de ânions ou cátions orgânicos permeantes e por um número de corantes catiônicos e aniônicos, que exibem mudanças

nas características de fluorescência ou absorvância, em função de variações do potencial de membrana.

O uso de microeletrodos oferece a vantagem da determinação direta do potencial de membrana, porém sua aplicação é limitada para a maioria dos sistemas biológicos, pois é preciso que haja uma certa proporção de tamanho entre a ponta do eletrodo e a organela em que vai ser determinado o potencial. As dimensões apresentadas pela maioria das organelas não correspondem a essa exigência. Mitocôndrias gigantes de *Drosophila* e de camundongos alimentados com dieta rica em cobre assumem dimensões que variam entre 5.000 e 15.000 nm o que possibilitou o emprego dessa técnica por Tupper & Tedeschi (1969) e Maloff et alii (1977). Porém, os resultados obtidos por este método contradizem totalmente a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa e estão em total desacordo com os valores de potenciais encontrados pelo uso de outras técnicas, motivo pelo qual seu uso não tem sido indicado na determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial. Além disso pequenas estruturas biológicas não podem manter um verdadeiro potencial de repouso por períodos além de poucos milissegundos, devido a vazamentos induzidos pelo impalamento (Lassen et alii, 1971; Lassen et alii, 1974).

O potencial elétrico transmembrana pode também ser inferido a partir da distribuição de rubídio ( $Rb^+$ ) ou potássio ( $K^+$ ) na presença de valinomicina, ou a partir da distribuição de cátions ou ânions orgânicos lipofílicos. A distribuição de tetrafenil-fosfônio ( $TPP^+$ ) tem sido usada com essa finalidade, podendo ser aplicada a vários sistemas biológicos (Muratsugu et alii, 1977). A concentração de  $TPP^+$  no meio extra-mitocondrial pode ser monitorada instantaneamente com um eletrodo seletivo construído artesanalmente segundo Kamo et alii, 1979. Este cátion, por ser lipofílico, pode distribuir-se através da membrana

em função do potencial elétrico de acordo com a equação de Nernst (Muratsugu et alii, 1977). Quando a membrana está polarizada, o cátion adicionado ao meio é transferido eletroforéticamente para dentro da mitocôndria, causando um decréscimo de sua concentração no meio e vice-versa.

Susbtâncias eletrocromicas são também amplamente usadas como indicadores de  $\Delta\psi$ . As características de fluorescência e absorbância exibidas pelos corantes catiônicos e aniônicos refletem variações de potencial de membrana de várias preparações biológicas. A habilidade de uma variedade de corantes funcionar como indicadores de potencial de membrana é devida à presença de grupos cromóforos em suas moléculas, que ao se ligarem às membranas energizadas exibem mudanças espectrais caracteristicamente associadas aos valores do potencial de membrana.

Dentre as sondas fluorimétricas, ANS (ácido 8-anilo-1-naftaleno sulfonado) e MI (Merocianina 540) foram consideradas as mais apropriadas, uma vez que as mesmas parecem não apresentar efeitos no metabolismo.

Åkerman e Wikström (1976) propuseram o uso do corante catiônico safranina O (Fig. 1) para determinação do potencial elétrico transmembrana em mitocôndrias e outras organelas. Esse corante lipofílico positivamente carregado apresenta um deslocamento no espectro visível quando ligado a membranas energizadas.

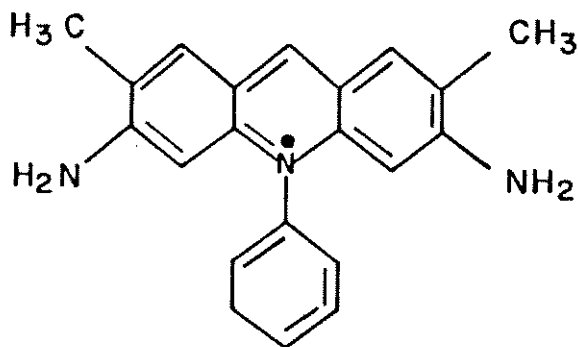


Fig. 1 - Fórmula estrutural da molécula de safranina

O espectro de absorção do corante (Fig. 2) é o mesmo, quer a mitocôndria seja energizada por respiração, hidrólise de ATP ou em condições em que o potencial de membrana é gerado por um gradiente de prótons ou de íons  $K^+$  na presença de desacoplador ou valinomicina respectivamente (Åkerman & Saris, 1976; Åkerman & Wikström, 1976).

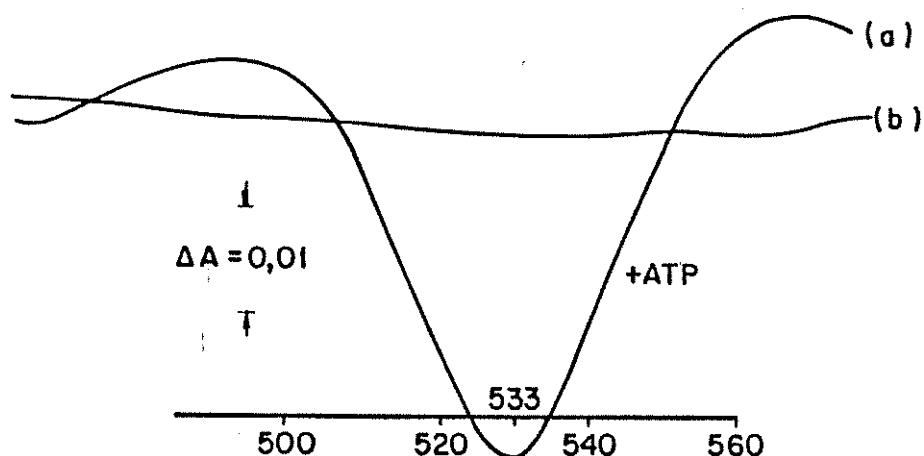


Fig. 2 - Espectro de absorção de safranina em mitocôndrias energizadas (a) e desenergizadas (b) (Åkerman & Wikström, 1976).

Como mostra a linha b da figura 2, a molécula de safranina não ligada absorve igualmente nos comprimentos de onda mostrados. Uma vez ligada ocorre alteração no espectro de absorção do corante que é expressa pelo decréscimo máximo de absorbância em 533 nm, mantendo-se aquela em 511 nm (Fig. 2, linha a). São essas características espectroscópicas do corante que constituem o princípio básico de sua utilização como indicador de potencial elétrico de membrana. A diferença de absorbância  $A_{511-533}$  nm varia linearmente em função dos valores de

$\Delta\psi$  (Åkerman & Wikström, 1976).

Não está totalmente esclarecido o mecanismo dessa mudança espectral. A diferença em absorbância  $\Delta A$  511-533 nm é atribuída à ligação de moléculas de safranina a sítios aniônicos de baixa polaridade na membrana mitocôndrial com posterior dimerização das moléculas ligadas. Essa diferença de absorbância dependeria não só da ligação da molécula nos sítios hidrofóbicos na face interna da membrana, como também da transição da forma monomérica para a dimerica (Fig. 3). Assim as mudanças espectrais acima mencionadas corresponderiam à transição monômero - dímero (Zanotti & Azzone, 1980).

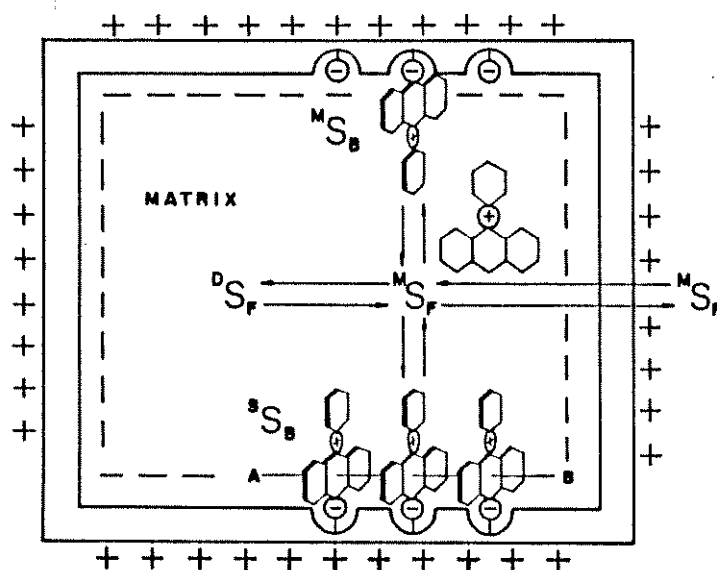


Fig. 3 - Captação e interação da molécula de safranina com a membrana mitocôndrial.  $M_{S_F}$ , safranina livre como monômero;  $D_{S_F}$ , safranina livre como dímero;  $M_{S_B}$ , safranina ligada como monômero;  $S_{S_B}$ , safranina ligada como dímero. A linha A-B representa o eixo ao longo do qual os elétrons  $\pi$  podem estar compartilhados (Zanotti & Azzone, 1980).

A safranina O tem sido amplamente usada para a determinação de  $\Delta\psi$  em mitocôndrias isoladas, lipossomos, células tumorais de Ehrlich (Åkerman & Wikström, 1976; 1978) vesículas bacterianas (Shuldiner & Kaback, 1975) e em mitocôndrias "in situ" (Åkerman & Jarvisalo, 1980). Em todos esses sistemas as respostas ópticas do corante apresentaram-se lineares com valores de  $\Delta\psi$  compreendidos entre 50 e 170 mV obtidos a partir de uma curva de calibração (Fig. 4) que relaciona  $\Delta A_{511-533}$  nm com valores de potencial de membrana. (Åkerman & Wikström, 1976).

Para a obtenção de uma curva de calibração são feitas adições sucessivas de quantidades conhecidas de KCl na presença de ionóforo de valinomicina. O  $K^+$  adicionado na presença de valinomicina é captado por mecanismo eletroforético e a cada adição de KCl o potencial elétrico de membrana decresce em resposta à entrada do cátion.

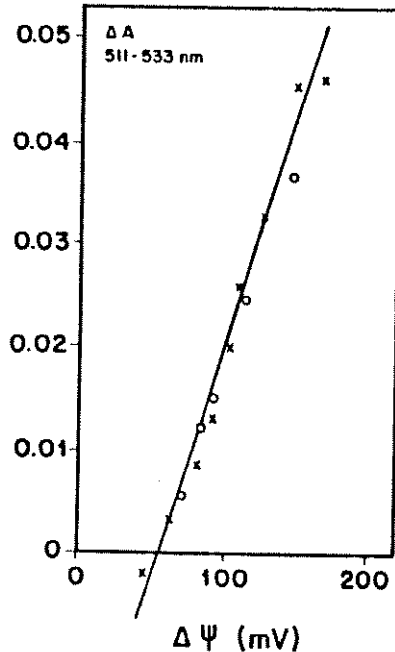


Fig. 4 - Dependência das mudanças espectrais do corante em relação ao potencial de difusão do íon  $K^+$  (x) e do íon  $H^+$  (o) na presença de valinomicina ou desacoplador respectivamente (Åkerman & Wikström, 1976).

O potencial elétrico após cada adição conhecida de KCl, é calculado através da relação:

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

onde  $[K^+]_{in}$  é a concentração do íon no interior da mitocôndria assumida como sendo 120 mM e  $[K^+]_{ex}$  é a concentração do íon adicionado ao meio de incubação.

A captação de safranina pela mitocôndria requer um ânion permeante e em geral são utilizados Pi ou acetato (Colonna et alii, 1973; Harris & Baum, 1980). Esse processo é similar ao de captação de  $Ca^{++}$  ocorrendo competição entre  $Ca^{++}$  e safranina (Colonna et alii, 1973). Como vermelho de Rutênio inibe a captação de  $Ca^{++}$  mas não afeta a captação de safranina (Åkerman, 1978) conclui-se que a competição com o  $Ca^{++}$  não ocorre a nível do transportador, mas provavelmente pela demanda de energia necessária para o processo de captação (Harris & Baum, 1980). Assim o corante move-se do meio externo sob influência de  $\Delta\psi$  até alcançar o equilíbrio eletroquímico numa faixa de concentração superior a 1mM na matriz mitocondrial quando o potencial é da ordem de 120-180 mV negativo internamente (Zanotti & Azzone, 1980).

### Transporte de $Ca^{++}$ e alterações funcionais da Mitocôndria

O significado fisiológico do sistema de transporte de  $Ca^{++}$ , localizado na membrana mitocondrial interna, constituído por uma via de influxo eletroforética sensível a vermelho de Rutênio e por uma via de efluxo eletroneutra, tem sido amplamente discutido.

Existe ainda uma grande controvérsia com respeito à capacidade desse

sistema em regular a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  no citosol, ou na matriz mitocondrial (Hansford & Castro, 1982; Joseph, S.K. et alii, 1983). Da operação simultânea desses dois transportadores resulta um movimento cíclico de  $\text{Ca}^{++}$  através da membrana. A situação de "steady state" é atingida quando as velocidades de influxo e efluxo do íon são iguais, o que propicia uma regulação cinética da distribuição de  $\text{Ca}^{++}$  entre a matriz e o meio extramitocondrial. (Lehninger et alii, 1978, a,b; Nicholls & Crompton, 1980; Hansford & Castro, 1982; Joseph et alii, 1983).

Se a distribuição de  $\text{Ca}^{++}$  entre o citosol e a mitocôndria ocorresse apenas com base nos princípios termodinâmicos, considerando-se a existência exclusiva do transportador eletroforético, aplicando-se a expressão

$$\Delta \mu \text{Ca}^{++} = 2 \Delta \psi - 60 \log \frac{\text{Ca}^{++}_{\text{in}}}{\text{Ca}^{++}_{\text{ex}}} \quad \text{chegaríamos a uma relação } \text{Ca}^{++}_{\text{in}} / \text{Ca}^{++}_{\text{ex}}$$

da ordem de  $10^6$  quando o equilíbrio fosse atingido, ou seja,  $\Delta \mu \text{Ca}^{++} = 0$ . Isto significa que nessas condições  $\text{Ca}^{++}_{\text{in}}$  seria 1.000.000 vezes maior que a  $\text{Ca}^{++}_{\text{ex}}$ .

De acordo com este valor, para uma concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre no citosol igual a  $10^{-7}$  M a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre na matriz seria igual a  $10^{-1}$  M, o que está em desacordo com a constante dissociação do complexo Ca-Pi e com resultados experimentais encontrados (Nicholls, 1982). De acordo com esses resultados a distribuição observada de  $\text{Ca}^{++}$  sugere a existência de 2 vias, uma de influxo e outra de efluxo, cujas velocidades são reguladas independentemente por fatores como pH, temperatura, concentração de  $\text{Ca}^{++}$  (Åkerman, 1983) e que no equilíbrio operariam com velocidades iguais, mantendo uma concentração externa próxima de 0,5  $\mu\text{M}$  (Nicholls, 1978; Becker et alii, 1980).



Uma vez atingido esse equilíbrio a mitocôndria é capaz de responder a qualquer perturbação na concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre extra mitocondrial. Um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre externo permite que a via de influxo opere mais rapidamente que a via de efluxo. Por outro lado, uma diminuição na concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre externo tornará a atividade da via de influxo mais lenta que a da via de efluxo (Becker, 1980).

A capacidade da mitocôndria tamponar o  $\text{Ca}^{++}$  citosólico nas condições normais "in situ" tem sido questionada em função das baixas concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  livre existente no citosol e na matriz mitocondrial. Nestas condições os parâmetros cinéticos do movimento cíclico de  $\text{Ca}^{++}$  não permitiriam sua operação no sentido do tamponamento do  $\text{Ca}^{++}$  citosólico (Hansford, 1981).

O movimento cíclico de  $\text{Ca}^{++}$  está associado com a contínua dissipação de  $\Delta\mu \text{H}^+$  decorrendo do processo um conseqüente consumo adicional de  $\text{O}_2$  (Stucki & Insichen, 1974). A volta da velocidade de respiração ao nível basal "in vitro" é completamente dependente da relação  $\text{Ca}^{++}/\text{proteína}$ , assim como da composição do meio (Chance, B. 1965; Bygrave, 1977).

Em determinadas condições experimentais como por exemplo quando mitocôndrias estão incubadas em meio isento de estabilizadores de membrana, tais como  $\text{Mg}^{++}$  e ATP, o transporte de cálcio por mitocôndrias está associado a uma série de eventos relacionados com a perda das características de permeabilidade específica, com conseqüentes alterações conformacionais, desacoplamento e inchamento mitocondrial. Acredita-se que essas alterações sejam decorrentes da perda de estabilizadores endógenos como  $\text{Mg}^{++}$ , ADP, ATP e NAD(H) (Siliprandi, D. et alii, 1977; Gunter & Harworth, 1979; Coelho & Vercesi, 1980).

O efluxo de  $Mg^{++}$  mitocondrial induzido por altas concentrações de  $Ca^{++}$  é aumentado por fosfato (Hoser et alii, 1976; Siliprandi et alii, 1975, 1977) oxidação de NAD(P)H mitocondrial (Coelho & Vercesi, 1979) e é diminuído por  $Mg^{++}$  (Coelho & Vercesi, 1980) e ADP ou ATP exógenos (Rugolo et alii, 1981). Os primeiros fatores, potencializam a deterioração mitocondrial causada por  $Ca^{++}$ . Os últimos desempenham um papel protetor contra a ação deletéria do  $Ca^{++}$  sobre mitocôndrias e como consequência promovem a retenção de  $Ca^{++}$  pela organela o que confirma o papel fundamental do  $Mg^{++}$  e ADP em preservar as propriedades de permeabilidade inerentes da membrana mitocondrial (Zoccarato et alii, 1981).

Como em algumas condições experimentais o transporte de  $Ca^{++}$  pela mitocôndria precede a fosforilação oxidativa (Rossi & Lehninger, 1964; Reynafarje & Lehninger, 1973; Vercesi et alii, 1978) às custas de utilização de  $\Delta\psi$ , torna-se necessária a determinação contínua do potencial de membrana durante os estudos de transporte de  $Ca^{++}$ .

Como já mencionado anteriormente, safranina O tem sido rotineiramente usada como indicador de potencial de membrana.

Recentemente, em nosso laboratório observou-se que a safranina nas concentrações usualmente empregadas para determinação de  $\Delta\psi$ , interfere nos experimentos de transporte de  $Ca^{++}$  em algumas condições experimentais.

Devido à ampla utilização de safranina O em estudos com mitocôndrias isoladas passamos a estudar estes efeitos mais detalhadamente e os resultados obtidos são apresentados neste trabalho.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos Wistar adultos pesando 180 a 250 g eram mantidos em jejum por 12 horas e mitocôndrias hepáticas eram isoladas segundo Shneider e Hogeboom, 1950. O fígado era homogeneizado em sacarose 250 mM contendo EGTA 0,5 mM sendo que EGTA era omitido na última etapa da preparação, conforme descrito abaixo:

a) o animal era sacrificado por concussão cerebral e o fígado era imediatamente retirado, lavado em solução de sacarose, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem;

b) o material era então centrifugado por 5 minutos à 2.500 g. O sobrenadante era mantido em banho de gelo e o sedimento novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições;

c) Os sobrenadantes eram combinados e centrifugados durante 10 minutos a 11.500 g e a fase lipídica superior era retirada com uma pipeta Pasteur. O sobrenadante era descartado e o sedimento resuspenso e novamente centrifugado nas condições anteriores. Terminada a centrifugação as mitocôndrias eram resuspensas em solução de sacarose 0,25 M a uma concentração de aproximadamente 100 mg de proteína por ml.

Os experimentos eram realizados até 6 horas após a obtenção das mitocôndrias.

### Dosagem de Proteína

A concentração de proteína da suspensão de mitocôndrias era determinada de acordo com o método de Kies e Murphy, 1960. Este método baseia-se essen-

cialmente na medida da diferença de absorbância da solução de proteínas em NaOH 5mM, nos comprimentos de onda 215 e 225 nm. Esta diferença é diretamente proporcional à concentração de proteínas na solução. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

### Consumo de Oxigênio

A respiração mitocondrial era medida polarograficamente utilizando-se eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) conectado a um oxígrafo Gilson.

Mitocôndrias eram incubadas em câmara de vidro termoestabilizada (32°C) e dotada de agitação magnética. O meio de incubação básico era constituído por sacarose 125 mM, KCl 65 mM e Hepes 3 mM, pH 7,2. Todas as adições próprias de cada condição experimental estão indicadas nas legendas das figuras.

A qualidade das mitocôndrias era determinada pela capacidade de fosforilação oxidativa estimada através da determinação do controle respiratório.

As mitocôndrias utilizadas apresentavam controle respiratório entre 5 e 7.

### Transporte de $Ca^{++}$

Variações nas concentrações de  $Ca^{++}$  livre no meio de reação eram determinadas usando-se eletrodo específico (Calcium Selectrode F 2112, Radiometer) cujos sinais eram amplificados através de um acessório de alta impedância (Sargent-Welch Scientific Co.) conectado a um registrador potenciométrico. O eletrodo de  $Ca^{++}$  era calibrado com adições de solução padrão do íon ao meio de reação.

## Quantificação do transporte de $\text{Ca}^{++}$ através da determinação do conteúdo de $\text{Ca}^{++}$ intramitocondrial

Mitocôndrias de fígado do rato (3 mg/ml) eram incubadas no meio básico contendo rotenona 5  $\mu\text{M}$ , fosfato 2 mM, succinato 2 mM e  $\text{Ca}^{++}$  40 nmoles /mg de proteína mitocondrial à temperatura ambiente e com agitação magnética. Aliquotas de 0,5 ml eram colhidas a cada 3 minutos. As amostras eram centrifugadas durante 2 minutos em uma mini centrífuga "Eppendorf". Os sobrenadantes eram descartados e os sedimentos ressuspensos em 0,6 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada. A seguir 0,5 ml de cada amostra era diluída até 6 ml com uma solução de óxido de lantânio-HCl-n-butanol- $\text{H}_2\text{O}$  segundo Gochman & Givelber (1970) e  $\text{H}_2\text{O}$  na proporção 2:4 respectivamente. As amostras eram lidas contra uma solução padrão de  $\text{Ca}^{++}$ . Em cada condição experimental eram obtidas 6 amostras com períodos de incubação entre 0 e 15 minutos.

## Determinação do $\text{Mg}^{++}$ Endógeno

O conteúdo de  $\text{Mg}^{++}$  endógeno era determinado por espectroscopia de absorção atômica, nas mesmas amostras utilizadas para determinação de  $\text{Ca}^{++}$ .

### Determinação de Variações do Volume Mitocondrial

A variação do volume mitocondrial era determinada em função de variações no espalhamento de luz (light scattering) num ângulo de 90° em 520 nm, (Gunter & Haworth, 1979) usando-se espectrofluorímetro Aminco Bowman.

### Determinação do Potencial de Membrana

O potencial de membrana foi determinado a partir da distribuição de tetrafenilfosfônio (TPP<sup>+</sup>) entre o meio de reação e matriz mitocondrial. A distribuição de TPP<sup>+</sup> através da membrana, era continuamente monitorada com eletrodo seletivo a TPP<sup>+</sup> e o potencial de membrana calculado usando-se a seguinte equação:

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

onde:

R = constante real dos gases

T = Temperatura

F = Número de Faraday

V = Volume do Meio de Incubação

v = volume mitocondrial (1,4 µl/mg de proteína, Kamo et alii, 1979).

ΔE = potencial do eletrodo observado após a adição da mitocôndria.

O eletrodo sensível a  $TPP^+$  (Fig. 5) construído em nosso laboratório segundo Kamo et alii, 1979, utiliza uma membrana de cloreto de polivinila contendo tetrafenilborato ( $TPB^-$ ) como trocador de íons. A 3 ml de tetrafenilborato de sódio  $10^{-2}M$ , dissolvidos em tetrahidrofurano, são adicionados 10 ml de tetrahidrofurano contendo 0,5 g de cloreto de polivinila e 1,5 ml de dioctilftalato. O solvente é então evaporado lentamente à temperatura ambiente em uma placa de petri ( $60\text{ cm}^2$  de área).

A membrana assim obtida é transparente e tem 0,15 a 0,2 mm de espessura. Um pedaço de membrana é colado na extremidade de um tubo de PVC com o uso de tetrahidrofurano e uma solução de  $TPP^+$   $10^{-2} M$  é colocada no interior do tubo como referência interna. Esta solução é ligada a um eletrodo Ag/AgCl através de uma ponte de Agar saturado com KCl e o eletrodo imerso em uma solução de  $TPP^+$   $10^{-2} M$  doze horas antes do uso.

A diferença de força eletromotriz (e.m.f.) entre o eletrodo de  $TPP^+$  e o eletrodo de calomelano de referência é medida por um potenciômetro conectado a um registrador, como mostrado na figura 5.

### Reagentes

Sefranina foi obtida do laboratório Aldrich.  $TPP^+$ , ATP, BHP foram obtidas do laboratório Sigma.

Os demais reagentes foram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente.

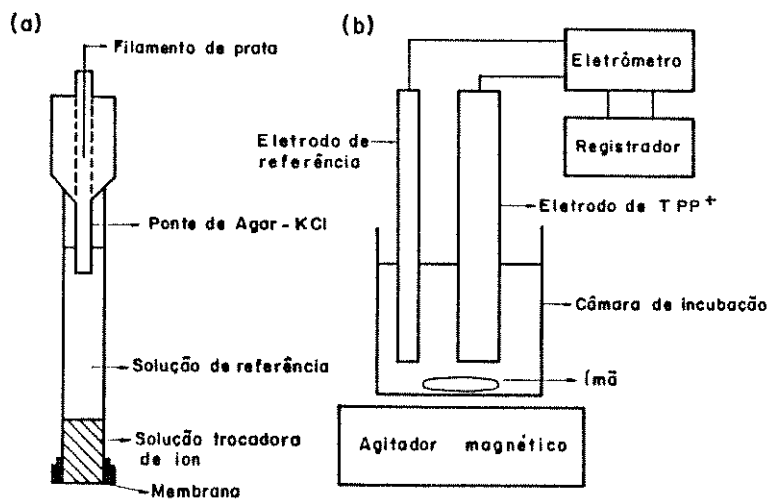


Fig. 5 - Construção de um eletrodo de TPP<sup>+</sup> (a) e diagrama dos aparelhos usados para medir o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias (b).



## RESULTADOS

**Efeito de safranina sobre a retenção de  $\text{Ca}^{++}$  por mitocôndrias hepáticas na presença de fosfato.**

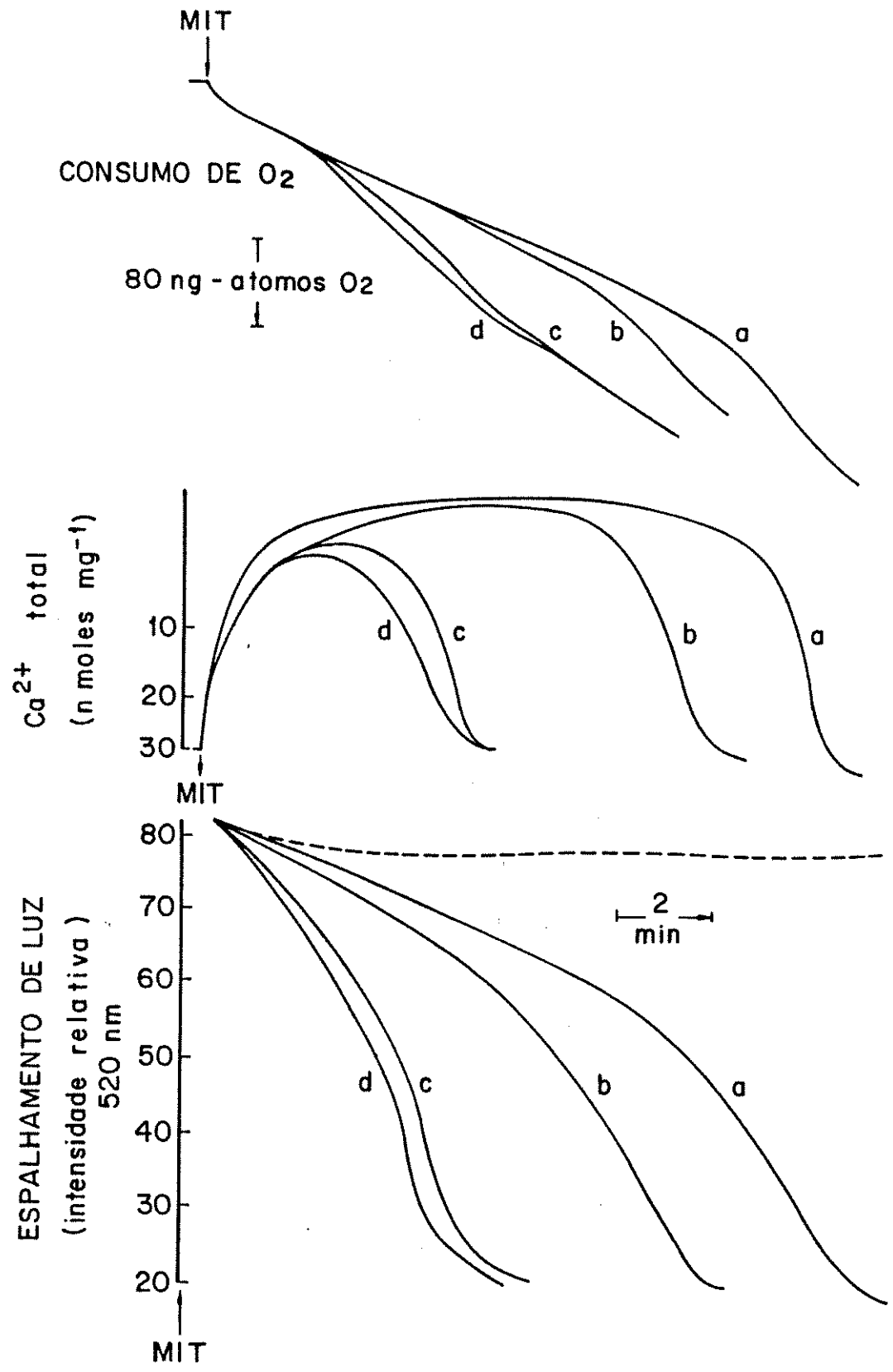
Está bem documentado que o acúmulo de  $\text{Ca}^{++}$  por mitocôndrias de fígado de rato incubadas em meio contendo Pi na ausência de  $\text{Mg}^{++}$ , ou ATP exógenos é seguido por uma liberação espontânea do  $\text{Ca}^{++}$  acumulado, após um variável período de tempo (0-20 min.) (Nicholls & Crompton, 1980; Nicholls & Åkerman, 1982; Åkerman & Nicholls, 1983).

Essa descarga de  $\text{Ca}^{++}$  é precedida por inchamento mitocondrial de grande amplitude e queda do potencial de membrana (Nicholls & Åkerman, 1983) e é potencializada por uma série de agentes tais como: fosfoenol-piruvato (Chudapongse & Haugaard, 1973), atractilato (Meisner & Klingenberg, 1968; Asimakis & Sordahl, 1977; Nicholls & Scott, 1980), oxidantes de  $\text{NAD(P)H}^+$  como acetoacetato, oxaloacetato e hidroperóxidos (Sul et alii, 1976; Asimakis & Sordahl, 1977; Lehninger et alii, 1978; Fiskum & Lehninger, 1979) e resíduos acil-CoA de cadeia longa (Lötscher et alii, 1979b; Wolkowics & Millan-Wood, 1979, 1980b).

O experimento da figura 6 mostra as características do fluxo de  $\text{Ca}^{++}$ , consumo de oxigênio e variações do volume de mitocôndrias de fígado de rato incubadas em meio contendo 30 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína e 2mM de Pi na ausência e presença de diferentes concentrações de safranina. As mitocôndrias eram energizadas às expensas da oxidação de succinato. Pode ser visto que na ausência de safranina a captação de  $\text{Ca}^{++}$  foi seguida por um intervalo de cerca de 13 minutos antes que uma rápida liberação do íon ocorresse. Durante esse

Fig. 6 - Efeito de diferentes concentrações de safranina sobre a retenção de  $\text{Ca}^{2+}$ , velocidade de respiração e aumento de volume de mitocôndria de fígado de rato.

A reação era iniciada pela adição de 1 mg de proteína a 1 ml de meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 3.0 mM Hapes (pH 7,1), 5,0  $\mu\text{M}$  de rotenona, 2,0 mM de fosfato, 2,0 mM de succinato e 30 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$  na ausência (a) ou presença de 5  $\mu\text{M}$  (b), 10  $\mu\text{M}$  (c), ou 20  $\mu\text{M}$  (d) de safranina. A linha tracejada representa um experimento realizado na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e safranina.



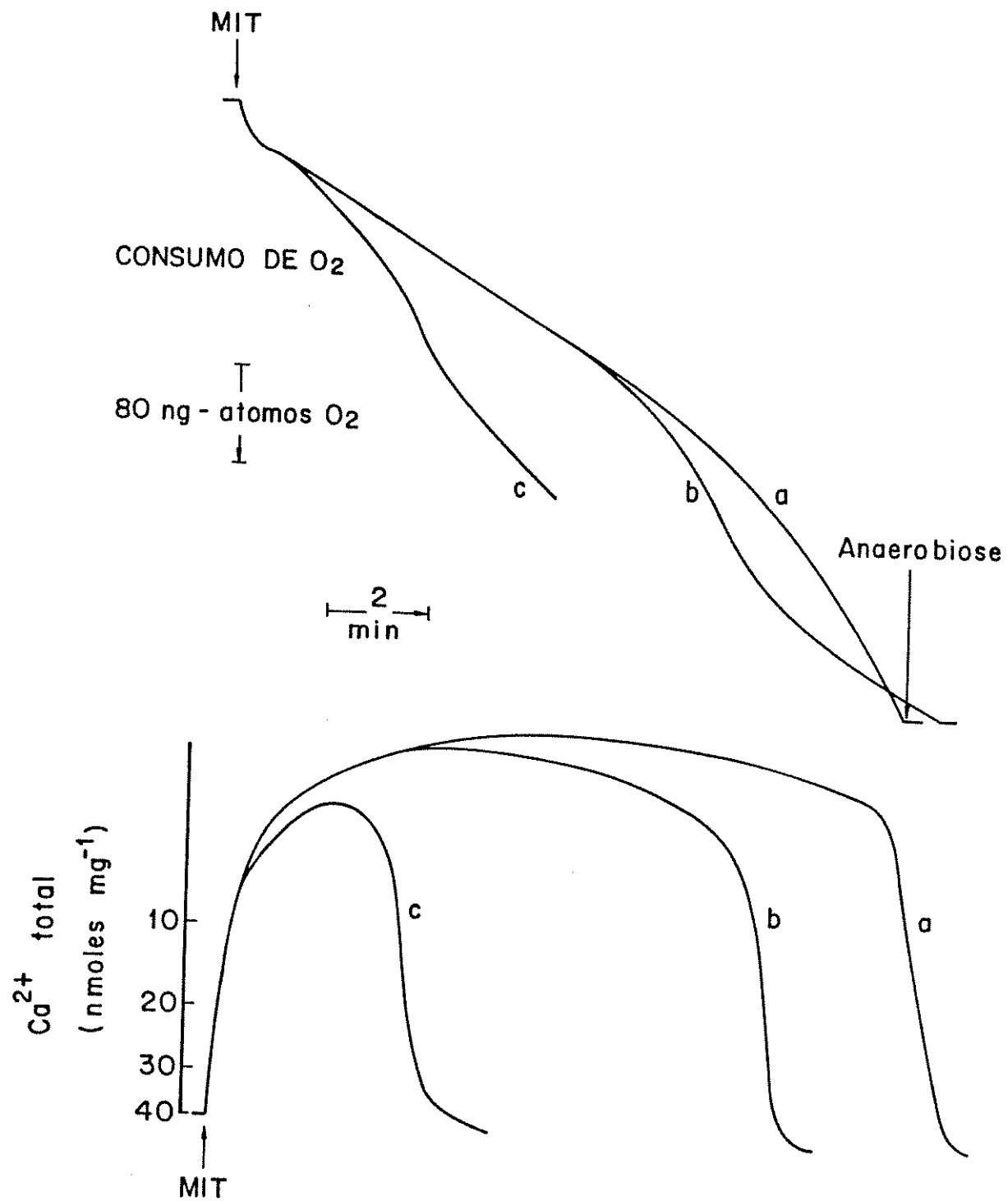
período um progressivo aumento na velocidade de respiração ocorreu paralelamente a uma diminuição do espalhamento de luz, o que significa um aumento do volume mitocondrial. (Béavis et alii, 1985). O intervalo de tempo entre a captação e liberação de  $\text{Ca}^{++}$  tornou-se mais curto com o aumento da concentração de safranina no meio. As variações na velocidade de respiração e o volume mitocondrial foram também aceleradas pelo aumento na concentração de safranina. Pode ainda ser observado nesta figura que após um grande aumento do volume mitocondrial ocorre uma ligeira diminuição na velocidade de respiração.

#### **Efeito do uso de safranina sobre o transporte de $\text{Ca}^{++}$ na presença de acetoacetato e Pi**

Neste experimento (Fig. 7) o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  foi estudado na presença de acetoacetato, conhecido estimulante da liberação de  $\text{Ca}^{++}$  mitocondrial devido a sua propriedade de oxidar os nucleotídeos de piridina mitocondriais (Lehninger et alii, 1978b; Coelho e Vercesi, 1980; Vercesi & Lehninger, 1982).

Os resultados mostram que na condição controle (Pi 0,3mM), 40 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína foram captados e retidos pela mitocôndria até se atingir a exaustão de todo  $\text{O}_2$  presente no meio (traçado a). Na presença de acetoacetato, entretanto, a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  precedeu o estado de anaerobiose (traçado b). A safranina numa concentração de 10  $\mu\text{M}$ , concentração normalmente empregada para monitorar  $\Delta\psi$ , potencializou significativamente o efeito do acetoacetato sobre o fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  mitocondrial diminuindo o período de retenção do íon no interior da organela.

Fig. 7 - Potencialização, pela safranina, do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e aumento do estado respiratório - 4 - induzidos por aceto-acetato. A reação era iniciada pela adição de 1 mg de proteína a 1 ml de meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 3,0 mM de HEPES (pH 7,1), 5,0  $\mu\text{M}$  de rotenona, 0,3 mM de fosfato, 2,0 mM de succinato e 40 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  (a) mais 1,0 mM de acetoacetato (b) ou 1,0 mM de aceto-acetato mais 10  $\mu\text{M}$  de safranina. (c).



### Efeito do uso da safranina sobre o transporte de $\text{Ca}^{++}$ na presença de acetoacetato, Pi, BSA e $\text{Mg}^{++}$

Neste experimento (fig. 8) as mitocôndrias foram incubadas em meio de reação contendo  $\text{Mg}^{++}$  e BSA como estabilizadores de membrana (Hunter & Haworth, 1979). Acetoacetato e Pi foram usados nas mesmas concentrações do experimento anterior, ou seja, 1 mM e 0,3 mM respectivamente. Nestas condições, o efeito da safranina na presença de acetoacetato foi menos pronunciado que no experimento anterior, apesar da alta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado.

### Efeito de safranina sobre o efluxo de $\text{Ca}^{++}$ na presença de hidroperóxidos

A figura 9 mostra os resultados de experimentos de transporte de  $\text{Ca}^{++}$  realizados na presença de t-butil hidroperóxido como oxidante de NAD(P)H.

As mitocôndrias (1 mg/ml) foram incubadas em meio contendo  $\text{Mg}^{++}$  e ATP como estabilizadores de membrana e acetato como ânion permeante. O painel A mostra que nestas condições as mitocôndrias de fígado de rato captam e retêm 100 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína na ausência de hidroperóxido, independentemente da presença ou não de safranina. Pode ser observado que um potencial de membrana da ordem de 175 mV é desenvolvido e mantido com o tempo. Embora as características do efluxo de  $\text{Ca}^{++}$  tenham sido praticamente idênticas, o potencial de membrana era ligeiramente inferior e a velocidade de respiração ligeiramente aumentada na presença de safranina nas condições de painel A.

O painel B mostra que na presença de 50  $\mu\text{M}$  de hidroperóxido houve alteração transitória na velocidade de respiração, fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  e nos valores de

Fig. 8 - Efeito da safranina sobre o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de acetoacetato; fosfato, BSA e magnésio. A reação era iniciada pela adição de 1 mg de proteína a 1 ml de meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 3,0 mM de HEPES (pH 7,1), 2,0 mM de succinato, 5  $\mu\text{M}$  de rotenona, 0,3 mM de fosfato, 2 mM de magnésio e 0,05 mg % de BSA. Acetoacetato e safranina 1 mM e 10  $\mu\text{M}$  respectivamente, conforme indicado.



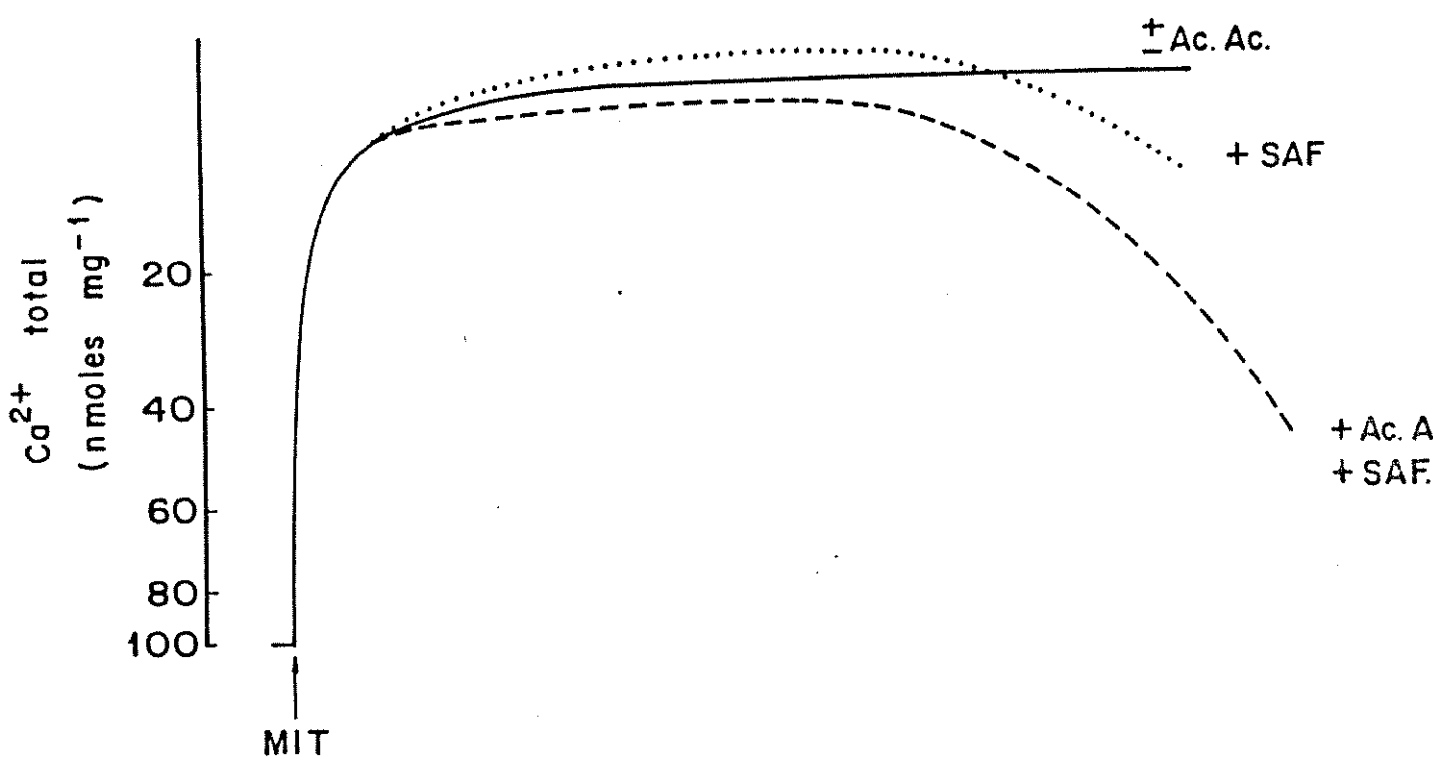
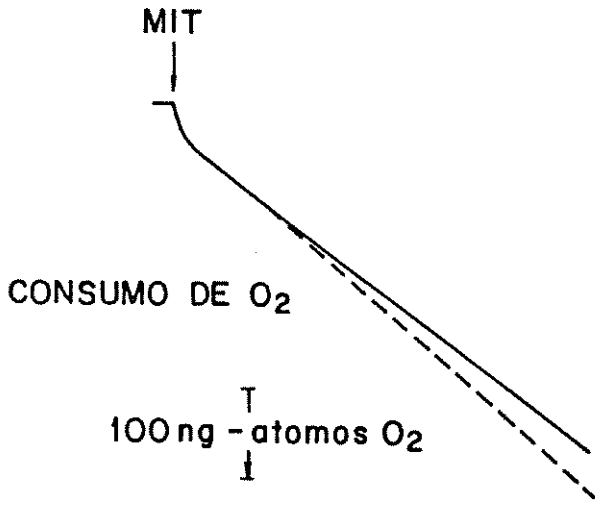
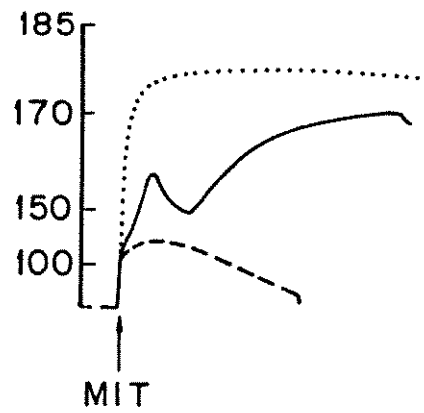
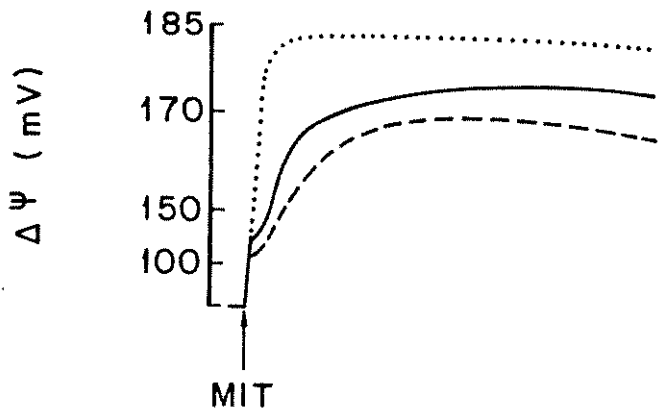
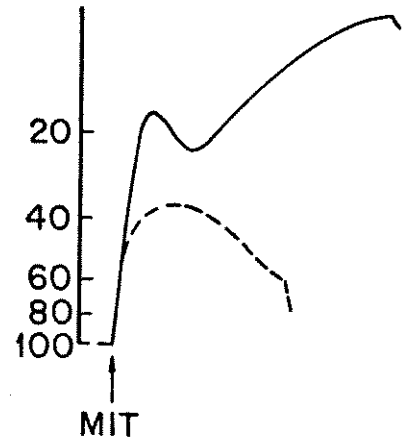
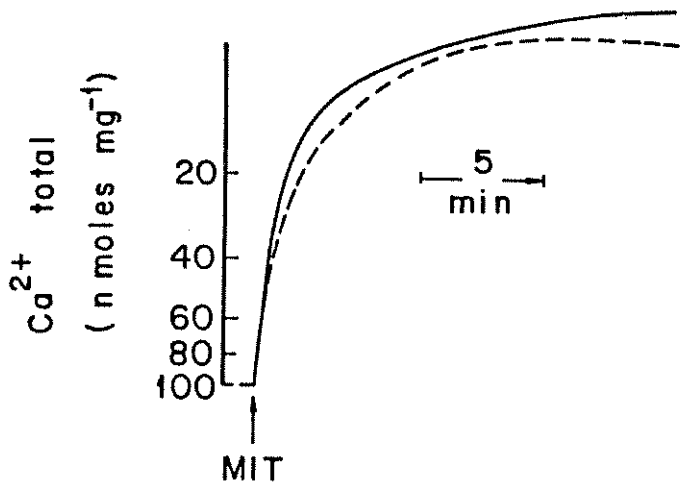
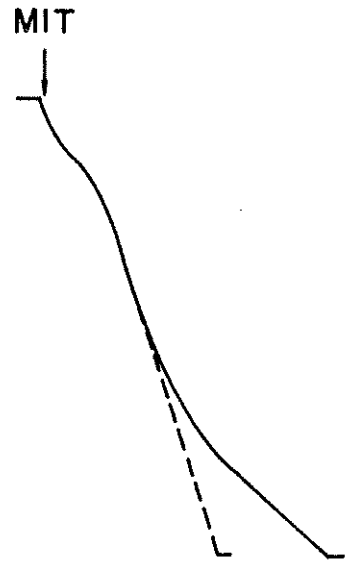


Fig. 9 - Efeito de safranina sobre o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência (A) ou presença de 50  $\mu\text{M}$  de hidroperóxido (B). A reação era iniciada pela adição de 1 mg de proteína a 1 ml de meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 3,0 mM de HEPES (pH 7,1), 10 mM de acetato, 30 mM de  $\text{TPP}^+$ , 4 mM de  $\text{Mg}^{++}$ , 3 mM de ATP e 100 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência (linhas sólidas) ou presença de 10  $\mu\text{M}$  de safranina (linhas tracejadas). As linhas pontilhadas representam experimentos realizados na presença de 1,0 mM de EGTA na ausência (A) ou na presença de 10  $\mu\text{M}$  de safranina (B).

A



B



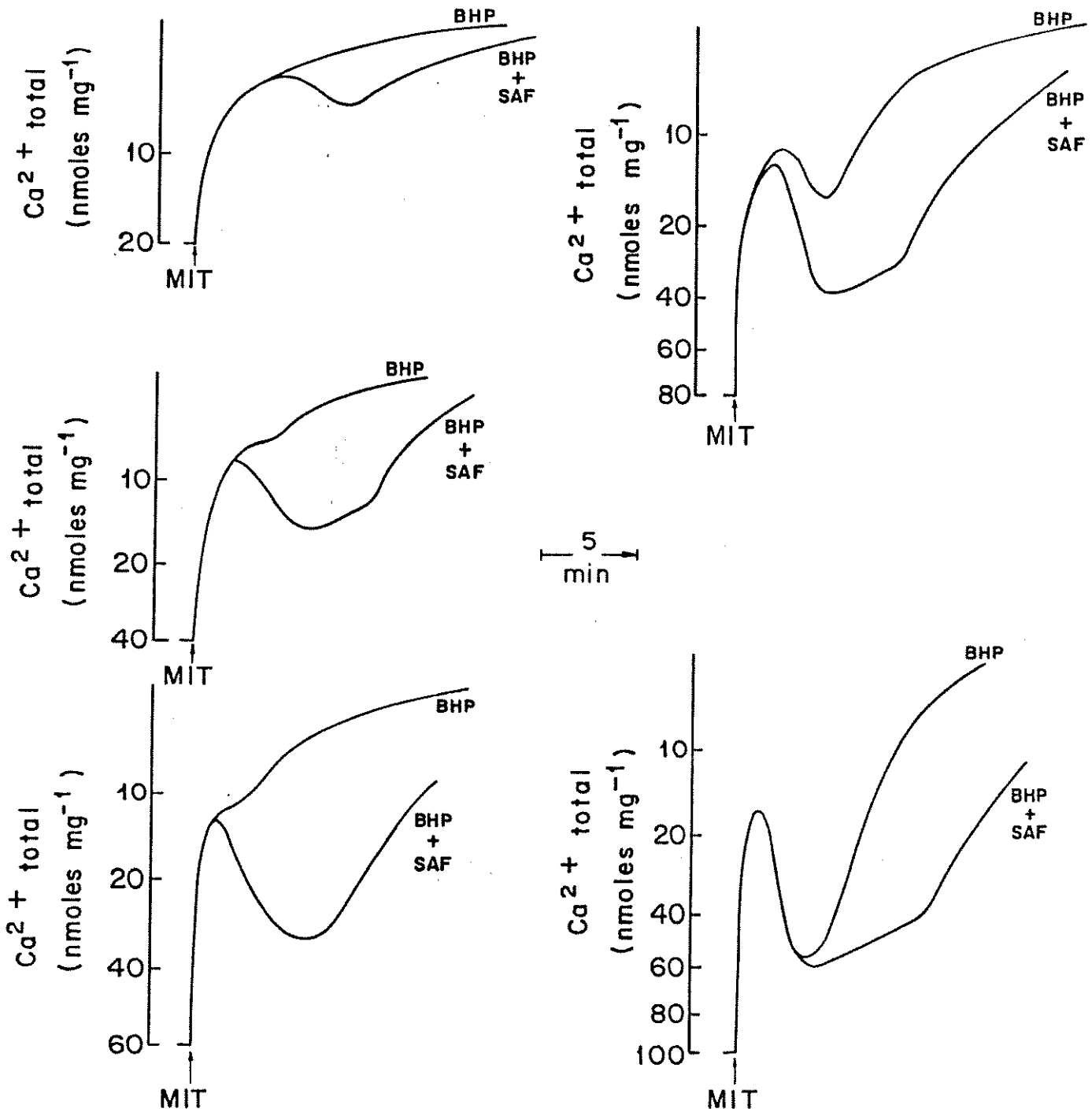
$\Delta\psi$ . Estes resultados estão de acordo com os obtidos em nosso laboratório que indicam, que estas variações são paralelas às alterações do estado de óxido redução dos nucleotídeos de piridina que ocorrem durante a redução de hidroperóxido causada pelo sistema enzimático glutathiona redutase/glutathiona peroxidase usando poder redutor proveniente do NADPH mitocondrial (Bernardes et alii, 1986). Entretanto, quando esses experimentos foram executados na presença de  $10 \mu\text{M}$  de safranina alterações significativas nesses parâmetros foram observadas. Pode ser visto que uma alta velocidade de respiração foi mantida até a exaustão do  $\text{O}_2$  do meio de incubação, numa tentativa de estabelecer  $\Delta\psi$ , que não foi além de 120-130 mV. Como consequência o  $\text{Ca}^{2+}$  presente no meio, foi apenas parcialmente acumulado e liberado em seguida.

As linhas pontilhadas na parte inferior do painel A e B mostram experimentos realizados na presença de EGTA (meio isento de  $\text{Ca}^{++}$ ). Pode ser observado que nestas condições (ausência de  $\text{Ca}^{++}$ ) o potencial de membrana é ligeiramente inferior na presença de safranina, porém é mantido constante com o tempo.

**Fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  na presença de hidroperóxido e safranina: efeito da safranina em diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{++}$ .**

A figura 10 mostra que na presença de uma concentração fixa de t-butil hidroperóxido o efluxo transitório de  $\text{Ca}^{++}$  depende da quantidade de  $\text{Ca}^{++}$  pré-acumulada pela mitocôndria. Nestes experimentos a mitocôndria (1 mg/ml) foi incubada em meio contendo  $\text{Mg}^{++}$  e ATP como no experimento anterior. Como pode ser visto o efluxo transitório de  $\text{Ca}^{++}$ , que é praticamente imperceptível quando a mitocô-

Fig. 10 - Fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  na presença de hidroperóxido e safranina: efeito da safranina em diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{++}$ . A reação era iniciada pela adição de 1 mg de proteína em 1 ml de meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 3,0 mM de HEPES (pH 7,1), 10 mM de acetato, 4 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ , 3 mM de ATP, e concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  que variaram de 20 a 100 nmoles, na presença de hidroperóxido (50  $\mu\text{M}$ ) ou hidroperóxido e safranina (10  $\mu\text{M}$ ) conforme indicado na figura.



dria está carregada com apenas 20 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína aumenta com o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  acumulado. Este efluxo é significativamente acentuado pela presença de safranina.

#### Efluxo de $\text{Mg}^{++}$ endógeno induzido pela captação de $\text{Ca}^{++}$ e Pi-Efeito de Safranina

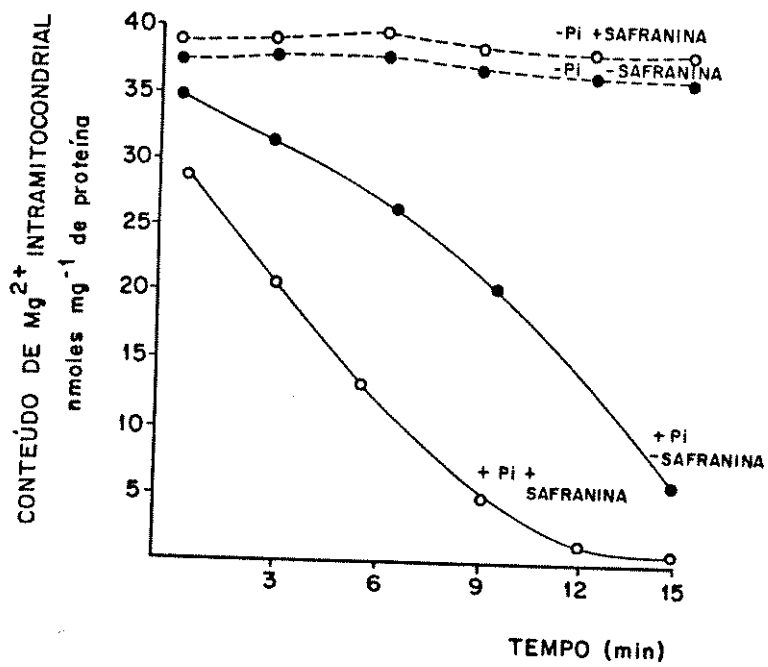
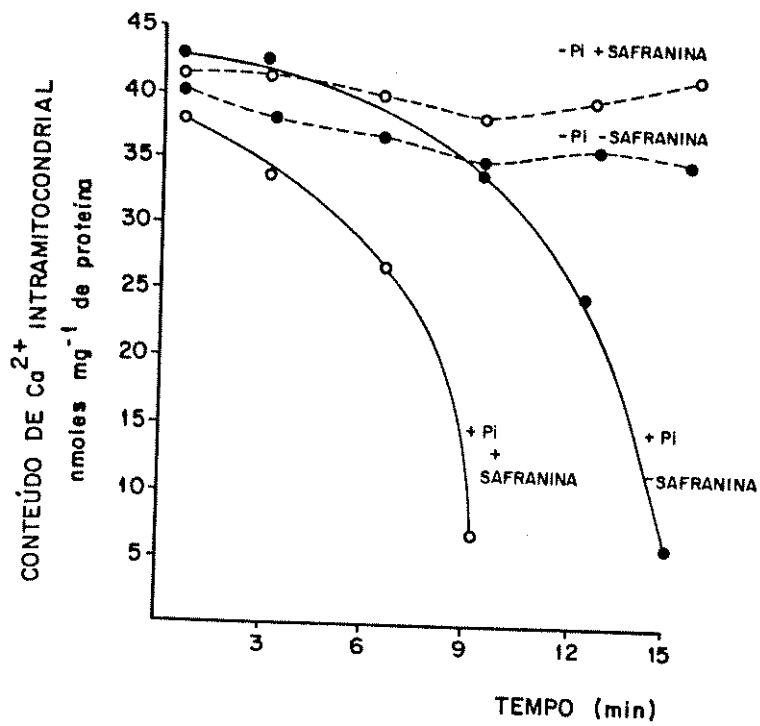
Os gráficos da figura 11, mostram perda de  $\text{Mg}^{++}$  endógeno e do  $\text{Ca}^{++}$  acumulado em função do tempo e da presença de fosfato e safranina. Mitocôndrias hepáticas eram pré-incubadas na presença de  $\text{Ca}^{++}$  e succinato como substrato respiratório. Após o acúmulo de  $\text{Ca}^{++}$  presente no meio de reação o conteúdo de  $\text{Mg}^{++}$  endógeno e do  $\text{Ca}^{++}$  acumulado eram determinados. Pode ser observado que na ausência de fosfato exógeno tanto o  $\text{Ca}^{++}$  acumulado como o  $\text{Mg}^{++}$  endógeno eram retidos pela mitocôndrias durante o período em análise (15 minutos) independentemente da presença de safranina. Entretanto, na presença de Pi, cerca de 50% do  $\text{Mg}^{++}$  mitocondrial era perdido num período de 9 minutos enquanto que nos 15 minutos analisados cerca de 80% do  $\text{Mg}^{++}$  endógeno era liberado. A perda do  $\text{Ca}^{++}$  acumulado era mais lenta inicialmente (cerca de 10% em 9 minutos) para ser acelerada entre 10 e 15 minutos. A presença de safranina potencializou fortemente o efeito de Pi sobre as perdas de  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Ca}^{++}$  de tal maneira que após 9 minutos de incubação cerca de 80% de ambos,  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , já haviam sido liberados.

Fig. 11 - Efeito da safranina sobre a perda de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  mitocondrial induzida por  $\text{P}_i$ .

Mitocôndrias (3 mg/ml) foram incubadas em meio contendo: sacarose 130 mM, KCl 65 mM, tampão Hepes 3mM (pH 7,1), rotenona 4  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  40 nmoles/mg, fosfato 2 mM e safranina 10  $\mu\text{M}$  quando adicionados.

Amostras de mitocôndrias foram retiradas de 3 em 3 minutos e o  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  mitocondriais foram dosados usando-se espectrofotômetro de absorção atômica.





## DISCUSSÃO

Mitocôndrias de diferentes tecidos podem perder  $\text{Ca}^{++}$  através de diferentes mecanismos, fato que tem gerado considerável grau de confusão na literatura.

A liberação de  $\text{Ca}^{++}$  pode ocorrer pela via de efluxo eletroneutra ( $\text{Ca}^{++}/2\text{H}^+$  ou  $\text{Ca}^{++}/2\text{Na}^+$ ) em condições fisiológicas, ou seja, quando o potencial de membrana é mantido em valores próximos a 180 mV. Efluxo líquido de  $\text{Ca}^{++}$  pode ser também induzido através do reverso da via de captação revertendo-se o potencial eletroquímico de  $\text{Ca}^{++}$  pela adição de quelantes ou colapsando-se o potencial de membrana pela adição de desaclopadores.

Outra modalidade de efluxo consiste na descarga espontânea de  $\text{Ca}^{++}$  observada dentro de um período de 0 a 20 min. (Nicholls & Crompton, 1980; Nicholls and Åkerman, 1982; Nicholls & Åkerman, 1983), após sua captação pela mitocôndria na presença de concentrações fisiológicas de Pi. Essa descarga maciça de  $\text{Ca}^{++}$  é observada somente quando mitocôndrias são incubadas em meio isento de  $\text{Mg}^{++}$  e nucleotídeos de adenina, conhecidos estabilizadores da membrana mitocondrial (Zoccarato et alii, 1981). Nestas condições, a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  está associada à deterioração mitocondrial caracterizada pelo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (Haworth & Hunter, 1979); queda do potencial de membrana (Lötscher et alii, 1980; Nicholls & Brandi, 1980); perda de nucleotídeos de adenina (Out et alii, 1971; Zoccarato et alii, 1981) e  $\text{Mg}^{++}$  (Coelho & Vercesi, 1980; Zoccarato et alii, 1981) aceleração da respiração e inchamento mitocondrial de grande amplitude (Chapell & Crofts, 1965). Esse conjunto de eventos não é restrito à condição de carregamento maciço de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lehninger et alii, 1967). Concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  de apenas 10-30 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína são

suficientes para tornar mitocôndrias de fígado (Zoccarato et alii, 1981) e mitocôndrias de cérebro (Nicholls & Scott, 1980) susceptíveis aos eventos acima citados dependendo da composição do meio de incubação. Uma variedade de agentes quimicamente diferentes potencializam essa descarga espontânea de  $Ca^{++}$ , por mecanismos não bem elucidados. Figuram entre os agentes potencializadores da liberação maciça de  $Ca^{++}$  os agentes oxidantes de nucleotídeos de piridina como acetoacetato, oxaloacetato e hidroperóxidos (Lehninger et alii, 1978; Fiskum & Lehninger, 1979; Lötscher et alii, 1979b; Wolkowics & McMillan-Wood, 1979; 1980b; Prpie & Bygrave, 1980; Nicholls & Brand, 1980), fosfoenol piruvato (Chudapongse & Haungaard, 1973; Peng et alii, 1974; Sul et alii, 1976; Ross et alii, 1978), atractilato ou carboxiatractilato (Meisner & Klingenberg, 1968; Asimakis & Sordahl, 1977; Nicholls and Scott, 1980), resíduos acil-CoA de cadeia longa (Sul et alii, 1976; Wolkowics and McMillan Wood, 1979, 1980b), N-etil maleimida e diamida (Pfeiffer et alii, 1979; Siliprandi et alii, 1979; Beatrice et alii, 1980; Beatrice et alii, 1982; Riley et alii, 1985).

Com exceção para a potencialização induzida por carboxiatractilato nenhum desses agentes é efetivo em prevenir a descarga maciça de  $Ca^{++}$  na presença de  $Mg^{++}$  e de nucleotídeos de adenina (Zoccarato et alii, 1981).

O ácido bongkrékico, que inibe a perda de nucleotídeos (ATP e ADP) mitocondriais (Zoccarato et alii, 1981), protege a organela contra as alterações induzidas pelo  $Ca^{++}$ . Isto sugere que a perda de nucleotídeos de adenina da matriz seja um evento dramático neste mecanismo de deterioração mitocondrial na presença de  $Ca^{++}$  e dos indutores de sua liberação. Esta hipótese é reforçada pelo fato de ATP, ADP e oligomicina fazerem parte da lista de agentes estabilizadores da membrana mitocondrial (Zoccarato et alii, 1981; Meisner & Klingenberg,

1968). O carboxiatractilato e o ácido bongkrékico são inibidores do transporte de nucleotídeos de adenina através da membrana mitocondrial (Nicholls, D., 1982). O carboxiatractilato não entra na mitocôndria, ligando-se ao translocador na face externa da membrana enquanto o ácido bongkrékico entra na mitocôndria e se liga no translocador na face interna da membrana. Como a densidade desta translocase na membrana mitocondrial é muito alta, na presença de carboxiatractilato os translocadores de nucleotídeos são fixados na face externa da membrana o que altera a conformação da mitocôndria levando ao estado ortodoxo (Klingenberg et alii, 1971). Nesta conformação a membrana mitocondrial interna está mais distendida e o espaço inter-membrana é o menor possível (Lehninger, 1982), condição que sensibiliza a organela aos efeitos deletérios do  $\text{Ca}^{++}$  (Hunter et alii, 1976; Hunter & Haworth, 1979 a,b; Haworth & Hunter, 1979). Na presença de ácido bongkrékico a mitocôndria assume um estado mais agregado, condição em que a mitocôndria é mais resistente aos efeitos deletérios do  $\text{Ca}^{++}$  (Hunter et alii, 1976; Hunter & Haworth, 1979 a,b). O mesmo ocorre quando a mitocôndria apresenta altas concentrações de nucleotídeos de adenina endógenos (Klingenberg & Buchholz, 1973).

Neste trabalho apresentamos resultados que mostram que safranina O em concentração geralmente empregada para monitorar o potencial de membrana causa efeitos indesejáveis sobre o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  mitocondrial.

Na figura 6 observamos que o corante potencializou fortemente a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  mitocondrial induzida por fosfato, enquanto que na ausência de safranina, 30 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína são captados e retidos pela mitocôndria durante um período de tempo de mais ou menos 13 min., seguindo-se então uma rápida liberação do cátion. Na presença de concentrações crescentes de safranina a habilidade da mitocôndria em reter o  $\text{Ca}^{++}$  captado diminui proporcionalmente ao aumento da con

centração do corante. Durante o período de retenção de  $\text{Ca}^{++}$  foi observado um progressivo aumento na velocidade de respiração e um contínuo aumento do volume mitocondrial refletindo certamente uma potencialização pela safranina do processo de deterioração mitocondrial por  $\text{Ca}^{++}$  na presença de fosfato.

O mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial e a potencialização pelos diferentes agentes citados não está totalmente esclarecido.

Segundo uma das interpretações correntes (Pfeiffer, 1979; Beatrice et alii, 1980; Riley W. & Pfeiffer, 1985) estas alterações são dependentes da presença de  $\text{Ca}^{++}$  na matriz que ativaria as fosfolipases  $\text{Ca}^{++}$  - dependentes associadas à membrana mitocondrial. Estas, uma vez ativadas, atuariam sobre os fosfolipídeos de membrana removendo o ácido graxo da posição 2 produzindo lisofosfolipídeos e ácidos graxos insaturados livres. Na presença dos agentes potencializadores, as enzimas acil-Coenzima A sintetase e acil-transferase, responsáveis pela reacilação de lisofosfolipídeos, estariam inibidas (Pfeiffer, 1979; Beatrice et alii, 1980; Ryley W. & Pfeiffer, 1985). A somatória destes dois processos, estímulo das fosfolipases e inibição das enzimas que fazem reacilação, promoveria um grande aumento na concentração de lisofosfolipídeos e ácidos graxos insaturados que tem efeito deletério sobre a membrana aumentando ainda mais sua permeabilidade (Pfeiffer, 1979; Beatrice et alii, 1980; Riley W. & Pfeiffer, 1985).

Outros autores acreditam que a perda de  $\text{Mg}^{++}$  ligado à membrana é um fator importante no aumento da permeabilidade induzida por  $\text{Ca}^{++}$  na presença de  $\text{Pi}$  ou outros indutores da perda passiva desse cátion (Siliprandi et alii, 1979; Harris et alii, 1979). Assim, a perda de  $\text{Mg}^{++}$  estrutural desestabilizaria a membrana, uma vez que o mesmo participa na formação de compostos ternários entre fosfolipídeos e proteínas (Binet & Volfin, 1975; Duszynski & Wojtezak, 1977).

O mecanismo de ação da safranina poderia ser explicado com base nas suas propriedades de lipossolubilidade e agregação à membrana mitocondrial e desta forma tanto estimular a perda de  $Mg^{++}$  estrutural, como dificultar de alguma maneira a reacilação dos fosfolipídeos lisados pela fosfolipase  $A_2$ .

Lehninger et alii, (1978b), Coelho e Vercesi, (1980) e Vercesi & Lehninger, (1982), mostraram claramente existir uma correlação entre o efluxo de  $Ca^{++}$  mitocondrial e o estado redox dos nucleotídeos de piridina dessa organela. Durante o presente trabalho realizamos experimentos de transporte de  $Ca^{++}$  em condições em que o "pool" de nucleotídeos de piridina foi induzido a um estado mais oxidado pela adição de 1 mM de acetoacetato. Os resultados da figura 7 mostram que quando o efluxo de  $Ca^{++}$  está estimulado por 1 mM de acetoacetato a adição de 10  $\mu M$  de safranina potencializou este efluxo o que se verifica pela diminuição do período de retenção do  $Ca^{++}$  captado.

O efluxo de  $Ca^{++}$  associado ao estado mais oxidado de nucleotídeos de piridina foi observado em mitocôndrias de fígado de rato (Lehninger et alii, 1978b), coração (Coelho & Vercesi, 1980) e células tumorais de Ehrlich (Landry & Lehninger, 1976), porém o mecanismo molecular deste processo continua sem elucidação. Segundo Pfeiffer et alii, (1979); Nicholls & Brand, (1980); Wolkowics & Mcmillan, (1980); Arshad et alii, (1980); Beatrice et alii, (1980) e Bardsley & Brand, (1982), o estado mais oxidado dos nucleotídeos de piridina mitocondriais meramente sensibiliza a mitocôndria aos efeitos deletérios do  $Ca^{++}$  causando desacoplamento e inchamento mitocondrial com queda do potencial de membrana e o consequente efluxo de  $Ca^{++}$  por via inespecífica ou, pelo inverso da via de captação.

Trabalhos mais recentes (Baumhuter & Richter, 1982; Roth & Dikstein, 1982; Bellomo et alii, 1984; Vercesi, A.E., 1984) contestam essa interpretação demonstrando que em condições apropriadas o efluxo de  $\text{Ca}^{++}$  estimulado pelo estado oxidado de nucleotídeos de piridina é reversível e independente de alterações inespecíficas da membrana mitocondrial.

O resultado que obtivemos na presença de safranina e acetoacetato indica que o efluxo deve ocorrer por via inespecífica uma vez que é potencializado pela safranina. Como mencionado anteriormente, o efeito da safranina parece ser inespecífico e relacionado com a sua lipossolubilidade desestabilizando de alguma maneira a membrana mitocondrial interna, fato que a torna mais sensível a outros agentes deletérios.

Os resultados da figura 8, mostrando o efeito menos pronunciado da safranina no efluxo de  $\text{Ca}^{++}$  quando as mitocôndrias são incubadas na presença de estabilizadores de membrana como  $\text{Mg}^{++}$  e BSA corroboraram esta hipótese. Neste experimento mitocôndrias de fígado de rato eram incubadas em meio idêntico ao experimento da figura 7 porém na presença de estabilizadores de membrana como BSA e  $\text{Mg}^{++}$ . Nestas condições, mitocôndrias de fígado de rato captaram e retiveram quantidades de  $\text{Ca}^{++}$  tão altas quanto 100 nmoles/mg de proteína. A adição de safranina não alterou significativamente o período de retenção do  $\text{Ca}^{++}$  captado. A habilidade de  $\text{Mg}^{++}$  e BSA em preservar a capacidade da mitocôndria de acumular e reter o  $\text{Ca}^{++}$  captado se deve ao fato do primeiro impedir a liberação do  $\text{Mg}^{++}$  ligado à membrana (Siliprandi et alii, 1977; Coelho & Vercesi, 1979), e do segundo funcionar como quelante de ácidos graxos livres, sabidamente deletérios às membranas biológicas (Riley, W. & Pfeiffer, 1985). Assim, o efeito protetor conferido pelo BSA e  $\text{Mg}^{++}$  reforçam a hipótese de que a perda de  $\text{Mg}^{++}$  estrutural e o acúmulo de

ácidos graxos são fatores determinantes no processo de permeabilização das membranas potencializado pela safranina. Na presença de  $Mg^{++}$  e BSA um alto potencial de membrana é mantido pela mitocôndria mesmo após a captação de  $Ca^{++}$ . Nestas condições o acetacetato que oxida somente o NADH e não o NADPH (Vercesi, A.E., 1985) que parece estar mais diretamente relacionado com o efluxo de  $Ca^{++}$  (Bernardes et alii, 1986; Vercesi, A.E., 1986). O experimento com hidroperóxido (Fig.9) que oxida tanto NADH como NADPH mesmo quando o potencial de membrana é mantido na faixa de 180 mV pela presença de estabilizadores de membrana constitui-se num bom modelo de estudo da ação da safranina sobre o transporte de  $Ca^{++}$ . Assim, pode ser visto que quando as mitocôndrias eram suspensas em meio contendo  $Mg^{++}$  e ATP o efeito da safranina "per se" era muito pequeno mesmo em mitocôndrias carregadas com alta concentração de  $Ca^{++}$  (100 nmoles/mg de proteína). Entretanto, nessas mesmas condições experimentais, a safranina teve um efeito significativo sobre o padrão de alterações no fluxo de  $Ca^{++}$ , potencial de membrana e respiração causada pelo hidroperóxido. Uma análise dos efeitos da safranina sobre esses parâmetros e sobre a alteração do volume mitocondrial indica uma ação generalizada do corante sobre a membrana mitocondrial possivelmente relacionada com a natureza lipofílica da safranina.

O efluxo de  $Ca^{++}$  induzido por hidroperóxido é bastante discutido, alguns autores argumentam que o efluxo ocorre por via inespecífica resultante de alterações das propriedades de permeabilidade da membrana mitocondrial (Beatrice et alii, 1980; Nicholls & Brand, 1980; Walkowics et alii, 1980; Palmer & Pfeiffer, 1981; Bardsley & Brand, 1982). Outros concluem que este mecanismo é independente de alterações da permeabilidade da membrana e que pode ter relevância fisiológica (Sies et alii, 1981; Vercesi & Lehninger, 1982).



Em face aos dados da literatura e em face aos nossos resultados com safranina somos levados a interpretar o efluxo de  $\text{Ca}^{++}$  induzido por hidroperóxido como sendo consequência de um processo de permeabilização súbito e transitório seguido por rápida restauração das propriedades de permeabilidade da membrana. Durante essa súbita transição a membrana se torna mais permeável a  $\text{H}^+$ , o que explica o aumento da velocidade respiratória e a queda transitória do potencial de membrana observado. A recaptação subsequente de  $\text{Ca}^{++}$  e a restauração do potencial de membrana seria consequência de um processo rápido de restauração da membrana mitocondrial, desencadeado por sistemas enzimáticos associados às membranas mitocondriais.

Na presença de safranina (Fig. 9 - painel B) todos os parâmetros estudados foram irreversíveis. Esse resultado, como os demais obtidos na presença de safranina, reforçam a nossa hipótese de que o corante por ser lipossolúvel e por se agregar à membrana mitocondrial, inibiria de alguma maneira o processo de restauração da membrana. Essa interpretação se torna coerente ao admitirmos o efluxo de  $\text{Ca}^{++}$  induzido por hidroperóxido como sendo inespecífico.

Na figura 10 temos os resultados obtidos com mitocôndrias incubadas nas mesmas condições da figura 9, ou seja, na presença de hidroperóxido e safranina. O nosso objetivo era estudar o efeito da safranina sobre o efluxo de  $\text{Ca}^{++}$  induzido pelo hidroperóxido em diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{++}$ . A exposição de mitocôndrias a concentrações crescentes de  $\text{Ca}^{++}$  afeta não só a magnitude do efluxo como também o período entre o efluxo e recaptação de  $\text{Ca}^{++}$ . Nestas condições a adição de safranina aumentou a magnitude do efluxo assim como o período entre efluxo e recaptação de  $\text{Ca}^{++}$ .

Os experimentos da figura 10 mostram que o efeito da safranina está

presente em todas as concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  estudadas, porém ele é quantitativamente diferente do experimento da figura 9 pelo fato de mesmo na presença de 100 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg de proteína a liberação do íon ainda ser reversível. Esses resultados estão de acordo com outros da literatura (Riley & Pfeiffer, 1985) mostrando que as concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  que causam o efeito deletério sobre a mitocôndria na presença de agentes potencializadores variam de preparação para preparação e com a idade da preparação mitocondrial.

A figura 11 apresenta dados quantitativos sobre a perda de  $\text{Mg}^{++}$  endógeno e  $\text{Ca}^{++}$  acumulado. A análise dos resultados comprova o sinergismo de ação entre o  $\text{Ca}^{++}$  e o fosfato sobre a membrana mitocondrial e o efeito potencializador de safranina nestas condições. Na presença de  $\text{Ca}^{++}$  e fosfato o período de retenção do  $\text{Ca}^{++}$  captado e o conteúdo de  $\text{Mg}^{++}$  endógeno era significativamente menor que na ausência de fosfato. Nestas condições a presença de safranina potencializou o efeito deletério do  $\text{Ca}^{++}$  e fosfato sobre a membrana o que é revelado pelas dosagens de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  em diferentes períodos de incubação.

Esses resultados devem ser interpretados de acordo com o mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial discutido anteriormente. As dosagens de  $\text{Mg}^{++}$  na condição em que o efluxo de  $\text{Ca}^{++}$  era bastante estimulado corroboram os dados da literatura que reservam ao  $\text{Mg}^{++}$  endógeno papel essencial na preservação das características de permeabilidade da membrana mitocondrial (Rossi & Lehninger, 1964; Meisner & Klingenberg, 1968; Siliprandi et alii, 1977; Siliprandi et alii, 1978; Harris et alii, 1979) atuando como elemento estabilizador de lipoproteínas de membranas.

Os resultados da figura 11, mostrando que o início da perda do  $\text{Mg}^{++}$

endógeno precede o início da perda de  $\text{Ca}^{++}$  presente na matriz, parece indicar que o mecanismo de ação da safranina envolveria alterações estruturais na membrana em consequência do deslocamento do  $\text{Mg}^{++}$  estrutural. Assim, fatores que previnem a perda do  $\text{Mg}^{++}$  ligado à membrana mitocondrial BSA, ATP e  $\text{Mg}^{++}$  exógeno abolem também o efeito da safranina que é muito mais pronunciado nas condições em que o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  "per se" é deletério à mitocôndria. Como pode ser verificado neste trabalho na presença de EGTA ou quando o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  era estudado em meio contendo estabilizadores de membrana os efeitos colaterais da safranina sobre a mitocôndria estavam ausentes ou não eram detectados com a metodologia empregada.

Nossos resultados permitem concluir que a safranina deve ser incluída na lista de agentes que sensibilizam a mitocôndria aos efeitos deletérios do  $\text{Ca}^{++}$  e como consequência causam descarrega espontânea do cátion presente na matriz dessa organela.

## RESUMO

Este trabalho descreve experimentos mostrando que safranina, em concentrações geralmente empregadas para monitorar o potencial elétrico da membrana mitocondrial, causa efeitos indesejáveis sobre o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  por mitocôndrias de fígado. Nossas observações indicam que:

(i) Safranina potencializa a descarga espontânea de  $\text{Ca}^{++}$  mitocondrial induzida por fosfato ou acetoacetato. A liberação de  $\text{Ca}^{++}$  é paralelamente acompanhada pela potencialização da liberação do estado respiratório - 4 - e pela potencialização do aumento de volume mitocondrial, indicando uma ação generalizada do corante sobre a membrana mitocondrial. (ii) O efluxo do  $\text{Ca}^{++}$  mitocondrial induzido por hidroperóxido é estimulado na presença de safranina mesmo na presença de estabilizadores de membrana como  $\text{Mg}^{++}$  e ATP. Conclui-se que o uso de safranina para indicar mudanças no potencial elétrico de membrana durante o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  por mitocôndrias deve ser evitado ou devem ser tomados cuidados especiais.

## SUMMARY

This work describes experiments showing that safranin, at the concentrations usually employed as a probe of mitochondrial membrane potential, causes significant undesirable side effects on  $\text{Ca}^{2+}$  transport by liver mitochondria. The major observations are: (i) safranin potentiates the spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release from liver mitochondria induced by phosphate or acetoacetate. This is paralleled by potentiation of the release of state-4 respiration and of the rate of mitochondrial swelling, indicating a generalized effect of the dye on the mitochondrial membrane; (ii) The efflux of mitochondrial  $\text{Ca}^{++}$  induced by hydroperoxide is stimulated in the presence of safranin even if membrane stabilizers such as  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP are present. It is concluded that the use of safranin to monitor the changes in membrane potential during  $\text{Ca}^{2+}$  transport by mitochondria should be avoided or special care be taken.

## REFERÊNCIAS

- Åkerman, K.E.D. & Wikström, M. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett., 68: 191-197, 1976.
- Åkerman, K.E.D. & Saris, N.E.L. Stacking of safranin in liposomes during valinomycin induced efflux of potassium ions. Biochim. Biophys. Acta, 426: 624-629, 1976.
- Åkerman, K.E.D. Effect of pH and  $Ca^{++}$  on the retention of  $Ca^{++}$  by rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 189: 256-262, 1978a.
- Åkerman, K.E.D. Changes in membrane potential during  $Ca^{++}$  ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. Biochim. Biophys. Acta, 502: 359-366, 1978b.
- Åkerman, K.E.D. Qualitative measurements of the mitochondrial membrane potential in situ in Ehrlich ascites tumour cells using the safranin method. Biochim. Biophys. Acta, 546: 341-347, 1979.
- Åkerman, K.E.D. & Jarvisalo, J.O. Effects of ionophores and metabolic inhibitors on the mitochondrial membrane potential within isolated hepatocytes as measured with the safranin method. Biochim. J., 192: 183-190, 1980.
- Åkerman, K.E.D. & Nicholls, D.G. Physiological and Bioenergetic Aspect of Mitochondrial Calcium Transport. Rev. Physiol. Biochim. Pharmacol., 95: 149-201, 1983.

- Arshad, J.H. & Holdsworth, E.S. Calcium uptake and release by rat liver mitochondria in the presence of rat liver cytosol or the components of cytosol. J. Membr. Biol., 57: 195-205, 1980.
- Asimakis, G.K. & Sordahl, L.A. Effect of atractylate and pamiltoil CoA on  $Ca^{++}$  transport in cardiac mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 179: 200-210, 1977.
- Bardsley, M.E. & Brand, M.D. Oxalacetate and acetoacetate - induced calcium efflux from mitochondria occurs by reversal of the uptake pathway. Biochem.J., 202: 197-201, 1982.
- Baumhuter, S. & Richter, C. The hidroperoxide - induced release of mitochondrial calcium occurs via a distinct pathway and leaves mitochondria intact. FEBS. Lett., 148: 271- 275, 1982.
- Beatrice, M.C.; Palmer, J.W. & Pfeiffer, D.R. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential and the retention of  $Ca^{++}$  by mitochondria. J. Biol. Chem., 255: 8663-8671, 1980.
- Beatrice, M.C.; Stiers, D. & Pfeiffer, D. Increased permeability of mitochondria during  $Ca^{++}$  release induced by t-Butil Hydroperoxide or Oxalacetate. J. Biol. Chem., 257: 7161-7171, 1982.
- Beavis, A.D.; 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: 13424-13433.

- Becker, G.L. Steady state regulation of extramitochondrial calcium by rat liver mitochondria, effects of  $Mg^{++}$  and ATP. Biochem. Biophys. Acta, 591: 234-239, 1980.
- Becker, G.L.; Fiskum, G. & Lehninger, A.L. Regulation of free  $Ca^{2+}$  by liver mitochondria and endoplasmatic reticulum. J. Biol. Chem., 255: 9009-9012, 1980.
- Bellomo, G.; Martino, A.; Richelmi, P.; Moore, G.A.; Jewell, S.A. & Orrenius, S. Pyridine-nucleotide oxidation,  $Ca^{2+}$  cycling and membrane damage during tert-butyl hydroperoxide metabolism by rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 140: 1-6, 1984.
- Bernardes, C.; Pereira da Silva, L. & Vercesi, A.E. T-Butylhydroperoxide - induced  $Ca^{2+}$  efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of  $Mg^{2+}$  and ATP. Biochim. Biophys. Acta., 1986 (no prelo).
- Binet, A. & Volfin, P. ADP requirement for prevention by a cytosolic factor of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  release from rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 164: 756-764, 1974.
- Binet, A. & Volfin, P. Effect of the A23187 ionophore on mitochondrial membrane  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{++}$ . FEBS. Lett., 49: 400-403, 1975.
- Brand, M.D.; Chen, C.H. & Lehninger, A.L. Stoichiometry of  $H^+$  ejection during respiration dependent accumulation of  $Ca^{++}$  by rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 251: 968-974, 1976a.



- Brand, M.D.; Reynafarje, B. & Lehninger, A.L. Re-evaluation of the  $H^+$ /site ratio of mitochondrial electron transport with Oxygen pulse technique. J. Biol. Chem., 251: 5670-5679, 1976b.
- Bygrave, F.L. Mitochondrial calcium transport. Curr. Topics in Bioenergetics, 6: 260-318, 1977.
- Carafoli, E.; Rossi, C.S. & Lehninger, A.L. Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria during active accumulation of  $Ca^{++}$  and phosphate. J. Biol. Chem., 240: 2254-2261, 1965.
- Carafoli, E. & Crompton, M. The regulation of intracellular calcium. Curr. Top. Mem. Transp., 10: 151-216, 1978.
- Chance, B. Quantitative aspects of the control of oxygen utilization. In: Wolstenholme, G.E.W. & O'Connor, C.M. Regulation of cell metabolism. Ciba Foundation Symposium, Boston, Little Brown and Company, 1959.
- Chance, B. In energy linked reaction of calcium with mitochondria. J. Biol. Chem., 240: 2729-2748, 1965.
- Chappell, J.B. & Crofts, A.R. Calcium accumulation and volume changes of isolated mitochondria. Biochem. J., 95: 378-392, 1965.
- Chudapongse, P. & Haugaard, N. The effect of phosphoenolpyruvate on  $Ca^{++}$  transport by mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 307: 503-509, 1973.
- Coelho, J.L.C. & Vercesi, A.E. Retention of  $Ca^{++}$  by rat heart mitochondria. I.R.C.S. Med. Sci., 7: 407, 1979.

- 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: 141-147, 1980.
- Collonna, R.; Massari, S. & Azzone, G.F. The problem of cation-binding sites in the energized membrane of intact mitochondria. Eur. J. Biochem., 34: 577-585, 1973.
- Drahota, Z.; Carafoli, E.; Rossi, C.S.; Gamble, R.L. & Lehninger, A.L. The steady state maintenance of accumulated  $\text{Ca}^{++}$  in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 240: 2712-2720, 1965.
- Duszynski, J. & Wojtczak, L. Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  depletion of mitochondria on their permeability to  $\text{K}^+$ : The mechanism by which ionophore A23187 increases  $\text{K}^+$  permeability. Biochem. Biophys. Res. Commun., 74: 417, 424, 1977.
- Fiskum, G. & Lehninger, A.L. Regulated release of  $\text{Ca}^{2+}$  from respiring mitochondria by  $\text{Ca}^{++}/2\text{H}^+$  antiport. J. Biol. Chem., 254: 6236-6239, 1979.
- Gazzoti, P. The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the oxidation of exogeneous NADH by rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 67: 634-638, 1975.
- Gochman, N. & Givelber, H. Automated, simultaneous microdetermination of calcium and magnesium by atomic absorption. Clin. Chem., 16(3): 229-234, 1970.
- Gunter, D.R. & Haworth, R.A. The  $\text{Ca}^{2+}$  induced membrane transition in mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 195: 453-459, 1979.

- Hansford, R.G. Effect of micromolar concentrations of free  $\text{Ca}^{2+}$  ions on pyruvate dehydrogenase interconversion in intact heart mitochondria. Biochem. J., 194: 721-732, 1981.
  
- Hansford, R.G. & Castro, F. Intramitochondrial and extramitochondrial free calcium ion concentrations of suspensions of heart mitochondria with very low plausibly physiological contents of total calcium. J. Bioenerg. Biomembr., 14: 361-376, 1982.
  
- Haworth, R.A. & Hunter, D.R. The  $\text{Ca}^{2+}$  induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the  $\text{Ca}^{2+}$  trigger site. Arch. Biochem. Biophys., 195: 460-467, 1979.
  
- Harris, E.J.; Al-Shaikhaly, M. & Baum, H. Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol - specific reagents and by thyroxine. The relationship to adenosine diphosphate retention and to mitochondrial permeability. Biochem. J., 182: 455-464, 1979.
  
- Harris, E.J. & Baum, H. Uptake of safranin by cardiac mitochondria. Competition with calcium ions and dependence of anions. Biochem. J., 192: 551-557, 1980.
  
- Heaton, G.M. & Nicholls, D.G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. Biochem. J., 156: 635-646, 1976.

- Höser, N.; Dargel, N.; Dawczynski, H. & Winnefeld, K. Respiration - dependent stimulation by inorganic phosphate of  $Mg^{2+}$  release from rat liver mitochondria. FEBS Lett., 72: 193-196, 1976.
  
- Hughes, B.P. & Barrit, G.J. Interaction between glucocorticoids and glucagon in the hormonal modification of calcium retention by isolated rat liver mitochondria. J. Biochem., 180: 291-295, 1980.
  
- Hunter, D.R.; Haworth, R.A. & Southard, J.M. Relationship between configuration, function and permeability in calcium treated mitochondria. J. Biol. Chem., 251: 5069-5077, 1976.
  
- Hunter, D.R. & Haworth, R.A. The  $Ca^{2+}$  induced membrane transition in mitochondria. I - The protective mechanisms. Arch. Biochem. Biophys., 195: 453-459, 1979.
  
- Hunter, D.R. & Haworth, R.A. The  $Ca^{2+}$  induced membrane transition in mitochondria. III - Transitional  $Ca^{++}$  release. Arch. Biochem. Biophys., 195: 468-477, 1979.
  
- Joseph, S.K.; Coll, K.E.; Cooper, R.H.; Marks, J.S. & Williamson, J.R. Mechanisms underlying calcium homeostasis in isolated hepatocytes. J. Biol. Chem., 258: 731-741, 1983.
  
- 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 phosphorylation potential in steady state. J. Membr. Biol., 49: 105-121, 1979.

- Kies, M.W. & Murphy, J.B. Spectrophotometric determination of protein in dilute solutions. Biochim. Biophys. Acta., 45: 382-384, 1960.
- Klingenberg, M.; Grebe, K. & Scherer, B. Oposite effects of bongkreikic acid and atractyloside on the adenine nucleotides induced mitochondrial volume changes and on the efflux of adenine nucleotides. FEBS Lett., 16: 253-256, 1971.
- Klingenberg, M. & Bucholz, M. On the mechanism of bongkreikate effect on the mitochondrial adenine-nucleotide carrier as studied through the binding of ADP. Eur. J. Biochem., 38: 346-358, 1973.
- Landry, Y. & Lehninger, A.L. Transport of calcium ions by Ehrlich ascites tumor cells. Biochem. J., 158: 427-438, 1976.
- Lassen, U.V.; Pape, L.; Vestergaard-Bogind, B. & Bengtson, O. Calcium related hyperpolarization of Amphiuma red cell membrane following micropuncture. J. Membr. Biol., 18: 125-144, 1974.
- Lassen, U.V.; Nielsen, A.M.; Pape, L. & Simonsen, L.D. The membrane potential of Ehrlich ascites tumor cells. Microelectrode measurments and their critical evaluations. J. Membr. Biol., 6: 269-288, 1971.
- Lehninger, A.L.; Carafoli, E. & Rossi, C.S. Energy-linked ion movements in mitochondrial systems. In: NORD, F.F. Advances in Enzimology, 29: 259-320, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1967.

- Lehninger, A.L.; Reynafarje, B.; Vercesi, A.E. & Tew, W.P. Transport and accumulation of calcium in mitochondria. Ann. N.Y. Acad. Sci., 307: 160-176, 1978a.
  
- Lehninger, A.L.; Vercesi, A.E. & Bababunmi, E.A. Regulation of calcium release by the oxido-reduction state of pyridine nucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1690-1694, 1978b.
  
- Lehninger, A.L. In: Principles of Biochemistry, Worth Publisher, Inc., New York, New York: 499, 1982.
  
- 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: 4340-4344, 1979b.
  
- Lötscher, H.R.; Winterhalter, K.H.; Carafoli, E. & Richter, C. The energy state of mitochondria during the transport of calcium. Eur. J. Biochem., 110: 211-216, 1980.
  
- Lötscher, H.R.; Winterhalter, K.H.; Carafoli, E. & Richter, C. Hydroperoxides induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 255: 9325-9330, 1980.
  
- Mallof, B.L.; Scordilis, S.P. & Tedeschi, H. The membrane potential of mitochondria measured with electrodes. Science, 195: 898-900, 1977.

- McCormack, J.G. & Denton, R.M. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism: properties of the  $\text{Ca}^{2+}$  - sensitive dehydrogenase within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of rat. Biochem. J., 190: 95-105, 1980.
- Meisner, H. & Klingenberg, M. Efflux of adenine nucleotides from rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 243: 3631-3639, 1968.
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, Lond., 191: 144-148, 1961.
- Mitchell, P. Chemiosmotic coupling on oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev., 41: 445-502, 1966a.
- Mitchell, P. & Moyle, J. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. European J. Biochem., 7: 471-484, 1969.
- Muratsugu, M; Kamo, N.; Kurihara, K. & Kobatake, Y. Selective electrode for Dibenzil Dimethyl Ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. Biochim. Biophys. Acta, 464: 613-619, 1977.
- Nedergaard, J.  $\text{Na}^+$  - dependent regulation of extra-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  by rat-liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 144: 159-168, 1984.
- Nicholls, D.G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. Biochem. J., 176: 463-474, 1978.

- Nicholls, D.G. & Brand, M.D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. Biochem. J., 188: 113-118, 1980.
- Nicholls, D.G. & Crompton, M. Mitochondria calcium transport. FEBS Lett., 111: 261-268, 1980.
- Nicholls, D.G. & Scott, I.D. The regulation of brain mitochondrial calcium transport, the role of ATP in the discrimination between kinetic and membrane potential dependent calcium efflux mechanism. Biochem. J., 186: 833-839, 1980.
- Nicholls, D.G. Bioenergetics. An introduction to the chemiosmotic theory - Academic Press, London - New York: 65, 1982.
- Nicholls, D.G. & Åkerman, K.E.D. Mitochondrial calcium transport. Biochim. Biophys. Acta, 683: 57-88, 1982.
- Ontko, J.A.; Otto, D.A.; Oshino, W. & Chance, B. Calcium mediated alterations in the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides in isolated liver cells. FEBS Lett., 53: 301, 1975.
- Out, T.A.; Kemp, A. & Sowerijn, J.H.M. Effect of bongkreikic acid on calcium stimulated oxidation in rat live mitochondria and its relation to the efflux of intramitochondrial adenine nucleotides. Biochim. Biophys. Acta, 254: 299-304, 1971.



- Palmer, J.W. & Pfeiffer, D.R. The control of  $\text{Ca}^{2+}$  release from mitochondria. J. Biol. Chem., 256: 6742-6750, 1981.
  
- Peng, C.F.; Price, D.W.; Bhuvaneshwaram, C. & Wadkins, C.L. Factor which influence phosphoenolpyruvate - induced calcium efflux from rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56: 134-141, 1974.
  
- Pfeiffer, D.R.; Schimid, D.C.; Beatrice, M.C. & Schimid, H.H.O. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of calcium plus N-ethylmaleimide on mitochondria function. J. Biol. Chem., 254: 11485-11494, 1979.
  
- Pripc, V.; Spencer, T.L. & Bygrave, F.L. Stable enhancement of calcium retention in mitochondria isolated from rat liver after the administration of glucagon to the intact animal. Biochem. J., 176: 705-714, 1980.
  
- Reed, K.C. & Bygrave, F.L. Inhibition of mitochondria calcium transport by lanthanides and ruthenium red. Biochem. J., 140: 143-155, 1974.
  
- Reynafarje, B. & Lehninger, A.L.  $\text{Ca}^{2+}$  transport by mitochondria from L1210 mouse ascites tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 1744-1748, 1973.
  
- Reynafarje, B. & Lehninger, A.L. Electric charge stoichiometric of calcium translocation in mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 77: 1273-1279, 1977.

- Riley, W. & 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: 12416:12425, 1985.
- Roos, I.; Crompton, M. & Carafoli, E. The effect of phosphoenolpyruvate on the retention of calcium by liver mitochondria. FEBS Lett., 94: 418-421, 1978.
- Rossi, C.S. & Lehninger, A.L. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of calcium and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 239: 3971-3980, 1964.
- Roth, Z. & Dikstein, S. Inhibition of ruthenium red-insensitive mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  release and its pyridine nucleotide specificity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105: 991-996, 1982.
- Rottenberg, H. & Scarpa, A. Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. Biochemistry, 13: 4811-4817, 1974.
- Rugolo, M.; Siliprandi, D.; Siliprandi, N. & Toninello, A. Parallel efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  and Pi in energized rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 200: 481-486, 1981.
- Scarpa, A. & Azzone, G. The mechanism of ion translocation in mitochondria. Eur. J. Biochem., 12: 328-335, 1970.
- Schneider, W.C. & 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.

- Schuldiner, S. & Kaback, H.R. Membrane potential and active transport in membrane vesicles from Escherichia coli. Biochemistry, 14: 5451-5460, 1975,
- Selwyn, M.J.; Dawson, A.P. & Dunnett, S.J. Calcium transport in mitochondria. FEBS Lett., 10: 1-5, 1970.
- Sies, H.; Graf, P. & Estrela, J.M. Hepatic calcium efflux during cytochrome P. 450 - dependent drug oxidations at the endoplasmatic reticulum in intact liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 3358-3362, 1981.
- Siliprandi, D.; Toninello, A.; Zaccarato, F.; Rugolo, M. & Siliprandi, N. Synergic action of calcium ions and diamide on mitochondrial swelling. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56: 956-961, 1975.
- Siliprandi, D.; Toninello, A.; Zaccarato, F. & Siliprandi, N. A possible mechanism for respiration dependent efflux of  $Mg^{2+}$  ions from liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 78: 23-27, 1977.
- Siliprandi, D.; Toninello, A.; Zaccarato, F.; Rugolo, M. & Siliprandi, N. Efflux of  $Mg^{2+}$  and  $K^+$  from liver mitochondria induced by inorganic phosphate and by diamide. J. Bioenerg. Biomembr., 10: 1-11, 1978.
- Siliprandi, N.; Rugolo, M.; Siliprandi, D.; Toninello, A. & Zaccarato, F. Induction of  $Mg^{++}$  efflux and  $Ca^{++}$  cycling in rat liver mitochondria by inorganic phosphate and oxidizing agents. In: Lee, C.P.; Schatz, G. & Ernster, L., eds. Membrane bioenergetics, Massachusetts, Addison - Wesley, 1979 - p. 533-545.

- Stucki, J.W. & Ineichen, A. Energy dissipation by calcium recycling and the efficiency of calcium transport in rat liver mitochondria, Eur. J. Biochem., 48: 365-375, 1974.
- Sul, H.S.; Shraga, E. & Shug, A.L. Relationships of phosphoenolpyruvate transport, acyl CoA, inhibition of adenine nucleotide translocase and calcium efflux in guinea-pig heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 172: 230-237, 1976.
- Tupper, J. & Tedeschi, H. Microelectrode studies on the membrane properties of isolated mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63: 370-377, 1969.
- Vercesi, A.E.; Reynafarje, B. & Lehninger, A.L. Stoichiometry of  $H^+$  ejection and  $Ca^{2+}$  uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem., 253: 6379-6385, 1978.
- Vercesi, A.E. & Lehninger, A.L. Uncoupling is not obligatory for  $NADP^+$  - induced  $Ca^{2+}$  efflux from mitochondria. Fedn. Proc. Fed. Am. Socs. exp. Biol., 41: 1434, 1982.
- Vercesi, A.E. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of  $NAD(P)^+$  - stimulated  $Ca^{2+}$  efflux from mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 119: 305-310, 1984.
- Vercesi, A.E. The participation of  $NADP$ , the transmembrane potential and the energy-linked  $NAD(P)$  transhydrogenase in the process of  $Ca^{2+}$  efflux from rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 1986 (no prelo).

- Williamson, J.R.; Cooper, R.H. & Hoek, J.B. Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism. Biochim. Biophys. Acta, 639: 243-295, 1981.
- Wolkowicz, P.E. & McMillan-Wood, J. Effect of malonyl CoA on calcium uptake and pyridine nucleotide redox in rat liver mitochondria. FEBS Lett., 101: 63-66, 1979.
- Wolkowicz, P.E. & McMillan-Wood, J. Respiration dependent calcium uptake by two preparations of cardiac mitochondria. Effect of palmitoyl CoA and palmitoyl carnitine on calcium cycling and nicotinamide nucleotide state. Biochem. J., 186: 257-266, 1980b.
- Yamazaki, R.K.; Mickey, D.L. & Story, M. Rapid action of glucagon on hepatic mitochondrial calcium metabolism and respiratory rates. Biochim. Biophys. Acta, 592: 1-42, 1980.
- Zanotti, A. & Azzone, F.G. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 201: 255-265, 1980.
- Zoccarato, F.; Rugolo, M.; Siliprandi, D. & Siliprandi, N. Correlated effluxes of adenine nucleotides,  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  induced in rat liver by external  $Ca^{2+}$  and phosphate. Eur. J. Biochem., 114: 195-199, 1981.