

EDSON ROSA PIMENTEL

Purificação da ATPase mitocondrial de fígado de Bufo paracnemis e estudos sobre o efeito das concentrações de ATP e Mg^{2+} sobre a atividade enzimática

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular).

Orientador : Prof. Dr. Q. S. Tahin

CAMPINAS

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais e irmãos,
pelo apoio e dedicação.

À
Shirlei Maria,
pelo seu apoio e dedicação
nos momentos mais difíceis
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Quivo S. Tahin, orientador desta tese, por me ter iniciado na carreira científica, pela dedicação e amizade, o meu profundo agradecimento.
- Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr. por ter permitido a realização deste trabalho no Departamento de Bioquímica.
- Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelo apoio e compreensão, o que permitiu a conclusão deste trabalho.
- Aos Profs. Drs. Ladáslav Sodek, Hebe M. L. de Souza, Nilce C. Meirelles e Avelino Rodrigues de Oliveira, pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.
- Ao Departamento de Biologia Celular, por me ter facilitado a utilização de equipamentos do laboratório.
- A Prof. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pelas preparações para Microscopia Eletrônica.
- Aos meus amigos Romário de Araújo Mello, Tereza Cristina Samico Cavalcanti, Clara P. B. Tahin, José Osmar Gaspar, Maria Laudénir Priolli e Jorge Luiz Cavalcante Coelho, pelo incentivo constante.
- Aos funcionários do Departamento de Bioquímica em especial às Srtas. Regina Célia Rosseto e Maria das Graças Borba, pela ajuda dispensada durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa, pela concessão de dois anos de Bolsa de Estudo.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela doação de um ultramicrotomo, processo 907/75.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho.

ABRUVIAÇÕES

- ADP - Adenosina difosfato
- A.E. - Atividade específica
- ATP - Adenosina trifosfato
- ATPase - Adenosina trifosfatase
- BSA - Soro albumina bovina
- DEAE - Dietilaminoetil
- EDTA - Ácido etilendiamino tetraacético
- SE - Sacarose-EDTA
- SEA - Sacarose-EDTA-ATP
- SH - Solução de homogeneização
- SN - Sobrenadante
- Tris - Tris (hidroximetil) aminometano
- U.A. - Unidade Absoluta

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Materiais e Métodos	9
2.1. Materiais	9
2.2. Métodos	10
2.2.1. Dosagem de proteínas	10
2.2.2. Dosagem de fosfato inorgânico (Pi)	10
2.2.3. Preparação de mitocôndrias hepáticas de <u>Bufo paracnemis</u>	11
2.2.4. Preparação de partículas submitocondriais .	12
2.2.5. Obtenção e purificação de F ₁	13
2.2.6. Determinação da atividade ATPásica	14
2.2.7. Microscopia eletrônica	15
3. Resultados	16
3.1. Purificação da F ₁ hepática dos anfíbios estudados.	16
3.2. Efeito do pH sobre a atividade hepática mitocon- drial de fígado de <u>A. mexicanum</u> e <u>B. paracnemis</u> ..	20
3.3. Sensibilidade a baixas temperaturas das F ₁ hepá- ticas de 3 espécies de anfíbios	20
3.4. Efeito das concentrações de ATP e Mg ²⁺ sobre a atividade ATPásica mitocondrial de fígado de <u>Bufo</u> <u>paracnemis</u>	25
4. Discussão	34
5. Resumo	40
6. Summary	42
7. Bibliografia	43

1. INTRODUÇÃO

A partícula F_1 ou ATPase mitocondrial [adenosina trifosfatase (E.C.3.6.1.3.)] é um dos componentes do complexo ATPásico-sensível à oligomicina ligado à membrana interna de mitocôndrias. O complexo ATPásico é constituído de quatro componentes funcionais (Pedersen 1975):

a. uma parte superior denominada fator 1 (F_1), o qual é responsável pela atividade catalítica ATPásica.

b. um complexo denominado F_0 , que liga F_1 ao setor de membrana e confere ao complexo ATPásico sensibilidade à oligomicina.

c. um setor de membrana, o qual dirige o fluxo de prótons para F_1 durante a fosforilação oxidativa.

d. um peptídeo que inibe a atividade ATPásica durante a fosforilação oxidativa (Pullman et al., 1963).

Segundo Mitchell (1976), o complexo ATPásico pode ser dissociado em dois componentes principais, um proteico hidrofílico relacionado com F_1 e um lipoproteico hidrofóbico relacionado com F_0 e o setor de membrana.

A origem das subunidades proteicas do complexo ATPásico mitocondrial ainda não está totalmente esclarecida, porém já existem muitas evidências sugerindo que as subunidades do componente F_1 seriam sintetizadas a nível dos ribossomos citoplasmáticos enquanto que as quatro subunidades hidrofóbicas do setor de membrana, seriam sintetizados ao nível de ribossomos mitocondriais (Gizagoloff et al., 1973).

O complexo ATPásico mitocondrial está intimamente ligado com o processo de fosforilação oxidativa por mecanismo ainda não totalmente esclarecido.

Os principais modelos para elucidar tais mecanismos são baseados nas seguintes hipóteses (Slater, 1977):

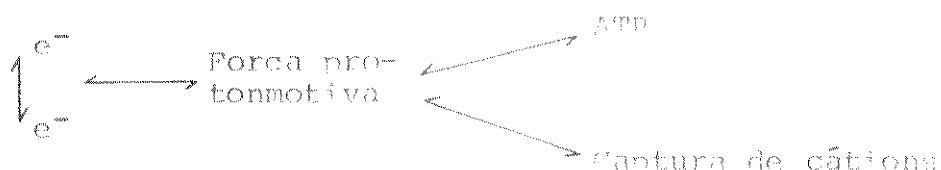
a. Química

A hipótese química prevê a existência de um intermediário químico que tem uma energia livre padrão altamente negativa, obtida do fluxo de elétrons da cadeia respiratória. Este intermediário químico (A ~ C) forneceria a energia necessária para a formação do ATP a partir de ADP e P_i , bem como para captura de cátions.



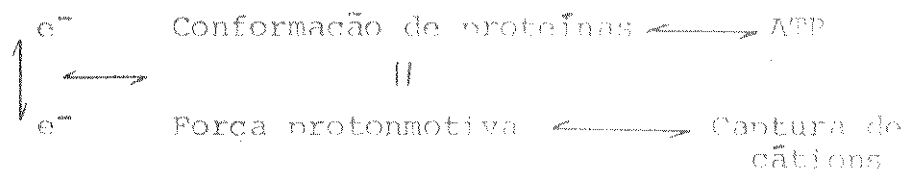
b. Quimiosmótica

Na hipótese quimiosmótica, a síntese de ATP e captura de cátions estão acoplados à cadeia respiratória através da força protonotiva, gerada pelo fluxo de elétrons. A síntese de ATP e captura de cátions não ocorrem simultaneamente, quando a energia do fluxo de elétrons é utilizada para a síntese de ATP, a captura de cátions é bloqueada e vice-versa.



c. Conformacional

Segundo esta hipótese a energia gerada pelo fluxo de elétrons na cadeia respiratória, é conservada na forma de uma mudança conformacional na partícula F_1 . De acordo com esta hipótese, conforme mostrado abaixo, mudança conformacional e gradiente de prótons são fenômenos correspondentes sendo que o primeiro acha-se mecanisticamente associado com a síntese de ATP e o segundo com transporte de cátions.

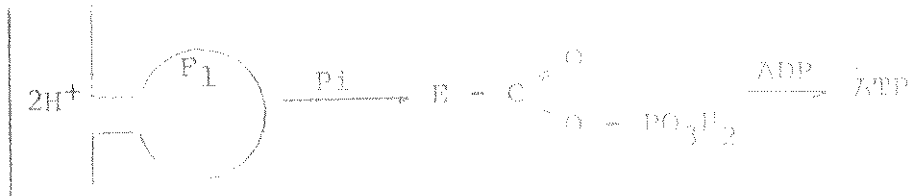


A participação da F_1 nesses mecanismos é fundamental. Senior (1973) descreve as funções da ATPase mitocondrial, como translocadora de síntese e hidrólise

de ATP. Nos esquemas abaixo apresentamos três hipóteses que tentam explicar o papel da ATPase no mecanismo de formação do ATP (Racker, 1977):

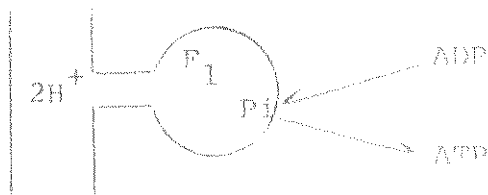
a. Química

Na presença de H_2 , ocorre a formação de um intermediário químico, uma fosfoenzima ($E-C \begin{smallmatrix} O \\ \parallel \\ O - PO_3(OH)_2 \end{smallmatrix}$) que em presença de ADP, catalisaria a síntese de ATP. Como se pode observar no diagrama, a ligação de $H_2PO_3^-$ se dá através dos radicais carboxílicos da enzima.



b. Quimiosmótica

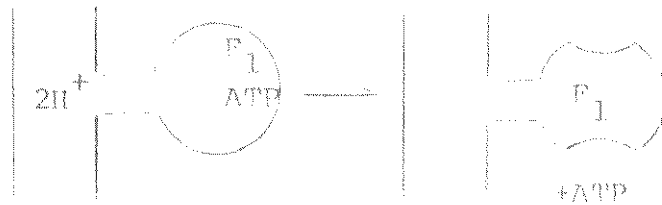
O fosfato se liga ao sítio ativo da partícula F_1 , que sofre imediato ataque das moléculas de ADP. Simultaneamente o fluxo de prótons através da partícula F_1 , permite a formação do ATP, após desidratação dos íons fosfato e ADP.



c. Conformacional

A mudança conformacional na partícula F_1 resultaria de uma mudança no número e na localização de ligações fracas, mantendo a conformação tridimensional da proteína. A energia inerente neste estado energizado é

utilizada na formação de ATP a partir de ADP e Pi, e simultaneamente à formação e liberação do ATP, a partícula F_1 volta à sua conformação original.



Os inibidores clássicos da função ATPásica mitocondrial, como oligomicina ou diciclohexilcarbodiimida, bloqueiam o complexo ATPásico devido a interação com F_0 , porém não atuam sobre a F_1 isolada nem sua atividade ATPásica. A F_0 parece ser realmente a via responsável para conduzir protons, visto que vesículas mitocondriais desprovidas de F_1 apresentam alta condutância para H^+ , que pode ser inibida pela oligomicina (Mitchell, 1976).

A partícula F_1 quando solubilizada, é inativada por baixas temperaturas ($0 - 4^{\circ}C$) e apresenta relativa estabilidade quando deixada à temperatura ambiente (Pullman et al., 1960). Esta labilidade pelo frio tem sido constatada para todas as ATPases mitocondriais até agora estudadas. Kobayashi and Anraku (1972) observaram que a ATPase de membrana de Escherichia coli, quando solubilizada, perdia 50% de sua atividade após 5 horas de permanência a $4^{\circ}C$.

Estudo sobre o efeito do pH na atividade enzimática da partícula F_1 , tem mostrado que o pH ótimo das várias ATPases estudadas está entre 8,0 e 9,5 (Pullman et al., 1960; Fonyo et al., 1966; Lambeth and Lardy, 1971; Kobayashi and Anraku, 1972).

A atividade enzimática da ATPase mitocondrial tem se mostrado bastante sensível à presença de íons. Particularmente para o Mg^{2+} a F_1 apresenta uma grande dependência, por formar o complexo ATP-Mg que é o verdadeiro substrato da enzima (Pullman et al., 1960; Kobayashi and Anraku, 1972). Outros cátions divalentes também podem estimular a enzima, como Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} (Pullman et al., 1960). Determinados ânions podem afetar a atividade da F_1 , como HCO_3^- , maleato, cloreto, acetato, que causam nesta ordem uma redução da atividade enzimática (Lambeth and Lardy, 1971). O K^+ é um cátion que apresenta um efeito estimulador sobre atividade ATPásica como foi demonstrado para F_1 de coração de boi, especialmente quando o nível de ADP é extremamente baixo, indicando ainda que diferentes concentrações de K^+ alteram o valor de V_{max} , mas não o de K_m para ATP dessa enzima (Tuena de Gómez-Puyou and Gómez-Puyou, 1977).

O estudo da atividade enzimática da F_1 depende muito do aperfeiçoamento dos métodos de purificação da F_1 de várias origens. No caso de ATPase mitocondrial de coração de boi, as técnicas de purificação basearam-se em precipitação isoelétrica, fracionamento com sulfato de protamina e aquecimento (Pullman et al., 1960; Knowles and Penefsky, 1972); solubilização com clorofórmio (Beechey et al., 1975); fracionamento com sulfato de amônia, cromatografia de troca iônica e aquecimento (Senior and Brooks, 1970) e por adsorção à resina de sepharose ligada covalentemente ao hexilamônia, após solubilização da F_1

por sonicação (Tuena de Gómez-Puyou and Gómez-Puyou, 1977). ATPase mitocondrial de fígado de rato foi purificada com sulfato de protamina e cromatografia em DEAE-Sephadex A-25, após solubilização da enzima por sonicação (Lambeth and Lardy, 1971).

Em bactérias a enzima tem sido purificada a través de cromatografia de afinidade (Gulla et al., 1976); cromatografia de coluna de DEAE-celulose com posterior fracionamento em sulfato de amônia e cromatografia em coluna de DEAE - sephadex (Hanson and Kennedy, 1973); cromatografia em coluna de agarose e DEAE-celulose (Schnebli and Abrams, 1970).

Embora as mitocôndrias de anfíbios pudessem ser um modelo promissor para estudos bioquímicos sobre as funções mitocondriais e mesmo sobre mitocôndriogênese, devido à grande alteração que sofrem durante a metamorfose, essas organelas tem sido muito pouco estudadas. Um dos grandes problemas metodológicos que envolvem a utilização das mitocôndrias de anfíbios é a dificuldade de se obter mitocôndrias isentas da grande quantidade de pigmentos que acompanha a purificação dessas organelas.

Estudos preliminares indicaram ser possível a obtenção de F_1 hepática de anfíbios (Pimentel et al., 1977). Assim, nesta tese descrevemos um método de purificação de F_1 hepática de Bufo paracnemis (A. Lutz, 1935) e estudamos o efeito do pH, a labilidade ao frio dessa enzima, particularmente, estudamos o efeito da variação das concentrações de ATP e Mg^{2+} sobre a atividade enzimática, bem co

mo determinamos os valores de K_m aparente e V_{max} para ATP e Mg^{2+} em diferentes proporções ATP/ Mg dessa enzima e investigamos a melhor proporção entre as concentrações de ATP e Mg^{2+} necessária para a atividade enzimática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os reagentes utilizados foram da seguinte procedência:

- ATP (sal dissódico - Sigma)
- Coomassie Brilliant Blue (Sigma)
- Tris (hidroximetil) aminometano (Sigma)
- AH-sepharose-4B (Pharmacia)
- Albumina de soro bovino (BSA) (Sigma)

Os demais reagentes usados foram de grau analítico. As **centrifugações** foram efetuadas em centrífuga Sorvall RC-2B refrigerada; as ultracentrifugações foram efetuadas na ultracentrífuga Beckman L-75; os rompimentos de mitocôndrias por ultrassom foram efetuados no Sonifier Cell Disruptor - Mod. W 185 (Heat System Ultrasonics, Inc.).

Os anfíbios utilizados neste trabalho foram das seguintes procedências: Bufo paracnemis coletados no município de Itapira (S.P.); Rana montesumae, Ambistoma mexicanum e Ambistoma tigrinum velasci, coletados na cidade de Xoximilco - México. Todos animais usados eram adultos.

2.2. Métodos

2.2.1. Dosagem de proteínas

As determinações das concentrações de proteínas em diferentes soluções, foram realizadas segundo método descrito por Lowry et al. (1951), utilizando-se BSA como padrão.

No caso de existir sulfato de amônia na amostra, a dosagem foi feita pelo método de Warburg-Christian (1941), em que a concentração de proteínas em $\mu\text{g/ml}$ foi determinada pela diferença entre as leituras em dois comprimentos de onda conforme especificado pela fórmula:

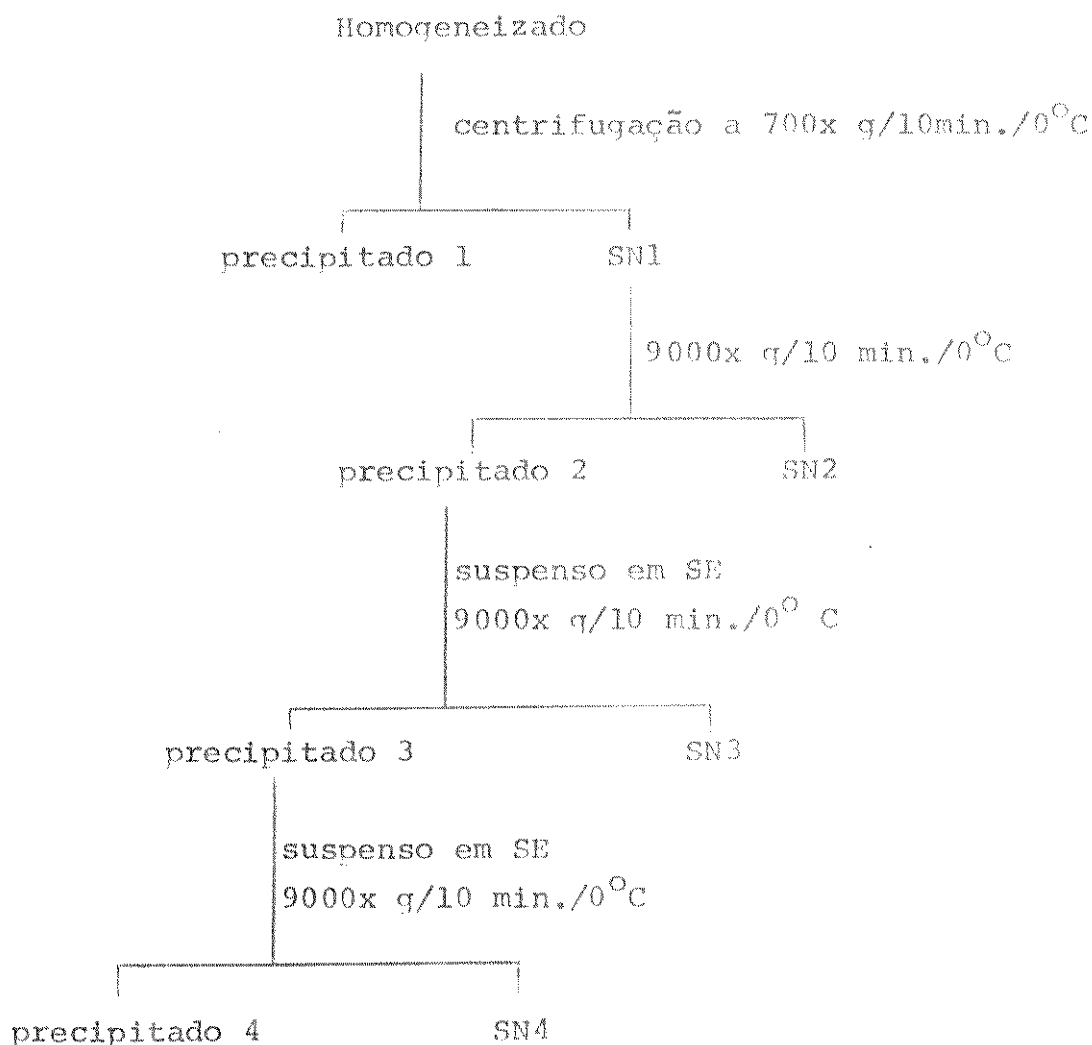
$$1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}$$

2.2.2. Dosagem de fosfato inorgânico (Pi)

As determinações de concentração de Pi foram realizadas segundo o método de Sumner (1944) com pequenas modificações. A coloração foi obtida misturando-se 1,0 ml de molibdato de amônio 6,6% em H_2SO_4 7,5N + H_2O bidestilada em quantidade necessária para completar o volume final de 5 ml + 0,4 ml da amostra a ser dosada ou do padrão, e por último a adição de 0,4 ml de FeSO_4 10% (adicionando-se algumas gotas de H_2SO_4 concentrado o suficiente para manter uma coloração azul claro). A reação corada se desenvolve em 3 minutos, e a intensidade de coloração é medida em comprimento de onda 660 nm. As leituras espectrofotométricas devem ser feitas o mais rápido possível, devido à tendência de aumentar a intensidade de coloração, com o decorrer do tempo.

2.2.3. Preparação de mitocôndrias hepáticas de Bufo paracnemis

Os fígados de B. paracnemis, obtidos após desmedulação do animal, foram imediatamente colocados em solução gelada NaCl 0,9% pH 7,0 com Tris e várias vezes picados e lavados com a mesma solução até clarificar o sobrenadante. Após esse processo os fragmentos de fígado foram suspensos em solução gelada de homogeneização (SH) (sacarose 0,25M - EDTA 1mM - BSA 0,1%, pH 7,4 com Tris), na proporção de 3 ml de SH/g de fígado, e transferidos para o homogeneizador tipo Potter com pistilo de teflon, e homogeneizado brandamente. Todas as etapas citadas foram efetuadas à temperatura de 0 - 4°C. Após homogeneização, a suspensão foi submetida a uma centrifugação a 700x g/10 min./0°C, sendo que o precipitado¹ foi descartado e o sobrenadante 1 (SN 1) foi submetido a uma centrifugação a 9000x g/10 min./0°C, para se coletar o precipitado 2 contendo mitocôndrias. O SN2 foi descartado. Com a finalidade de diminuir a quantidade de pigmentos, o precipitado 2 mitocondrial foi suspenso em solução de sacarose 0,15M - EDTA 2mM (SE). Essa suspensão foi submetida a uma centrifugação a 9000x g/10 min./0°C. Dessa forma obtínhamos o precipitado 3 e o SN3 que foi descartado. O precipitado 3 foi mais uma vez suspenso com SE e a suspensão obtida submetida a uma centrifugação a 9000x g/10 min./0°C, após o que obtínhamos o precipitado 4 que era utilizado como mitocôndrias isoladas e parcialmente purificada. O processo acima descrito está resumido no esquema abaixo:



2.2.4. Preparação de partículas submitocondriais

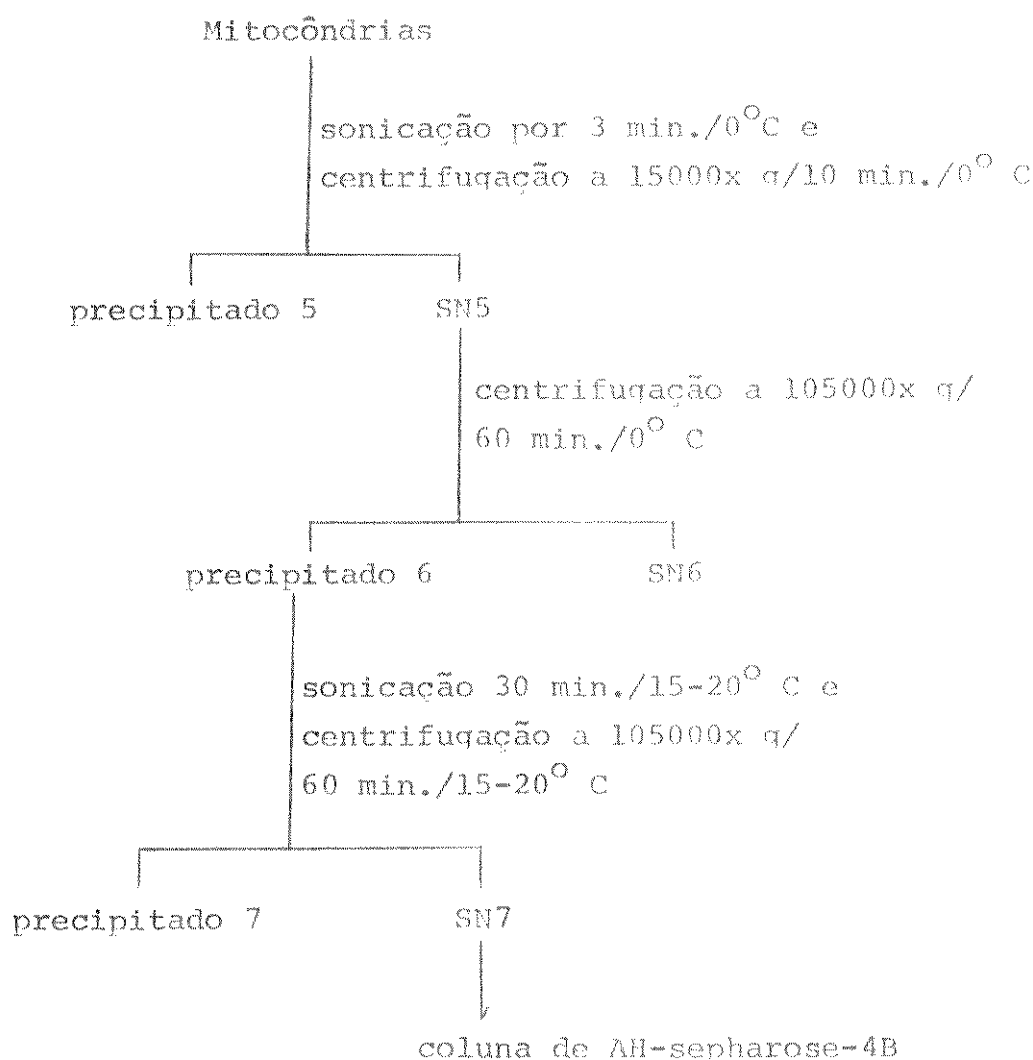
As mitocôndrias purificadas segundo método descrito anteriormente foram suspensas em solução de sacarose 0,15M - EDTA 2mM - ATP 2mM, pH 7,4 com Tris (SEA), e rompidas em partículas submitocondriais por sonicação durante 3 minutos, em etapas de 1 minuto com intervalos de 30 segundos entre cada etapa, mantendo-se a temperatura 0 - 4°C. A suspensão obtida era submetida a uma centrifugação de 15000x g/10 min./0°C, e o precipitado 5 obtido, que continha mitocôndrias não rompidas, restos de membranas, etc., foi descartado. O SN5 foi então submetido a uma ul-

tracentrifugação a 105000x g/60 min./0°C. O precipitado obtido continha as partículas submitocondriais que foram coletadas e suspensas em SEA, e mantidas entre 0 - 4°C quando usadas imediatamente ou a -15°C quando estocadas até 30 dias (ver esquema abaixo).

2.2.5. Obtenção e purificação da F₁

O método de obtenção e purificação de F₁ utilizado neste trabalho foi baseado no descrito por Tuen de Gómez-Puyou and Gómez-Puyou (1977). O precipitado 6 de partículas submitocondriais suspenso em SEA foi submetido a uma sonicação, à temperatura de 18 a 25°C, durante 30 minutos, em etapas de 10 minutos com intervalo de 1 minuto entre cada etapa. A fração insolúvel (precipitado 7) foi descartada após uma ultracentrifugação a 105000x g/60 min./15 a 20°C. O SN7 foi considerado como solução im_pura de F₁ e determinava-se atividade específica ATPásica dessa solução. Em seguida iniciava-se um processo de purificação através da cromatografia de afinidade em coluna de 10 cm x 1 cm, de AH-sepharose-4B, previamente equilibra_da com SEA, aplicando-se 3 a 5 ml de solução de F₁ contendo aproximadamente 100 - 400 mg de proteínas e 400 a 5 mil unidades absolutas de atividade ATPásica. Após a total introdução da solução de F₁ na coluna, iniciava-se uma eluição com 40 ml de SEA que elimina a maior parte das prote_inas contaminantes. A F₁ foi eluída da coluna de cromatografia com SEA-KCl 1M, coletando-se os eluatos de 3 em 3 ml. Para cada fração da cromatografia obtida, determinava-se a atividade específica da ATPase (ver esquema abaixo).

ESQUEMA DA PURIFICAÇÃO DA F_1 HEPÁTICA DE B. PARACNEMIS



A solução de F_1 purificada, eluída da colu
na, foi mantida à temperatura ambiente se usada imediata-
mente, ou então precipitava-se a enzima em solução de sul-
fato de amônio 2M pH 7,4 com Tris, e armazenada a 0-4°C.

F_1 de outras origens utilizadas nesta tese
foram obtidas pelo método análogo ao descrito para a de B.
paracnemis.

2.2.6. Determinação da atividade ATPásica

A atividade ATPásica foi ensaiada pela in-
cubação de uma alíquota da solução a ser determinada, com

ATP 5,5mM, $MgCl_2$ 4,0mM e Tris-HCl 0,1M pH 8,5 (concentrações finais) em um volume final de 1,0 ml, durante 10 minutos, a 37° C. A reação enzimática era encerrada com TCA em concentração final 5%, após o que foi realizada uma centrifugação a 13000x g/2 min., sendo o precipitado descartado e uma alíquota do sobrenadante foi usada para determinar a quantidade de Pi liberado na reação. Quando se variavam as concentrações do ATP e/ou $MgCl_2$, as concentrações finais desses compostos eram indicadas no experimento.

Uma unidade absoluta de velocidade da reação enzimática (U.A.) é aqui expressa como o número de μ moles de Pi liberado durante 1 minuto de reação a 37°C.

Uma unidade de atividade específica (A.E.) é aqui expressa como o número de U.A. por mg de proteína da solução estudada.

2.2.7. Microscopia eletrônica

O material observado e fotografado ao microscópio eletrônico foi preparado pela Prof. Dra. M. A. Heide Dolder. A fixação do material foi em glutaraldeído e tetróxido de ósmio, e os cortes corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. O microscópio eletrônico utilizado foi Zeiss Modelo 9-S.

3. RESULTADOS

3.1. Purificação da F₁ hepática dos anfíbios estudados

As F₁ hepática de B. paracnemis, bem como as de Rana montesumae, Ambistoma tigrinum velasci e Ambistoma mexicanum foram purificadas através de uma cromatografia de afinidade em coluna de AH-sepharose-4B. Os perfis cromatográficos obtidos mostram que os resultados são bastante reprodutíveis (Figura 1).

Em todos os processos cromatográficos por nós realizados, nas presentes condições, obtivemos a maior atividade específica da enzima na fração 3 eluída da coluna após início da eluição com SEA-KCl 1M. As frações 2 e 4 sempre apresentaram menores atividades específicas. As F₁ hepáticas de Rana montesumae e Bufo paracnemis, obtidos por esse método apresentaram um grau de purificação de 14 a 15 vezes e uma recuperação possível da enzima de 70 a 80% quando se reuniam as frações 2, 3 e 4 da cromatografia (Tabela 1 e 2).

Micrografias eletrônicas de mitocôndrias hepáticas de B. paracnemis preparadas como descrito em Materiais e Métodos (Figura 2) mostram que essas organelas celulares apresentam aspectos semelhantes aos descritos para as de outras origens (Bustamante et al., 1977). Observações ao nível de microscopia eletrônica das partículas submitocondriais de fígado de B. paracnemis, após 10 minutos de sonicação, mostram uma parcial solubilização da F₁ (Figura 3) e após 30 minutos de sonicação, uma quase total solubilização da F₁ (Figura 4).

TABELA 1. Purificação da F_1 de mitocôndrias hepáticas de Rana montesumae.

FASE	[Prot.] (mg/ml)	Atividade ATPásica (1)		% de recupera- ção da enzima	Grau de pu- rificação
		U.A./ml	U.A. totais		
SN 105000x g	180.0	2000	4600	--	1.0
Fração 0 (2)	9.0	18	720	15.6	0.2
Fração 1	1.0	16	48	1.0	1.4
Fração 2	2.2	150	450	9.8	6.1
Fração 3	4.5	700	2100	45.6	14.0
Fração 4	4.2	380	1140	24.8	8.1
Fração 5	1.9	70	36.8	1.7	3.3
Fração 6	1.0	6	6.0	0.4	0.5
Fração 7	0.6	5	15	0.3	0.7

(1) U.A. = amoles de P_i liberado/minuto/ $37^\circ C$; A.E. = U.A./mg de proteína.

(2) A Fração 0 corresponde ao volume de 40 ml de eluato anteriores à eluição das proteínas por SEA-KCl IM, como descrito em Materiais e Métodos. As frações de 1 a 8 correspondem cada uma ao volume de 3 ml de eluato à partir da eluição com SEA-KCl IM.

TABELA 2. Purificação da F_1 de mitocôndrias hepáticas de Bufo paracnemis

FASE	[Prot.] (mg/ml)	Atividade ATPásica (1)		% de recupera- ção da enzima	Grau de pu- rificação
		U.A./ml	U.A.totais		
SN 105000x g	22.2	150.00	375.00	---	1.0
Fração 0 (2)	1.21	1.85	74.20	19.8	0.23
Fração 1	0.16	1.10	3.30	0.9	1.02
Fração 2	0.37	12.77	38.32	10.2	5.14
Fração 3	0.56	55.88	167.64	44.7	14.89
Fração 4	0.44	22.61	67.83	18.1	7.68
Fração 5	0.36	6.24	18.72	5.0	2.53
Fração 6	0.22	0.86	2.59	0.7	0.57
Fração 7	0.02	0.29	0.88	0.5	0.21

(1) U.A. = μ moles de Pi liberado/ minuto /37°C; A.E. = U.A./mg de proteína

(2) A Fração 0 corresponde ao volume de 40 ml de eluato anteriores à eluição das proteínas por SEA-KCl 1M, como descrito em Materiais e Métodos. As frações de 1 a 8 correspondem cada uma ao volume de 3 ml de eluato à partir da eluição com SFA-KCl 1M.

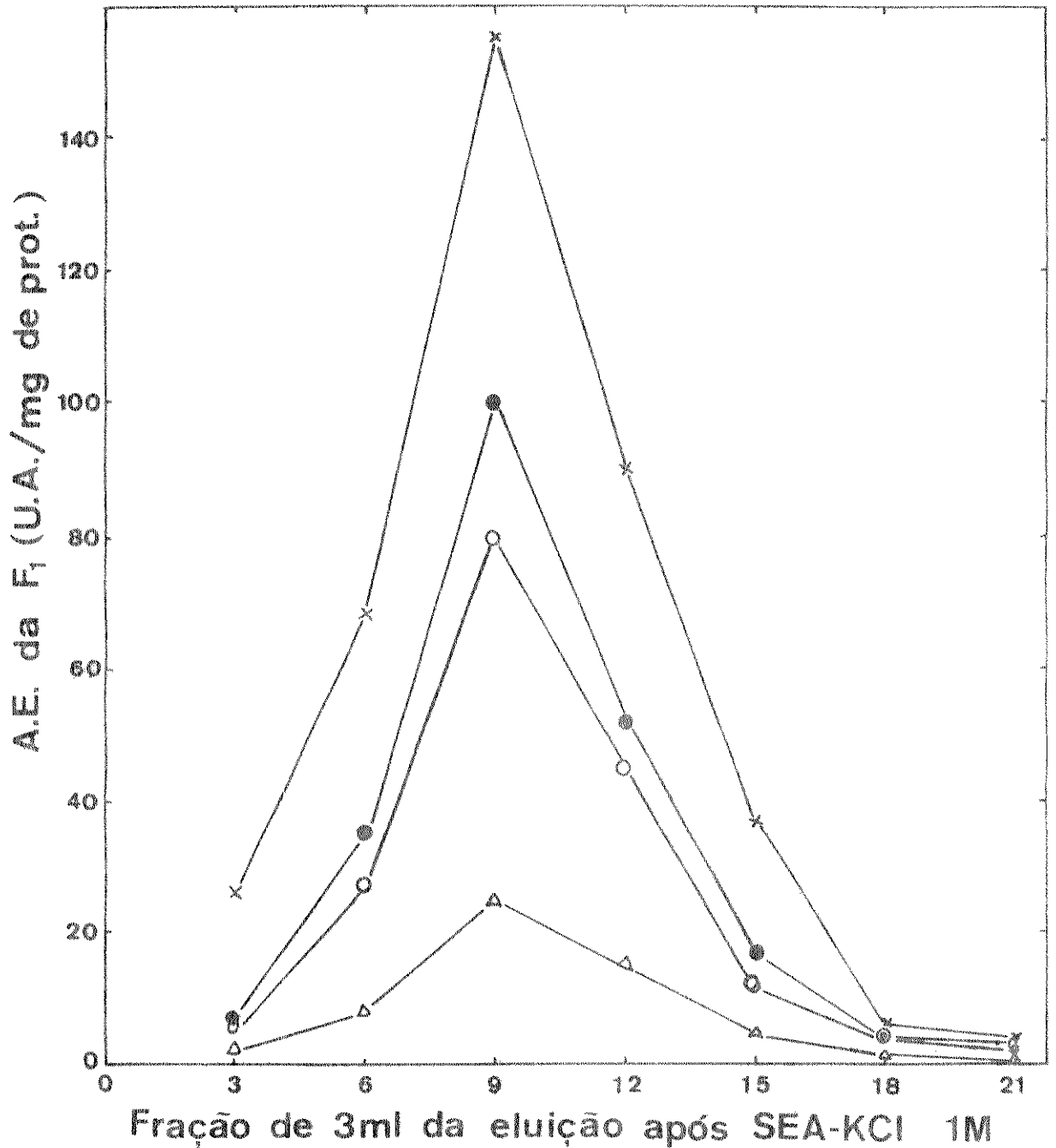


FIGURA 1. Perfil da cromatografia de afinidade em coluna de AM-sepharose-4B, da F₁ hepática de anfíbios, obtidas por sonicação. Detalhes em Materiais e Métodos. (x - x) R. montesumae, (● - ●) B. paracnemis, (o - o) A. tigrinum velas ci e (Δ - Δ) A. mexicanum.
U.A. = μmoles de Pi liberado/minutos/37° C.

3.2. Efeito do pH sobre a atividade ATPásica mitocondrial de A. mexicanum e B. paracnemis.

O pH ótimo da atividade ATPásica da F_1 hepática de A. mexicanum (Fig. 5-A) e o de B. paracnemis (Fig. 5-B) foi sempre acima de 7,6, e praticamente a atividade enzimática se mantém constante até pH 9,0. Idêntico efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática é observado para a atividade ATPásica de mitocôndrias isoladas intactas de fígado de B. paracnemis (Fig. 5-C).

3.3. Sensibilidade a baixas temperaturas das F_1 hepáticas de 3 espécies de anfíbios

A F_1 hepática de anfíbios, de modo análogo como as de outras origens, mostrou ser bastante sensível a temperaturas próximas a 0° C. A atividade enzimática de cresce consideravelmente quando a enzima permanece a temperatura de 4° C, em comparação com a atividade da mesma enzima, quando permanece a 30° C, embora pudéssemos observar também um decréscimo de atividade a 30° C para as F_1 de A. tigrinum velasci e B. paracnemis, mas não para a de R. montesumae (Figura 6). As F_1 das três espécies estudadas, apresentam uma perda de atividade de cerca de 70 a 80% após uma hora de permanência a 4° C. As F_1 utilizadas nestes experimentos, foram purificadas pelo método já descrito, através da cromatografia em AH-sepharose-4B, e após a eluição com SEA-KCl 1M, precipitou-se em sulfato de amônio 2M (concentração final) pH 7,4 a temperatura de $0 - 4^{\circ}$ C. No momento do ensaio, o precipitado coletado por centrifugação era apropriadamente diluído com SE (portanto sem ATP).

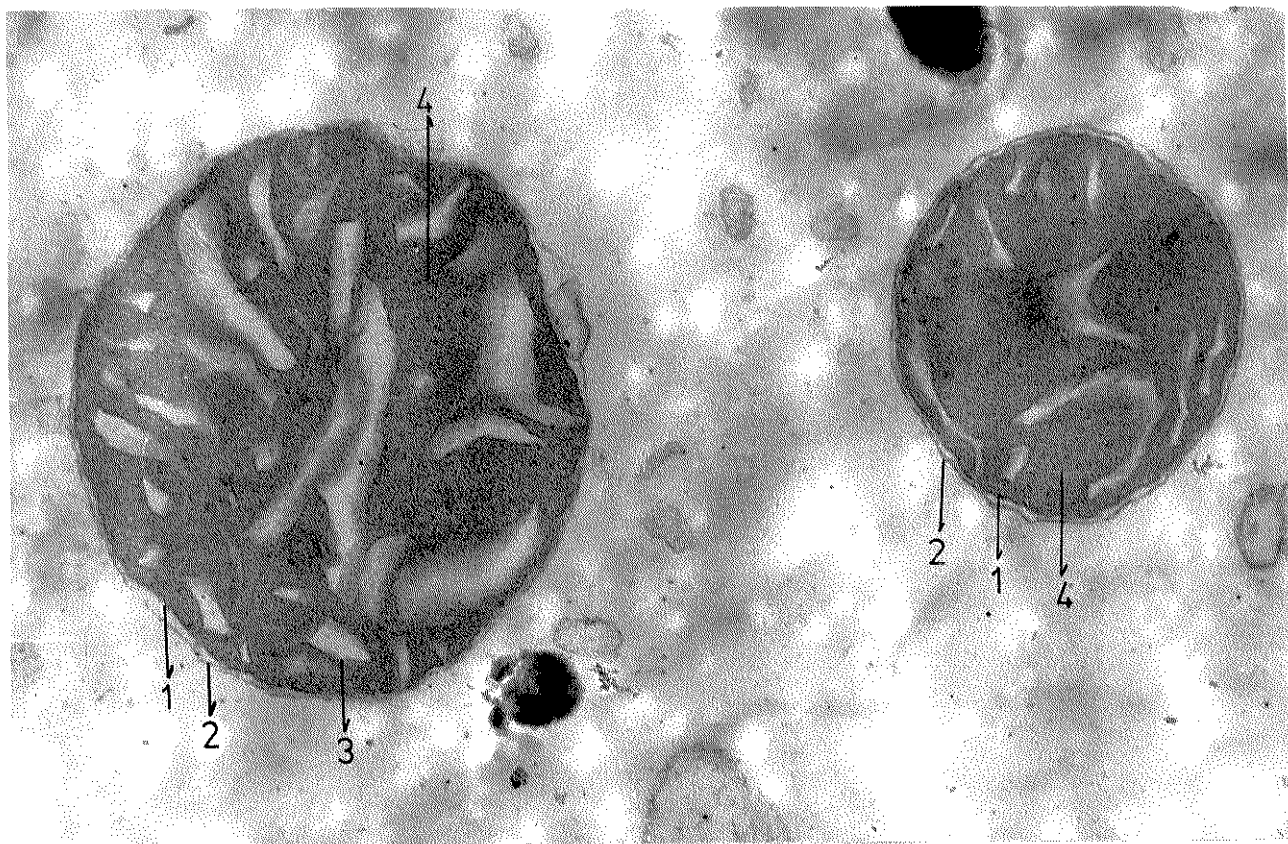


FIGURA 2. Mitocôndrias hepáticas de Bufo paracnemis obtidas por centrifugação diferenciada. São bem visíveis as membranas interna (seta 1) e externa (seta 2), cristas mitocondriais (seta 3) e matriz mitocondrial (seta 4). A fixação foi em glutaraldeído e tetróxido de ósmio. Os cortes foram corados com uranila e chumbo. x 43.000

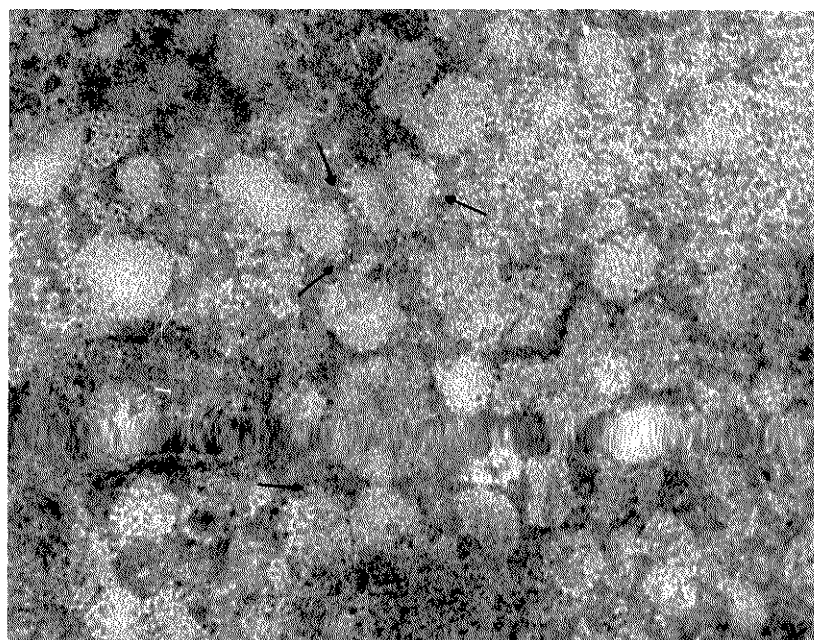
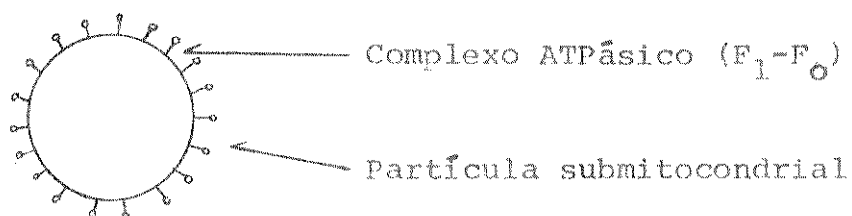


FIGURA 3. Partículas submitocondriais hepáticas de Bufo paracnemis após 10 minutos de sonicação, apresentando ainda complexo ATPásico (seta) associado, como mostrado no esquema abaixo.



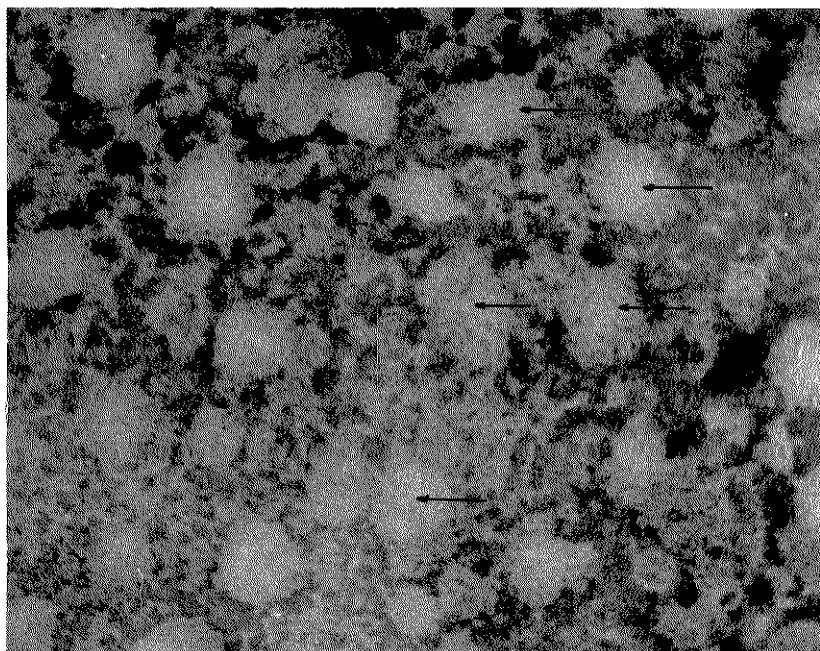
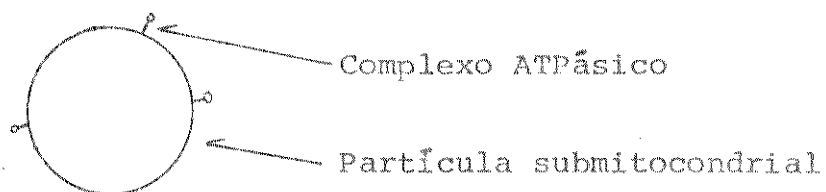


FIGURA 4. Partículas submitocondriais hepáticas de Bufo paracnemis após 30 minutos de sonicação, apresentando raríssimo complexo ATPásico ainda associado à partícula submitocondrial (seta) como mostrado no esquema abaixo. Coloração negativa em ácido fosfotungstico 2%. x 107.000



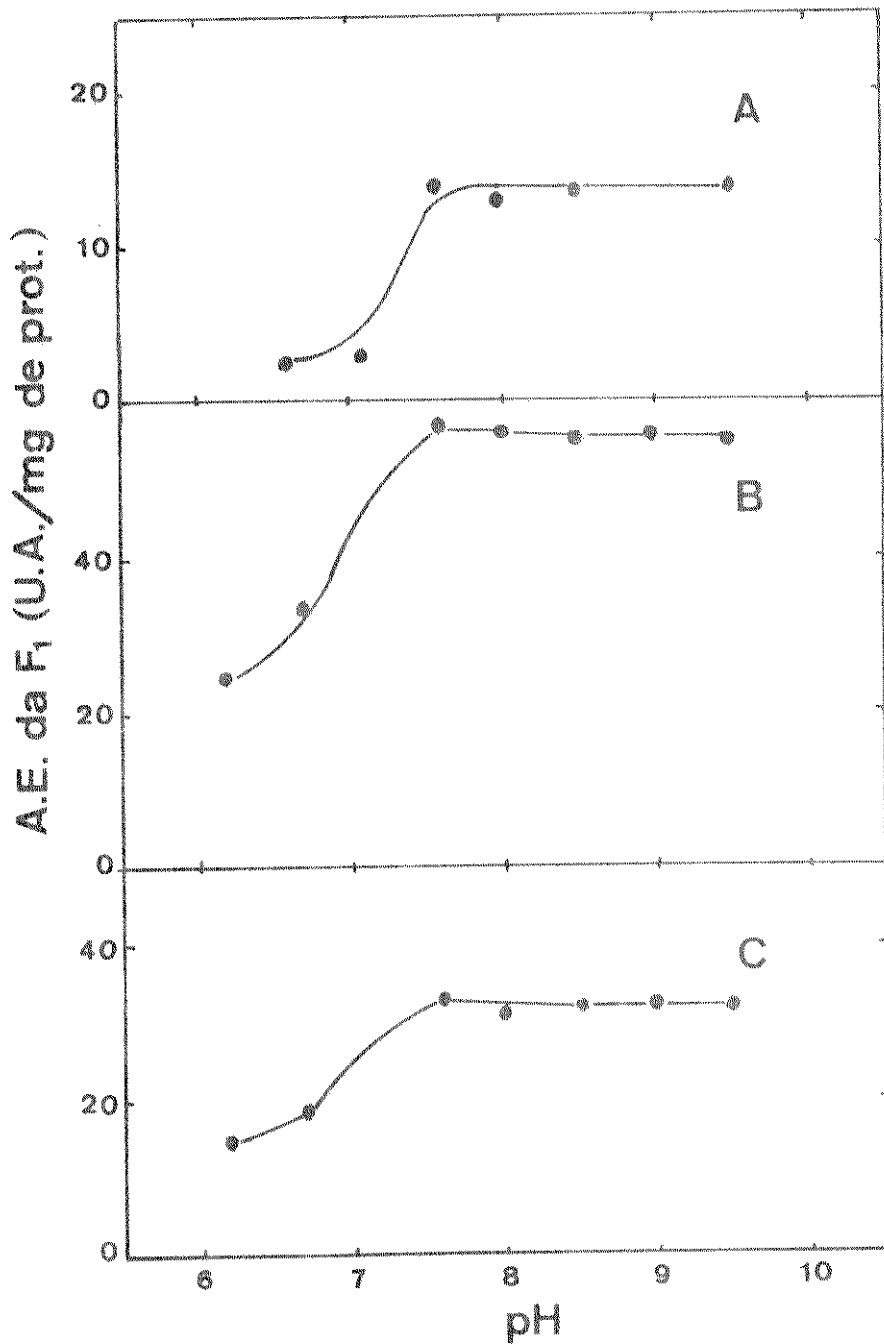


FIGURA 5. Efeito do pH sobre atividade ATPásica da partícula F₁ de A. mexicanum (A); de F₁ de B. paracnemis (B); e de mitocôndrias isoladas intactas de fígado de B. paracnemis (C). Cada ponto representa o valor médio de pelo menos 3 experiências. Detalhes em Materiais e Métodos. U.A. = umoles de Pi liberado/minutos/37° C. Para os pH entre 6,0 a 7,0 o tampão usado foi inidazol 0,1M e para os demais foi Tris-HCl.

3.4. Efeito das concentrações de ATP e Mg^{2+} sobre a atividade ATPásica mitocondrial de fígado de Bufo paracnemis

Estudamos a variação da velocidade da reação enzimática catalizada pela F_1 hepática de B. paracnemis, purificada conforme descrito em Materiais e Métodos, em diferentes condições de relação entre as concentrações de ATP e de Mg^{2+} . Observamos que mantendo-se constante a concentração de Mg^{2+} e variando-se a do ATP, havia um aumento da atividade específica da F_1 de B. paracnemis até a concentração de Mg^{2+} 6mM, concentrações superiores a esta causavam menores valores de atividade específica da enzima, e que o maior valor de A.E. encontrado para a enzima, na presença da concentração constante de Mg^{2+} 0,5 mM, foi com a concentração de ATP 2 mM, acima da qual havia uma inibição; para Mg^{2+} 1mM, o maior valor de A.E. encontrado foi com a concentração de ATP 3 - 4 mM; para Mg^{2+} 2mM, a concentração de ATP foi 5mM; para Mg^{2+} 3mM, a concentração de ATP foi 6mM; para Mg^{2+} 4mM, a concentração de ATP foi 7 - 8mM; para Mg^{2+} 6mM, a concentração de ATP foi 8mM; para Mg^{2+} 10mM, a concentração de ATP \geq 10mM; para Mg^{2+} 20mM, ATP \geq 10mM (Figura 7).

Quando se mantinha constante a concentração de ATP e variava-se a concentração de Mg^{2+} , havia um aumento da atividade específica da F_1 hepática de B. paracnemis até a concentração de ATP 8mM, concentrações superiores a esta causavam menores valores de atividade específica da enzima. O maior valor de A.E. encontrado para

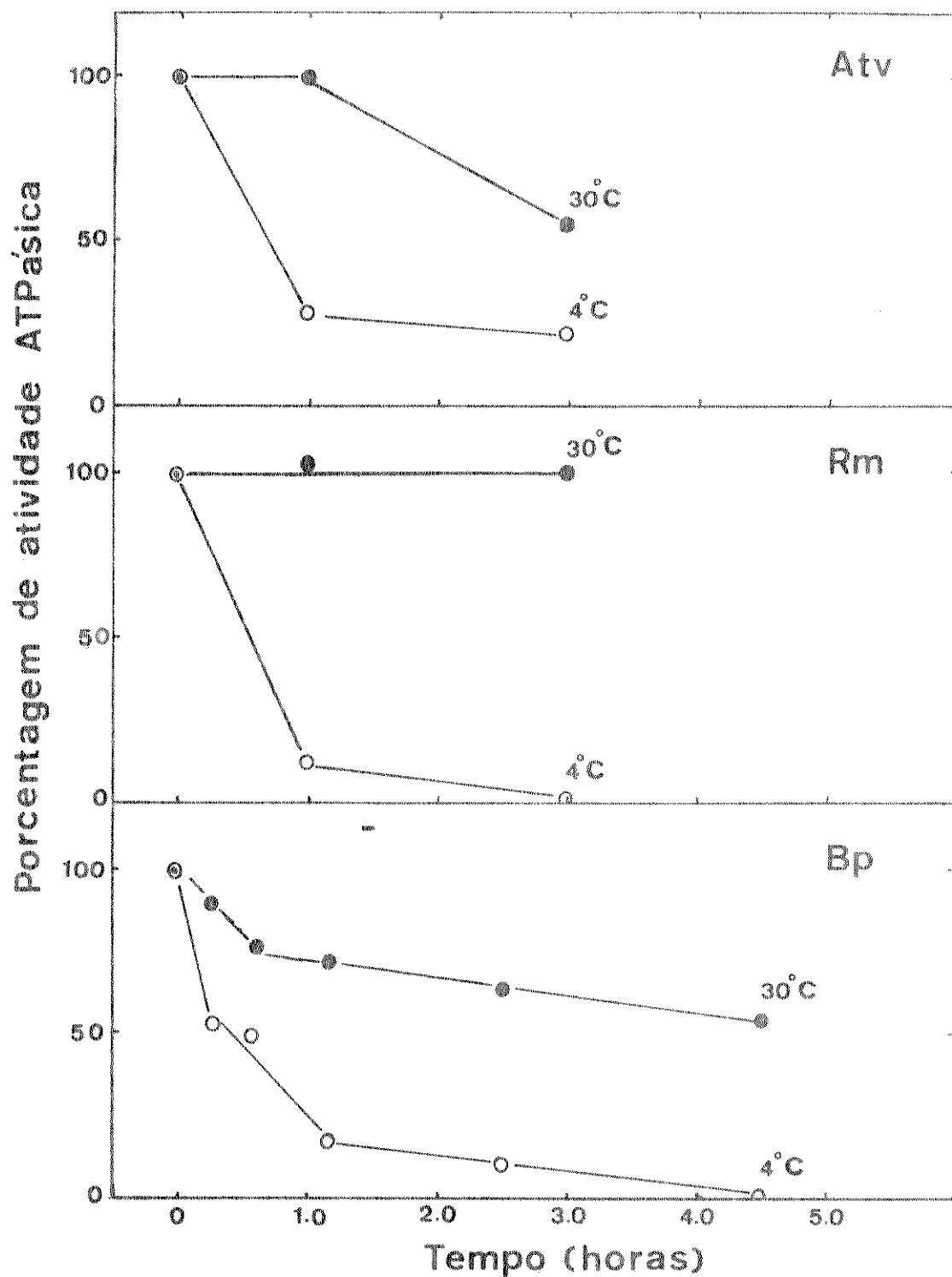


FIGURA 6. Sensibilidade de F_1 hepáticas de anfíbios a 4°C e a 30°C . ATV = *A. tigrinum velasci*; Rm = *R. montesumae*; Bp = *B. paracnemis*. A atividade enzimática considerada 100% corresponde àquela encontrada no tempo zero de permanência em uma dada temperatura. Detalhes em Material e Métodos.

esta enzima na presença da concentração constante de ATP 0,5mM e 1,0mM foi com a concentração de Mg^{2+} 1,0mM e 1,0 a 2,0mM respectivamente; para ATP 2,0mM, o maior valor de A.E. foi com a concentração de Mg^{2+} entre 2,0 a 3,0mM; para concentrações de ATP iguais a 3,0 e 4,0mM, as concentrações de Mg^{2+} variaram entre 4,0 e 6,0mM; para concentrações de ATP iguais ou superiores a 5mM, a concentração de Mg^{2+} foi 6,0mM (Figura 8).

Estudamos a variação da atividade da F_1 hepática de B. paracnemis na presença de variáveis proporções entre concentrações de ATP e Mg^{2+} presentes na relação enzimática. Nesse sentido determinamos que as proporções ATP/Mg iguais a 1 e 2 causam os maiores valores de atividade específica da F_1 em comparação com os encontrados quando as proporções ATP/Mg eram superiores a 2 ou inferiores a 1 (Figura 9 e 10).

Com os dados experimentais obtidos, determinamos os valores de K_m aparente e V_{max} tanto para ATP como para Mg^{2+} da F_1 hepática de B. paracnemis, na presença de variáveis proporções de concentrações de ATP e Mg^{2+} (Figura 11 e Tabela 3)

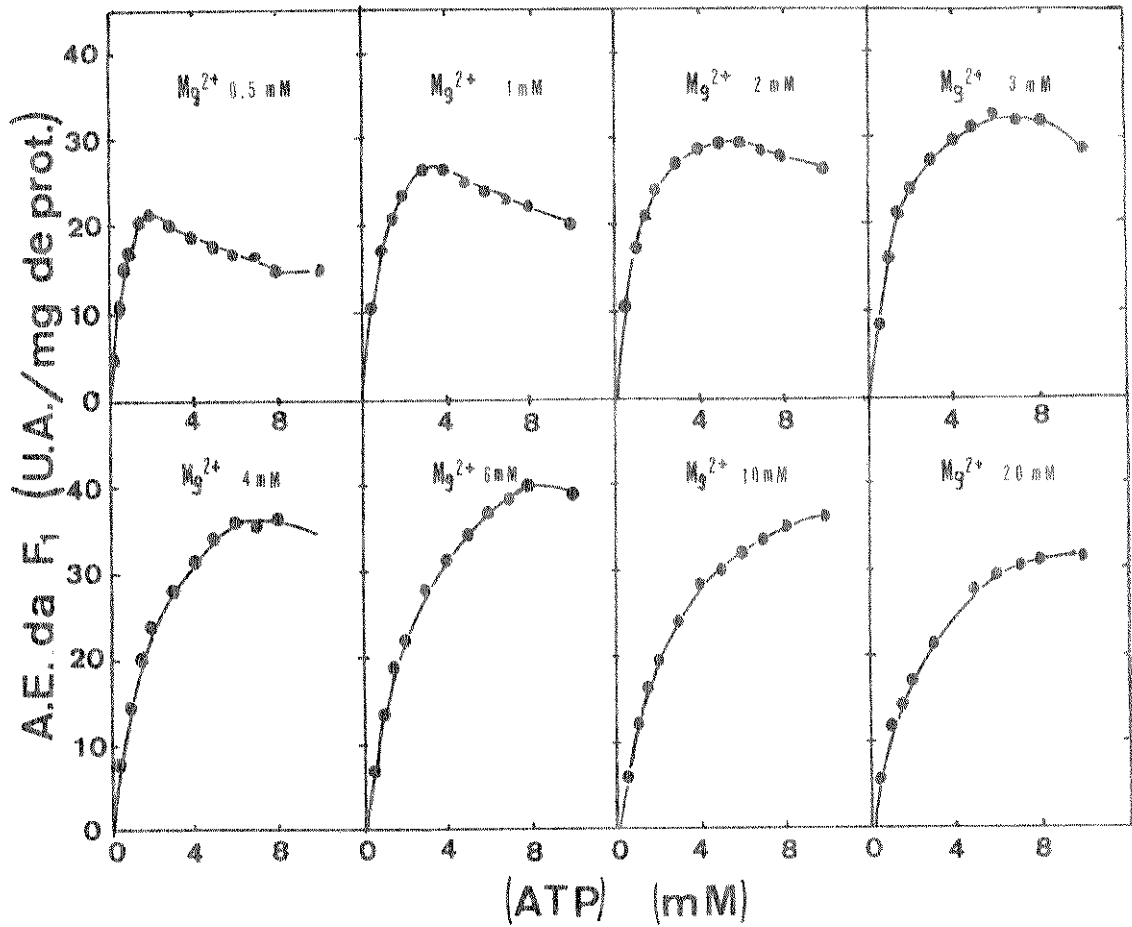


FIGURA 7. Efeito da concentração do ATP sobre a atividade específica da F₁ hepática de *B. paracnemis*, na presença de uma determinada concentração constante de Mg²⁺, indicada em cada caso. U.A. = μ moles de Pi liberado/minuto /37°C. Detalhes em Materiais e Métodos.

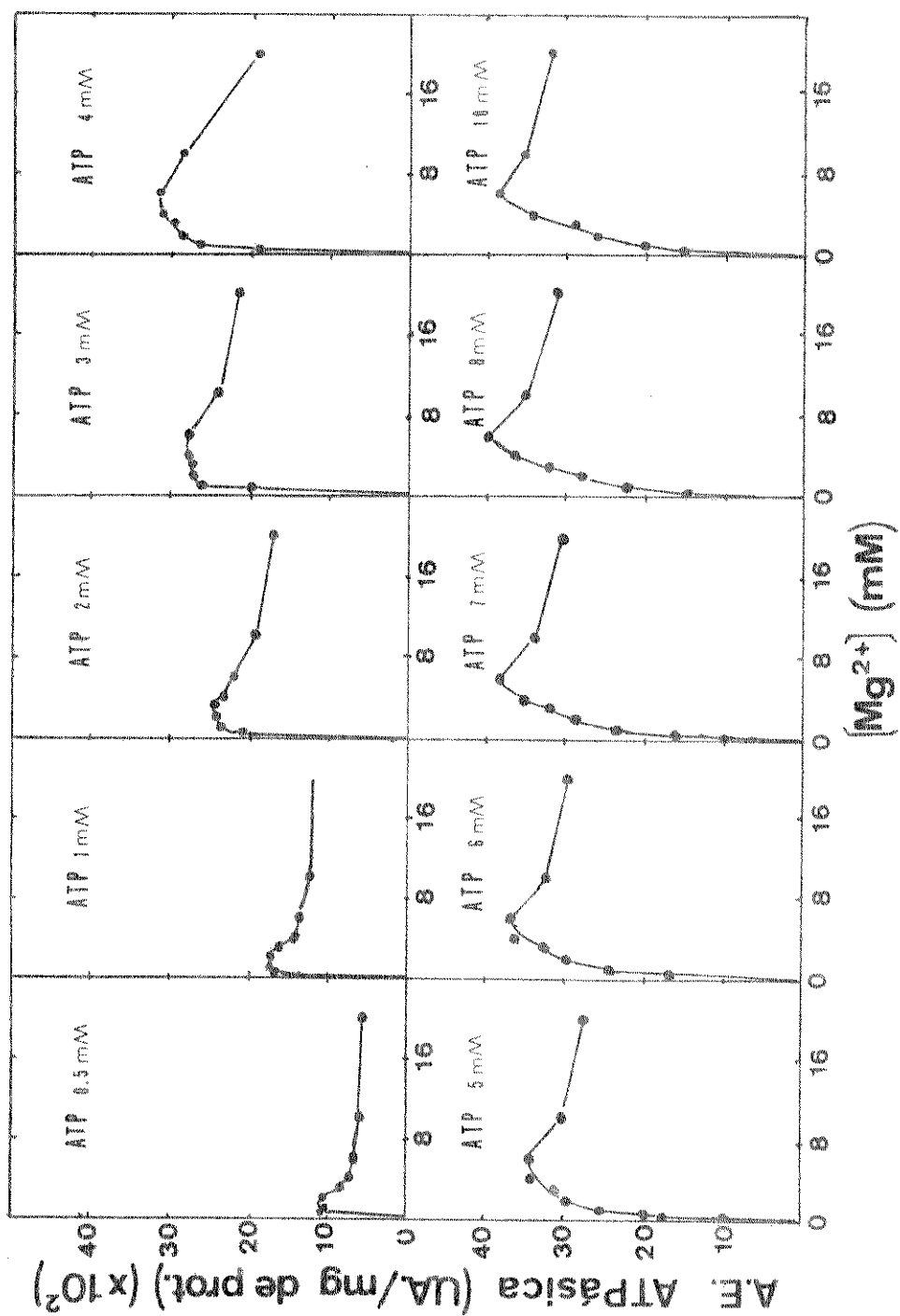


FIGURA 8. Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade específica da Fl. hepática de B. paracnemis na presença de uma determinada concentração constante de ATP, como indicado para cada caso. U.A. = μ moles de Pi liberado/ minuto/ 37°C. Detalhes em Materiais e Métodos.

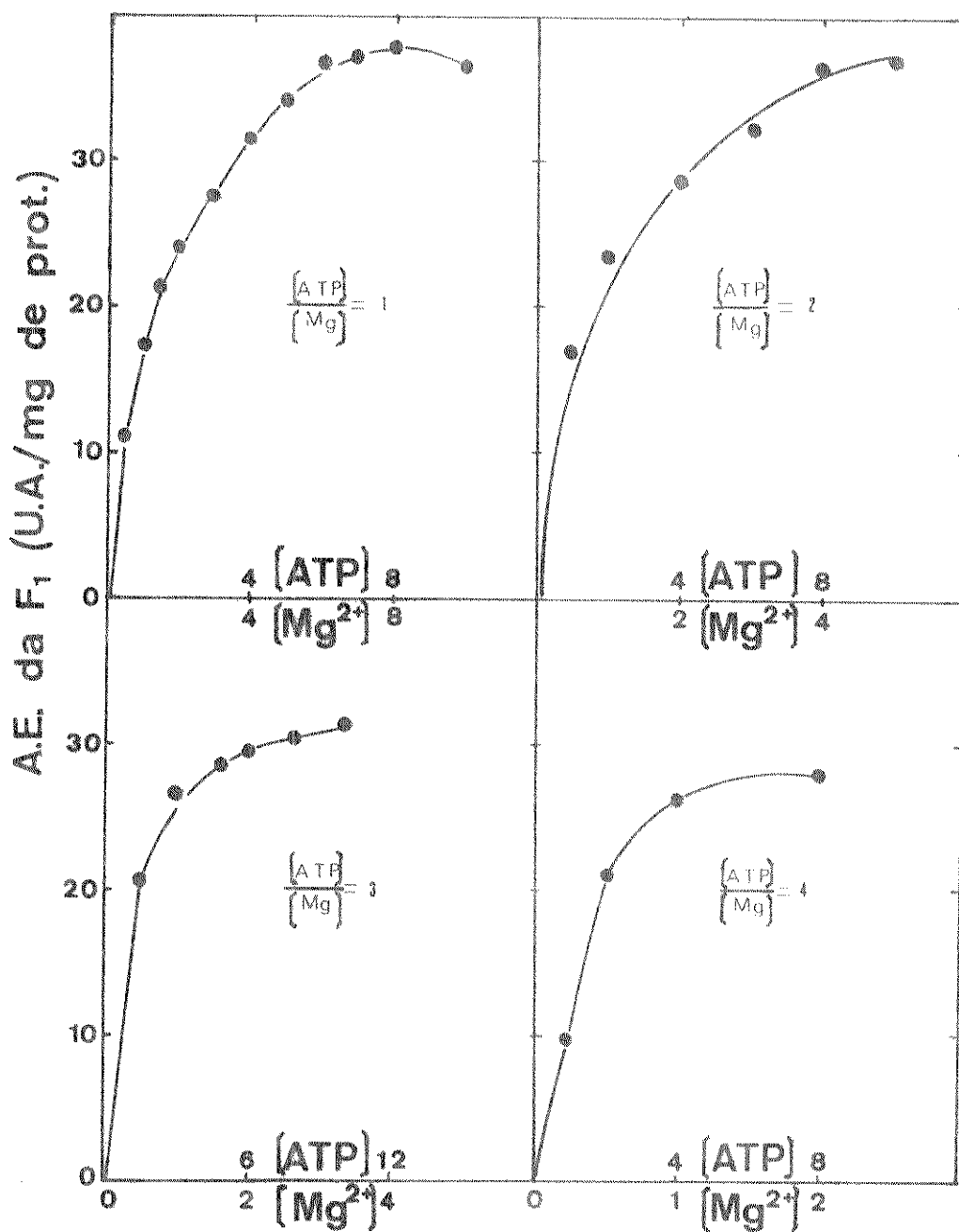


FIGURA 9.. Efeito da concentração de Mg^{2+} e ATP presentes na reação enzimática em variáveis proporções ATP/Mg, como indicado para cada caso, sobre a atividade específica de F_1 hepática de B. paracnemis. As concentrações tanto de ATP como de Mg^{2+} estão expressas em mM. U.A. = μ moles de Pi liberado/1 minuto/37°C. Detalhes em Materiais e Métodos.

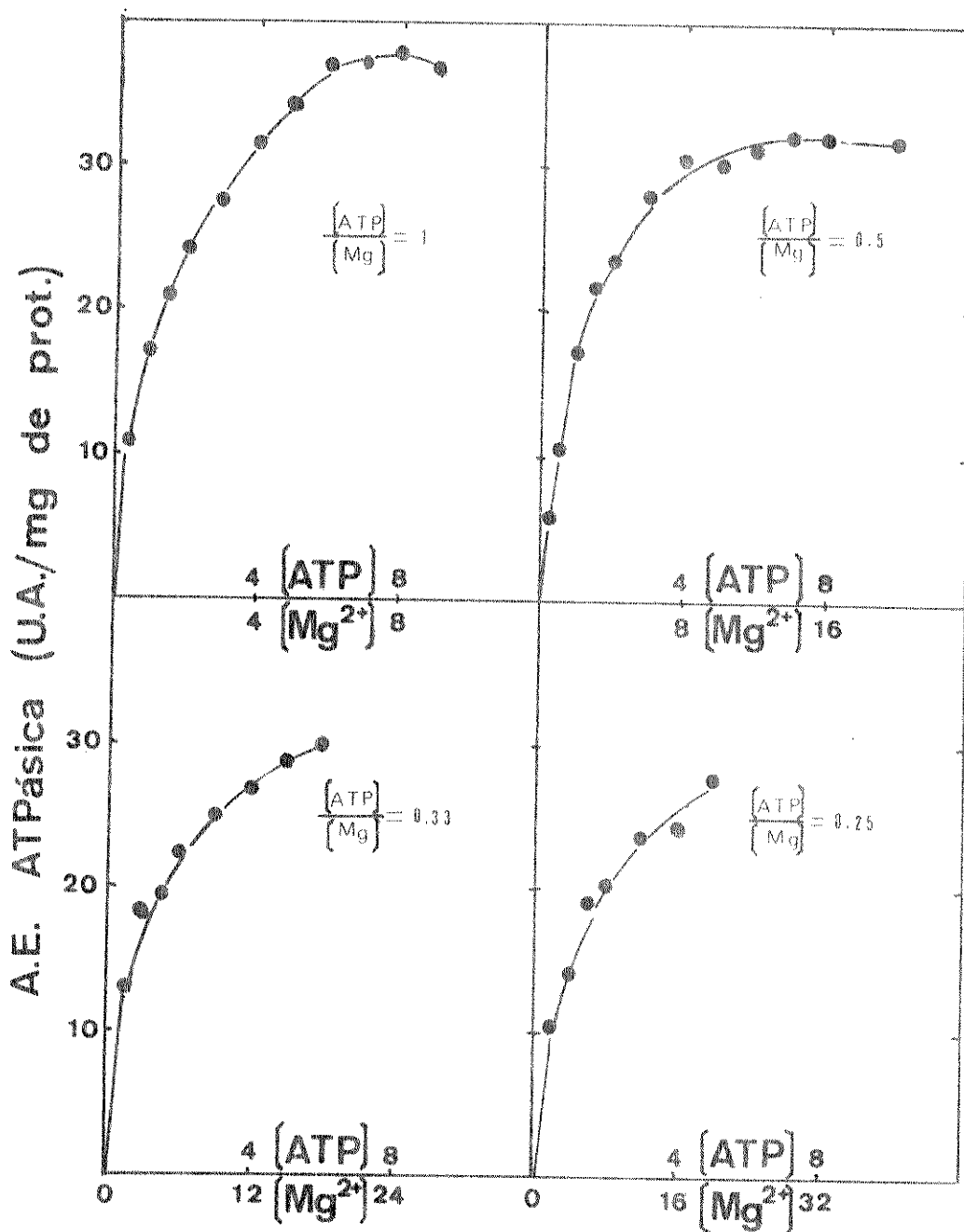


FIGURA 10. Efeito das concentrações de Mg^{2+} e ATP presentes na reação enzimática em variáveis proporções ATP/Mg, como indicado em cada caso, sobre a atividade de específica de F₁ hepática de *B. paracnemis*. As concentrações tanto de ATP como de Mg^{2+} estão expressas em mM. U.A. = umoles de Pi liberado/ 1 minuto/37°C. Detalhes em Materiais e Métodos.

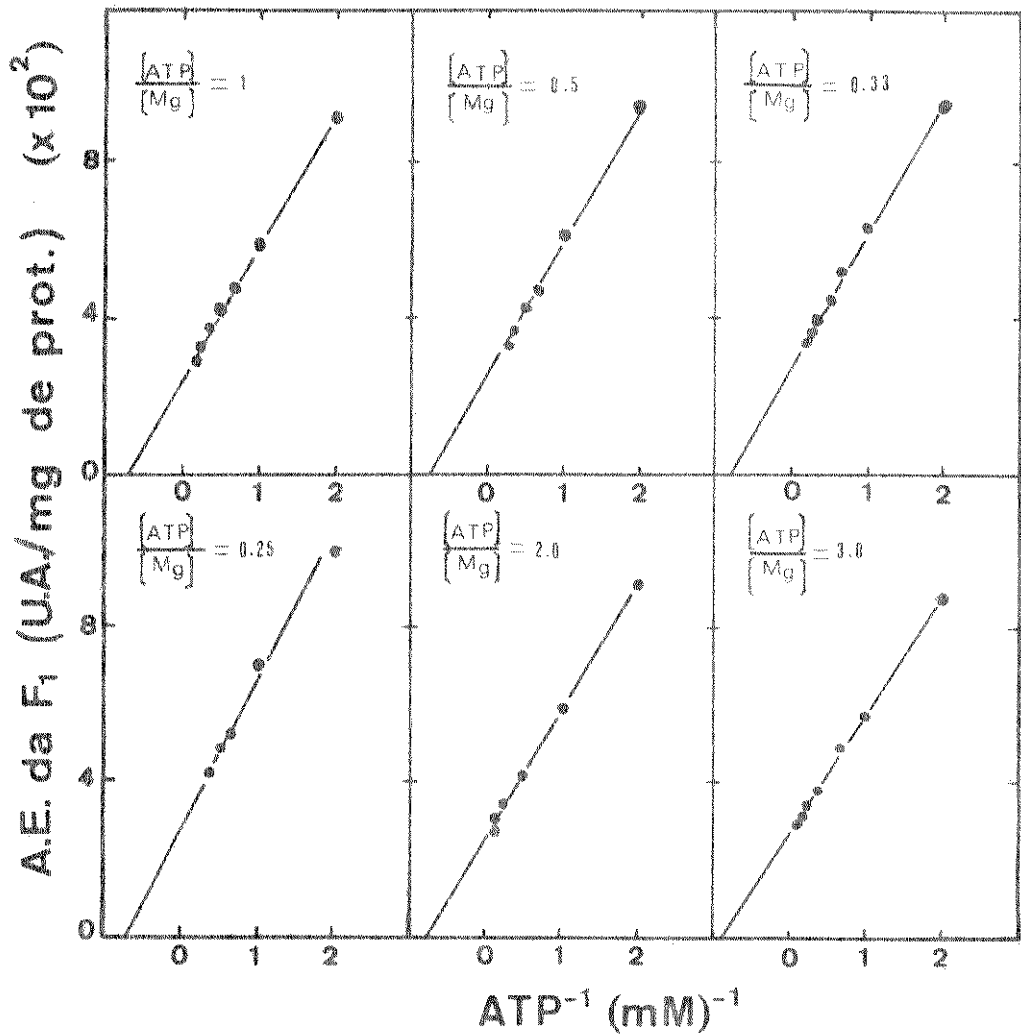


FIGURA 11. Gráfico da dupla recíproca da variação da A.E. da F₁ hepática de *B. paracnemis* em função da variação da concentração de ATP e de Mg²⁺; nas proporções ATP/Mg indicadas para cada caso. As retas foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados a partir dos pontos experimentais. Detalhes em Materiais e Métodos. U.A. = umoles de Pi liberado/minuto/37° C.

TABELA 5. Variação do Km e Vmax para ATP da atividade de ATPásica de Fl hepática de B. paracnemis na presença de variáveis concentrações de ATP e Mg²⁺, nas proporções ATP/Mg indicadas para cada caso.

ATP/Mg ²⁺ (1)	K _m _{ATP} (2)	V _{max} _{ATP} (3)
0.25	1.51	36.4
0.33	1.25	37.0
0.50	1.41	40.3
1.00	1.59	44.4
2.00	1.49	41.7
3.00	1.22	37.0

(1) As concentrações de ATP e Mg²⁺ estão expressas em mM.

(2) Km é expresso como concentração mM de ATP.

(3) Vmax é expresso por $\mu\text{mol de Pi liberado/segundo/mg de proteína}$.

4. DISCUSSÃO

A utilização de cromatografia de AH-sepharose-4B como coluna de afinidade para purificar ATPase mitocondrial, baseando-se no fato de que cátions lipofílicos inibidores de atividade ATPásica, podiam se ligar covalentemente à coluna de sepharose, permitindo a adsorção das partículas F_1 . A facilidade de preparação e o pouco tempo para obtenção das partículas F_1 estão entre as principais vantagens da metodologia empregada. Obtivemos um grau de purificação de 14-15 vezes para partículas F_1 de fígado de Bufo paracnemis, enquanto que a utilização de DEAE-sephadex (Lambeth and Lardy, 1971) para purificação de partícula F_1 hepática de rato, permitiu uma purificação de 3 a 4 vezes apenas. Para purificação de F_1 de coração de boi, Tuena et al. (1977) utilizando a mesma resina AH-sepharose-4B conseguiu um grau de purificação de 4 vezes, após eluir a enzima com SEA-KCl 1M. Com relação à utilização da coluna, a única diferença entre o procedimento por nós levado a efeito e o realizado por Tuena et al (1977), foi quanto a velocidade de eluição de proteínas da coluna, que para F_1 de coração de boi foi 0,5 ml/minuto enquanto que para F_1 hepática de Bufo paracnemis foi de 0,3 ml/minuto.

Alguns métodos utilizando precipitação da F_1 de coração de boi em sulfato de protamina (Horstman and Racker, 1970; Penefsky, 1967) além de serem bastante complicados são dificilmente reproduzíveis, chegando a causar

uma perda de 90% na atividade da partícula F_1 (Senior and Brooks, 1970).

O efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade enzimática da partícula F_1 hepática de fígado de Bufo paracnemis e Ambistoma mexicanum mostrou que a atividade enzimática é máxima nos pH entre 7,6 e 9,5. Este efeito é análogo ao observado para F_1 de outras origens. Pullman et al. (1960) com experimentos variando o pH de 5,0 a 10,0 observaram que o valor de pH que proporciona uma maior atividade para F_1 de coração de boi, se situava entre 8,5 e 9,3, usando-se tampão Tris-acetato. Kobayashi and Anraku (1972) estudando o efeito do pH sobre a atividade da ATPase de membrana de Escherichia coli, encontrou um pH ótimo igual a 9,5, usando tampão glicina-NaOH. Fonyo et al. (1966) encontraram o pH 9,5 como pH ótimo para a atividade ATPásica de F_1 de coração de rato.

É possível que pequenas diferenças nas determinações de pH ótimos obtidos por diferentes autores, seja consequência do tipo de ânion utilizado no tampão. Segundo Lambeth and Lardy (1971) que afirmam ser 8,0 o pH ótimo para a atividade ATPásica de F_1 , o tampão que possibilitou maior atividade específica foi o tampão bicarbonato, enquanto maleato, cloreto e sulfato, nesta ordem permitiram atividades enzimáticas cada vez menores. Uma outra possibilidade é que a estrutura da enzima seja alterada reversivelmente em determinados valores de pH, facilitando deste modo a hidrólise de ATP; isto daria margem a pequenas diferenças de pH ótimo quando se trata de partí-

culas F_1 de origens diversas. Assim Kobayashi and Anraku (1972) trabalhando com partícula F_1 de E. coli, encontrou um pH ótimo em 9,5, sendo que a atividade enzimática era bem menor para valores de pH inferiores ou superiores a 9,5. Fonyo et al. (1966) para F_1 de coração de rato, verificaram um aumento de 65% na atividade enzimática, quando se aumentava o pH de 7,6 a 9,5, utilizando tampão Tris-HCl.

Os nossos dados para F_1 hepática de Ambistoma mexicanum e Bufo paracnemis, mostrando uma atividade enzimática mais ou menos constante a partir de pH 7,6 até pH 9,5, usando tampão Tris-HCl pode sugerir alguma diferença estrutural em relação à partícula F_1 de coração de rato e de E. coli.

A inativação de cerca de 50% da atividade ATPásica por nós encontrada para a partícula F_1 hepática de 3 espécies de anfíbios, quando esta era incubada durante 30 minutos à temperatura de 4° C, foi diferente da porcentagem de inativação encontrada por outros autores para partículas F_1 de outras origens. Penefsky (1967), por exemplo, para F_1 de coração de boi observou 50% de inativação após 2 horas de incubação da enzima a 0° C. Para F_1 de fígado de rato, Lambeth and Lardy (1971), verificaram uma inativação de 98% após 90 minutos de permanência em temperatura de 5° C. Para Escherichia coli os resultados foram bem diferentes, conforme observado por Kobayashi and Anraku (1972) ocorria uma perda de 50% de atividade da F_1 quando esta era incubada durante 5 horas à temperatura de 4° C.

Provavelmente essas diferenças de sensibilidade a baixas temperaturas, quando se comparam partículas F_1 de diferentes origens, estão relacionadas com a própria enzima, que pode mostrar diferentes graus de associação de suas subunidades, uma vez que de acordo com Forrest and Edelstein (1970), a inativação da atividade enzimática por efeito do frio, está associada com a dissociação da enzima em suas subunidades.

A importância de cátions divalentes na atividade ATPásica da partícula F_1 tem sido confirmado por vários autores, no entanto o Mg^{2+} é o cátion que mais estimula a atividade da enzima, podendo ser substituído por outros cátions como Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Ca^{2+} ; porém sempre produzindo menores estímulos sobre a velocidade enzimática, do que o Mg^{2+} nas mesmas condições experimentais. Nossos resultados com relação aos experimentos em que se variou as concentrações de Mg^{2+} , mostraram claramente o efeito inibidor deste íon sobre a atividade enzimática; do mesmo modo quando se variou a concentração do ATP, também ficou demonstrado o efeito inibidor deste nucleotídeo. Nossos dados com relação a influência das concentrações de ATP e Mg^{2+} sobre a atividade enzimática da partícula F_1 estão de acordo com estudos feitos para F_1 de coração de boi, em que foi constatado o efeito inibitório de ATP ou Mg^{2+} livres (Pullman, 1960; Selwin, 1967).

A inibição verificada pela presença de Mg^{2+} ou ATP livres no meio de incubação da enzima, sugere

re que para partícula F_1 hepática de anfíbios, o complexo ATP-Mg seja o verdadeiro substrato, conforme Selwin (1967) observou para F_1 de coração de boi, e Vianna (1975) para ATPase de vesícula do retículo sarcoplasmático.

As concentrações de ATP e Mg^{2+} utilizadas por vários autores para estudos desta enzima são bastante variadas. Para F_1 hepática de Bufo paracnemis verificamos que as concentrações que mais favorecem a atividade desta enzima são Mg^{2+} 6mM e ATP 8mM.

A proporção ATP/Mg que melhor favoreceu a atividade enzimática da F_1 hepática de B. paracnemis, foi entre 1 e 2. Este resultado está de acordo com Pullman et al. (1960) que encontrou uma proporção ATP/Mg = 1,5 para F_1 de coração de boi e Selwyn (1967) para a mesma F_1 encontrou uma proporção ATP/Mg = 1,0. Para ATPase de membrana de Escherichia coli, foi encontrada a proporção ótima ATP/Mg = 2,5 (Kobayashi and Anraku, 1972). No entanto Tuna de Gómez Puyou and Gómez-Puyou (1977) determinaram o K_m aparente e V_{max} da F_1 de coração de boi na presença de uma proporção de ATP/Mg igual a 0,5. Nossos resultados mostram que proporções menores do que 1, ou seja excesso de Mg^{2+} em relação a estequiometria uma molécula de ATP para cada Mg^{2+} , causavam um efeito inibitório.

Os valores de K_m para ATP, obtidos a partir de preparações de mitocôndria de fígado de rato e de coração de boi estão entre 0,79 e 1,25mM (Pedersen, 1975); para E. coli, Hanson and Kennedy (1976) observaram um K_m igual a 0,29 mM e Kobayashi and Anraku (1972), um K_m igual

a 0,6 mM. O valor de K_m para ATP, no caso da partícula F_1 hepática de Bufo paracnemis é de 1,59, quando se utiliza uma proporção ATP/Mg²⁺ igual a 1.

Estudos cinéticos para determinação dos valores de $K_{m_{ATP}}$ nas diversas proporções ATP/Mg mostraram um valor de K_m bem diferente do normalmente encontrado por autores estudando partículas F_1 de origens diversas. Uma análise comparativa mostra $K_{m_{ATP}}$ para Bufo paracnemis igual a 1,59 quando se utiliza ATP/Mg²⁺ igual a 1, enquanto para fígado de rato e coração de boi, os valores de K_m estão entre 0,79 e 1,25 mM (Pedersen, 1975), usando proporções ATP/Mg²⁺ entre 1 e 2. Para partícula F_1 de membrana de E. coli, Kobayashi and Anraku (1972) encontraram um $K_{m_{ATP}}$ igual a 0,6 mM, para uma proporção ATP/Mg²⁺ igual a 5/2. Nossos dados mostram claramente que a ATPase mitocondrial de membrana interna de mitocôndria, apresenta-se bem diferente das demais ATPases mitocondriais, principalmente no que se refere à sua afinidade pelo substrato, que parece ser menor do que as outras partículas F_1 .

Conhecido já um método de preparação de F_1 partindo-se de mitocôndrias hepáticas de anfíbios, bem como algumas características dessa enzima em Bufo paracnemis está dentro de nossas metas prosseguir nas investigações que levam ao conhecimento da verdadeira função do Mg²⁺, se realmente exerce sua ação sobre o processo catalítico diretamente ou se apenas facilita a ligação do ATP à ATPase. Seguir-se-á a isto, estudos de fosforilação oxidativa e determinação das subunidades da partícula F_1 bem como os pesos moleculares destas subunidades.

5. RESUMO

A preparação da partícula F_1 dos anfíbios estudados, foi possível a partir de preparação das mitocôndrias hepáticas, solubilização da partícula F_1 e purificação através de uma coluna de afinidade (AH-sepharose-4B). Nesse processo de purificação considerando-se a etapa referente à coluna de afinidade, obtivemos uma purificação de 14-15 vezes e uma recuperação de 70-80%.

O rompimento das mitocôndrias e consequente solubilização das partículas F_1 foram acompanhadas através de microscopia eletrônica.

Estudos sobre efeito do pH sobre a atividade enzimática, mostraram que a atividade da enzima se mantém mais ou menos constante em valores de pH entre 7,6 e 9,0.

A ação inibitória de baixas temperaturas foi verificada, chegando a enzima a perder de 70 a 80% de sua atividade quando deixada à temperatura de 4° C durante 1 hora.

A importância do Mg^{2+} ficou também evidenciada para a partícula F_1 de mitocôndrias hepáticas dos anfíbios estudados, sendo que a concentração de Mg^{2+} que melhor favoreceu a atividade enzimática foi 6mM, enquanto a concentração de ATP mais favorável foi 8mM. Experimentos em que se analisou a variação da atividade específica da F_1 em função de variadas proporções ATP/Mg, mostraram que a proporção ATP/Mg que proporciona maior atividade especí-

fica está entre 1 e 2, enquanto ATP ou Mg^{2+} livre no meio de incubação causava inibição da atividade enzimática. Os valores de $K_{m_{ATP}}$ e $V_{max_{ATP}}$ encontrados para uma proporção $ATP/Mg = 1$ foram 1,59 e 44,4 respectivamente.

6. SUMMARY

A preparation of the F_1 particle of various amphibians, was possible beginning with hepatic mitochondria, solubilizing and purifying the F_1 particle by passing it through an affinity column (AH-sepharose-4B). Considering the affinity column step, we obtained a purification of 14-15 times, and a possible recuperation of 70-80% for a single purification process.

The rupture of the mitochondria and solubilization of the F_1 particles were observed with the electron microscope.

Comparing the enzymatic activity and the pH, the enzymatic activity was found to maintain constant for the interval of pH 7.6 to 9.0.

The inhibiting effect of low temperature was investigated, attaining a loss of enzymatic activity of 70 to 80% when kept at a temperature of 4° C for 1 hour.

The presence of Mg^{2+} was also shown to be important for the activity of the F_1 particle of amphibian hepatic mitochondria. The most favorable concentration of Mg^{2+} was established to be 6mM, while the most favorable concentration of ATP was 8mM.

Experiments analysing the specific activity of F_1 in relation to various proportions of ATP/Mg demonstrated greater specific activity between 1 and 2, while ATP or free Mg^{2+} in the incubation medium inhibited enzymatic activity. The $K_{m_{ATP}}$ and $V_{max_{ATP}}$ values found for the proportion ATP/Mg = 1, were respectively 1,59 and 44,4.

BIBLIOGRAFIA

- Beechey, B.R.; Hubbard, S.A.; Linnett, P.E.; Mitchell, D.A. and Munn, E.A.. A simple and rapid method for the preparation of adenosine triphosphatase from submitochondrial particles. *Biochem. J.* 143 : 533-537, 1975.
- Bustamante, E.; Soper, J.W. and Pedersen, P. A high yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria. *Analytical Biochemistry* 80 : 401-408, 1977.
- Fonyo, A.; Szende, L. and Mezei, I. The reversible activation of mitochondrial ATPase by high pH. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22 (5) : 511-517, 1966.
- Forrest, G. and Edelstein, S.J. On the subunit structure of the cold labile adenosine triphosphatase of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245 (23) : 6468-6470, 1970.
- Hanson, R.L. and Kennedy, E.P. Energy-transducing ATPase from E. coli: purification, properties and inhibition by antibody. *J. Bacteriol.* 114 (2) : 772-781, 1973.
- Horstman, L. and Racher, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol Chem.* 245 (6) : 1336-1344, 1970.
- Hulla, F.W.; Höckel, M.; Risi, S. and Dose, K. Membrane-bound F₁-ATPase from Micrococcus sp ATCC 398E. Purification and characterization by affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 67 : 469-476, 1976.
- Knowles, A.F. and Penefsky, H.S. The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247 (20) : 6617-6623.
- Kobayashi, H. and Anraku, Y. Membrane bound ATPase of E. coli I. Partial purification and properties. *J. Biochem.* 71 : 387-399, 1972.

- Lambeth, D.O. and Lardy, H.A. Purification and properties of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 22 : 355-363, 1971.
- Lowry, O.H.; Rosebroug, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- Mitchell, P.. Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling : power transmission by proticity. *Biochemical Society Transactions* 4 : 399-430, 1976.
- Pedersen, P.L. Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *Bioenergetics* 6 : 243-275, 1975.
- Penefsky, H.S. Preparation and properties of mitochondrial ATPase (coupling Factor 1). *Methods in Enzymology* X : 522-526, 1967.
- Pimentel, E.R.; Tahin, O.S.; Tuena de Gómez-Puyou, H. and Gómez-Puyou, A. Características da F₁ de mitocôndrias hepáticas de anfíbios. In: Resumos do 69 Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 48, 1977.
- Pullman, M.E.; Harvey, P.S.; Datta A. and Racker, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble DNP-stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* 235 (11): 3322-3329, 1960.
- Pullman, M.E. and Monroy, G.C. A naturally occurring inhibitor of mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* 238 (11) : 3762-3769, 1963.
- Racker, E. Mechanisms of energy transformations. In: Snell, E.E. *Ann. Rev. Biochem.* Palo Alto, Califórnia, Annual Review Inc. 1977, 46 : 1006-1014.
- Schnebli, H.P. and Abrams, A. Membrane ATPase from Streptococcus faecalis. *J. Biol. Chem.* 245 (5) : 1115-1121, 1970.

- Selwyn, M.J. Preparation and general properties of a soluble ATPase from mitochondria. *Biochem. J.* 105: 279-288, 1967.
- Senior, A.E. The structure of mitochondrial ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* 301 : 249-277, 1973.
- Senior, A.E. and Brooks, J.C. Studies on the mitochondrial oligomycin - Insensitive ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 140 : 257-266, 1970.
- Slater, E.C. Mechanism of oxidative phosphorylation. In: Snell, E.E. *Ann. Rev. Biochem.* Palo Alto, Califórnia, Annual Review Inc., 1977, 46 : 1015-1026.
- Sumner, J.B. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100 : 413-414, 1944.
- Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez-Puyou, A. A simple method of purification of a soluble oligomycin-insensitive mitochondrial ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 182 : 82-86, 1977.
- Tzagoloff, A.; Rubin, M.S. and Sierra, M.F. Biosynthesis of mitochondrial enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 301 (1) : 71-104, 1973.
- Vianna, A.L. Inter-relação entre cálcio e magnésio para a ativação e inibição da ATPase de vesículas do retículo sarcoplasmático. Tese submetida à Universidade Federal de Rio de Janeiro para obtenção do grau de doutor em Ciências, 1975.
- Warburg, O. and Christian, W. Isolierung und Kristallisation des gährungsferments enolase. *Biochem. Zeit.*, 310 : 384, 1941.