

La azida induce transición de la permeabilidad de la membrana interna en mitocondrias de hígado de rata

Marco Vinicio Ramírez-Mares* & Francisco Alfredo Saavedra Molina**

Resumen

La azida induce transición de la permeabilidad de la membrana interna en mitocondrias de hígado de rata. Este artículo informa una investigación del efecto de la azida, un inhibidor de la cadena respiratoria, sobre el poro de transición de la permeabilidad sensible a ciclosporina A, en mitocondrias de hígado de rata. La apertura del poro despolariza la mitocondria, permitiendo el ingreso de solutos a la matriz mitocondrial, causando hinchamiento. La ciclosporina A (CsA) previene la apertura de este poro. Encontramos que la disminución del Ca^{2+} libre intramitocondrial en mitocondrias cargadas con Ca^{2+} , fue prevenido por la CsA. La disminución del Ca^{2+} libre intramitocondrial inducida por la azida, fue acompañada por hinchamiento mitocondrial y despolarización de la membrana mitocondrial interna. El hinchamiento fue prevenido por la CsA, pero la despolarización no. Estos hallazgos sugieren que la azida induce la apertura del poro de una manera sensible a CsA, pero es posible que los dos mecanismos propuestos para explicar la transición de la permeabilidad mitocondrial estén traslapados.

Palabras clave: Calcio, ciclosporina A, despolarización, hinchamiento, permeabilidad.

Abstract

Azide induces permeability transition in the inner membrane of mitochondria of rat liver. This paper reports an investigation of the effect of azide, an inhibitor of the respiratory chain, on the cyclosporine A-sensitive permeability transition pore in rat liver mitochondria. Pore opening depolarizes the mitochondria, letting solutes enter the mitochondrial matrix, causing swelling. Cyclosporine A (CsA) prevents opening of this pore. We found that azide-induced decrease of intramitochondrial free Ca^{2+} from Ca^{2+} -loaded mitochondria was prevented by CsA. The azide-induced decrease of intramitochondrial free Ca^{2+} was accompanied by mitochondrial swelling and depolarization of the mitochondrial inner membrane. Swelling was prevented by CsA, but depolarization was not. These findings suggest that azide induce pore opening in a CsA sensitive manner, but it is possible that the two mechanisms proposed to explain the mitochondrial permeability transition are overlapping.

Key words: Calcium, cyclosporine A, depolarization, permeability, swelling.

Résumé

Azide induit la transition de perméabilité dans la membrane interne des mitochondries de foie de rat. Ce travail étudie l'effet d'un azide, inhibiteur de la chaîne respiratoire, sur le pore de transition de la perméabilité sensible à la cyclosporine A, sur des mitochondries de foie de rat. L'ouverture du pore dépolarise la mitochondrie, en permettant l'entrée des solutés dans la matrice mitochondriale, en causant un gonflement. La cyclosporine A (CsA) empêche l'ouverture de ce pore. Nous avons trouvé que la baisse de Ca^{2+} libre intramitochondrial en mitochondries chargées en Ca^{2+} , fut empêchée par la CsA. La baisse du Ca^{2+} libre intramitochondrial induite par l'azide, fut accompagnée par un gonflement mitochondrial et une dépolarisation de la membrane mitochondriale interne. Le gonflement fut empêché par la CsA, mais pas la dépolarisation. Ces découvertes suggèrent que l'azide induit l'ouverture du pore de façon sensible au CsA, mais il est possible que les deux mécanismes proposés pour expliquer la transition de la perméabilité mitochondriale soient superposés.

Mots clefs: Calcium, cyclosporine A, dépolarisation, enflure, perméabilité.

* Instituto de Recursos, Universidad del Mar, Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Distrito de San Pedro Pochutla, Oaxaca, 70902, México
Correo electrónico: marcoram@angel.umar.mx

** Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, edificio B-3, Morelia, Michoacán, 58030, México
Correo electrónico: saavedra@zeus.ccu.umich.mx

Introducción

La mitocondria juega un papel central en la síntesis de ATP y en la regulación de la muerte celular, lo cual la hace esencial para la supervivencia de la célula. Las mitocondrias aisladas pueden sufrir un dramático incremento en la permeabilidad a iones y solutos (menores a 1,500 Da), conocida como transición de la permeabilidad (Gunter & Pfeiffer 1990), generándose la pérdida de los mecanismos homeostáticos que controlan el volumen mitocondrial (Bernardi 1992). La transición de la permeabilidad se relaciona con la apertura de un mega-canal, cuya estructura está aún en debate. El estrés oxidante con una sobrecarga de calcio, el agotamiento del ATP y concentraciones elevadas de fosfato, inducen transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) con la formación de poros de TPM no específicos (PTPM) en la membrana mitocondrial interna (Halestrap *et al.* 2004). Durante los últimos 20 años se ha aceptado que tres proteínas son componentes estructurales clave de los PTPM: la adenin-nucleótido traslocasa (ANT) en la membrana interna, la ciclofilina D (CyP-D) en la matriz y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa (Crompton 1999, Zoratti *et al.* 2005). La apertura del poro genera colapso del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), el hinchamiento de la matriz, el desacoplamiento de la cadena respiratoria, la salida de citocromo c y otros factores pro-apoptóticos y la actividad hidrolítica de la F1-F₀ ATPasa, lo que finalmente lleva a la muerte celular (Crompton 2000).

Se piensa que la apertura del PTPM es activado por la unión de la CyP-D al complejo proteico por el lado de la matriz, esta unión es favorecida por la acumulación de calcio intramitocondrial ($[Ca^{2+}]_m$) (Gunter & Pfeiffer 1990). Muchos factores pueden regular la apertura del PTPM, tales como la ciclosporina A (CsA, inhibidor específico), el ATP, el Ca²⁺ y los radicales libres derivados de oxígeno (ROS) (Hagen *et al.* 2003). Se ha demostrado que el efecto de la CsA es a través de la inhibición de la actividad de la peptidil-prolil cis-trans

isomerasa (PPIasa) de la CyP-D (Tanveer *et al.* 1996). La transición de la permeabilidad se observa fácilmente después del ingreso de Ca²⁺ dependiente de energía, en presencia de una amplia variedad de "agentes inductores", con características estructurales o funcionales no relacionadas. En su exhaustiva revisión Gunter & Pfeiffer (1990) han recolectado una lista de 43 inductores, que van del fosfato a los ácidos grasos, de metales pesados a oxidantes de piridin-nucleótidos, de grupos sulfhidrilo reactivos a quinonas y plaguicidas. Típicamente, después de una fase de retardo durante la cual la permeabilidad de la membrana permanece normal, el ingreso de Ca²⁺ es seguido de un incremento espontáneo de la permeabilidad. La apertura del PTPM induce la entrada a la matriz de moléculas de bajo peso molecular, lo cual permite el equilibrio de solutos a ambos lados de la membrana interna. Sin embargo, proteínas mitocondriales son retenidas en la matriz y esto incrementa la presión osmótica coloidal, generando hinchamiento de la matriz. Debido a que el área superficial de la membrana interna es mucho mayor que la de la membrana externa, esta última se puede romper, dejando relativamente intacta la integridad de la membrana interna. La ruptura de la membrana externa se puede ver acompañada de la liberación de proteínas pro-apoptóticas hacia el citoplasma, lo que a su vez puede inducir apoptosis (Sasnauskiene *et al.* 2009).

La apertura del PTPM puede ser inhibida con baja afinidad por una gran variedad de agentes que incluye a compuestos tan diversos como: anestésicos locales, ácido bongkreico (BA, actúa a nivel de ANT), N-aciletanolaminas, carnitina, ADP, iones de Me²⁺ y H⁺ (Gunter & Pfeiffer 1990). La apertura del PTPM se demuestra experimentalmente por medio de: la despolarización de la mitocondria, la liberación del Ca²⁺ acumulado, la penetración de solutos externos hacia la matriz y el hinchamiento mitocondrial (Aronis *et al.* 2002). En este trabajo se informa el efecto de la azida, un inhibidor de la citocromo oxidasa, sobre el $[Ca^{2+}]_m$ en mitocondrias cargadas con Ca²⁺. Se discute el efecto

de la CsA sobre el $[Ca^{2+}]_m$ y se registra el estado del PTPM por medio de experimentos que evalúan el potencial de membrana y el hinchamiento mitocondrial, en mitocondrias de hígado de rata sometidas a anoxia química.

Material y métodos

Material

Las sustancias manitol, sacarosa, ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico (Mops), ácido etilendiaminotetraacético (EGTA), albúmina de suero de bovino (BSA), azul de Coomassie brillante (Blue G-250), etanol, H_3PO_4 , ciclosporina A (CsA), antimicina A, carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona (CCCP), KCL, $CaCl_2$, $MgCl_2$, L-glutamato, malato, azida de sodio, tritón X-100, ácido plurónico, 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol (Tris-base), desoxicolato sódico y rojo de rutenio $[Ru_3O_2(NH_3)_{14}]Cl_6 \cdot 4H_2O$ (RR), fueron de Sigma Chemical Co. El fluo-3/AM se compró de Molecular Probes Inc., el $[^{14}C]TPP^+$ fue de American Radiolabeled Chemicals Inc. El RR se purificó como describió Luft (1971). Todas las soluciones fueron tratadas con la resina Chelex-100 (Biorad, Richmond, California) para eliminar cationes divalentes.

Preparación de las mitocondrias

Las mitocondrias de hígado de rata se prepararon a partir de ratas "Wistar", de un peso entre 150 y 200 g, como ya fue descrito (Uribe *et al.* 1987) en un medio enfriado con hielo, que contenía: manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, Mops 2 mM y EGTA 1 mM, ajustado a un pH de 7.4. El EGTA se omitió en los dos lavados finales. La proteína se cuantificó por el método colorimétrico de Bradford (1976), con albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar.

Medición del hinchamiento mitocondrial

El hinchamiento mitocondrial se midió monitoreando la disminución en la difracción/absorción de la luz por la suspensión mitocondrial a 540 nm (Broekemeier *et al.* 1989). Las mitocondrias se suspendieron (1mg/ml) en medio de incubación conteniendo:

KCL 100 mM, $MgCl_2$ 3 mM, Mops 5 mM, glutamato 5 mM y malato 5 mM, ajustado a un pH de 7.4, en una celda de 3 ml a 25 °C, la absorbencia se midió en un espectrofotómetro u.v./vis Beckman DU 640. Después de que la absorción se estabilizó, el hinchamiento se midió adicionando 20 mM de azida de sodio (NaN_3). Condiciones experimentales específicas se presentan en las leyendas de las figuras.

Medición del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial se determinó a partir de la distribución del catión lipofílico tetrafenilfosfonio (TPP^+), a través de la membrana mitocondrial interna. Después de adicionar al medio de incubación 1 μM de TPP conteniendo 37757 c.p.m./ μmol ($[^{14}C]TPP^+$). Las mitocondrias (4 mg proteína/ml) fueron incubadas a 30 °C durante 10 min en 0.5 ml de un medio conteniendo: KCL 100 mM, $MgCl_2$ 3 mM, Mops 5 mM, glutamato 5 mM y malato 5 mM, ajustado a un pH de 7.4. La pastilla mitocondrial se obtuvo por centrifugación a 16000 g durante 1 minuto. El sobrenadante (150 μl) se removió, la pastilla mitocondrial se secó y se resuspendió en 150 μl de Tritón X-100 al 2%. Los extractos se mezclaron con 7 ml de líquido de centelleo (Fricke 1975) y se hizo el conteo. El potencial de membrana se calculó con la ecuación de Rotemberg Hagai (1984). Las condiciones experimentales específicas se presentan en las leyendas de las figuras.

Medición del Ca^{2+} libre intramitocondrial ($[Ca^{2+}]_m$)

Las mitocondrias (25mg/ml) se incubaron con 10 μM fluo-3/AM y ácido plurónico 0.003%, durante 20 min a 25 °C y con agitación a 80rpm. Fueron después centrifugadas en un microcentrífuga Eppendorf por dos minutos, se lavaron dos veces y se resuspendieron en el medio de aislamiento sin EGTA. La fluorescencia de la suspensión mitocondrial se monitoreo con un espectrofluorómetro Shimatzu RF-5000 a 25 °C; la longitud de onda de excitación fue 506 nm y la de emisión 526 nm. La cuantificación del Ca^{2+} de

la matriz mitocondrial se determinó midiendo la fluorescencia mínima (F_{\min}) al final de cada experimento por adición de EGTA/Tris-base 4mM/30mM, ajustado a un pH de 8.7 y desoxicolato 0.05%, y la fluorescencia máxima (F_{\max}) por la subsecuente adición de Ca^{2+} 4 mM. La $[\text{Ca}^{2+}]_m$ se determinó a partir de la ecuación de equilibrio: $[\text{Ca}^{2+}]_m = Kd(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$, en donde F es el valor experimental de fluorescencia. Se utilizó un valor de 400 mM para la Kd (Minta *et al.* 1989); las variaciones de pH entre 7.0 y 7.4 no alteraron la Kd significativamente, amortiguadores de calcio EGTA se utilizaron para mantener el calcio libre extramitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) como lo describió Fabiato (1988). Condiciones experimentales específicas se presentan en las leyendas de las figuras.

Análisis estadístico

Los valores de cada determinación son producto de tres incubaciones de tres diferentes preparaciones mitocondriales. Los resultados fueron expresados como la media, desviación estándar (\pm), a una significancia de $p \leq 0.05$; las variables discretas se determinaron por análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el programa PRISM™ (GraphPad, San Diego, California).

Resultados

Hinchamiento mitocondrial

La Figura 1 muestra que cuando se adiciona solamente Ca^{2+} al medio, se aprecia un hinchamiento que provoca su ingreso a la mitocondria, pero no representa transición de la permeabilidad. La adición de azida (20 mM) a mitocondrias previamente cargadas con Ca^{2+} , sí induce transición de la permeabilidad, es decir se apertura el PTPM, provocando un hinchamiento muy pronunciado y rápido (no se presenta una fase de retardo). La adición de CsA (1µg/mg proteína), esencialmente elimina el hinchamiento mitocondrial producido por la azida. En general, las curvas de hinchamiento muestran tiempos de retardo, las cuales varían de agente a agente. Las curvas son complejas y no son fáciles de resumir

numéricamente, como sería deseable, para describir el efecto de un inhibidor como función de la concentración. Sin embargo, como se puede apreciar de manera cualitativa, la CsA disminuyó el desarrollo del hinchamiento provocado por la azida, en aproximadamente un 65%.

Potencial de membrana mitocondrial

En la Tabla I se puede observar que, la sola adición de Ca^{2+} al medio no afecta el potencial de membrana (153 ± 2 mV), respecto del potencial de las mitocondrias control (150 ± 4 mV). El empleo de azida disminuye el potencial de membrana en cualquiera de las condiciones ensayadas en aproximadamente un 63%. Nótese que en presencia (sin RR, 58 ± 6 mV) o en ausencia (con RR, 58 ± 6 mV) del ciclo de Ca^{2+} , tal disminución ocurre, lo cual implica que se presenta un fenómeno que no requiere que la mitocondria se cargue de Ca^{2+} . Esto se reafirma por la disminución del potencial que se obser-

Tabla I. Potencial de membrana de mitocondrias sometidas a anoxia con azida, en presencia de diferentes efectores. Las mitocondrias fueron incubadas como se describe en la sección de material y métodos; sin adiciones, Ca^{2+} /EGTA 1.3 µM, NaN_3 20 mM (pH 7.4), RR 1 µM, CsA 1 µg/mg prot., CCCP 2 µM, Antimicina A 20 µM; en donde se indica. El potencial de membrana se midió después de 10 min de incubación. El volumen de la matriz mitocondrial utilizado para calcular el potencial de membrana se asumió que era de 1 µl/mg de proteína.

Adiciones	Potencial de membrana en mV
Nada	150 ±4
Ca^{2+}	153 ±2
Azida	62 ±6
Azida+ Ca^{2+}	58 ±6
Azida+ Ca^{2+} +RR	58 ±6
Azida+ Ca^{2+} +CsA	48 ±5
Azida+ Ca^{2+} +RR+CsA	52 ±4
CCCP+Antimicina A	41 ±6

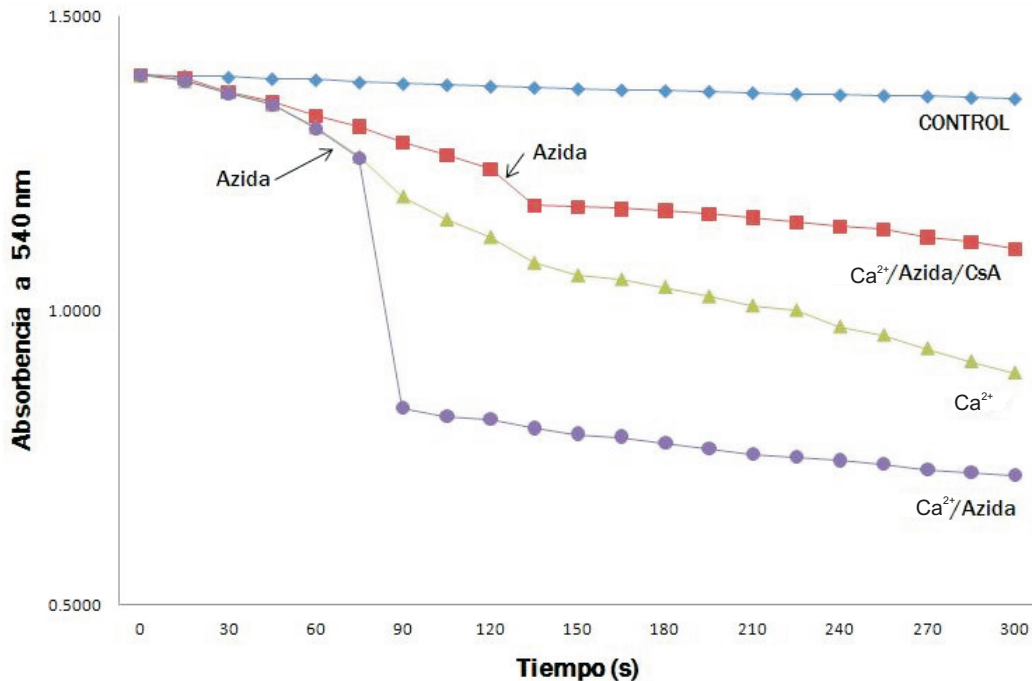


Figura 1. Disminución de la absorbancia de suspensiones mitocondriales (hinchamiento mitocondrial) en presencia de diferentes efectores. Las mitocondrias fueron incubadas como se describe en la sección de material y métodos, sin adiciones (♦), Ca^{2+} 1.3 μM (▲), Ca^{2+} + NaN_3 20 mM (●) o Ca^{2+} + NaN_3 + CsA 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot. (■).

va en presencia de azida (62 ± 6 mV), pero en ausencia de Ca^{2+} . Además, en ausencia (52 ± 4 mV) o presencia (48 ± 5 mV) del ciclo de Ca^{2+} , la CsA no tiene efecto sobre el potencial de membrana. El control positivo (CCCPC + antimicina A), produce la despolarización esperada (41 ± 6 mV).

Ca^{2+} libre intramitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$)

La adición de azida a mitocondrias cargadas de Ca^{2+} , causó una disminución de aproximadamente el 25% del $[\text{Ca}^{2+}]_m$ dentro de los primeros 10 min (Fig. 2). Cuando este tratamiento se repitió en presencia de CsA, la concentración del $[\text{Ca}^{2+}]_m$ se incrementó substancialmente. Debido a que el Ca^{2+} debe acumularse en el espacio de la matriz para que ocurra la transición de la membrana, se adicionó RR (inhibidor del uniporter de Ca^{2+}) simultáneamente con la azida para evitar dicha acumulación. La adición de RR provocó una disminución del 50% en el valor del $[\text{Ca}^{2+}]_m$

dentro de los primeros 10 min, presumiblemente por la inhibición del ingreso de Ca^{2+} . En presencia del RR, la CsA no tuvo efecto. Nuestros datos muestran que la azida induce la apertura del PTPM, provocando disminución del $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en mitocondrias cargadas con Ca^{2+} , lo cual se previene si se adiciona CsA.

Discusión

La necrosis celular involucra disfunción de los complejos de la cadena respiratoria, pérdida del potencial de membrana y transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, mientras que la apoptosis es precipitada por permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la consecuente liberación de factores apoptogénicos tales como el citocromo c. La azida induce necrosis en células cancerosas escamosas (SCC131) de rata (Sato *et al.* 2008), apoptosis en células renales del túbulo proximal (Brooks *et al.* 2009), y daño neuronal vía apoptosis y necrosis (Ohyagy *et*

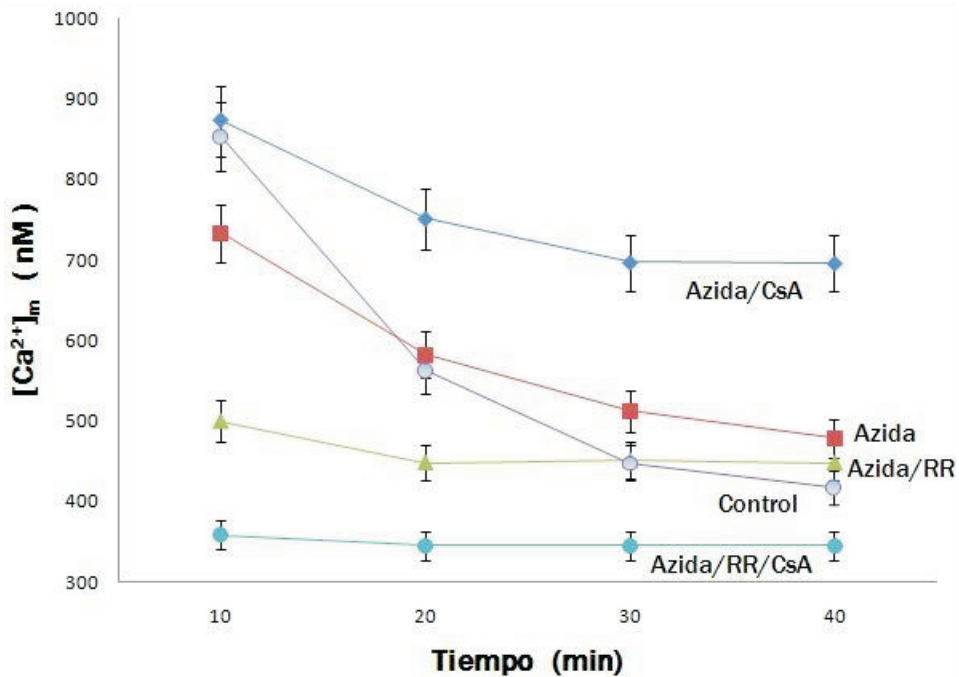


Figura 2. Calcio libre intramitocondrial de mitocondrias cargadas con Ca^{2+} , en presencia de diferentes efectores. Las mitocondrias fueron incubadas como se describe en la sección de material y métodos; sin adiciones (●), NaN_3 20 mM (pH 7.4) (■), NaN_3 + RR 1 μM (▲), NaN_3 + CsA (1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.) (◆) o NaN_3 + RR + CsA (●).

al. 2000, Grammatopoulos *et al.* 2002). Lo anterior implica que la muerte celular debida a la azida es tejido-específica. La muerte celular por necrosis se ha asociado con diversas patologías tales como la isquemia-reperfusión y todas las enfermedades degenerativas, en las cuales se presentan altos niveles de calcio extracelular y mitocondrial, estrés oxidante y disfunción mitocondrial.

El $[\text{Ca}^{2+}]_m$ de mitocondrias cargadas con Ca^{2+} se ve disminuido al incubarlas con azida, de una manera sensible a CsA. La baja ocurre en presencia de hinchamiento y despolarización de la membrana. No obstante que la CsA evita el decremento del $[\text{Ca}^{2+}]_m$ y el hinchamiento, no afectó el potencial de membrana. Los datos del presente estudio son consistentes con la propuesta de que la apertura del PTPM requiere Ca^{2+} y es influenciada por el pH de la matriz, y que el colapso del potencial de membrana es una consecuencia de la apertura del poro (Di Lisa & Bernardi 2006). La transi-

ción de la permeabilidad que ocurre con la azida, parece depender de mecanismos sensibles e insensibles a CsA. Existen dos hipótesis principales, que se han propuesto para explicar la transición de la permeabilidad mitocondrial. Umegaki *et al.* (2008) han sugerido que ambas rutas transmembranales (la del poro proteínico y la de la fase lipídica) se abren durante o después de la transición y que las rutas son interactivas. Por ejemplo, que los productos de reacción (lisofosfolípidos y ácidos grasos) de la fosfolipasa A_2 (PLA_2), contribuyen a la regulación del PTPM y/o que la apertura y cierre del poro altera la actividad de la PLA_2 .

Ya se ha demostrado (Pastorino *et al.* 1993), que se requiere CsA y butacaina (inhibidor de la PLA_2) para prevenir la muerte celular por cianuro (otro inhibidor de la citocromo oxidasa). Nuestros datos sugieren que la azida podría ser usada con mejores resultados para inducir "anoxia química", que los obtenidos

con cianuro. Ya que, la adición de cianuro a mitocondrias respirando de hígado de rata, no induce transición de la permeabilidad (no se muestran los resultados), que se sabe ocurre durante la anoxia. Esta incapacidad del cianuro para inducir transición de la permeabilidad, podría deberse a que *in vitro*, el cianuro bloquea la formación de radicales superóxido y H₂O₂ en el sitio de ubiquinona-citocromo b (Turrens & Boveris 1980). Ya que la peroxidación de lípidos es la principal consecuencia bioquímica del ataque por ROS, medimos la acumulación de malondialdehído (MDA) en mitocondrias tratadas con cianuro o azida (no se muestran resultados). La acumulación de MDA, fue significativamente reducida en mitocondrias tratadas con cianuro en comparación a mitocondrias no tratadas. Por otro lado, el nivel de MDA fue mayor que el control, en las mitocondrias tratadas con azida. Estos resultados podrían explicar, porque la azida sola, disminuye el potencial de membrana en ausencia de la carga de Ca²⁺. En conclusión, la azida puede ser incluida en la lista de agentes que inducen la apertura del PTPM de una forma sensible a CsA, pero es importante tener en mente que, los dos mecanismos propuestos para explicar la transición de la permeabilidad podrían estar traslapados.

Agradecimientos

Se agradece a Aitor Aizpuru, del Instituto de Ecología de la UMAR, por la traducción del resumen al idioma francés. Se agradece a dos árbitros anónimos la revisión y comentarios a una versión previa del manuscrito.

Referencias

- Aronis, A., R. Komarnitsky, S. Shilo & O. Tirosh. 2002. Membrane depolarization of isolated rat liver mitochondria attenuates permeability transition pore opening and oxidant production. *Antioxid. Redox Signal.* 4(4): 647-654.
- Bernardi, P. 1992. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* 267(13): 8834-8839.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Broekemeier, K.M., M.E. Dempsey & D.R. Pfeiffer. 1989. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264(14): 7826-7830.
- Brooks, C., Q. Wei, S-G. Cho & Z. Dong. 2009. Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *J. Clin. Invest.* 119(5): 1275-1285.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal* 341(2): 233-249.
- Crompton, M. 2000. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *Journal of Physiology* 529: 11-21.
- Di Lisa, F. & P. Bernardi. 2006. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovascular Research* 70(2): 191-199.
- Fabiato, A. 1988. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods in Enzymology* 157: 378-417.
- Fricke, U. 1975. Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Analytical Biochemistry* 63(2): 555-558.
- Grammatopoulos, T., K. Morris, P. Ferguson & J. Weyhenmeyer. 2002. Angiotensin protects cortical neurons from hypoxic-induced apoptosis via the angiotensin type 2 receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 99(2): 114-24.
- Gunter, T.E. & D.R. Pfeiffer. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 258: C755-C786.
- Hagai, R. 1984. Membrane potential and surface potential in mitochondria: Uptake and binding of lipophilic cations. *J. Membrane Biol.* 81: 127-138.
- Hagen, T., C.J. Lagace, J.S. Modica-Napolitano & J.R. Aprille. 2003. Permeability transition in rat liver mitochondria is modulated by the ATP-Mg/Pi carrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285: 9274-9281.
- Halestrap, A.P., S.J. Clarke & S.A. Javadov. 2004. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovascular Research* 61: 372-385.
- Luft, J.H. 1971. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anatomical Record* 171(3): 347-368.
- Minta, A., J.P. Kao & R.Y. Tsien. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264(14): 8171-8178.
- Ohyagi, Y., T. Yamada, K. Nishioka, N.J. Clarke, A.J. Tomlinson, S. Naylor, Y. Nakabeppu, J. Kira & S.G.

- Younkin. 2000. Selective increase in cellular Ab42 is related to apoptosis but not necrosis. *Neuroreport* 11: 167-171.
- Pastorino, J.G., J.W. Snyder, A. Serroni, J.B. Hoek & J.L. Farber. 1993. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 268(19): 13791-23798.
- Sasnauskiene, A., J. Kadziauskas, N. Vezelyte, V. Jonusiene & V. Kirveliėne. 2009. Damage targeted to the mitochondrial interior induces autophagy, cell cycle arrest and, only at high doses, apoptosis. *Autophagy* 5(5): 743-744.
- Sato, E., T. Suzuki, N. Hoshi, T. Sugino & H. Hasegawa. 2008. Sodium azide induces necrotic cell death in rat squamous cell carcinoma SCC131. *Med. Mol. Morphol.* 41(4): 211-220.
- Tanveer, A., S. Virji, L. Andreeva, N.F. Totty, J.J. Hsuan, J.M. Ward & M. Crompton. 1996. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca^{2+} and oxidant stress. *Eur. J. Biochem.* 238: 166-172.
- Turrens, J.F. & A. Boveris. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal* 191(2): 421-427.
- Umegaki, T., Y. Okimura, H. Fujita, H. Yano, J. Akiyama, M. Inoue, K. Utsumi & J. Sasaki. 2008. Flow cytometric analysis of ca-induced membrane permeability transition of isolated rat liver mitochondria. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 42: 35-44.
- Uribe, S., S.T. Ohnishi, C. Israelite & T.M. Devlin. 1987. Calcium ionophoretic activity of chemically synthesized oligomeric derivatives of prostaglandin B1. *Biochim. Biophys. Acta* 924(1): 87-98.
- Zoratti, M., I. Szabo & U. De Marchi. 2005. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 40-52.

Recibido: 13 de agosto de 2009.

Aceptado: 7 de diciembre de 2009.