

ENEIDA JANISCKI DALOCE

**PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL
INTERNA POR CITRININA E Ca^{2+}**

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, visando a obtenção do título de
Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1995

ENEIDA JANISCKI DALOCE

PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA POR
CITRININA E Ca^{2+}

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelas professoras:

Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri - Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná

Dra. Ione Salgado Martins - Departamento de Bioquímica - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas - SP

Dra. Maria Lúcia Wambier Klüppel - Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 7 de abril de 1995.

Tese orientada pela Professora
Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri.

Mas o maior de todos os erros está em interpretar mal o objetivo final do conhecimento; pois alguns homens almejam o conhecimento em função de uma curiosidade natural e de um temperamento inquiridor; alguns outros para entreter a mente com variedade e deleite; outros ainda, para debates e triunfos, muitos para lucro e subsistência; e bem poucos para aplicar o Divino dom da razão em benefício e para uso da humanidade.

Francis Bacon ~

Aos meus pais
e ao Narciso.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri por sua orientação, dedicação e amizade.

Ao Professor Dr. Annibal de Paiva Campello e às Professoras Dra. Maria Lúcia Wambier Klüppel, Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, Dra. Orieta Silveira , e Maria Eliane Merlin Rocha, pela acolhida carinhosa e importantes sugestões para a realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa , Dr. Shigehiro Funayama, Dra. Liu Un Rigo, Dr. Aguinaldo José do Nascimento e Dra. Glaci Terezinha Zancan por haverem permitido o uso dos seus laboratórios e/ou pelo empréstimo de material, sempre que necessário.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica pelo estímulo e apoio.

Aos amigos e colegas do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pelo incentivo e amizade constantes.

Às bolsistas de iniciação científica do projeto CNPq-PIBIC, Alessandra Hauser, Fabiane Fortes e Rosiane G. Mello pela valiosa colaboração, e principalmente pela amizade.

Aos colegas de laboratório Fabiana Mansani, Fabio C. Pedroso, Fabíola Stevan, Luiz Fernando Pereira e Sônia M. R. Ribeiro pelo apoio e carinho que tornaram a luta diária mais amena.

Às amigas Giseli Klassen e Janye A. Sugui pelo incentivo e pelo apoio na fase de impressão da tese.

Aos familiares e amigos que me acompanharam nas dificuldades e conquistas pertinentes a realização deste trabalho, em especial aos meus pais e ao Narciso pela compreensão e estímulo constantes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HOMEOSTASE INTRACELULAR DE CÁLCIO.....	1
1.2 TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE Ca^{2+}	3
1.2.1 Mecanismos de influxo e efluxo mitocondrial de Ca^{2+}	5
1.2.2 Transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias vegetais.....	8
1.3 TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA.....	9
1.3.1 Fatores envolvidos na regulação da transição de permeabilidade.....	13
1.4 CITRININA.....	15
1.5 OBJETIVOS.....	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1 Reagentes.....	19
2.2 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	19
2.3 Isolamento de mitocôndrias de tubérculo de batata.....	20
2.4 Determinação da concentração de proteínas.....	20
2.5 Preparo da solução de citrinina.....	21
2.6 Determinação do consumo de oxigênio.....	21
2.7 Determinação espectrofotométrica do transporte mitocondrial de Ca^{2+}	22
2.8 Preparação do Chelex -100.....	23
2.9 Determinação das variações do volume mitocondrial (inchamento mitocondrial).....	23
2.10 Cálculo da concentração de Ca^{2+} livre.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1 Efeito da citrinina sobre a velocidade respiratória em mitocôndrias hepáticas.....	25
3.2 Efeito da citrinina sobre o efluxo de Ca^{2+}	27
3.3 Efeito da citrinina sobre o efluxo de Ca^{2+} , na presença de vermelho de rutênio.....	29
3.4 Efeito das concentrações de Ca^{2+} e citrinina sobre a velocidade e extensão do inchamento mitocondrial.....	31

3.5 Efeito do vermelho de rutênio sobre o inchamento mitocondrial induzido por e citrinina.....	36
3.6 Efeito do ditiotreitól no inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrinina.	40
3.7 Efeito protetor de nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrinina.....	43
3.8 Efeito da ciclosporina A sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrinina.....	45
4. DISCUSSÃO FINAL.....	48
5. CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina 5' monofosfato
ADP	Adenosina 5' difosfato
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
Cit	Citrinina
CsA	Ciclosporina A
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Ácido etileno glicol bis (β - aminoetil éter) N N' - tetra acético
FCCP	p- trifluoro-metoxicarbonil cianeto fenil hidrazina
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa dissulfeto
Hepes	Ácido 4 - (2-hidroetil) - 1 - piperazinoetano sulfônico
MB	Mitocôndrias de batata
MFR	Mitocôndrias de fígado de rato
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
NAD(P)	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
Pi	Fosfato inorgânico
PTP	Poros de transição de permeabilidade
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Suc	Succinato
TPP ⁺	Tetrafenilfosfônio
TPMP ⁺	Trifenil metilfosfônio
VR	Vermelho de rutênio
ΔΨ	Potencial elétrico transmembrana
Δ(Gp)	Potencial de fosforilação citosólica
Δμ Ca ²⁺	Gradiente eletroquímico de Ca ²⁺

RESUMO

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato e de tubérculo de batata foram estudadas em presença de citrinina. Os resultados deste trabalho mostram inibição da velocidade respiratória, dependente da concentração de citrinina, em ambos os tipos de mitocôndrias respirando com succinato e FCCP. Efluxo de Ca^{2+} ocorre por adição de altas concentrações de citrinina a mitocôndrias de fígado energizadas e na condição de fluxo constante. Quando vermelho de rutênio é adicionado anteriormente à citrinina, há diminuição do efluxo, mostrando que parte dele ocorre pelo reverso do uniporter eletroforético.

Mitocôndrias desenergizadas sofrem inchamento dependente de citrinina e Ca^{2+} que pode ser evitado pela presença de nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} . A adição de vermelho de rutênio a mitocôndrias de fígado de rato mostrou a utilização do uniporter eletroforético para a entrada do Ca^{2+} e a obrigatoriedade do íon estar no interior da organela para observar-se o inchamento mitocondrial. Em mitocôndrias de batata não houve proteção pela adição de vermelho de rutênio indicando não haver uniporter nestas mitocôndrias. Entretanto, na presença do ionóforo A23187 houve aumento acentuado do inchamento em mitocôndrias de batata, mostrando ser essencial o Ca^{2+} no interior para ocorrer o fenômeno. Nestas mitocôndrias vegetais o ditiotreitol evita o inchamento.

Em presença de ciclosporina A há proteção contra o inchamento somente em mitocôndrias de fígado de rato energizadas.

Estes resultados mostram a permeabilização da membrana mitocondrial interna na presença de citrinina e Ca^{2+} .

1. INTRODUÇÃO

1.1 HOMEOSTASE INTRACELULAR DE CÁLCIO

O reconhecimento da importância da concentração do Ca^{2+} citosólico na regulação de processos fisiológicos, tais como: contração muscular, secreção e glicogenólise, por hormônios e outros fatores extrínsecos, levou a realização de muitos estudos no sentido de definir como este íon desempenha sua função de segundo mensageiro celular (RASMUSSEN & BARRET, 1984; CARAFOLI, 1987; RASMUSSEN, 1989; MC CORMACK & DENTON, 1986; MC CORMACK et al.1990).

A concentração de Ca^{2+} citosólico de células em repouso é mantida entre 0,05 e 0,2 μM enquanto a concentração extracelular é aproximadamente quatro ordens de magnitude maior, 1,3 mM. Normalmente a homeostase intracelular de Ca^{2+} , em células eucarióticas, é regulada por uma operação coordenada de translocases da membrana plasmática e sistemas de transporte de Ca^{2+} localizados nas membranas de compartimentalização intracelular, como a membrana mitocondrial e do retículo endo (sarco) plasmático (CARAFOLI, 1987).

Basicamente, a membrana plasmática contém três sistemas de transporte de Ca^{2+} : uma ATPase específica, um canal de Ca^{2+} e um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Na membrana plasmática de tecidos excitáveis, diferentes tipos de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem foram identificados, bem como, canais receptores que estão envolvidos na entrada de Ca^{2+} durante o estímulo hormonal (FASOLATO et al. 1990).

As mitocôndrias contêm um uniporter eletroforético, que é usado para a captação de Ca^{2+} e um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, diferente daquele da membrana plasmática, com função de liberar o Ca^{2+} da matriz para o citosol. Alguns tipos de mitocôndrias possuem um trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (NICHOLLS & AKERMAN, 1982).

O retículo endo(sarco)plasmático contém uma ATPase específica para a captação de Ca^{2+} , diferente daquela encontrada na membrana plasmática, e um sistema de liberação para o citoplasma (CARAFOLI, 1987).

Quanto à função destes sistemas de transporte intracelulares, a definição de parâmetros cinéticos mostrou que a velocidade de captação do Ca^{2+} pela mitocôndria é uma ordem de magnitude menor que a do retículo endoplasmático (CARAFOLI, 1987). Além disso, evidências que o Ca^{2+} aumenta a atividade de três desidrogenases intramitocondriais, a concentrações de 0,1 a 10 μM , indicam que esta organela desempenha uma função secundária no tamponamento de Ca^{2+} sob condições normais (DENTON & MC CORMACK, 1980; 1986). Análise de raio-x de secções de fígado rapidamente congeladas, mostraram que mitocôndrias contêm pouco Ca^{2+} in situ (cerca de 1 nmol de Ca^{2+} por miligrama de proteína), enquanto que o retículo endoplasmático é o principal responsável pelo seqüestro de Ca^{2+} intracelular, representando o principal estoque de Ca^{2+} da célula (SOMLYO et al. 1985).

A função metabólica das proteínas citosólicas que ligam Ca^{2+} com alta afinidade é ainda objeto de estudo, mas acredita-se que desempenham função no processamento da mensagem pelo Ca^{2+} e/ou tamponamento de Ca^{2+} celular. Troponina C, parvalbumina e calmodulina são exemplos destas proteínas (CARAFOLI, 1987).

Estudos recentes demonstraram um sistema de captação de Ca^{2+} , dependente de ATP e de calmodulina, em núcleo de fígado. Estes estudos sugerem a possibilidade do núcleo ter um mecanismo próprio para regular sua concentração de Ca^{2+} e para modular a resposta intranuclear de Ca^{2+} por hormônios e fatores de crescimento (NICOTERA et al. 1989).

Todos estes sistemas de transporte possuem propriedades cinéticas diferentes, equilibradas para satisfazer as necessidades da célula durante seu ciclo funcional. Uma ruptura do mecanismo que regula a homeostase intracelular de Ca^{2+} é frequentemente o primeiro evento no desenvolvimento da injúria celular irreversível. Embora a morte celular possa ocorrer por mecanismos independentes de Ca^{2+} o aumento de sua concentração intracelular, se mantido, é capaz de bloquear a resposta causada por estímulo hormonal, comprometer a função mitocondrial e a organização do citoesqueleto, bem como ativar processos catabólicos irreversíveis (NICOTERA et al. 1992).

Muitos mecanismos são citados como determinantes de vários processos patológicos em consequência de alteração da concentração intracelular de Ca^{2+} . Toxinas químicas, bacterianas e virais podem alterar a sinalização celular por interagir com receptores, proteínas e outras enzimas ou por interferir diretamente com bombas e canais de Ca^{2+} . Íons metálicos também são capazes de interferir com a sinalização celular por interagir com sistemas de transporte e canais de Ca^{2+} ou ainda competir com este íon na ligação com proteínas ligantes, como a calmodulina (NICOTERA et al. 1992; ORRENIUS et al. 1989).

O dano mitocondrial é também, um evento comum no desenvolvimento da injúria celular causada por vários agentes tóxicos e é inicialmente manifestado por um decréscimo no potencial da membrana seguido por depleção de ATP. Os sistemas que controlam a homeostase do Ca^{2+} requerem energia e qualquer disfunção mitocondrial com subsequente depleção de ATP, invariavelmente resulta na ruptura da homeostase intracelular de Ca^{2+} .

1.2 TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE Ca^{2+}

Mitocôndrias de todos os vertebrados, muitas espécies de invertebrados e de algumas espécies de plantas e de protozoários, são capazes de seqüestrar Ca^{2+} do meio de suspensão (VERCESI, 1993).

Historicamente o estudo do transporte mitocondrial de Ca^{2+} desenvolveu-se juntamente com os estudos da bioenergética. POTTER (1947), mostrou o estímulo da atividade de ATPase provocado por Ca^{2+} , em mitocôndrias intactas; LEHNINGER (1949), demonstrou que este íon era capaz de desacoplar a respiração da fosforilação. A primeira citação do acúmulo de Ca^{2+} pela mitocôndria foi feita por SLATER & CLELAND (1953). Pouco mais tarde constatou-se que Ca^{2+} e outros cátions divalentes poderiam ser acumulados por mitocôndrias isoladas, contra um gradiente de concentração em um processo dependente de energia (BARTHEY & AMOORE, 1958). Muitos estudos foram desenvolvidos desde então, no sentido de compreender o mecanismo deste fenômeno, bem como sua função fisiológica.

BYGRAVE (1977) dividiu em três, as fases do desenvolvimento do estudo do transporte mitocondrial de Ca^{2+} .

A primeira fase corresponde aos estudos desenvolvidos na década de 50 referentes às primeiras constatações do acúmulo do íon pelas mitocôndrias.

O início da década de 60 marca a segunda fase, quando vários grupos mostraram os efeitos do movimento de Ca^{2+} e as grandes modificações morfológicas sofridas pelas mitocôndrias na presença de excesso de Ca^{2+} .

A terceira fase estende-se do final da década de 60 até, aproximadamente, o final da década de 70. Os principais avanços desta fase sobre o transporte mitocondrial de Ca^{2+} foram: a descoberta de inibidores específicos e a elucidação dos seus mecanismos de ação; a constatação e comprovação da existência de carreador específico; a identificação de uma força diretriz para o movimento do íon; a estequiometria da ejeção de H^+ e acúmulo de Ca^{2+} dependente da respiração; o desenvolvimento e uso de técnicas para medida da velocidade inicial do transporte.

Até então acreditava-se que a função do sistema de transporte mitocondrial de Ca^{2+} estava primariamente relacionada com a regulação da concentração de Ca^{2+} citosólico e que a mitocôndria desempenhava um importante papel no estoque do íon, que poderia ser mobilizado por hormônios. Contudo na década de 80 os estudos realizados por DENTON & MC CORMACK (1980 a, b; 1989), utilizando mitocôndrias de vários vertebrados, demonstraram que o Ca^{2+} aumenta a atividade de três importantes enzimas intramitocondriais, a concentrações de 0,1 a 10 μM : a piruvato desidrogenase, NAD^+ isocitrato desidrogenase e 2-oxoglutarato desidrogenase. Este resultados demonstraram a importância do íon cálcio no metabolismo oxidativo. Também reforçaram a proposição que o Ca^{2+} intramitocondrial seria um segundo mensageiro, mediando os efeitos hormonais sobre as enzimas chaves do metabolismo oxidativo mitocondrial. Dentro deste contexto o sistema mitocondrial de transporte de Ca^{2+} desempenharia uma função primordial (MC CORMACK & DENTON, 1986).

1.2.1 Mecanismos de influxo e efluxo mitocondrial de Ca^{2+}

A membrana mitocondrial interna de mamíferos e possivelmente de todos os vertebrados possui um sistema elaborado de transporte de Ca^{2+} , que consiste de três mecanismos com características cinéticas de carreador ou poro, e provavelmente um quarto mecanismo envolvido na alteração da permeabilidade da membrana para pequenos íons e moléculas (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Em mitocôndrias energizadas, o influxo de Ca^{2+} foi originalmente descrito como processo ativo e o efluxo como processo passivo (CHANCE, 1965). A teoria quimiosmótica (MITCHELL, 1966) e a determinação do potencial de membrana (ROTTENBERG & SCARPA, 1974; ROTTENBERG, 1975), conduziram ao conceito atual, sendo a captação feita por mecanismo eletroforético uniporter dirigido pelo potencial elétrico da membrana, resultante da extrusão de prótons pela cadeia respiratória, hidrólise do ATP ou potencial de difusão de K^+ pela presença do ionóforo valinomicina. (SCARPA & AZZONE, 1970)

A força dirigente para o uniporter de Ca^{2+} é definida como gradiente eletroquímico de Ca^{2+} , $\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}} = RT \ln([\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}} / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}) + 2F(\Psi_{\text{ext}} - \Psi_{\text{int}})/2$. Portanto, o estudo cinético da captação mitocondrial de Ca^{2+} deve ser relacionado ao gradiente de concentração de Ca^{2+} e ao potencial elétrico da membrana. O uniporter também liga e transporta outros íons divalentes com a seguinte ordem de afinidade: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \gg \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$, e também Fe^{2+} , Pb^{2+} e lantanídeos (VAINIO et al. 1970). Outros fatores que influenciam a cinética do uniporter são pH externo, temperatura e presença de inibidores (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Os inibidores do influxo mitocondrial de Ca^{2+} podem ser subdivididos nas seguintes categorias:

- 1) inibidores competitivos: íons que podem ser transportados pelo uniporter (Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} e lantanídeos).

- 2) íons como Mg^{2+} , poliaminas e H^+ , que embora não transportados pelo uniporter podem interferir com o transporte de Ca^{2+} através de efeitos ligantes.
- 3) polications tais como vermelho de rutênio e hexamina cobalto, que são distintos da segunda categoria pela baixa constante (K_i) para sua inibição.
- 4) um número de agentes farmacológicos tais como, β bloqueadores, guanidinas e diuréticos.

O mais comumente utilizado é o polication vermelho de rutênio, um corante polissacarídico, hexavalente, específico para glicoproteínas, que liga-se a muitos sítios ligantes de Ca^{2+} .

O efluxo de Ca^{2+} ocorre por outra via, insensível a vermelho de rutênio e independente da via de influxo, envolvendo um mecanismo eletroneuro que troca Ca^{2+} por Na^+ ou H^+ , dependendo do tipo de tecido. O mecanismo primário para o efluxo do Ca^{2+} em mitocôndrias de tecidos excitáveis parece ser o da troca $Ca^{2+}/2 Na^+$ (CROMPTON et al. 1976; 1978; CARAFOLI et al. 1974), já o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado, rim, pulmão e músculo liso ocorre por um mecanismo independente de Na^+ , envolvendo a troca direta $Ca^{2+}/2 H^+$ (CROMPTON et al. 1978). Todavia, foi constatada a existência de trocador $Ca^{2+}/2Na^+$ em mitocôndrias hepáticas (NEDERGAARD, 1984), bem como efluxo de Ca^{2+} independente de Na^+ em coração (CROMPTON, 1977). A quantidade relativa e a importância destes dois mecanismos pode diferir de tecido para tecido e depende do nível de Ca^{2+} mitocondrial (CARAFOLI, 1979).

A possibilidade que o transporte independente e dependente de Na^+ fossem mediados pelo mesmo mecanismo, funcionando na presença ou ausência de Na^+ , foi descartada, pois os dois mecanismos são afetados com cinéticas diferentes por inibidores e ativadores. Na realidade existe um número maior de inibidores capazes de agir sobre o mecanismo dependente de Na^+ do que sobre o independente de Na^+ . Além disso, quando o mesmo inibidor age em ambos os mecanismos, geralmente uma concentração maior é necessária para inibição do mecanismo independente de

Na^+ , por exemplo os cátions lipofílicos como tetrafenilfosfônio (TPP^+) e trifenilmetil fosfônio (TPMP^+) agem como inibidores do mecanismo independente de Na^+ numa concentração cerca de uma ordem de magnitude maior do que aquela necessária para inibir o outro tipo de mecanismo. Isto sugere que o mecanismo dependente de Na^+ possa ser mais sensível ao controle farmacológico e mesmo fisiológico que o mecanismo independente de Na^+ (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

A existência de vias distintas para captação e liberação de Ca^{2+} estabelece um movimento cíclico e contínuo do íon através da membrana mitocondrial interna e constitui a base para uma regulação cinética da distribuição de Ca^{2+} entre matriz e compartimentos extramitocondriais (NICHOLLS, 1978; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Esta distribuição é regulada pelas velocidades relativas de transporte através destas vias, e pode ser alterada pelo estímulo ou inibição de uma ou ambas as vias. Um exemplo clássico é a inibição da via de influxo por vermelho de rutênio induzindo o efluxo líquido de Ca^{2+} (CARAFOLI, 1979).

Além destas vias específicas de efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias, há também outras duas maneiras do efluxo ocorrer, porém não em condições fisiológicas: liberação não específica de Ca^{2+} através da membrana interna e liberação de Ca^{2+} pelo reverso da via uniporter de influxo, provavelmente importantes durante isquemia e anoxia (RICHTER & FREI, 1988).

A liberação de Ca^{2+} pelo reverso da via de captação ocorre quando o potencial de membrana cai (NICHOLLS, 1978), por exemplo, na presença de desacopladores (RICHTER & FREI, 1988). A liberação não específica, como consequência do aumento inespecífico de permeabilidade da membrana é acompanhada pelo colapso de $\Delta\psi$ e grande amplitude de inchamento mitocondrial (BEATRICE et al. 1980). Este fenômeno conhecido como transição de permeabilidade da membrana mitocondrial, pode também ser considerado como um tipo de efluxo de Ca^{2+} , embora numerosas outras funções sejam possíveis (GUNTER & PFEIFFER, 1990). Devido à complexidade deste assunto e a existência de uma literatura fragmentada e controversa, ele será visto mais detalhadamente em outro tópico.

O efluxo de Ca^{2+} pode ainda ser mediado por ionóforos específicos como os antibióticos A-23187 e lasalocid A (X537A), que aumentam a permeabilidade da membrana por mecanismos ainda não totalmente elucidados (REED & LARDY, 1972).

1.2.2 Transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias vegetais

Os estudos iniciais de transporte mitocondrial de Ca^{2+} em vegetais afirmavam que a captação de Ca^{2+} estava ligada a captação de fosfato, era dependente do substrato, insensível a VR e Mg^{2+} e não estava associada com estímulo respiratório e queda do potencial de membrana (DOUCE, 1985). Além disso, o alto K_m e a baixa velocidade inicial da captação levou a conclusão que era improvável um transporte de Ca^{2+} mediado por um carreador em mitocôndrias vegetais (MC CORMACK & DENTON, 1986). Havia também a opinião que a captação de Ca^{2+} por mitocôndrias vegetais poderia ser um artefato resultante de um dano da membrana interna durante a preparação (MOORE & BONNER, 1977).

O desenvolvimento de uma técnica para a obtenção de mitocôndrias vegetais intactas e funcionais (MARTINS & VERCESI, 1985) e posterior estudo do transporte mitocondrial de Ca^{2+} levou à conclusão que o acúmulo por algumas espécies vegetais era acompanhado pela extrusão de H^+ , aumento da velocidade respiratória, decréscimo de potencial de membrana, inibido por VR e Mg^{2+} , e também que a captação de Ca^{2+} ocorre de forma semelhante em mitocôndrias energizadas por substratos respiratórios diferentes ou por hidrólise de ATP (MARTINS et al. 1986; CARNIERI et al. 1987). As três desidrogenases intramitocondriais preparadas de mitocôndrias vegetais não apresentam sensibilidade ao Ca^{2+} (MC CORMACK & DENTON, 1986), indicando que o sistema de transporte não está ligado a regulação destas enzimas.

Atualmente sugere-se que o influxo de Ca^{2+} nestas mitocôndrias seja mediado por um simporter Ca^{2+}/Pi sensível a mersalyl, onde o influxo de cada íon cálcio representa a transferência líquida de uma carga positiva (VERCESI, 1993).

Mitocôndrias isoladas de folhas brancas de repolho (*Brassica oleracea*), tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*) e raiz de beterraba (*Beta vulgaris*), não são capazes de acumular Ca^{2+} , apesar de apresentarem alto potencial elétrico de membrana, indicando que não possuem uniporter eletroforético de Ca^{2+} (MARTINS & VERCESI, 1985; SILVA et al. 1992).

Portanto estas diferenças no transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias vegetais não são uma consequência da falta de integridade da membrana, mas talvez possam ser determinadas geneticamente de acordo com as características fisiológicas celulares (MARTINS et al. 1994).

1.3 TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

Evidência da existência desta transição foi observada desde o início do trabalho com mitocôndrias (POTTER, 1947; LENHINGER, 1949, SLATER & CLELAND, 1953), contudo o termo **transição de permeabilidade induzida pelo Ca^{2+}** foi primeiramente definido por HUNTER & HAWORTH (1979 a) após um estudo aprofundado do fenômeno. Os autores demonstraram que o inchamento mitocondrial, induzido pelo acúmulo de Ca^{2+} , estava associado à transição configuracional e funcional, ou seja, passagem de uma configuração agregada e de um estado acoplado para uma configuração ortodoxa (matriz mitocondrial expandida) e estado desacoplado. Esta mudança repentina na forma e função mitocondrial induzida pelo Ca^{2+} , deve-se ao aumento inespecífico da permeabilidade da membrana, permitindo a entrada de moléculas neutras ou carregadas, de peso molecular ≤ 1500 , componentes do suporte osmótico. Estas alterações foram observadas por microscopia eletrônica e por um decréscimo na densidade óptica da suspensão mitocondrial a 540 nm (HUNTER & HAWORTH, 1979 a).

O mecanismo molecular para este fenômeno, proposto por estes pesquisadores, baseia-se na ligação do Ca^{2+} a sítios internos da membrana provocando a abertura de um canal hidrofílico transmembrana. Este processo ocorre na ausência de protetores endógenos como NADH, ADP e Mg^{2+} . A transição de permeabilidade induzida pelo Ca^{2+} é inespecífica, e como consequência ocorre perda de nucleotídeos e íons endógenos, inclusive o Ca^{2+} (HAWORTH & HUNTER, 1979; HUNTER & HAWORTH, 1979 b).

Paralelamente o laboratório do professor Lehninger (LEHNINGER et al. 1978; VERCESI et al. 1978) demonstrou que o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas, era estimulado pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina. Sugeriu-se que esta liberação de Ca^{2+} estava associada a oxidação de NAD(P)H e ao baixo potencial de fosforilação citosólica (ΔGp). Seu objetivo seria, por um mecanismo “feedback”, aumentar o potencial de fosforilação citosólica e a relação NAD(P)H/NAD(P) através de estímulo do catabolismo citoplasmático pela liberação do Ca^{2+} mitocondrial.

Posteriormente verificou-se que agentes oxidantes de nucleotídeos de piridina, eram capazes de induzir a liberação de Ca^{2+} mitocondrial (LOTSCHER et al. 1979).

Apesar de muito estudado, o mecanismo molecular e o significado fisiológico deste efluxo estimulado por NAD(P⁺) é ainda pouco entendido.

RICHTER & FREI (1988) propuseram que o mecanismo molecular envolvido na liberação do Ca^{2+} induzido por oxidantes de NAD(P)H em mitocôndria intacta seria por uma rota regulada por ADP ribosilação de proteína após hidrólise do NAD⁺ intramitocondrial por uma NADase Ca^{2+} -dependente produzindo ADP ribose, nicotinamida e AMP. Também afirmaram a necessidade de um ciclo rápido de Ca^{2+} através da membrana para a observação do fenômeno.

A observação de que o efluxo era precedido por decréscimo do potencial de membrana, aumento da velocidade respiratória, seguido de inchamento mitocondrial associado à penetração de sacarose e água, sugeriu que este fenômeno fosse devido a um aumento inespecífico da permeabilidade da membrana, relacionando-o ao fenômeno de transição de permeabilidade (BERNARDES et al. 1986).

Vercesi e colaboradores, utilizando mitocôndrias desenergizadas, demonstraram inchamento extensivo, na presença de Ca^{2+} mais prooxidantes, devido a um aumento inespecífico da permeabilidade mediada pela ligação de Ca^{2+} a sítios internos da membrana mitocondrial interna e a possível oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana (MACEDO et al. 1988 ; VERCESI et al. 1988), este resultado contesta a afirmação da necessidade de um ciclo rápido de Ca^{2+} pela membrana, como proposto por RICHTER & FREI (1988).

A similaridade entre a ação de oxidantes de NAD(P)H e compostos exógenos que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), em mitocôndrias isoladas, levou o grupo a propor que, no primeiro caso, as alterações na permeabilidade da membrana poderiam estar associadas a um acúmulo de ROS, produzidos pela cadeia respiratória, em mitocôndrias exauridas de antioxidantes. (HERMES-LIMA et al. 1991, 1992).

Entre os vários mecanismos moleculares propostos para explicar a transição de permeabilidade, CARBONERA et al. (1988) preconizam que o fenômeno é consequência do dano da membrana causado pela peroxidação de fosfolipídeos e outros processos envolvendo a ação de radicais de oxigênio.

FAGIAN et al. (1990) apresentaram evidências que o aumento da permeabilidade da membrana de partículas submitocondriais de coração e de mitoplastos de fígado incubados na presença de Ca^{2+} e diamida (um oxidante de grupos SH) está associado com a produção de agregados proteicos devido a ligações cruzadas de grupamentos tiólicos. Demonstraram também que tanto o processo de permeabilização quanto a polimerização podiam ser revertidos pela adição de ditioneitol (DTT) ou β -mercaptoetanol, conhecidos redutores de grupo dissulfeto.

Cerca de 65 compostos capazes de desencadear a transição de permeabilidade na presença de Ca^{2+} , também chamados de agentes liberadores de Ca^{2+} , foram encontrados em aproximadamente 20 anos de pesquisa. Estes agentes não apresentam características funcionais ou estruturais em comum, são por exemplo, agentes oxidantes de nucleotídeos de piridina, agentes oxidantes de grupamentos tiólicos, agentes geradores de espécies reativas de oxigênio, inibidores do carreador ADP/ATP, Pi e vários outros (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Após muitos estudos, atualmente dois mecanismos são propostos para explicar a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna:

1) Abertura do poro não seletivo, chamado poro de transição de permeabilidade (PTP), com um diâmetro mínimo de 2,8 nm (BERNARDI et al. 1992), regulado por ligação de Ca^{2+} no lado da matriz, revertido por EGTA e inibido por H^+ , Mg^{2+} e nucleotídeos de adenina, como proposto pelos trabalhos pioneiros de HUNTER & HAWORTH (1979).

2) Indução de defeitos na fase lipídica da membrana, causando aumento da permeabilidade devido ao acúmulo de lisofosfolípidos como consequência da ativação da fosfolipase A_2 pelo Ca^{2+} (BEATRICE et al. 1980; PFEIFFER et al. 1979).

A segunda hipótese foi confirmada pela constatação do aparecimento de produtos da ação da fosfolipase A_2 durante a transição e pela habilidade dos inibidores (não específicos) da fosfolipase A_2 em inibir a transição (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Fortes evidências também apoiam a hipótese do poro:

1) A transição de permeabilidade é inibida com alta especificidade pelo imunossupressor ciclosporina A (CsA) (CROMPTON et al. 1988; BROEKEMEIER et al. 1989) enquanto a atividade da fosfolipase A_2 não é afetada (BROEKEMEIER et al. 1989).

2) O megacanal mitocondrial, um canal de alta condutância com um diâmetro estimado de 2,8 nm identificado por estudos de "patch clamp" em mitoplastos de fígado de rato (PETRONILLI et al. 1989), é inibido por ciclosporina A e responde aos mesmos efetores e da mesma maneira que a transição de permeabilidade (BERNARDI et al. 1992; SZABÒ et al. 1992). Este megacanal e o poro de transição de permeabilidade parecem, portanto, constituírem a mesma entidade molecular.

Acredita-se que os dois mecanismos possam estar envolvidos em paralelo e/ou cooperação na manutenção da conformação "aberta" do poro (GUNTER & PFEIFFER, 1990), justificando a complexidade para a regulação do fenômeno, que na presença de Ca^{2+} pode ser induzido por muitos compostos não relacionados entre si.

1.3.1 Fatores envolvidos na regulação da transição de permeabilidade

Fatores envolvidos na regulação incluem o conteúdo mitocondrial de Pi, nucleotídeos de adenina, produtos de ação da fosfolipase A₂, estado reduzido dos nucleotídeos de piridina e/ou glutatona e concentração de Ca²⁺, Mg²⁺ e H⁺ (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Além disso, grupos sulfidrílicos da membrana (LÊ-QUÔC & LÊ-QUÔC, 1982; 1985), ADP ribosilação de proteínas mitocondriais (RICHTER & FREI, 1988) e estado de energização estão implicados.

A maneira como estes fatores regulam e interagem uns com os outros não pode ser determinado no presente. Afirma-se que a regulação da abertura/fechamento do poro é complexa e muitas características envolvidas no mecanismo ainda não estão claras.

O fato da ciclosporina A ser um potente inibidor da abertura do poro (CROMPTON et al. 1988; BROEKEMEIER et al. 1989) e inibir a peptidil-prolil cis-trans isomerase (ciclofilina) mitocondrial com uma concentração similar, sugere uma função desta enzima na regulação do PTP (HALESTRAP & DAVIDSON, 1990). Há também indicações que a translocase de adenina nucleotídeo esteja envolvida na regulação do PTP. Por exemplo, quando a translocase é estabilizada na conformação-m (voltada para o lado da matriz) pelo ácido bongkrékico, a transição é antagonizada. Inversamente, a estabilização da translocase na conformação-c (voltada para o lado do citosol) com carboxiatractilosídeo está associada com a abertura do poro. Além disso, o efeito inibidor do ADP na abertura do poro é perdido sob condições onde ADP é deslocado do seu sítio de ligação na translocase pelo carboxiatractilosídeo (HALESTRAP & DAVIDSON, 1990; LÊ-QUÔC & LÊ-QUÔC, 1988). Tais resultados levaram a sugestão que a própria translocase poderia ser convertida no PTP pela ligação simultânea do Ca²⁺ e ciclofilina. Este modelo

considera a ligação da ciclofilina à translocase como o evento que converte a última estrutura em um canal não específico (HALESTRAP & DAVIDSON, 1990).

Existem dados confirmando que o envolvimento da translocase na estrutura e/ou regulação do poro poderia também ser consistente com um modelo alternativo onde efetores da conformação da translocase afetam a atividade do poro através de interações com outras proteínas mitocondriais. Estudos recentes tem mostrado que a eficiência da ciclosporina A como um inibidor da abertura do poro é fortemente dependente da ligação do ADP a um sítio de baixa afinidade, insensível a atractilósídeo (NOVGORODOV et al. 1991; 1992). Devido não haver relatos de um sítio ligante de ADP com estas propriedades na translocase, parece que o sítio de baixa afinidade está localizado em outro componente da membrana. Quando vistos no total, os dados existentes são consistentes com o PTP sendo formado pela ligação de Ca^{2+} a uma proteína ligante de ADP que é distinta, mas estreitamente relacionada com a translocase.

Estudos recentes do grupo liderado por BERNARDI atribuem a regulação do poro a três fatores principais:

- 1) Ao potencial de membrana, onde a despolarização da membrana favorece a abertura do poro (PETRONILLI et al. 1993 a);
- 2) Ao pH da matriz, onde a acidificação da matriz abaixo de pH 7,0 favorece o fechamento do poro (BERNARDI et al. 1992; SZABÒ et al. 1992) através da protonação reversível de resíduos de histidina (NICOLI et al. 1993);
- 3) A ligação de Me^{2+} a sítios internos e externos, independentemente, modulando a abertura/fechamento do poro (BERNARDI et al. 1993).

Então a complexidade da modulação do poro em mitocôndria intacta poderia ser parcialmente explicada pelo efeito combinado de alguns indutores nestes eventos regulatórios básicos.

Este grupo afirma que muitos efetores incluindo Ca^{2+} e ADP, parecem modificar a probabilidade de abertura do poro por afetar o sensor de voltagem mais do que por modificar o potencial de membrana (PETRONILLI et al. 1993 b).

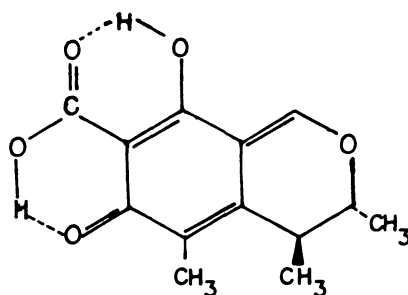
Estes dados levaram a investigação da natureza do sensor de voltagem do PTP e seu modo de regulação por efetores fisiológicos e patológicos, concluindo que o

estado de oxidação-redução de tióis vicinais em resíduos de cisteína desempenham uma função crítica no sensor de voltagem do PTP, com um aumento na probabilidade da abertura do poro apesar do alto potencial de membrana quando o sensor se encontra em um estado mais oxidado.

Estes resultados sugerem que o conceito da transição de permeabilidade como um evento deletério, por décadas considerado como dano inespecífico ou defeito da permeabilidade levando a uma disfunção mitocondrial irreversível (GUNTER & PFEIFFER, 1990), possa ser modificado, sugerindo o PTP como um canal regulado servindo a uma função ainda não identificada (PETRONILLI et al. 1994).

1.4 CITRININA

A citrinina é um metabólito fúngico e um contaminante comum de alimentos. Foi primeiramente isolada em 1931 (HETHERINGTON & RAISTRICK, 1931), de várias cepas de *Penicillium citrinum*. Subsequentemente foi isolada de várias cepas pertencentes a 14 espécies de *Penicillium* e 3 espécies de *Aspergillus* (KROGH, 1978). Possui peso molecular de 250 e forma de agulhas prismáticas amarelas quando cristalizadas. A estrutura é mostrada a seguir (THE MERCK, 1989). Ela é pouco solúvel em água, sendo solúvel em soluções diluídas de NaOH e Na₂CO₃ e em diversos solventes orgânicos (KROGH, 1978).



Citrinina (3R-trans 4,6-Dihidro-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopiran-7-ácido carboxílico).

Primeiramente foi estudada com o objetivo de ser utilizada como antibiótico para fins terapêuticos. Porém suas propriedades tóxicas, particularmente para o tecido renal, impediram tal uso (AMBROSE & De EDS, 1946; OHMONI et al, 1954).

Esta micotoxina já foi identificada como contaminante natural de trigo, arroz, cevada, centeio e milho (SCOTT et al, 1972; CIEGLER, 1978; CRUZ et al, 1984; ROSA et al. 1985; RANJAN & SINHA, 1991).

Além de seus efeitos nefrotóxicos (BERNDT & HAYES, 1982; PHILLIPS et al. 1980) possui também efeitos deletérios a nível hepático, pulmonar, gastrointestinal, osteomedular, cardíaco e tecido linfático (KROGH et al. 1970; CARLTON et al. 1974; JORDAN et al. 1977; TACKER et al. 1977).

Como os efeitos deletérios de algumas micotoxinas, entre as quais a citrinina, parecem estar relacionados a alterações no metabolismo mitocondrial, a ação da citrinina sobre este metabolismo tem sido estudada (HARAGUCHI et al. 1987; ALEO et al. 1991; CHAGAS et al. 1992 a, b; 1994 a, b, c).

Os resultados obtidos neste laboratório por CHAGAS et al. (1992 a, b; 1994 a, b, c) em mitocôndrias de fígado e de córtex renal de rato, mostraram que entre os efeitos da citrinina destacam-se:

- inibição da velocidade respiratória no estado 3, estímulo no estado 4 e redução no controle respiratório, durante a oxidação de substratos NAD^+ e FAD dependentes;
- redução no índice de fosforilação oxidativa, determinado como relação ADP/O;
- inibição da atividade da Fo-F1-ATPase de mitocôndrias tratadas com FCCP ou rompidas por congelamento;
- inibição das desidrogenases relacionadas ao metabolismo dos seguintes substratos: malato, glutamato, 2-oxoglutarato, piruvato e glicerol fosfato;
- redução do fluxo de elétrons a nível de complexo I da cadeia respiratória;
- redução parcial de potencial elétrico transmembrana e da velocidade de repolarização após a fosforilação do ADP adicionado;

- inibição da velocidade de inchamento mitocondrial induzido por valinomicina, indicativo de interferência sobre a fluidez da membrana mitocondrial interna;
- redução da amplitude do inchamento mitocondrial decorrente da captação de íons sódio;
- redução nos níveis de Ca^{2+} na matriz mitocondrial em decorrência da inibição na velocidade de captação e/ou estímulo na velocidade de liberação;
- inibição na velocidade de captação de Ca^{2+} e estímulo na velocidade de liberação deste íon.

1.5 OBJETIVOS

Devido à importância da homeostase intracelular de Ca^{2+} para a manutenção da integridade e viabilidade celular e tendo em vista que o dano mitocondrial representa um evento freqüente no desenvolvimento da ruptura desta homeostase levando à injúria celular, o presente trabalho tem por objetivos:-

1. Dar continuidade aos estudos da ação da citrinina sobre o fluxo mitocondrial de Ca^{2+} , anteriormente iniciados neste laboratório, com a finalidade de colaborar para o entendimento do mecanismo que determina seus efeitos deletérios.
2. Explorar a possibilidade de ação da citrinina como agente indutor de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna, considerada por alguns autores como um tipo de efluxo de Ca^{2+} ;
3. Verificar os efeitos da citrinina e Ca^{2+} na permeabilização da membrana de mitocôndrias de tubérculo de batata.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os seguintes reagentes foram obtidos pela Merck do Brasil: cisteína, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, hidróxido de potássio, dimetilsulfóxido, tetrafenilfosfônio, tris-base.

Succinato de potássio, Hepes, soro albumina bovina, A23187, oligomicina, rotenona, vermelho de rutênio, ADP, ATP, EGTA, ditiotreitól, foram obtidos da Sigma Chemical Co.

Os reagentes a seguir foram adquiridos dos laboratórios indicados: sacarose (Reagen), arsenazo III (Aldrich), Chelex (Bio Rad), ciclosporina A (Sandoz).

A citrinina (cristalina) foi preparada no laboratório de Micotoxinas, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, a partir de cultivos de *Penicillium citrinum*, crescidos no meio Czapeck-Dox. O grau de pureza foi estimado através dos dados espectrais obtidos por espectrometria de ressonância magnética protônica, massa, infravermelho e ultra-violeta (CRUZ et. al. 1985).

Os demais reagentes utilizados foram igualmente do maior grau de pureza.

2.2 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

Mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo o método descrito por VOSS et al. (1961) com pequenas modificações, usando-se meio de extração contendo: D-manitol 250 mM, tampão Hepes 10 mM pH 7,2, EGTA 1mM, BSA 0,1g%.

Utilizou-se ratos brancos Wistar, machos mantidos em jejum por 12 horas, mortos por decapitação. O fígado retirado imediatamente após a morte do animal, foi lavado em meio de extração gelado, picado com tesoura e homogeneizado com homogeneizador VAN POTTER-ELVEHJEN, usando-se sucessivamente pistilo frouxo e normal. O homogenado assim obtido foi centrifugado a 500 x g a 2°C em

centrífuga Beckman Modelo J-21B durante 5,0 minutos, a fim de eliminar restos de células intactas, membranas e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 11.500 x g durante 10,0 minutos a 2°C. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas foi ressuspensão e lavado duas vezes, em meio de extração do qual se omitiu o EGTA, sendo centrifugado a 8.000 x g durante 10,0 minutos. As mitocôndrias assim obtidas, foram ressuspensas em meio de extração sem EGTA, a concentração de aproximadamente 35 miligramas de proteína por mililitro.

2.3 Isolamento de mitocôndrias de tubérculo de batata

Aproximadamente 1.500 g de batatas foram descascadas, cortadas em pedaços pequenos, lavadas e colocadas em água deionizada gelada. Foram, então, processadas em centrífuga de cozinha Walita juntamente com aproximadamente 800 ml de meio de extração gelado contendo: sacarose 300 mM, tampão Hepes 10 mM pH 8,0, EGTA 1,0 mM, cisteína 2 mM, BSA 0,1 g%. O material assim obtido foi filtrado em gaze, sendo o pH ajustado para 7,2 com solução de KOH 1N. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 1.465 x g a 2 °C por 10,0 minutos, em centrífuga Servall. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g e o precipitado, mitocôndrias, foi ressuspensão em meio de isolamento contendo: sacarose 300 mM, tampão Hepes 10 mM pH 7,2, EGTA 0,1 mM, BSA 0,2 g% , e submetido a duas centrifugações de 1.465 x g a 2°C por 10,0 minutos, em centrífuga Beckman Modelo J-21B. Finalmente o precipitado foi obtido por centrifugação a 10.400 x g a 2°C por 10,0 minutos, foi cuidadosamente ressuspensão com pincel fino em volume mínimo de meio de isolamento de maneira a obter uma concentração aproximada de 25 miligramas de proteína por mililitro.

2.4 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas nas preparações mitocondriais foi determinada pelo método descrito por LOWRY et al. (1951), utilizando soro albumina bovina

como padrão. As leituras foram realizadas a 700 nm, com auxílio de espectrofotômetro B-380 Micronal.

2.5 Preparo da solução de citrinina

A citrinina, por ser pouco solúvel em água, foi solubilizada com dimetilsulfóxido (DMSO). Este solvente, nos volumes empregados nos ensaios, não apresentou qualquer interferência nos resultados experimentais. A solução estoque foi preparada na concentração de 100 mM.

A citrinina utilizada nos experimentos de determinação do transporte de cálcio na presença de arsenazo III, foi previamente tratada com chelex-100, por 12 horas, sob agitação em câmara fria. A seguir o Chelex-100 foi retirado por centrifugação durante 5 minutos a 8.000 x g e a concentração da citrinina determinada espectrofotometricamente a 340 nm, a partir de uma curva padrão previamente determinada.

2.6 Determinação do consumo de oxigênio

A respiração mitocondrial foi medida através do consumo de oxigênio, determinado com eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.). A qualidade de cada preparação mitocondrial foi avaliada diariamente em função dos valores de controle respiratório (CR), obtido após o término do isolamento das mitocôndrias. Estes valores foram determinados pela relação entre velocidade de respiração na presença de ADP (estado 3) e a velocidade após o consumo de ADP (estado 4) (CHANCE & WILLIAMS, 1955).

O sistema de reação utilizado para preparações mitocondriais de fígado de rato, era composto de : D-manitol 125 mM, KCl 65mM, tampão Hepes 10 mM pH 7,2, BSA 0,1 g%. Para mitocôndrias isoladas de tubérculo de batata a composição do meio era: sacarose 260 mM, KCl 20 mM, tampão Hepes 10 mM pH 7,2, BSA 0,2 g%.

Os sistemas de incubação foram suplementados com rotenona 10 μ M, Pi 0,8 mM, ADP 0,08 mM, succinato 2 mM.

As velocidades respiratórias foram expressas em nanomoles de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, considerando-se que a solubilidade do oxigênio na água a 30°C e 1 atmosfera é de 235 micromoles por litro (ESTABROOK, 1967).

2.7 Determinação espectrofotométrica do transporte mitocondrial de Ca^{2+}

Mitocôndrias de fígado de rato (0,5 mg/ml), foram suspensas em 3,0 mililitros de meio de reação, contendo: D-manitol 125 mM, KCl 65 mM, tampão Hepes 10 mM pH7,2, Pi 1 mM, arsenazo III 31 μM , rotenona 10 μM , CaCl_2 10 μM .

O influxo de Ca^{2+} foi iniciado pela adição de succinato de potássio 3 mM. Finalizada a captação, o efluxo de Ca^{2+} foi induzido por VR 2,5 μM ou por diferentes concentrações de citrinina. Para a determinação do efeito da citrinina sobre o sistema de efluxo, várias concentrações da micotoxina foram adicionadas ao meio de reação um minuto após a adição de VR.

As alterações espectrais provocadas pela captação de Ca^{2+} foram acompanhadas a 675-685 nm, com auxílio de espectrofotômetro de duplo feixe acoplado a registrador (SCARPA, 1979). As variações na concentração do Ca^{2+} livre no meio foram determinadas através de uma curva de calibração obtida pela adição de concentrações conhecidas de Ca^{2+} ao sistema de reação.

O meio de reação utilizado neste experimento, foi considerado livre de Ca^{2+} pelo tratamento com Chelex-100, por 12 horas, após o que foi filtrado a vácuo com papel de filtro livre de Ca^{2+} . Foi então estocado em frasco plástico, protegido da luz e conservado a -20°C por no máximo de 3 dias. Em todos os experimentos as mitocôndrias foram utilizadas imediatamente ou no máximo até 5 horas após o isolamento.

2.8 Preparação do Chelex-100

Suspendeu-se 10 gramas de Chelex-100, em 100 mililitros de HCl 1,0 N, sendo submetido a agitação durante 12 horas. A seguir este material foi filtrado a vácuo, lavado com 200 mililitros de água bidestilada e transferido para um becker. O pH da solução foi cuidadosamente ajustado para 7,4 com Tris-base e então filtrado sob vácuo até secura. O material obtido foi armazenado em frasco plástico para posterior utilização.

2.9 Determinação das variações do volume mitocondrial (inchamento mitocondrial)

Suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é função da diferença no índice de refração entre a matriz e o meio, e qualquer processo que cause decréscimo desta diferença, resultará em decréscimo na dispersão de luz. O aumento do volume da matriz mitocondrial pelo influxo de solutos permeáveis, resultará em decréscimo na dispersão de luz, com o índice de refração da matriz aproximando-se ao do meio (NICHOLLS, 1982). Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias prestam-se bem para a aplicação desta técnica porque sua membrana interna pode sofrer grandes desdobramentos de suas pregas.

O inchamento mitocondrial pode ser usado para monitorar a transição de permeabilidade. O mecanismo deste inchamento tem natureza colóide-osmótica. O inchamento ocorre devido ao fato das moléculas pequenas atingirem equilíbrio de concentração através do defeito de permeabilidade enquanto as proteínas ficam retidas na matriz, gerando um desequilíbrio osmótico. A água entra para equilibrar a pressão osmótica, dilui os solutos internos causando inchamento mitocondrial (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

O grau de inchamento mitocondrial foi acompanhado a 540 nm a 30°C, utilizando-se espectrofotômetro AMINCO-CHANCE DUAL WAVELENGTH/SPLIT BEAM, acoplado a registrador.

O sistema de reação utilizado para a determinação da variação do volume de mitocôndrias hepáticas, em um volume final de 3 mililitros, continha: D-manitol 125 mM, tampão Hepes 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, BSA 0,1 g%. Para as determinações em mitocôndrias de tubérculo de batata o sistema de reação continha: sacarose 300 mM, tampão Hepes 10 mM pH 7,2. Os sistemas foram suplementados com FCCP, CaCl₂, diamida, citrinina, nas concentrações indicadas nas legendas das respectivas figuras. A concentração de proteína mitocondrial nos experimentos era 0,5 miligramas por mililitro. Os resultados foram expressos como absorvância por minuto.

2.10 Cálculo da concentração de Ca²⁺ livre

A concentração de Ca²⁺ livre do meio, nos experimentos de inchamento mitocondrial em presença de ATP e Mg²⁺, foi calculada usando um programa computacional contendo método iterativo (INESI et al. 1980) modificado do descrito por FABIATO & FABIATO 1979, levando em consideração as constantes de dissociação mencionadas por SCHWARZENBACH et al. 1975.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da citrinina sobre a velocidade respiratória em mitocôndrias hepáticas.

Mitocôndrias hepáticas foram energizadas com succinato na presença do protonóforo FCCP, clássico agente desacoplador da fosforilação oxidativa. O efeito da citrinina sobre esta respiração (fig.1) foi determinado, avaliando-se o consumo de oxigênio. Observou-se uma crescente inibição da velocidade respiratória com concentrações crescentes de citrinina.

Sabe-se, devido a estudos previamente realizados neste laboratório (CHAGAS et al 1992 a, b), que a citrinina produz redução da velocidade respiratória no estado 3, estímulo no estado 4, redução do controle respiratório e no índice de fosforilação oxidativa, indicando que a micotoxina provoca dissipação do potencial de membrana interna, além de interferir no fluxo de elétrons através da cadeia respiratória e na ATP sintetase.

Os resultados deste experimento confirmam a ação inibitória da citrinina sobre a cadeia respiratória, fator que levaria a uma queda do potencial elétrico de membrana o que conseqüentemente afetaria o influxo mitocondrial de Ca^{2+} .

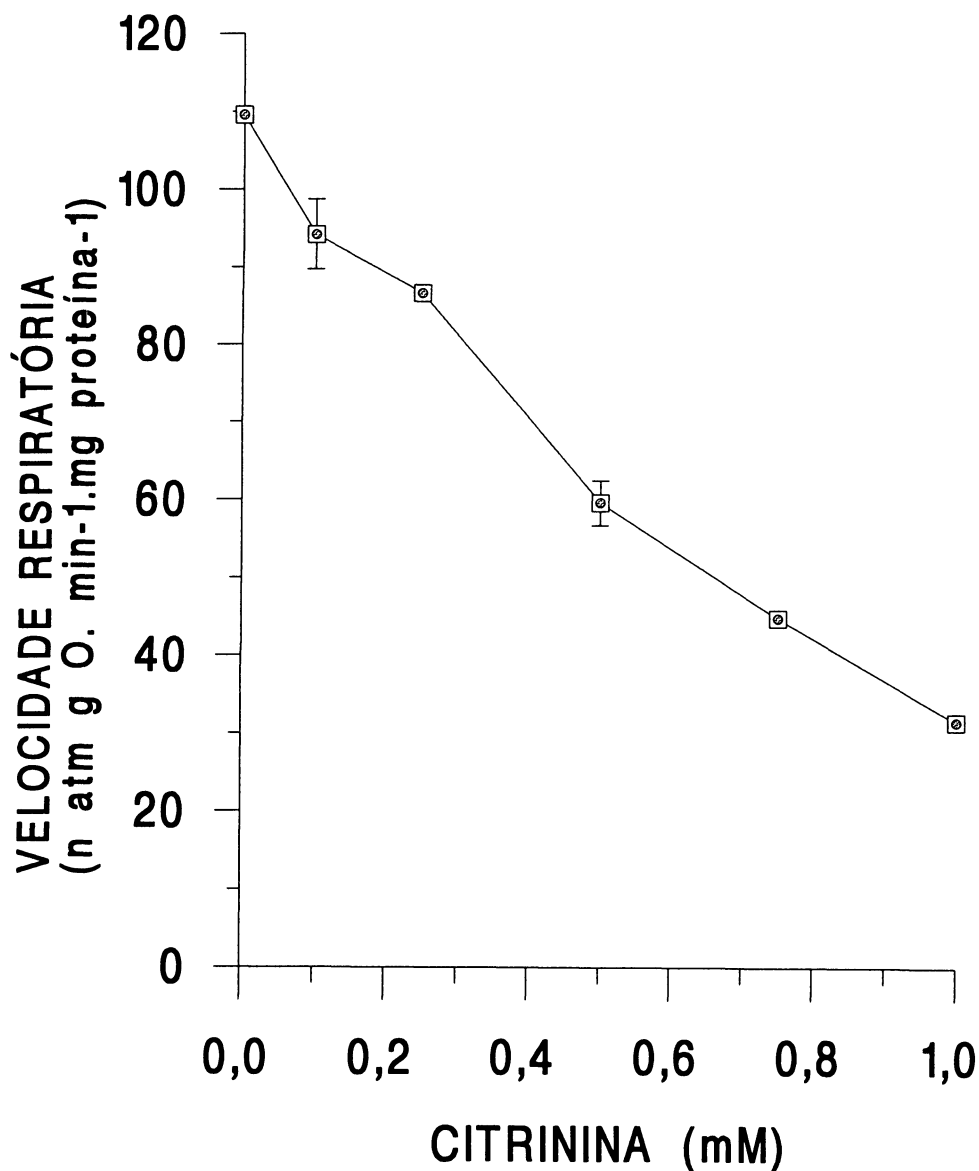


FIGURA 1 - Efeito da citrinina sobre a velocidade respiratória desacoplada em mitocôndrias de fígado de rato (MFR)

MFR (1mg/ml) foram incubadas em sistema de reação contendo: D-manitol 125 mM, KCl 65 mM, tampão Hepes 10 mM pH 7,2 e BSA 0,1 g%. O sistema foi suplementado com 1 μ M de FCCP e citrinina nas concentrações: 0,1; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mM. A respiração foi iniciada pela adição de succinato 2 mM. Cada ponto representa a média de 5 experimentos diferentes.

3.2 Efeito da citrinina sobre o efluxo de Ca^{2+}

Na figura 2 mitocôndrias hepáticas energizadas com succinato captaram Ca^{2+} do meio de reação. Após a captação de todo o Ca^{2+} adicionado e a condição de fluxo constante ser atingida, foram adicionadas diferentes concentrações de citrinina. As concentrações maiores (0,75 e 1,0 mM) levaram a um efluxo acentuado do Ca^{2+} acumulado.

Como visto na introdução, existem três mecanismos possíveis para o efluxo mitocondrial de Ca^{2+} : efluxo pelo reverso da via de captação, pela própria via de efluxo e ainda liberação não específica como consequência do aumento inespecífico de permeabilidade da membrana.

Estes resultados podem sugerir que o efluxo de Ca^{2+} ocorra pelo reverso da via de captação, uma vez que a inibição do fluxo de elétrons da cadeia respiratória leva a uma queda do potencial elétrico de membrana, do qual o influxo de Ca^{2+} é dependente. RIZZUTTO et al. (1987), porém, sugeriram que a redução no potencial elétrico da ordem de 40-50 mV, não modifica substancialmente o nível de captação de cálcio por mitocôndrias de fígado.

CHAGAS et al. (1992, a, b) demonstraram que mitocôndrias isoladas de fígado, incubadas em meio contendo EGTA, energizadas com succinato e tratadas com citrinina, sofrem apenas pequena redução nos valores de potencial elétrico gerados, o que não justificaria a expressiva liberação do Ca^{2+} determinada pela citrinina, observada por estes autores em experimentos de fluxo de Ca^{2+} . Porém, outros resultados do mesmo trabalho demonstraram que a adição de VR posteriormente à citrinina, diminui o efluxo provocado pela micotoxina, resultado repetido em nossos experimentos (dados não mostrados). Foi sugerido, então, que o estímulo do efluxo provocado pela citrinina (fig. 2) seria consequência da saída parcial de Ca^{2+} através do uniporter, devendo ainda serem exploradas as outras duas possibilidades de efluxo de Ca^{2+} .

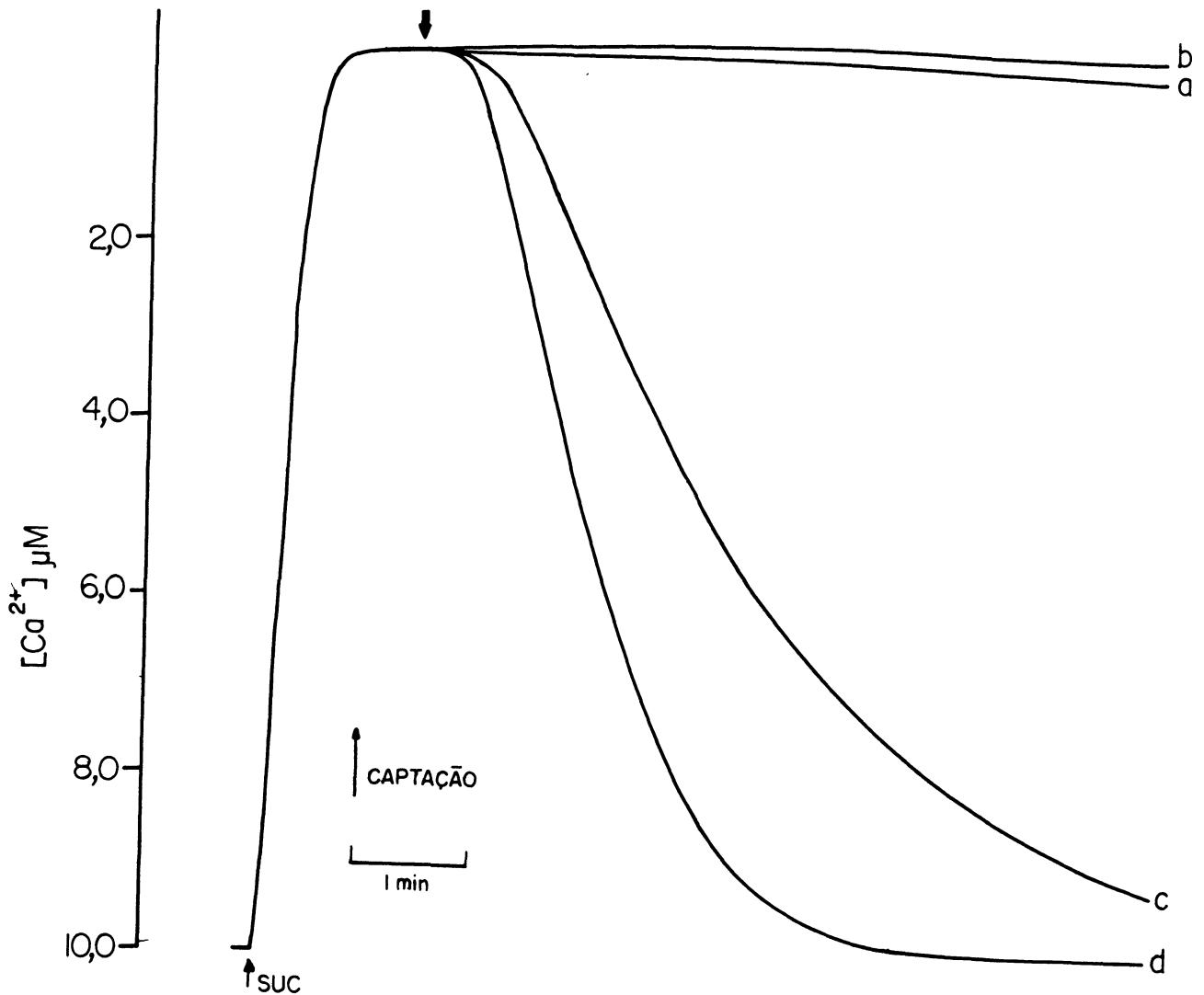


FIGURA 2 - Efeito da citrinina sobre o efluxo de Ca^{2+}

MFR (0,5mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo: D-manitol 125 mM, KCl 65 mM, tampão HEPES 10 mM pH 7,2, Pi 1 mM, arsenazo III $31 \mu M$, rotenona $10 \mu M$, $CaCl_2$ $10 \mu M$. A captação de Ca^{2+} foi desencadeada pela energização com succinato 3 mM. Diferentes concentrações de citrinina foram adicionadas onde indicado pela seta (\downarrow): (a) ausência, (b) 0,5 mM, (c) 0,75 mM e (d) 1,0 mM.

3.3 Efeito da citrinina sobre o efluxo de Ca^{2+} , na presença de vermelho de rutênio

Na figura 3 mitocôndrias hepáticas energizadas com succinato captaram Ca^{2+} adicionado ao sistema de incubação e logo após a condição de fluxo constante ser atingida, foi adicionado VR 2,5 μM . Com a via de influxo inibida, o estado de equilíbrio é perturbado e evidencia-se o efluxo de Ca^{2+} . Diferentes concentrações de citrinina foram adicionadas um minuto após a adição de VR.

Observou-se, conforme mostra a figura, que nas concentrações maiores de citrinina há aumento do efluxo de Ca^{2+} enquanto nas menores concentrações não há alteração do efluxo ocasionado pelo VR.

O cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP^+) é citado como um inibidor das vias de efluxo dependente e independente de Na^+ (GUNTER & PFEIFFER, 1990). Utilizou-se este íon para verificar se o efeito da citrinina seria específico sobre a via de efluxo independente de Na^+ . Os resultados obtidos (não mostrados) indicaram que o TPP^+ inibiu o efluxo de Ca^{2+} induzido pelo VR, na ausência de citrinina, porém não foi capaz de inibi-lo na sua presença.

Este resultado sugere que a ação da citrinina seja à nível de alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial interna e não uma ação específica sobre a via de efluxo. Além disso, a observação que a presença concomitante de Ca^{2+} e citrinina causam queda acentuada do potencial elétrico de membrana (dados não mostrados) reforçam esta suposição.

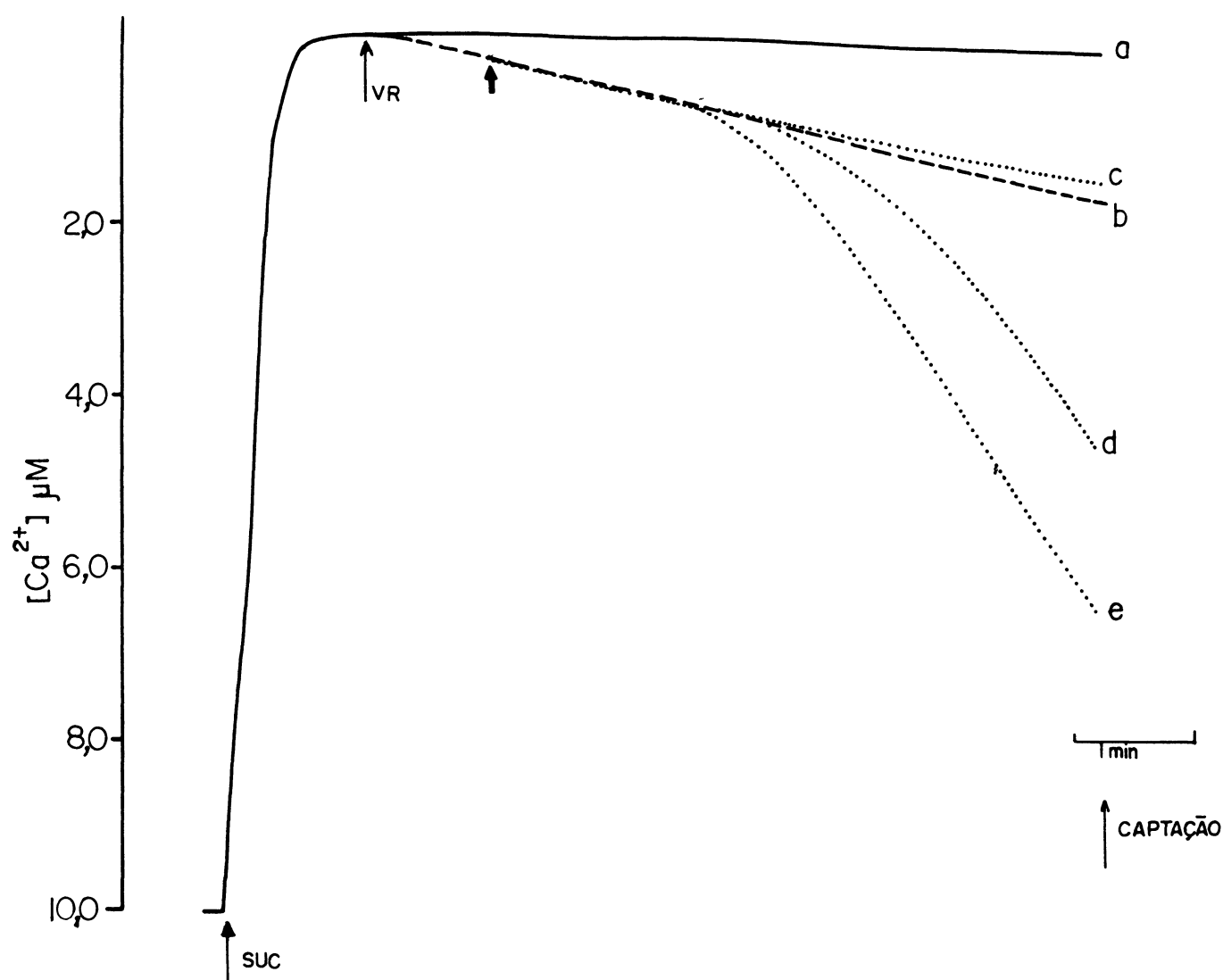


FIGURA 3 - Efeito da citrinina sobre o efluxo de Ca^{2+} , na presença de vermelho de rutênio

MFR (0,5mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições descritas para a figura 2. O traçado (a) representa a situação na ausência de VR ou citrinina. VR 2,5 μM foi adicionado onde indicado e o efluxo decorrente desta adição está representado por linha tracejada (b). As linhas pontilhadas representam a adição de citrinina 0,5 mM (c); 0,75mM (d) e 1,0 mM (e) cerca de um minuto após a adição de VR, como indicado pela seta (\uparrow).

3.4 Efeito das concentrações de Ca^{2+} e citrinina sobre a velocidade e extensão do inchamento mitocondrial.

O fato de uma série de agentes liberadores de Ca^{2+} estarem relacionados ao fenômeno da transição da permeabilidade de membrana mitocondrial interna (GUNTER & PFEIFFER, 1990), levou a verificar se a ação da citrinina ocorreria neste nível.

Utilizou-se a técnica de inchamento mitocondrial como parâmetro de permeabilização inespecífica da membrana. Mitocôndrias desenergizadas foram utilizadas, com objetivo de excluir a ação da citrinina sobre a cadeia respiratória. Além disso, um estudo comparativo entre mitocôndrias de tubérculo de batata e de fígado de rato foi realizado com o intuito de verificar a implicação dos sistemas de transporte de Ca^{2+} no mecanismo de inchamento mitocondrial por Ca^{2+} e citrinina, uma vez que as mitocôndrias de batata não apresentam este sistema de transporte.

A figura 4 mostra o efeito da citrinina sobre a velocidade respiratória em mitocôndrias de tubérculo de batata. Em um experimento semelhante ao realizado para mitocôndrias hepáticas, os resultados obtidos também foram semelhantes, ou seja, crescente inibição da velocidade respiratória com aumento da concentração de citrinina.

A partir deste resultado todos os experimentos foram feitos de forma comparativa entre mitocôndrias hepáticas e de tubérculo de batata.

Suspendeu-se proteína mitocondrial em 3,0 ml de meio de reação suplementado com FCCP o que leva a um rápido consumo do substrato endógeno. Neste sistema contendo mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas, variou-se a concentração de Ca^{2+} de 50 a 500 μM e adicionou-se 1,0 mM de citrinina (fig.5A). Observou-se um aumento na velocidade e extensão do inchamento mitocondrial em função da concentração de Ca^{2+} . Citrinina adicionada na ausência de Ca^{2+} não foi capaz de causar o inchamento.

Quando em sistema semelhante, fixou-se a concentração de Ca^{2+} em $250 \mu\text{M}$ e variou-se a de citrinina (fig.5B), também ocorreu aumento na velocidade e extensão do inchamento, mostrando uma interdependência de Ca^{2+} e citrinina para ocorrer o fenômeno. Ca^{2+} adicionado na ausência de citrinina não causou inchamento mitocondrial.

Em mitocôndrias de tubérculo de batatas observou-se inchamento na presença somente de Ca^{2+} $600 \mu\text{M}$ e um aumento da velocidade deste inchamento dependente da concentração de citrinina (fig.6). Outras diferenças no fenômeno desenvolvido nos dois tipos de mitocôndrias devem ser ressaltadas: a necessidade de uma concentração maior de Ca^{2+} ($600 \mu\text{M}$) e de um tempo maior para a obtenção do inchamento em mitocôndrias de tubérculo de batata, além disso a extensão do inchamento em mitocôndrias de batata é muito menor que em mitocôndrias hepáticas, talvez devido ao menor número de cristas das mitocôndrias vegetais.

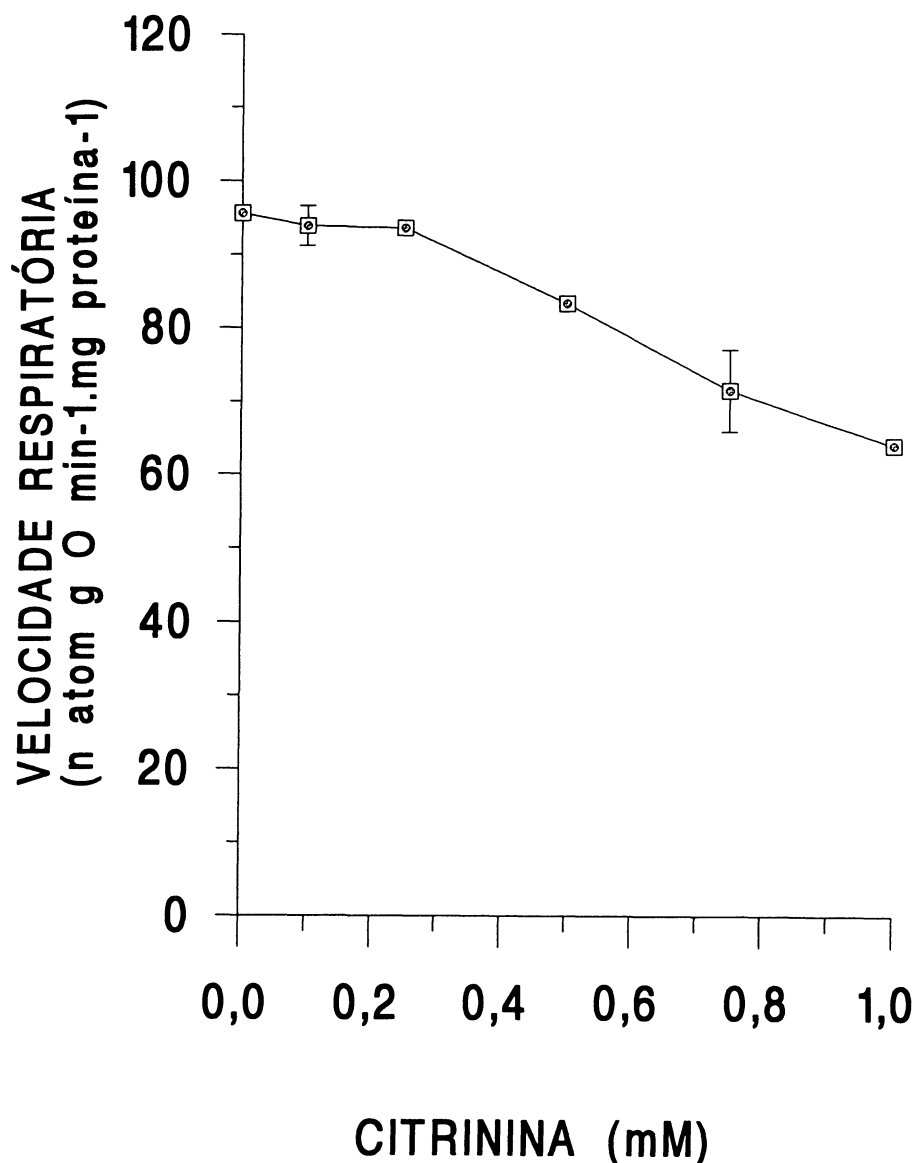


FIGURA 4 - Efeito da citrinina sobre a velocidade respiratória desacoplada em mitocôndrias de tubérculo de batata (MB)

MB (0,5 mg/ml) foram incubadas em sistema de reação contendo: sacarose 260 mM, KCl 20 mM, tampão HEPES 10 mM pH 7,2 e BSA 0,2 g%. O sistema foi suplementado com FCCP 1 μ M e citrinina nas concentrações: 0,1; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mM. A respiração foi iniciada pela adição de succinato 2 mM. Cada ponto representa a média de 5 experimentos diferentes.

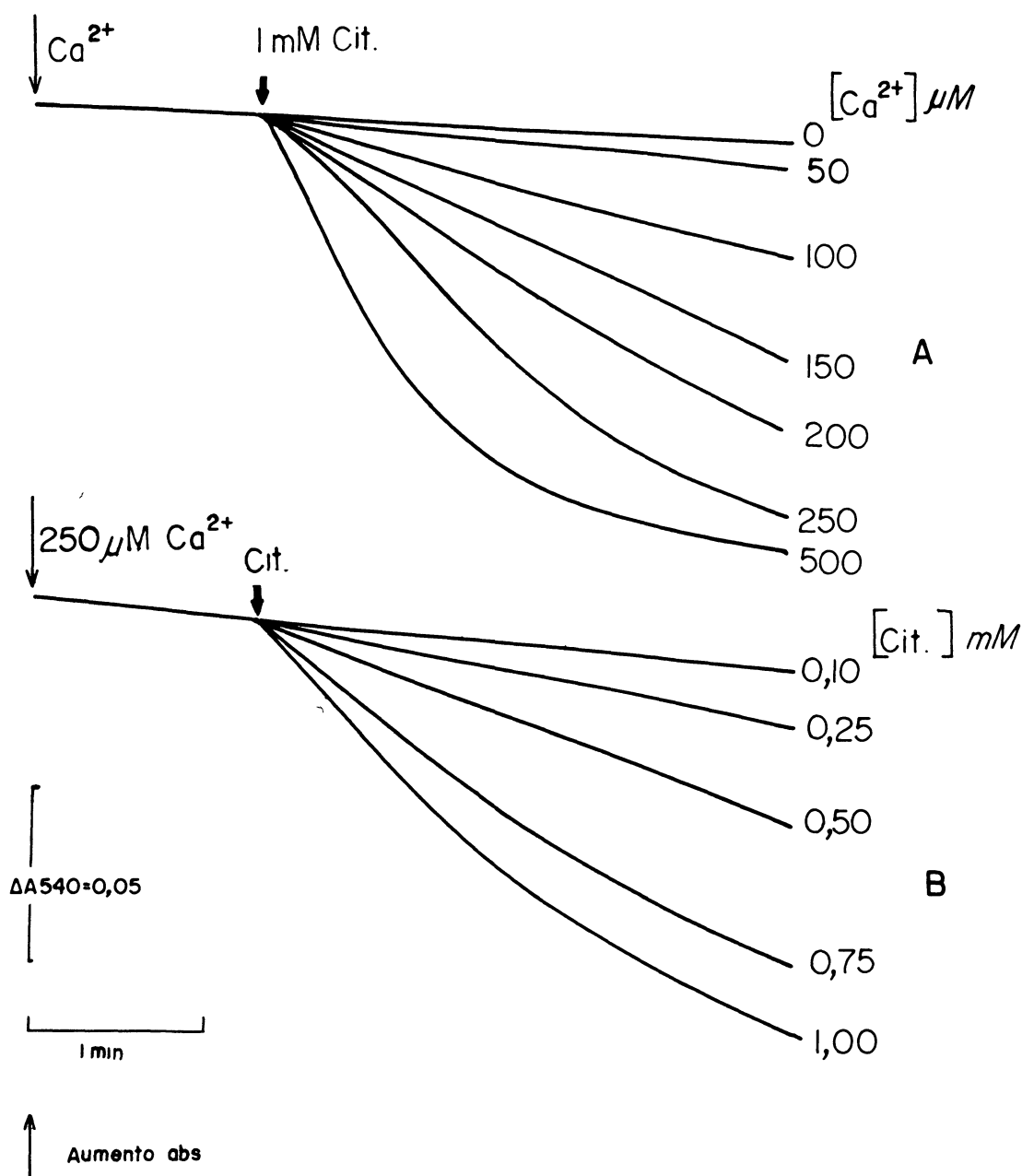


FIGURA 5 - Efeito de diferentes concentrações de Ca^{2+} e citrinina sobre a velocidade e extensão do inchamento de mitocôndrias hepáticas

MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas em sistema de reação contendo: D-manitol 125 mM, tampão Hepes 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, BSA 0,1 g% e suplementado com FCCP 1 μM . Em A, citrinina 1 mM foi adicionada a mitocôndrias pré-incubadas com diferentes concentrações de Ca^{2+} . Em B, a mitocôndrias pré-incubadas na presença de Ca^{2+} 250 μM foram adicionadas diferentes concentrações de citrinina como indicado na figura.

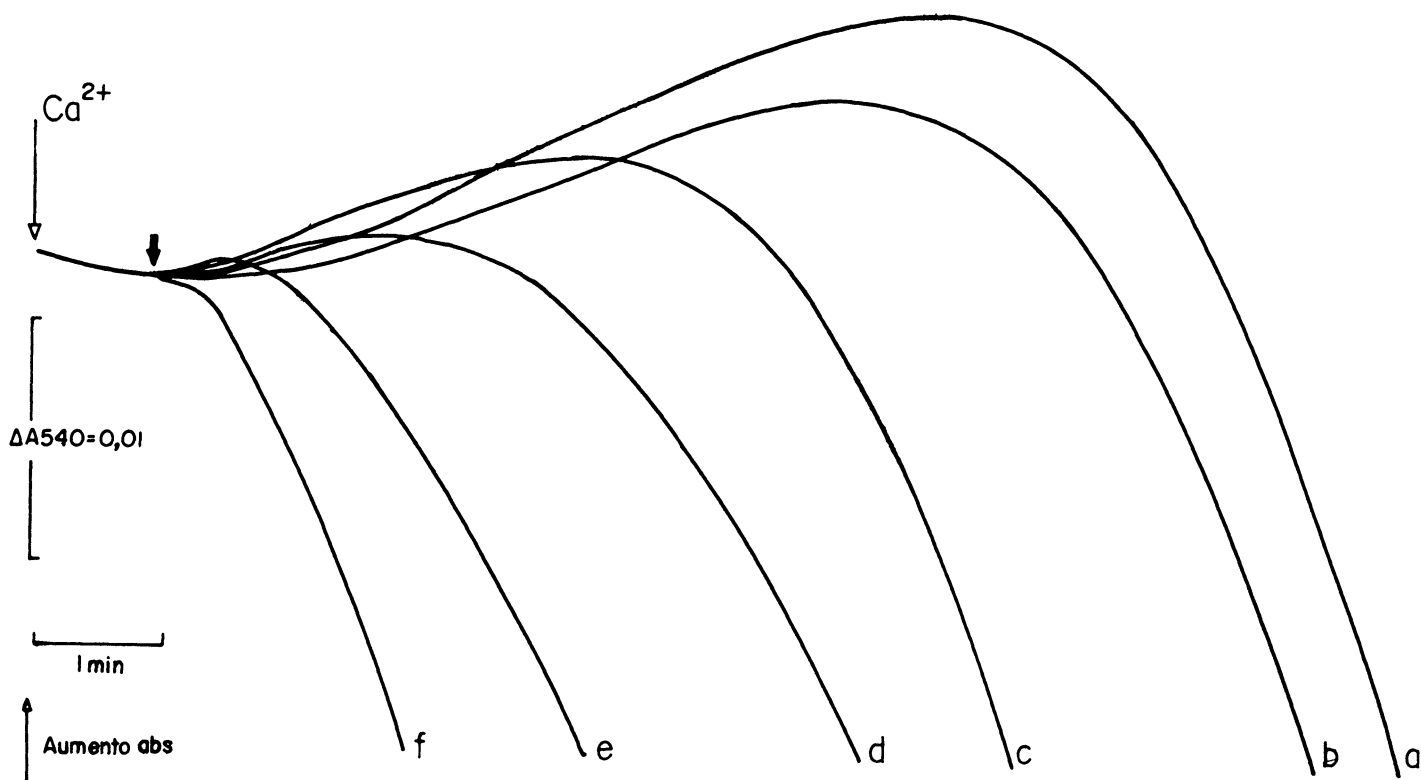


FIGURA 6 - Efeito de diferentes concentrações de citrinina sobre a velocidade e extensão do inchamento de mitocôndrias de tubérculo de batata (MB)

MB (0,5 mg/ml) foram incubadas em sistema de reação contendo: sacarose 300 mM, tampão HEPES 10 mM pH 7,2; suplementado com FCCP $1\mu\text{M}$ e Ca^{2+} $600\mu\text{M}$. Após cerca de um minuto, diferentes concentrações de citrinina foram adicionadas onde indicado pela seta (\downarrow): (b) 0,1 mM; (c) 0,25 mM; (d) 0,5 mM; (e) 0,75 mM e (f) 1,0 mM. O traçado (a) representa a situação na presença de Ca^{2+} $600\mu\text{M}$ e ausência de citrinina.

3.5 Efeito do vermelho de rutênio sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrinina

Sabe-se que a diamida, um oxidante de grupos SH, é responsável por um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna quando Ca^{2+} apresenta-se ligado a sítios internos desta membrana (GUNTER & PFEIFFER, 1990) e está relacionada no grupo das substâncias conhecidas como agentes liberadores de Ca^{2+} ou indutores de transição de permeabilidade.

Neste experimento o inibidor da via de influxo, VR, adicionado desde o início do experimento, ou seja, antes do Ca^{2+} , mostrou ser capaz de inibir o inchamento mitocondrial de citrinina mais Ca^{2+} e de diamida mais Ca^{2+} (fig. 7e) em mitocôndrias hepáticas. Isto indica que, mesmo em mitocôndrias desenergizadas, a via de influxo é importante para a entrada de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, neste caso a favor do gradiente de concentração de Ca^{2+} , e tanto no mecanismo exercido pela diamida quanto pela citrinina o Ca^{2+} localizado internamente é fundamental para desencadear o fenômeno do inchamento, o que é confirmado pela adição do ionóforo de Ca^{2+} , A23187 (fig. 7d)

Em mitocôndrias de tubérculo de batata, o inchamento também foi verificado pela utilização de citrinina mais Ca^{2+} (fig. 8d) e de diamida mais Ca^{2+} (fig. 8c). A presença do VR não foi capaz de inibir tal inchamento, contudo a utilização do ionóforo A23187 (fig. 9) demonstrou que o Ca^{2+} localizado no interior da matriz, ou talvez ligado a sítios internos, acelera o fenômeno do inchamento. Como ainda não foi encontrado um sistema específico de transporte de Ca^{2+} nestas mitocôndrias, a falta de proteção pelo VR sugere que realmente a entrada do íon cálcio nesta situação se dê por um mecanismo diferente do uniporter eletroforético.

Um requisito básico para que possa ocorrer a transição de permeabilidade é a ligação de Ca^{2+} a sítios internos da membrana mitocondrial. Os resultados obtidos reforçam a sugestão de adicionar a citrinina no grupo dos agentes indutores de permeabilidade, apesar de ainda não haver subsídios para traçar qualquer comentário sobre o seu mecanismo de ação.

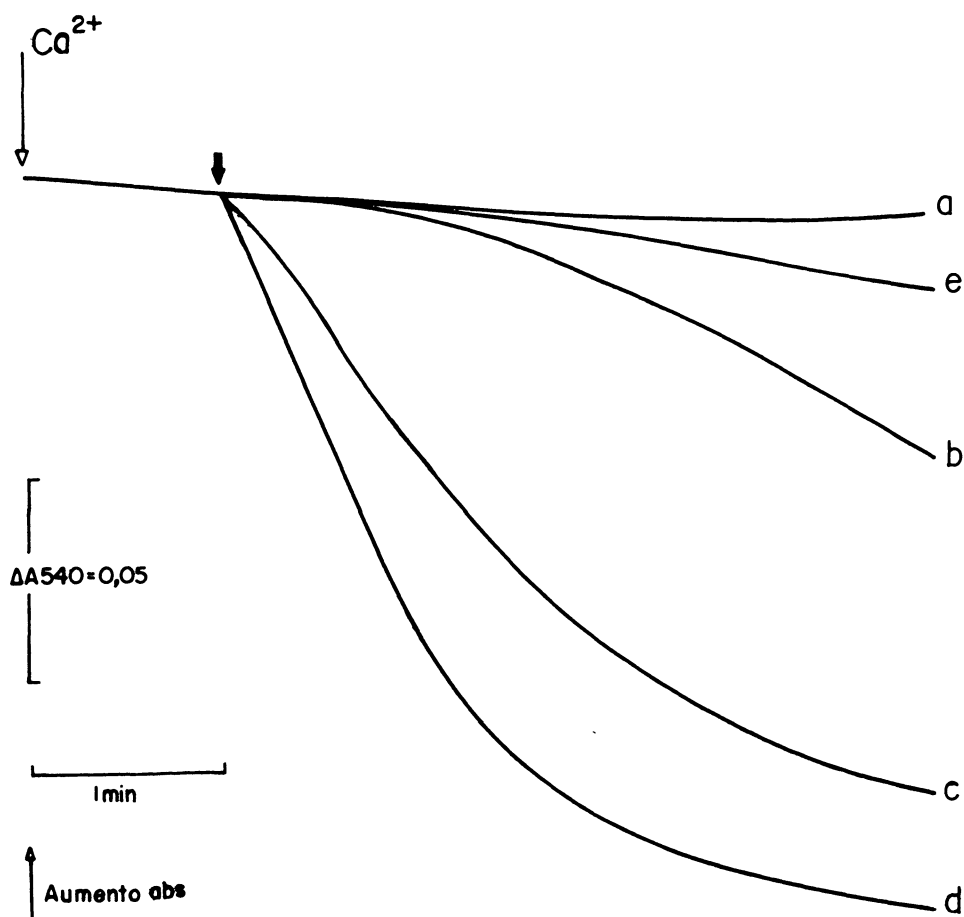


FIGURA 7 - Efeito do vermelho de rutênio sobre o inchamento, induzido por Ca^{2+} e citrinitina, de mitocôndrias hepáticas desenergizadas

MFR (0,5mg/ml) foram incubadas no mesmo meio básico descrito para a figura 5, suplementado com FCCP $1\mu\text{M}$ e Ca^{2+} $250\mu\text{M}$ (a). A seta (\downarrow) indica a adição de diamida $300\mu\text{M}$ (b), citrinitina 1mM (c) e A23187 $5\mu\text{M}$ (d) sobre a situação (a). O traçado (e) representa tanto a situação (b) quanto a (c) na presença de VR $2,5\mu\text{M}$, o qual foi adicionado antes do Ca^{2+} .

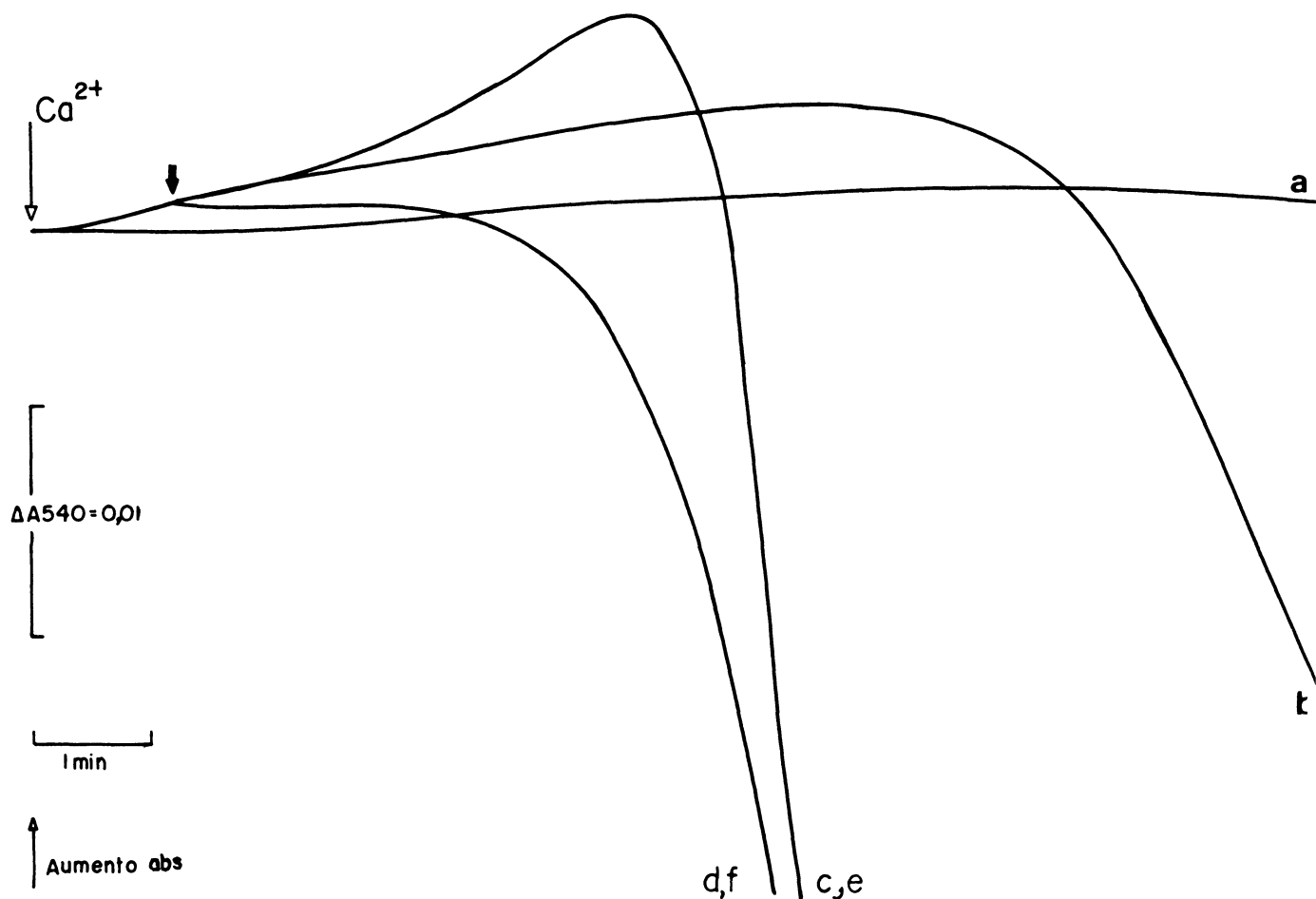


FIGURA 8 - Efeito de vermelho de rutênio sobre o inchamento, induzido por Ca^{2+} e citrinina, de mitocôndrias desenergizadas de tubérculo de batata

MB (0,5 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 6. O traçado (a) representa MB na presença de citrinina 1 mM e ausência de Ca^{2+} ; em (b) presença de Ca^{2+} 500 μM e ausência da citrinina. Sobre a situação (b) foi adicionado diamida 300 μM (c) e citrinina 1,0 mM (d) onde indicado pela seta (\downarrow). Os traços (e) e (f) representam respectivamente as mesmas condições de (c) e (d) mas na presença de VR 2,5 μM .

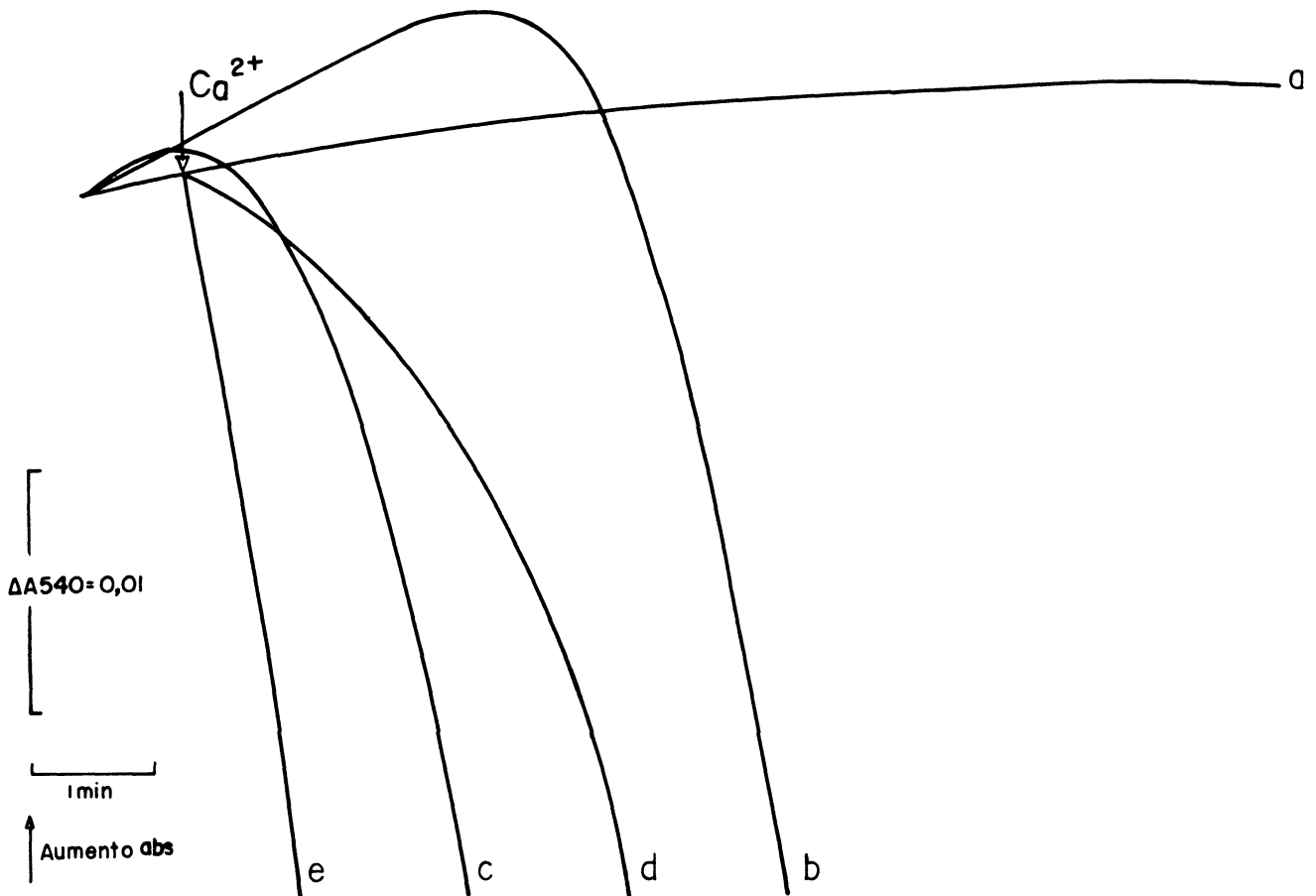


FIGURA 9 - Efeito do ionóforo A 23187 sobre o inchamento de mitocôndrias de batata induzido por Ca^{2+} e citrinina

MB (0,5 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 6. O traçado (a) representa presença de A23187 5 μM mais citrinina 1,0 mM, na ausência de Ca^{2+} . (b) representa presença somente de Ca^{2+} 600 μM , desde o início do experimento. A situação (b) na presença de A23187 5 μM está representada em (c). Nos traçados (d) e (e) Ca^{2+} 600 μM foi adicionado a mitocôndrias pré-incubadas respectivamente com citrinina 1,0 mM e A23187 5 μM mais citrinina 1,0 mM.

3.6 Efeito do ditioneitol no inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrinina

FAGIAN et al. (1990) apresentaram evidências que o aumento de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e diamida, está associado com a formação de agregados proteicos devido a ligações cruzadas de grupamentos tiólicos. Demonstraram também que tanto o processo de permeabilização quanto a polimerização podiam ser revertidos pela adição de ditioneitol ou β -mercaptoetanol, conhecidos redutores de grupos dissulfeto.

A figura 10 mostra o efeito do ditioneitol sobre o inchamento induzido por Ca^{2+} e citrinina em mitocôndrias hepáticas desenergizadas. Observa-se que a citrinina 1 mM causou um inchamento mitocondrial maior comparado com diamida 300 μM . O ditioneitol, inibiu o inchamento mitocondrial ocasionado por Ca^{2+} e diamida, mas não o decorrente da adição de Ca^{2+} e citrinina. Este resultado sugere que o mecanismo pelo qual a citrinina causa aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna na presença de Ca^{2+} , é diferente daquele provocado pela diamida, em mitocôndrias hepáticas e independente de grupos SH, nas condições experimentais utilizadas.

Em mitocôndrias de batata incubadas em condições semelhantes (fig.11), observou-se que os efeitos decorrentes da adição de citrinina 1,0 mM e diamida 300 μM , foram também semelhantes ao observado em mitocôndrias de fígado, ou seja, aumento na velocidade do inchamento em relação ao inchamento provocado somente por Ca^{2+} 600 μM . Já o efeito protetor do DTT nestas mitocôndrias foi observado tanto com diamida quanto com citrinina.

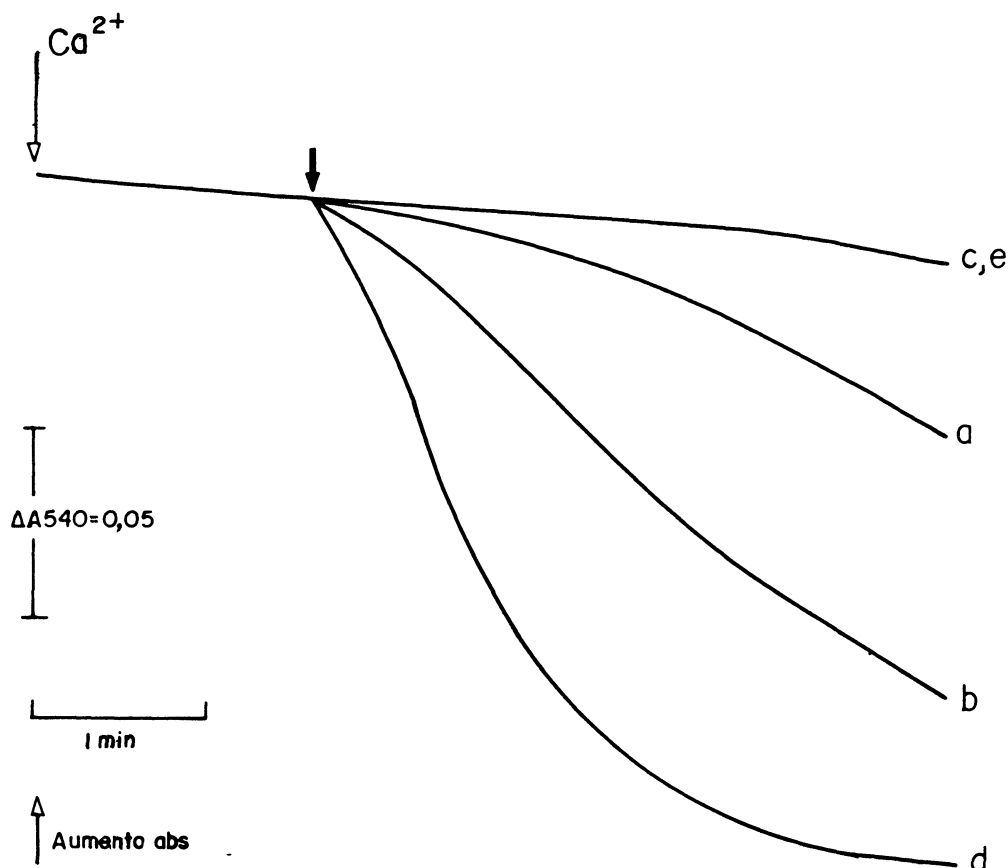


FIGURA 10 - Efeito do ditiotreitól (DTT) no inchamento, induzido por Ca²⁺ e citrinina, de mitocôndrias hepáticas desenergizadas

MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 5, suplementadas com FCCP 1 μM e Ca²⁺ 250 μM. Após pré-incubação com Ca²⁺ 250 μM, (a) diamida 300 μM, (b) citrinina 1,0 mM foram adicionados onde indicado pela seta (↓). Os traços (c) e (d) representam respectivamente a mesma condição que (a) e (b) mas na presença de DTT 1,0 mM desde o início do experimento. O traço (e) representa a adição de citrinina 1,0 mM e diamida 300 μM na ausência de Ca²⁺.

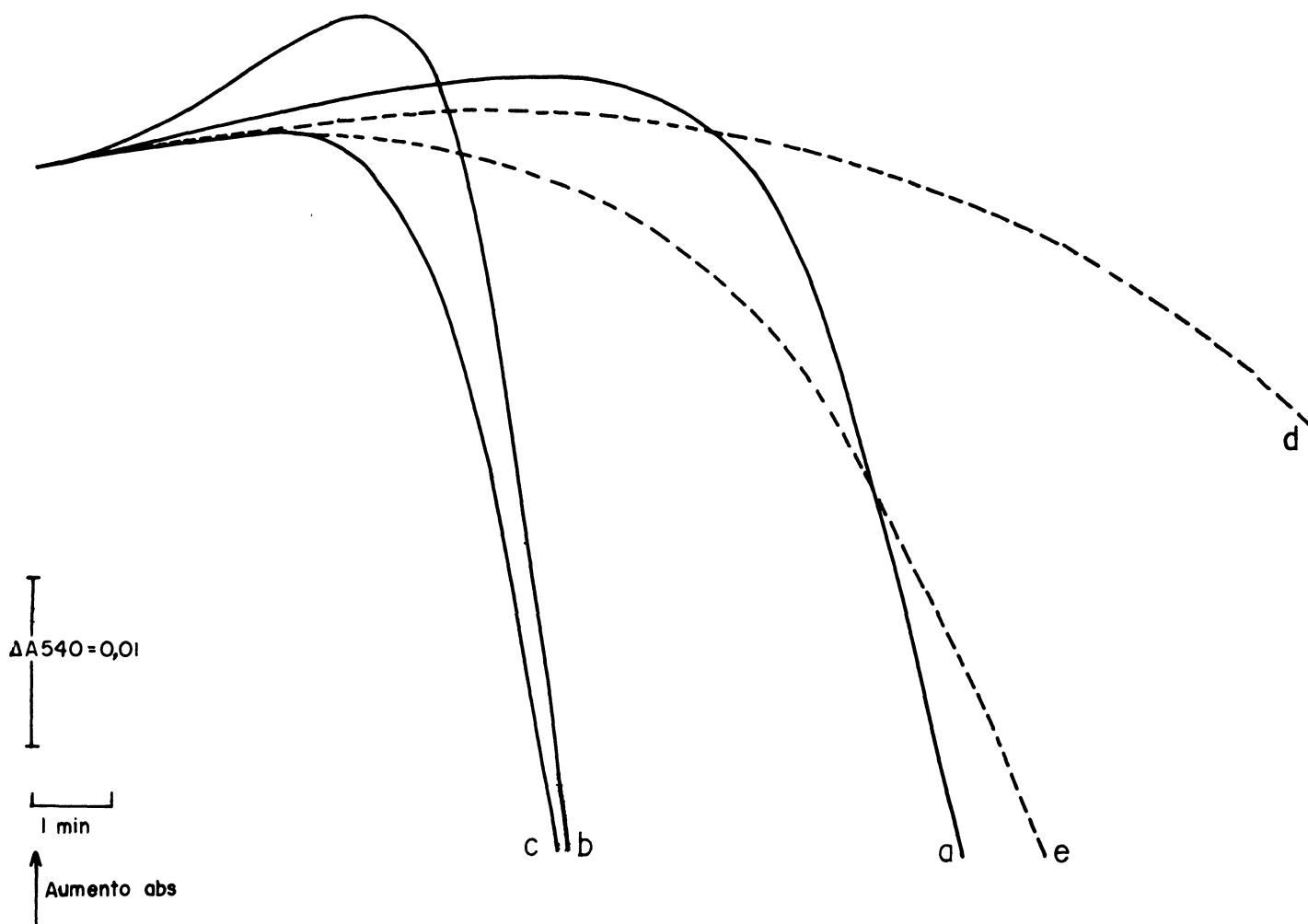


FIGURA 11 - Efeito do ditiotreitól (DTT) no inchamento, induzido por Ca^{2+} e citrinina, de mitocôndrias desenergizadas de tubérculo de batata

MB (0,5 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições experimentais descritas para a figura 6. As linhas cheias representam: (a) presença de Ca^{2+} 600 μM ; (b) Ca^{2+} 600 μM mais diamida 300 μM ; (c) Ca^{2+} 600 μM mais citrinina 1,0 mM. Os traços (d) e (e) (linhas pontilhadas) representam respectivamente (b) e (c) na presença de DTT 1,0 mM.

3.7 Efeito protetor de nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrulina

Desde os primeiros estudos sobre transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna, realizados por HUNTER & HAWORTH (1976; 1979), ficou constatado que a ausência de protetores endógenos, como os nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} , favorecia o fenômeno. Com o desenvolvimento do estudo nesta área, apareceram indicações do envolvimento da translocase de nucleotídeos de adenina na regulação do poro de transição de permeabilidade, assunto que foi detalhadamente explanado na introdução deste trabalho.

Os experimentos mostrados a seguir tiveram por objetivo verificar a ação dos nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} como fatores de regulação do fenômeno, sem a preocupação de explicar o mecanismo desta proteção.

A fig. 12 mostra a proteção conferida por ATP mais Mg^{2+} ao inchamento de mitocôndrias hepáticas induzido por 250 μM de Ca^{2+} livre, na presença de citrulina 1 mM. Esta concentração de Ca^{2+} livre foi calculada pelo programa computacional contendo método iterativo descrito em Materiais e Métodos. Das concentrações totais de ATP (500 μM), Mg^{2+} (500 μM) e Ca^{2+} (368 μM), aproximadamente 95 μM de ATP apresenta-se na forma livre, 260 μM como complexo ATP- Mg^{2+} e 118 μM como complexo ATP- Ca^{2+} . Nesta situação há 239 μM de Mg^{2+} livre.

Em mitocôndrias de tubérculo de batata a adição de ADP 500 μM e Mg^{2+} 500 μM evitaram o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} livre 400 μM . Já na presença de citrulina 1 mM juntamente com a mesma concentração de Ca^{2+} o efeito protetor não foi tão intenso (dados não mostrados).

Os resultados obtidos demonstraram efeito protetor dos nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} sobre o fenômeno, reforçando a sugestão da ação da citrulina como agente indutor da transição.

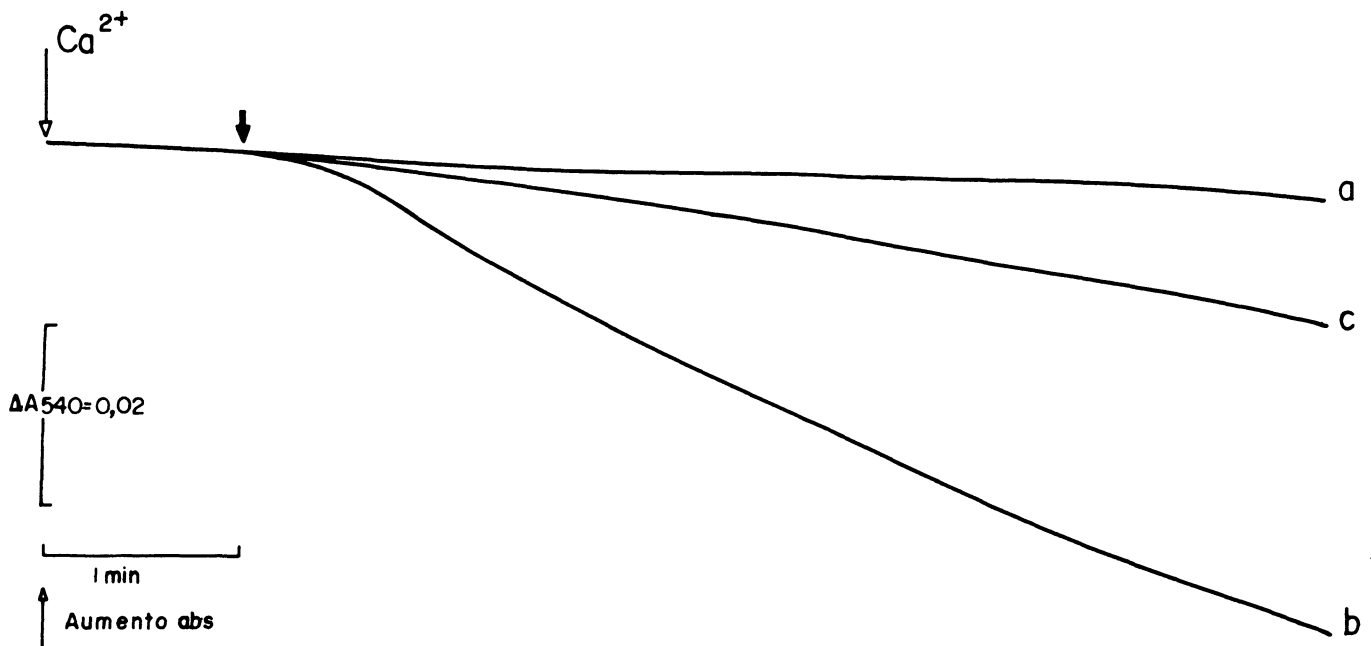


FIGURA 12 - Efeito protetor do ATP e Mg^{2+} sobre o inchamento de mitocôndrias hepáticas, induzido por Ca^{2+} e citrinitina

MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas nas mesmas condições básicas descritas na figura 5, suplementadas com FCCP 1 μM e Ca^{2+} 250 μM . (a) representa presença de Ca^{2+} livre 250 μM e ausência de citrinitina. A adição de citrinitina 1,0 mM, indicada pela seta (\downarrow), sobre mitocôndrias pré-incubadas com Ca^{2+} 250 μM é mostrada em (b). O traçado (c) representa a situação (b) na presença de ATP 0,5 mM e Mg^{2+} 0,5 mM.

3.8 Efeito de ciclosporina A sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrinina

Recentemente a ciclosporina A, um peptídeo cíclico usado como agente imunossupressor, foi identificada como um inibidor altamente específico da transição de permeabilidade. Este composto é igualmente eficiente quando diferentes tipos de agentes indutores são empregados, e parece agir pela sua ligação a sítios mitocondriais com uma constante de afinidade 10^{-9} M. A ciclosporina A tem sido usada em investigação do mecanismo e do significado fisiológico da transição (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Experimentalmente a inibição do inchamento mitocondrial pela ciclosporina A, consiste numa maneira de se sugerir que o aumento de permeabilidade da membrana é mediado pelo poro de transição de permeabilidade (PTP).

Observou-se que o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} 250 μM e citrinina 1 mM em mitocôndrias hepáticas desenergizadas, não foi protegido pela presença de CsA 0,5 ou 1,0 μM (dados não mostrados), porém com mitocôndrias energizadas por succinato 3 mM (fig.13) a presença de CsA 0,5 μM foi capaz de proteger o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} 100 μM e por Ca^{2+} 100 μM mais citrinina 0,75 mM.

Dados preliminares sugerem que a CsA 0,5 μM iniba totalmente o efluxo de Ca^{2+} provocado por VR mais citrinina, em mitocôndrias hepáticas energizadas por succinato na presença de Ca^{2+} 10 μM .

Esta diferença de comportamento entre mitocôndrias energizadas e desenergizadas deve-se, provavelmente, a complexidade da cinética de regulação como a concentração de Ca^{2+} , pH da matriz e potencial elétrico da membrana.

Por exemplo, BERNARDI et al. (1992) constataram que a inibição da indução do poro conferida pela CsA é afetada por altas concentrações de Ca^{2+} , altas concentrações de CsA são requeridas quando a concentração de Ca^{2+} é aumentada, sugerindo que Ca^{2+} ligado pode influenciar a afinidade de ligação da CsA ao seu ligante.

Este pode ser também um dos motivos que não permitiram a inibição da transição de permeabilidade pela CsA em mitocôndrias hepáticas desenergizadas, onde a concentração de Ca^{2+} é maior.

Em mitocôndrias de tubérculo de batata, nenhuma proteção foi conferida pela CsA tanto em situação energizada quanto desenergizada, provavelmente devido ao fato da concentração de Ca^{2+} ser também muito alta em ambas as situações. Contudo um estudo mais aprofundado é necessário antes de se sugerir qualquer diferença de mecanismo da citrinina no fenômeno desenvolvido nestes dois tipos de mitocôndrias.

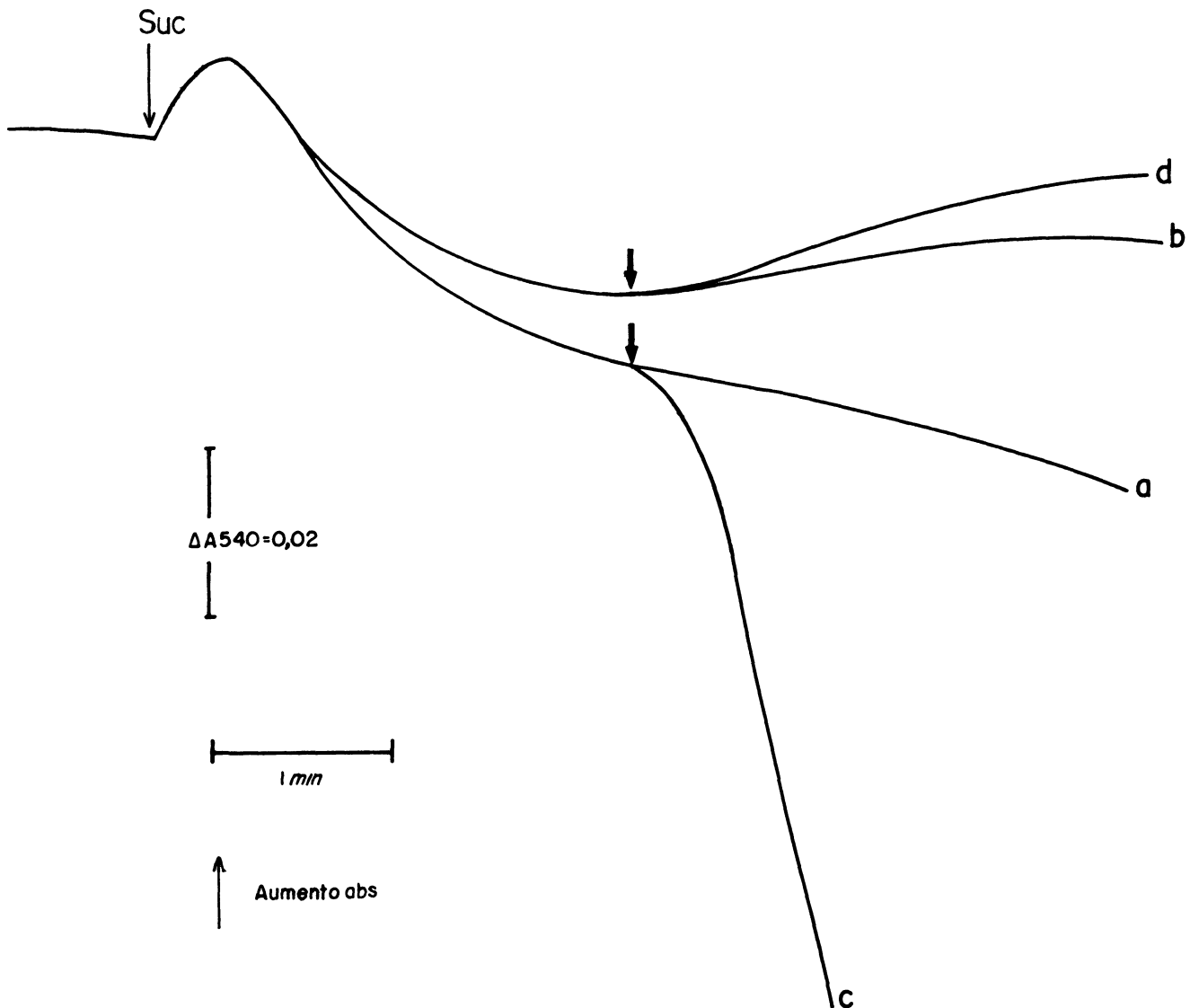


FIGURA 13 - Efeito da ciclosporina A (CsA) sobre o inchamento de mitocôndrias hepáticas energizadas, induzido por Ca^{2+} e citrinitina

MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas no meio de reação básico descrito para a figura 5, suplementado com rotenona 10 μM , oligomicina 3 $\mu\text{g/ml}$, succinato 3 mM, Pi 1,0 mM e Ca^{2+} 100 μM (a). (b) representa a situação (a) na presença CsA 0,5 μM . Citrinitina 0,75 mM foi adicionada, onde indicado pelas setas (\downarrow) sobre as situações (a) e (b) levando respectivamente aos traçados (c) e (d).

4. DISCUSSÃO FINAL

Os resultados deste trabalho mostram que a citrinina inibe componentes da cadeia respiratória de mitocôndrias de fígado (fig.1), sendo esta inibição de até 70% da velocidade respiratória na concentração 1 mM. Este fato levou ao direcionamento de experimentos visando excluir os efeitos da citrinina sobre a cadeia respiratória, isto é, operando em condições desenergizadas.

Comparando o grande efluxo de Ca^{2+} gerado pela adição de citrinina a mitocôndrias respirando com succinato nas condições de equilíbrio dinâmico (fig.2), aos resultados anteriores do laboratório de que a citrinina por si não causa uma queda muito grande de potencial, sugere-se que a causa principal do efluxo observado na figura 2 não é a queda de potencial de membrana, porém um efeito da micotoxina ou sobre as vias de efluxo ou um efeito inespecífico sobre a permeabilidade da membrana, talvez associado à presença do Ca^{2+} .

O aumento do efluxo de Ca^{2+} pela adição de citrinina a mitocôndrias energizadas em “steady-state” e também na presença de VR (fig.3), mostra que nesta situação o efluxo não está ocorrendo pelo reverso do uniporter pois este encontra-se bloqueado pelo inibidor (VR). Porém, como pode ser observado na figura 3, este efluxo é menor que o da figura 2, confirmando a sugestão inicial de efluxo tanto pelo reverso do uniporter quanto por outro mecanismo.

A utilização de TPP^+ , citado como um inibidor dos sistemas de efluxo dependente ou independente de Na^+ , mostrou que o efluxo causado pela citrinina na presença de VR não foi inibido quando o TPP^+ estava presente dando um indicativo que tal efluxo não estivesse relacionado diretamente a esses sistemas. Uma outra possibilidade desse resultado seria uma interação entre a citrinina e TPP^+ ou citrinina e o sítio de ligação do TPP^+ do sistema de efluxo.

Os experimentos da figura 4 mostram que a velocidade respiratória de mitocôndrias de batata é inibida por citrinina, porém esta inibição foi menor que em mitocôndrias de fígado chegando a aproximadamente 30% de inibição da velocidade respiratória com citrinina 1 mM. Estudos estão em andamento para definir o mecanismo de ação da citrinina, para promover tal efeito, nestas mitocôndrias.

Para testar a hipótese de que a citrinina estaria causando um aumento inespecífico da permeabilidade, os experimentos de inchamento mitocondrial foram realizados. Com o objetivo de excluir os efeitos, já conhecidos, da citrinina sobre a cadeia respiratória, utilizou-se mitocôndrias desenergizadas na presença de FCCP e ausência de substrato respiratório. Desta forma os resultados obtidos mostram uma ação da droga somente sobre a permeabilidade da membrana, sendo excluídos os efeitos sobre o metabolismo mitocondrial.

Apesar do mecanismo e função da transição de permeabilidade ainda estarem sendo intensamente estudados, as condições básicas que a determinam estão, há muito, definidas: a transição de permeabilidade é induzida por Ca^{2+} em conjunção com outro agente, chamado agente indutor ou agente liberador de Ca^{2+} . O Ca^{2+} deve estar localizado no interior da matriz, e outros íons divalentes não devem desencadear o fenômeno, havendo portanto especificidade por Ca^{2+} (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Demonstrou-se nas figuras 5 e 6 que o inchamento mitocondrial, tanto em fígado quanto em batata, foi dependente da associação de Ca^{2+} e citrinina e que a micotoxina sozinha ou somente o Ca^{2+} , em mitocôndrias de fígado, não foi capaz de desencadear o fenômeno. Além disso, a presença de Ba^{2+} em substituição ao Ca^{2+} também não foi capaz de induzir o inchamento (dados não mostrados) reforçando a tese da exigência do Ca^{2+} como íon divalente.

A inibição do inchamento em mitocôndrias de fígado de rato por VR (fig.7) mostrou que a localização interna do Ca^{2+} é responsável pela indução do fenômeno, e que a entrada do Ca^{2+} ocorre pelo uniporter eletroforético, mesmo em condições desenergizadas, devido às altas concentrações de Ca^{2+} empregadas. Em mitocôndrias de batata (fig. 8) o VR não foi capaz de inibir o fenômeno, muito provavelmente pelo fato destas mitocôndrias não possuírem o sistema clássico para o influxo de Ca^{2+} . A importância da localização interna do Ca^{2+} também nestas mitocôndrias vegetais foi confirmada pela adição do ionóforo A23187 (fig. 9) que aumentou consideravelmente a velocidade de inchamento mitocondrial. Esses resultados indicam que mitocôndrias de batata permitem a entrada do Ca^{2+} , nas condições experimentais utilizadas, porém de maneira ainda não identificada.

Os nucleotídeos de adenina e o íon Mg^{2+} são considerados agentes protetores da transição de permeabilidade. Alguns autores sugerem que o Mg^{2+} inibe competitivamente a ligação do Ca^{2+} a sítios internos impedindo a “formação do poro” (SZABÒ et al. 1992). Observa-se que realmente há uma inibição do fenômeno de inchamento pela utilização de ATP e Mg^{2+} (fig. 10), ADP e Mg^{2+} e somente Mg^{2+} (dados não mostrados) sendo este mais um indicativo que a citrinina possa estar agindo como indutor de transição de permeabilidade, em ambos os tipos de mitocôndrias.

Muitos estudos tem sido realizados no sentido de definir o mecanismo pelo qual ocorre a transição de permeabilidade. Entre as tendências científicas atuais foram escolhidos alguns experimentos, visando encontrar um possível caminho para explicar como a citrinina desenvolve sua ação.

O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna como uma consequência da formação de agregados proteicos, proposta por FAGIAN et al. 1990, foi verificada indiretamente pela utilização de ditiotreitol. Em mitocôndrias hepáticas o DTT não inibiu o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrinina, somente aquele induzido por Ca^{2+} e diamida, sugerindo que nas condições experimentais empregadas a ação da citrinina não resulta da oxidação de grupos SH de proteínas e consequente formação de agregados proteicos. O mecanismo pelo qual Ca^{2+} e prooxidantes, como a diamida, interagem para desenvolver o fenômeno ainda não está esclarecido. Há indicação que seja mediado pelo ataque de ROS (geradas pela mitocôndria) a grupamentos SH de proteínas, formando agregados de alto peso molecular via ligação cruzada S-S (FAGIAN et al. 1990; VALLE et al. 1993; BERNARDES et al. 1994). Esta ação sinérgica entre Ca^{2+} e prooxidante foi também sugerida como uma consequência de um aumento da produção de ROS pela mitocôndria devido a presença de Ca^{2+} e um aumento da concentração de ROS na matriz pela depleção de equivalentes redutores, tais como GSH e NAD(P)H, favorecida pela presença do prooxidante (VERCESI et al. 1994).

O fato do DTT inibir o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e citrinina em mitocôndrias de batata indica a necessidade de um estudo mais aprofundado para explicar tal fenômeno.

A ação da citrinina sobre as enzimas mitocondriais de proteção do estresse oxidativo, bem como sua capacidade de gerar ROS, já estão sendo estudadas neste laboratório. Estes resultados juntamente com outros capazes de esclarecer a formação ou não de agregados proteicos, que podem ser obtidos através da realização de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, nas condições idealizadas por FAGIAN et al. 1990, podem auxiliar muito na compreensão do fenômeno, tanto em mitocôndrias hepáticas quanto em mitocôndrias de tubérculo de batata.

Estudos recentes indicam que o mecanismo de transição de permeabilidade pode envolver a formação de um poro ou megacanal sensível a ciclosporina A. A proteção conferida pela CsA ao inchamento mitocondrial somente em mitocôndrias de fígado de rato energizadas (fig.13) sugere que este efeito protetor só é possível na presença de alto potencial de membrana como mostrado por vários autores. Alguns autores sugerem a existência de um sensor de voltagem, sensível a variação de potencial de membrana, o que explicaria a não inibição pela CsA em mitocôndrias desenergizadas (PETRONILLI et al. 1993 b). Estes últimos resultados fortemente sugerem a formação de poro ou megacanal induzido pela citrinina.

Apesar de evidente a capacidade da citrinina, na presença de Ca^{2+} , causar aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, muito ainda deve ser pesquisado para definir seu mecanismo de ação.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

1. Há permeabilização da membrana mitocondrial interna de fígado de rato e de tubérculo de batata, na presença de Ca^{2+} e citrinina;
2. É essencial a presença de Ca^{2+} na matriz mitocondrial para que ocorra a permeabilização;
3. A permeabilização provocada por Ca^{2+} e citrinina causa efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de rato e inchamento mitocondrial em ambos os tipos de mitocôndrias;
4. O inchamento mitocondrial é prevenido por nucleotídeos de adenina e Mg^{2+} . A ciclosporina A evita o inchamento somente em mitocôndrias energizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEO, M. D.; WYATT, R. D.; SCHNELLMANN, R. G. The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth, v. 107, p. 73-80, 1991.
- AMBROSE, A. M.; De EDS, F. Some toxicological and pharmacological properties of citrinin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 88, p. 173-186, 1946.
- BARTLEY, W.; AMOORE, J.E. The effects of manganese on the solute content of rat liver mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 69, p. 348-360, 1958.
- BEATRICE, M. C.; PALMER, J.W.; PFEIFFER, D. R. The relationship between mitochondrial permeability, membrane potential, and the retention of Ca^{2+} by mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 255, n. 18, p. 8663-8671, 1980.
- BERNARDES, C. F.; 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**, Amsterdam, v. 850, p. 41-48, 1986.
- BERNARDES, C. F.; MEYER-FERNANDES, J. R.; BASSERES, D.S.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Ca^{2+} -dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4, 4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1188, p. 93-100, 1994.
- BERNARDI, P.; VASSANELLI, S.; VERONESE, P.; COLONNA, R.; SZABÒ, I.; ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, n. 5, p. 2934-2939, 1992.
- BERNARDI, P.; VERONESE, P.; PETRONILLI, V. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n. 2, p. 1005-1010, 1993.
- BERNDT, W. O.; HAYES, A.W. The effect of probenecid on citrinin-induced nephrotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth, v.64, p.118-124, 1982.

- BRIERLEY, G. P. The uptake and extrusion of monovalent cations by isolated heart mitochondria. **Molecular & Cellular Biochemistry**, v. 10, n. 1, p. 41-61, 1976.
- BROEKEMEIER, K. M.; DEMPSEY, M. E.; PFEIFFER, D. R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, p. 7826-7830, 1989.
- BYGRAVE, F. L. Mitochondrial calcium transport. **Current Topics in Bioenergetics**. v. 6, p. 259-318, 1977.
- CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 56, p. 395-433, 1987.
- CARAFOLI, E.; TIOZZO, R.; LUGLI, G.; CROVETTI, F.; KRATZING, C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. **J. Molec. Cell. Cardiol.**, London, v. 6, p. 361-371, 1974.
- CARAFOLI, E. The calcium cycle of mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 105, n.1, p. 1-5, 1979.
- CARBONERA, D.; ANGRILLI, A.; AZZONE, G. F. Mechanism of nitrofurantoin toxicity and oxidative stress. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 936, p.139-147, 1988.
- CARLTON, W. W.; SANSING, G.; SZEZECH, G. M. Citrinin mycotoxicosis in Beagle dogs. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v. 12, p. 479-490, 1974.
- CARNIERI, E. G. S.; MARTINS, I. S.; VERCESI, A. E. The mechanism and biological role of calcium transport by plant mitochondria. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 635-638, 1987.
- CHAGAS, G. M.; CAMPELLO, A. P.; KLÜPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. **J. Appl. Toxicol.**, v. 12, p. 123-129, 1992 a.
- CHAGAS, G. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; CAMPELLO, A. P.; KLÜPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effect on respiration, enzyme activities, and membrane potential of liver mitochondria. **Cell. Biochem. Func.**, v. 10, p. 209-216, 1992 b.

- CHAGAS, G. M.; KLÜPPEL, M. L. W.; CAMPELLO, A. P.; BUCHI, D.F.; OLIVEIRA, M. B. M. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. **Cell Structure and Function**, v. 19, p. 103-108, 1994 a.
- CHAGAS, G. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; CAMPELLO, A. P.; KLÜPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondrial swelling. **J. Appl. Toxicol.**, in press, 1994 b.
- CHAGAS, G. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; CAMPELLO, A. P.; KLÜPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV. Effect on Ca^{2+} transport. **Cell Biochem. Func.**, in press, 1994 c.
- CHANCE, B. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 240, p. 2729-2748, 1965.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. Kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 217, n. 1, p. 383-393, 1955.
- CIEGLER, A. Fungi that produce mycotoxins: conditions and occurrence. **Mycopathology**, Dordrecht, v. 65, p. 5-11, 1978.
- CROMPTON, M.; CAPANO, M.; CARAFOLI, E. The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v. 69, p. 453-462, 1976.
- CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem. J.**, London, v. 255, p. 357-360, 1988.
- CROMPTON, M.; HEID, I.; BASCHERA, C.; CARAFOLI, E. The resolution of calcium fluxes in heart and liver mitochondria using the lanthanide series. **FEBS Lett.**, v. 104, p. 352-354, 1979.
- CROMPTON, M.; KÜNZL, M.; CARAFOLI, E. The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, v. 79, p. 549-558, 1977.
- CROMPTON, M.; MOSER, R.; LUDI, H.; CARAFOLI, E. The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v. 82, p. 25-31, 1978.

- CRUZ, L. C. H.; ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G. Fungos produtores de citrinina isolados de alimentos. **Bol. Inf. Soc. Brasil. Cienc. Tecnol.**, Rio de Janeiro, n. 8, p. 3-6, 1984.
- DENTON, R. M.; MC CORMACK, J. G. The calcium sensitive dehydrogenases of vertebrate mitochondria. **Cell Calcium**, v. 7, p. 377-386, 1986.
- DENTON, R. M.; MC CORMACK, J. G. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 1-7, 1980.
- DOUCE, R. Mitochondria in higher plants: structure, function, and biogenesis, Academic Press, Orlando, Florida, 327 p., 1985.
- ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. In: **METHODS IN ENZYMOLOGY**, New York: Academic Press, 1967. v. x, p.41-47.
- FABIATO, A.; FABIATO, F. Calculator programs for computing the compositions of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. **J. Physiol.**, Paris, v. 75, p. 463-505, 1979.
- FAGIAN, M. M.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MARTINS, I. S.; VERCESI, A.E. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 19955-19960, 1990.
- FASOLATO, C.; PIZZO, P.; POZZAN, T. Receptor-mediated calcium influx in PC 12 cells: ATP and bradykinin activate two independent pathways. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 33, p. 20351-20355, 1990.
- GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 755-786, 1990.
- HALESTRAP, A. P.; DAVIDSON, A. M. Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. **Biochem. J.**, London, v. 268, p. 153-160, 1990.

- HARAGUCHI, H.; TANAKA, T.; TANAGUCHI, M.; OI, S.; HASHIMOTO, K. Inhibitory effects of citrinin on mitochondrial function. **Agr. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 51, n. 5, p. 1373-1378, 1987.
- HAWORTH, R. A.; HUNTER, D. R. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 195, n. 2, p. 460-467, 1979.
- HEATHERINGTON, A. C.; RAISTRICH, H. Studies in the biochemistry of microorganisms. Part XIV. On production and chemical constitution of a new yellow colouring matter citrinin, produced from glucose by *P. citrinum*. **Thom. Phil. Trans. R. Soc. Ser. B.**, v. 220, p. 169-295, 1931.
- HERMES-LIMA, M.; VALLE, V. G. R.; VERCESI, A. E.; BECHARA, E. J. H. Damage to rat liver mitochondria promoted by aminolevulinic acid-generated active oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1056, p. 57-63, 1991.
- HERMES-LIMA, M.; CASTILHO, R. F.; VALLE, V. G. R.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. E. 5-Aminonolevulinic acid induces a Ca^{2+} -dependent mitochondrial oxidative stress antagonized by Mg^{2+} : a model for acute intermittent porphyria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1180, p. 201-206, 1992.
- HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A.; SOUTHARD, J. H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 251, n. 16, p. 5069-5077, 1976.
- HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanism. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 195, n. 2, p. 453-459, 1979 a.
- HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca^{2+} release. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 195, n. 2, p. 468-477, 1979 b.
- INESI, G.; KURZMACK, M.; COAN, C.; LEWIS, D. E. Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 255, p. 3031, 1980.

- JORDAN, W. H.; CARLTON, W. W.; SANSING, G. A. Citrinin mycotoxicosis in the mouse. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v. 15, p. 29-34, 1977.
- KROGH, P. Causal associations of mycotic nephropathy. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, Copenhagen, v. 269, p. 1-28, 1978.
- KROGH, P. The role of micotoxins in disease of animals and man. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, p. 99-104, 1989.
- KROGH, P.; HASSELAGER, E.; FRISS, P. Studies on fungal nephrotoxicity. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B.** Copenhagen, v. 78, p. 401-413, 1970.
- LÊ QUÔC, K.; LÊ QUÔC, D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 265, n. 2, p. 249-257, 1988.
- LÊ-QUÔC, K.; LÊ-QUÔC, D. Control of the mitochondrial inner membrane permeability by sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 216, n. 2, p. 639-651, 1982.
- LÊ-QUÔC, K.; LÊ-QUÔC, D. Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 260, p. 7422-7428, 1985.
- LEHNINGER, A. L. Esterification of inorganic phosphate coupled to electron transport between dihydrophosphopyridine nucleotide and oxygen. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 178, p. 625-644, 1949.
- LEHNINGER, A. L.; VERCESI, A.; BABABUNMI, E. A. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 75, n. 4, p. 1690-1694, 1978.
- LOTSCHER, H. R.; WINTERHALTER, K. H.; CARAFOLI, E.; RICHTER, C. Hydroperoxides can modulate the redox state of mitochondrial pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 76, p. 4340-4344, 1979.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J. ; FARR, A. C.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

- MACEDO, D. V.; FERRAZ, V. L.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; VERCESI, A. E. Ca^{2+} -dependent NAD(P)^+ -induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. In: LEMASTERS, J. J.; HACKENBROCK, C. R.; THURMAN, R.G.; WESTERHOFF, H. V. **Integration of Mitochondrial Functions**. New York:Plenum Publishing Corporation, 1988. P. 535-542.
- MARTINS, I. S.; CARNIERI, E. G. S.; VERCESI, A. E. Mechanism of Ca^{2+} and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. In: **Current Topics in Plant Physiol.**, Trivandrum, 1994. p. 211-217.
- MARTINS, I.; VERCESI, A. E. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 129, p. 943-948, 1985.
- MARTINS, I. S. ; CARNIERI, E. G. S.; VERCESI, A. E. Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 850, p. 49-56, 1986.
- MC CORMACK, J. G.; DENTON, R. M. Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v. 11, p. 258- 262, 1986.
- MC CORMACK, J. G.; DENTON, R. M. Calcium ions, hormones, and mammalian oxidative metabolism. In: FISKUM, G. **Cell Calcium Metabolism**. New York : Plenum Press, 1989. p. 325-330.
- MC CORMACK, J. G.; HALESTRAP, A. P.; DENTON, R. M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 391-425, 1990.
- MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. **Biol. Rev.**, v. 41, p. 445-502, 1966.
- NEDERGAARD, J. Na^+ -dependent regulation of extramitochondrial Ca^{2+} by rat-liver mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, v. 144, p. 159-168, 1984.
- NICHOLLS, D. G. **Bioenergetics: an introduction to the chemiosmotic theory**. New York: Academic Press, 1982, 190 p.
- NICHOLLS, D.; AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 683, p. 57-88, 1982.

- NICHOLLS, D.G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 176, p. 463-474, 1978.
- NICOLLI, A.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. **Biochemistry**, Washington, v. 32, n. 16, p. 4461-4465, 1993.
- NICOTERA, P.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 32, p. 449-470, 1992.
- NICOTERA, P.; MC CONKEY, D. J.; JONES, D. P.; ORRENIUS, S. ATP stimulates Ca^{2+} uptake and increases the free Ca^{2+} concentration in isolated rat liver nuclei. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 86, p. 453-457, 1989.
- NOVGORODOV, S. A.; GUDZ, T. I.; JUNG, D. W.; BRIERLEY, G. P. The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 180, n. 1, p. 33-38, 1991.
- NOVGORODOV, S. A.; GUDZ, T.I.; MILGROM, Y. M.; BRIERLEY, G. P. The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, n. 23, p. 16274-16282, 1992.
- OHMONI, V.; ISONO, C.; UCHIDA, H. On toxicity of Thailand yellowises rice and Islandia yellowises rice. **Jap. J. Pharmacol.**, Tokyo, v. 50, p. 256-261, 1954.
- ORRENIUS, S.; MC CONKEY, D. J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. **Trends. Pharmacol. Sci.**, Cambridge, v. 10, p. 281-285, 1989.
- PETRONILLI, P.; NICOLLI, A.; COSTANTINI, P.; COLONNA, R.; BERNARDI, P. Regulation of the permeability transition pore, voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1187, p. 255-259, 1994.

- PETRONILLI, V.; SZABÒ, I.; ZORATTI, M. The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 259, n. 1, p. 137-143, 1989.
- PETRONILLI, V.; COLA, C.; BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A -sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca^{2+} . **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n. 2, p. 1011-1016, 1993 a.
- PETRONILLI, V.; COLA, C.; MASSARIS, S.; COLONNA, R.; BERNARDI, P. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n. 29, p. 21939-21945, 1993 b.
- PFEIFFER, D. R.; SCHMID, P. C.; BEATRICE, M. C.; SCHMID, H. H. O. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca^{2+} plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 254, p. 11485-11494, 1979.
- PHILIPS, R. D.; HAYES, A. W.; BERNDT, W. O.; WILLIAMS, W. L. Effects of citrinin on renal function and structure. **Toxicology**, Limerick, v. 16, p. 123-137, 1980.
- POTTER, V. R. The assay of animal tissues for respiratory enzymes. VI. Further studies on oxidative phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 169, p. 17-37, 1947.
- RANJAN, K. S.; SINHA, A. K. Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar India. **J. Sci. Food Agric.**, v. 51, p. 39-47, 1991.
- RASMUSSEN, H.; BARRET, P. Q. Calcium messenger system: an integrated view. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 64, n. 3, p. 938-985, 1984.
- RASMUSSEN, H. The cycling of calcium as an intracellular messenger. **Scientific American**, p. 44-51, 1989.
- REED, K. C.; LARDY, H. A. A23187 a divalent cation ionophore. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 247, n.21, p. 6970-6977, 1972.

- RICHTER, F.; FREI, B. Ca^{2+} release from mitochondria induced by prooxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, USA, v. 4, p. 365-375, 1988.
- RIZZUTO, R.; BERNARDI, P.; FAVARON, M.; AZZONE, G. F. Pathways for Ca^{2+} efflux in heart and liver mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 246, p. 271-277, 1987.
- ROSA, C. A. R.; CRUZ, L. C. H.; CHAGAS, W. A.; WEIGE, C. E. M. O. Ocorrência natural de nefropatia micotóxica suína causada pela ingestão de cevada contaminada com citrinina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, p. 87-90, 1985.
- ROTTENBERG, H. The measurement of transmembrane electrochemical proton gradients. **Bioenergetics**, v. 7, p. 61-74, 1975.
- ROTTENBERG, H.; SCARPA, A. Calcium uptake and membrane potencial in mitochondria. **Biochemistry**, v. 13, p. 4811-4817, 1974.
- SCARPA, A. Measurements of cation transport with metalochromic indications. In: **METHODS IN ENZYMOLOGY**, New York: Academic Press, 1979. V. 61, p. 301-358.
- SCARPA, A.; AZZONE, G. F. The mechanism of ion translocation in mitochondria. 4. Coupling of K^+ efflux with Ca^{2+} uptake. **Eur. J. Biochem.**, v. 12, p. 328-335, 1970.
- SCHWARZENBACH, G.; SEN, H.; ANDEREGG, G. **Helv. Chim. Acta**, v. 40, p. 1886-1900, 1957.
- SCOTT, P. M.; Van WALBEED, W.; KENNEDY, B.; ANYETTI, D. Mycotoxins (ochrotoxin A, citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. **Agric. Food Chem.**, London, v.20, p. 1103-1109, 1972.
- SILVA, M. A. P.; CARNIERI, E. G. S.; VERCESI, A. E. Calcium transport by corn mitochondria: evaluation of the role of phosphate. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 452-457, 1992.
- SLATER, E. C.; CLELAND, K. W. The effect of calcium on the respiratory and phosphorylative activities of heart-muscle sarcosomes. **Biochem. J.**, London, v. 55, p. 566-580, 1953.

- SOMLYO, A. P.; BOND, M.; SOMLYO, A. V. Calcium content of mitochondria and endoplasmic reticulum in liver frozen rapidly *in vivo*. **Nature**, London, v. 314, n. 18, p.622-625, 1985.
- SZABÒ, I.; BERNARDI, P.; ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, n. 5, p.2940-2946, 1992.
- TACKER, H. L.; CARLTON, W. W.; SANSING, G. A. Citrinin mycotoxicosis in guinea pigs. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.15, p. 553-561, 1977.
- THE MERCK index. 11.ed. Rahway: Merck, 1989, 1606 p.
- VALLE, G. R. V.; FAGIAN, M. M.; PARENTONI, L. S.; MEINICKE, A. R.; VERCESI, A. E. The participation of reactive oxygen species and protein thiol in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 307, n. 15, p.1-7, 1993.
- VAINIO, H.; MELA, L.; CHANCE, B. Energy dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, v. 12, p. 387-391, 1970.
- VERCESI, A. E.; FERRAZ, V. L.; MACEDO, D. V.; FISKUM, G. Ca^{2+} -dependent NAD(P)^+ -induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 154, p. 934-941, 1988.
- VERCESI, A. E. Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 441-457, 1993.
- 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.**, Baltimore, v. 253, p. 6379-6385. 1978.
- VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F.; MEINICKE, A. R.; VALLE, V. G. R., HERMES-LIMA, M.; BECHARA, E. J. H. Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of Ca^{2+} and membrane protein thiols. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1188, p. 86-92, 1994.

VOSS, D. O.; CAMPELLO, A.P.; BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 4, p. 48-51, 1961.