

Este exemplar corresponde a versão final da
tese defendida pela Dra Ione Salgado Martins
e aprovada pela comissão julgadora

26/7/85

Auf. após

CARACTERÍSTICAS DO TRANSPORTE DE Ca^{2+} EM
MITOCÔNDRIAS DE MILHO (*Zea mays* L.)

Ione Salgado Martins

Ione Salgado Martins

CARACTERÍSTICAS DO TRANSPORTE DE Ca^{2+} EM
MITOCÔNDRIAS DE MILHO (*Zea mays* L.)

Tese de Doutorado

Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
Orientador: Prof. Dr. A. E. Vercesi

Campinas - São Paulo

- 1985 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu esposo e à minha filha

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi pela valiosa colaboração como orientador deste trabalho.

À Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva pelo auxílio na realização de alguns experimentos e na elaboração do manuscrito.

Aos Profs. Drs. Nilce Correa Meirelles, Antônio Celso N. de Magalhães e Benedito Honório Machado pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

Aos Profs. Drs. Avelino Rodrigues de Oliveira e Ladaslav Sodek pelas sugestões feitas a este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UNICAMP, especialmente ao Prof. Dr. William José da Silva pelo fornecimento de material vegetal.

Ao Prof. Dr. W. C. Sgarbieri do Instituto de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP pelo uso do espectrofotômetro de duplo feixe.

Aos Departamentos de Fisiologia Vegetal e Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo empréstimo de equipamentos.

Aos colegas estagiários do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo apoio e incentivo.

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

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho e com minha formação profissional.

ABREVIACES

ADP, ATP	adenosina-5'-di e trifosfato
Anti-A	antimicina-A
BSA	albumina de soro bovino
DNF	2,4-dinitrofenol
EGTA	cido etileno glicol bis(β -aminoetil eter) N,N'-tetracético
Hepes	cido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-etano- -sulfnico
VR	vermelho de rutênio
$\Delta\psi$	potencial elétrico da membrana mitocondrial
MM	mitocôndrias de raízes ou coleoptiles de milho
MR	mitocôndrias de folhas de repolho
MF	mitocôndrias de fígado de rato

Í N D I C E

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias de mamíferos.....	3
1.a. Características da via de captação de Ca^{2+}	6
1.b. Cinética do transporte de Ca^{2+}	8
1.c. Significado fisiológico do transporte de Ca^{2+} mitocondrial ...	10
2. Transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias vegetais.....	12
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Fonte e preparo de material.....	14
2. Isolamento de mitocôndrias.....	14
3. Meios de reação.....	15
4. Consumo de oxigênio.....	17
5. Potencial elétrico de membrana.....	17
6. Determinação da concentração de Ca^{2+} livre.....	18
7. Ejeção de H^+	19
III. RESULTADOS.	20
1. Controle respiratório e razão ADP/O de mitocôndrias de milho e repolho.....	20
2. Potencial elétrico de membrana de mitocôndrias de repolho ($\Delta\psi$).....	20
3. Efeito de ADP e Ca^{2+} sobre $\Delta\psi$ em diferentes tipos de mitocôndrias..	23
4. Transporte de Ca^{2+} por diferentes tipos de mitocôndrias.....	26
5. Transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias de milho.....	26
5.1. Cinética de captação de Ca^{2+}	26
5.2. Efeito de Mg^{2+} e fosfato sobre o fluxo de Ca^{2+}	28
5.3. Efeito de inibidores e desacopladores sobre o transporte de Ca^{2+}	32
5.4. Comparação da habilidade de tamponamento do Ca^{2+} externo por mitocôndrias de milho e fígado.....	32
IV. DISCUSSÃO.....	42
V. RESUMO.....	52
VI. ABSTRACT.....	53
VII. BIBLIOGRAFIA.....	54

I. INTRODUÇÃO

A importância do íon cálcio (Ca^{2+}) na regulação de uma série de funções em células vegetais tem se tornado cada vez mais evidente. Observações anteriores indicam que o Ca^{2+} está envolvido nos seguintes processos: movimento sismonástico de folhas de *Mimosa pudica* L. (Van den Driessche, 1978); fototaxia de *Chlamydomonas reinhardtii* (Nultsch, 1979) e despolarização de células de *Nitella* spp. (Weisenseel & Ruppert, 1977). Níveis elevados de Ca^{2+} foram observados nas extremidades de crescimento de tubos de pólen de *Lilium longiflorum* Thunb., sugerindo a importância deste íon na regulação deste processo (Jaffe *et al.*, 1975; Reiss & Herth, 1979). Em *Chlamydomonas reinhardtii*, o aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático, provocado pela adição de herbicidas, provoca o desagregamento de microtúbulos, impedindo a divisão celular (Hertel *et al.*, 1980). O Ca^{2+} está também envolvido na ativação da fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos de *Phaseolus vulgaris* L. (Brown *et al.*, 1977), na inibição da frutose difosfatase de cloroplastos de *Spinacia oleracea* L. (Charles & Halliwell, 1980) e na ativação da desidrogenase glutâmica em *Pisum sativum* L. (Kindt *et al.*, 1980). A inibição de movimento citoplasmático em *Characeae* (*Chara australis* e *Nitella axilliformis*) é dependente de Ca^{2+} (Hayama *et al.*, 1979). Cormier *et al.* (1981) apresentaram evidências de que o Ca^{2+} atua como um mensageiro secundário na regulação da taxa fotossintética em cloroplastos de *Pisum sativum*.

Muito pouco se conhece sobre os mecanismos pelos

quais a concentração do Ca^{2+} é controlada em células vegetais. A participação de mitocôndrias (Hodges & Hanson, 1965; Wilson & Graesser, 1976; Dieter & Marmê, 1980a), microssomos e membranas plasmáticas (Gross & Marmê, 1978; Dieter & Marmê, 1980a,b; Caldogno *et al.*, 1982) na regulação da homeostase do Ca^{2+} no citoplasma já foram aventadas. Não existem, até o momento, medidas diretas da concentração de Ca^{2+} livre no interior de células vegetais. Em animais este valor é mantido na faixa de 10^{-6} a 10^{-8} M (Bygrave, 1978a; Saris & Akerman, 1980; Murphy *et al.*, 1980) contra uma concentração extra celular na faixa de 1 a 2 mM. Este gradiente de concentração é mantido graças ao efluxo ativo de Ca^{2+} através da membrana plasmática (Schatzmann, 1966; Scott *et al.*, 1980) e pela captação desse íon por mitocôndrias (Lehninger *et al.*, 1967; Carafoli & Lehninger, 1971; Carafoli, 1974) e retículo endoplasmático (Hales *et al.*, 1974) ou sarcoplasmático (Martonosi, 1972).

Um dos campos mais explorados em bioenergética tem sido o estudo do transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias de mamíferos (Nicholls & Akerman, 1982; Vercesi, 1984). Estes estudos, juntamente com aqueles sobre transporte de Ca^{2+} em membrana plasmática e retículos endoplasmático e sarcoplasmático, resultaram em importantes avanços no conhecimento sobre a regulação da homeostase do Ca^{2+} na célula e seu papel como segundo mensageiro da ação hormonal em células animais (Rasmussen & Goodman, 1977; Williamson; *et al.*, 1981; Veldhuis & Klase, 1982).

1. TRANSPORTE DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS DE MAMÍFEROS

As primeiras observações sugerindo a existência de um sistema de transporte de Ca^{2+} na membrana mitocondrial foram feitas por Slater & Cleland (1953) que identificaram grandes quantidades de Ca^{2+} no interior de mitocôndrias cardíacas. Além disto, a ocorrência de estímulo de respiração (Siekevitz & Potter, 1955) e ejeção de H^+ (Saris, 1959) provocados pela adição de Ca^{2+} a suspensões de mitocôndrias isoladas sugeriram que o íon era transportado pela organela. Porém, foi só em 1962 que Vasington & Murphy demonstraram pela primeira vez que mitocôndrias isoladas de rins de rato tinham a habilidade de captar Ca^{2+} por um processo ativo, às expensas de energia respiratória ou de hidrólise de ATP. Inúmeros trabalhos foram então apresentados, estendendo-se estes achados para os mais diferentes tecidos animais, alguns fungos e vegetais superiores (Lehninger, 1970; Bygrave, 1977; Lehninger *et al.*, 1978a; Carafoli & Crompton, 1978; Saris & Akerman, 1980; Tedeschi, 1981; Fiskum & Lehninger, 1981; Nicholls & Akerman, 1982). Hoje, é reconhecido o importante papel da mitocôndria em regular tanto o Ca^{2+} livre no citoplasma (Nicholls, 1978a; Saris & Akerman, 1980; Fiskum & Lehninger, 1981; Joseph *et al.*, 1983; Nicchita & Williamson, 1984) quanto na matriz mitocondrial (Denton *et al.*, 1980; McCormack & Denton, 1980; Hansford, 1981; Crompton *et al.*, 1983). Sob determinadas condições experimentais a energia respiratória é utilizada preferencialmente para captação de Ca^{2+} com prejuízo da síntese de ATP (Rossi & Lehninger, 1964; Reynafarje & Lehninger, 1973; Vercesi *et al.*, 1978).

Em animais, a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria ocor

re por um mecanismo de transdução de energia semelhante ao utilizado no processo de fosforilação oxidativa. Segundo a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa (Mitchell, 1966) a energia livre liberada durante a transferência de elétrons do NADH ao O_2 na cadeia respiratória é armazenada sob a forma de um gradiente de H^+ gerado pelo efluxo eletrogênico de H^+ da matriz para o lado citosólico da membrana mitocondrial interna (Mitchell, 1961; 1966). Este gradiente de prótons gerado através da membrana ($\Delta\bar{\mu}H^+$) é constituído por um componente químico (ΔpH , alcalino internamente) e pelo potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$, negativo internamente) que se relacionam da seguinte forma:

$$\Delta\bar{\mu}H^+ = \Delta\psi - 60\Delta pH$$

Em mitocôndrias energizadas, o componente elétrico ($\Delta\psi$) do gradiente eletroquímico de prótons atinge valores de 150 a 180 mV quando $\Delta\bar{\mu}H^+$ é de aproximadamente 230 mV em condições de "steady state", no estado respiratório 4 (Mitchell, 1966; Nicholls, 1974).

A entrada de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria é mediada por um transportador específico (Lehninger, 1970), sem acoplamento direto com movimento de outros íons, caracterizando este transportador como um "uniporter" (Reynafarje & Lehninger, 1977). A captação de Ca^{2+} ocorre então por um mecanismo eletroforético em resposta ao potencial elétrico da membrana, negativo internamente (Rottenberg & Scarpa, 1974). Como resultado observa-se uma diminuição de $\Delta\psi$. Isto leva a uma queda no gradiente eletroquímico de prótons que induz a um estímulo da respiração e a uma maior velocidade de ejeção de prótons. Assim, a queda no valor de $\Delta\psi$ é compensada pelo aumento do termo ΔpH no sentido de restabelecer o valor de $\Delta\bar{\mu}H^+$.

Como já foi mencionado, em mitocôndrias energizadas no estado respiratório 4 os valores de $\Delta\psi$ e de $\Delta\tilde{\mu}H^+$ estão na faixa de 150-180 e 230 mV, respectivamente. Assumindo-se estes valores e sabendo-se que a membrana é negativa internamente, a captação de Ca^{2+} através do "uniporter" atingiria o estado de equilíbrio quando o gradiente de concentração do íon através da membrana fosse da ordem de 10^5 a 10^6 , caso o influxo eletrogênico fosse o único tipo de transporte de Ca^{2+} existente na membrana mitocondrial. Nestas condições a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma seria da ordem de 10^{-9} M. Isto porque, é improvável que a concentração de Ca^{2+} livre na matriz exceda o valor de 1 mM, devido à formação de $Ca_3(PO_4)_2$ (Lehninger, 1970). O valor de 10^{-9} M para a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma é extremamente baixo e está em desacordo com os valores encontrados experimentalmente (Murphy *et al.*, 1980).

A distribuição de Ca^{2+} através da membrana interna mitocondrial é consistente com a atuação exclusiva do "uniporter" apenas em condições não fisiológicas de alta concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial e baixo $\Delta\psi$ (Puskin *et al.*, 1976; Nicholls, 1978a; Crompton & Heid, 1978; Nicholls & Crompton, 1980). Em condições fisiológicas de baixa concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma e alto $\Delta\psi$ a distribuição do íon através da membrana não está de acordo com a equação de Nernst (Puskin *et al.*, 1976; Massari & Pozzan, 1976; Pozzan *et al.*, 1977; Azzone *et al.*, 1977; Nicholls, 1978a). Este desequilíbrio na distribuição termodinâmica verificado em condições fisiológicas, isto é, baixa concentração de Ca^{2+} livre externo e alto $\Delta\psi$ sugere a exis -

tência de dois sistemas diferentes para o transporte de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial (Puskin *et al.*, 1976; Lehninger *et al.*, 1978b; Caroni *et al.*, 1978). Haveria um sistema para o influxo e outro para o efluxo do íon, operando por mecanismos diferentes e independentemente regulados. Assim, o estado de equilíbrio seria dado pela razão entre as velocidades de influxo e efluxo através das duas vias. De fato, a inibição da via de influxo por vermelho de rutênio, após a mitocôndria ter captado Ca^{2+} , dá origem a uma lenta liberação do íon (Fiskum & Lehninger, 1979; Crompton *et al.*, 1976a, 1979). Este efluxo de Ca^{2+} mitocondrial, na presença de vermelho de rutênio, é estimulado por prótons em mitocôndrias de fígado (Akerman, 1978a; Nicholls, 1978a; Fiskum & Lehninger, 1979) e por Na^+ em mitocôndrias de tecidos excitáveis (Carafoli *et al.*, 1974; Crompton *et al.*, 1976a; Nicholls, 1978b). Além disto, este efluxo ocorre em condições em que o potencial elétrico da membrana mitocondrial é mantido na faixa de 160 a 180 mV (Nicholls, 1978b). Por isto, acredita-se que o mesmo ocorra por mecanismo eletroneutro, através de um "antiporter". Este sistema catalisaria a troca de um íon Ca^{2+} interno por dois íons H^+ ou Na^+ externos, dependendo do tipo de mitocôndria (Brand *et al.*, 1976b; Fiskum & Lehninger, 1979; Coll *et al.*, 1982).

1.a. Características da Via de Captação de Ca^{2+}

Antes de Mitchell (1966) postular a teoria quimiosmótica para a fosforilação oxidativa acreditava-se que a energia utilizada para a síntese de ATP provinha da hidrólise de um

intermediário químico. Esta hipótese também era utilizada para explicar a captação de Ca^{2+} . Porém, Scarpa & Azzone (1970) puderam pela primeira vez demonstrar que a captação de Ca^{2+} podia ocorrer na ausência de respiração ou de hidrólise de ATP. Neste sistema, a captação de Ca^{2+} ocorria contra gradiente de concentração, em resposta ao potencial gerado pelo efluxo de K^+ mitocondrial, na presença do ionóforo valinomicina (Scarpa & Azzone, 1970). Estes resultados estavam de acordo com o trabalho de Selwyn *et al.* (1970). Estes autores demonstraram a capacidade de mitocôndrias captarem Ca^{2+} em resposta ao potencial de difusão do ânion SCN^- , livremente permeável através da membrana mitocondrial. Hoje, é amplamente aceita a hipótese de que o Ca^{2+} difunde para o interior da mitocôndria por um mecanismo eletroforético. Embora, normalmente, seja dito que o Ca^{2+} entra na mitocôndria em resposta ao potencial elétrico de membrana, a verdadeira força motriz para o acúmulo de Ca^{2+} é o seu potencial eletroquímico dado por:

$$\Delta\tilde{\mu}_{\text{Ca}^{2+}} = 2\Delta\psi - 60 \log \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{matriz}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{meio}}}$$

Como já mencionado, a entrada de Ca^{2+} converte $\Delta\psi$ em gradiente de pH (Nicholls, 1978a). Como a capacitância elétrica da membrana mitocondrial interna é muito baixa (Mitchell, 1976) a captação de somente 1 nmol Ca^{2+} /mg de proteína resulta na despolarização total da membrana (Drahota *et al.*, 1965). Acúmulo de grandes quantidades de Ca^{2+} na matriz mitocondrial pode ocorrer apenas na presença de ânions com capacidade de migrar para o inte-

rior da mitocôndria, em co-transporte com H^+ (ou troca por OH^-). Nestas condições o valor do termo ΔpH não aumenta, $\Delta\psi$ é restabelecido pela ejeção de H^+ e até 2000 nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína mitocondrial podem ser acumulados (Lehninger, 1974). Entre os ânions considerados permeantes para o transporte de Ca^{2+} ao interior da mitocôndria incluem-se acetato, propionato, butirato (Lehninger, 1974), fosfato, bicarbonato (Elder & Lehninger, 1973), β -hidroxibutirato (Lehninger, 1974; Brand *et al.*, 1976a) e glutamato (Debise *et al.*, 1978). Estes ânions acumulam-se na matriz mitocondrial em resposta ao gradiente de pH, alcalino internamente, gerado pela captação de Ca^{2+} . O co-transporte com prótons dissipa o ΔpH permitindo que a cadeia respiratória restaure o valor de $\Delta\psi$. O ânion $H_2PO_4^-$ acompanha o Ca^{2+} entrando em co-transporte com H^+ através de um transportador específico (Coty & Pedersen, 1975). Isto resulta na dissipação de ΔpH e formação do complexo $Ca_3(PO_4)_2$ na matriz mitocondrial.

A estequiometria entre a captação de Ca^{2+} , ejeção de prótons e transporte de elétrons na cadeia respiratória é de $4H^+/1Ca^{2+}/2e^-$ para cada sítio de fosforilação oxidativa (Brand *et al.*, 1976b; Reynafarje & Lehninger, 1977; Vercesi *et al.*, 1978).

1.b. Cinética do transporte de Ca^{2+}

A cinética de captação de Ca^{2+} apresenta uma curva de forma sigmoideal quando se faz o gráfico das velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} em função das concentrações do íon, apresentando também uma alta velocidade máxima (Vinogradov & Scarpa, 1973; Reed & Bygrave, 1975; Noack & Heinen, 1977; Bragadin

et al., 1979). Um Km aparente na faixa de 2 a 10 μM é relatado tanto para mitocôndrias de fígado (Carafoli & Azzi, 1972 ; Reed & Bygrave, 1975; Carafoli, 1979) quanto de coração de rato (Noack & Heinen, 1977). Na presença de íons Mg^{2+} observam-se valores de Km mais elevados (Hutson *et al.*, 1976 ; Becker, 1980). A velocidade máxima de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de fígado de rato é da ordem de 900 nmoles/min por mg de proteína a 20°C , quando um gradiente de difusão de K^{+} é utilizado como fonte de energia para a captação (Bragadin *et al.*, 1979). Quando a captação de Ca^{2+} é energizada por respiração, a Vmax observada é de cerca de 400 nmoles/min por mg de proteína (Bragadin *et al.*, 1979). A comparação destes diferentes valores de Vmax nas duas condições experimentais deixa bem claro que é a velocidade de transporte de elétrons que limita a velocidade de transporte de Ca^{2+} e não a saturação do sistema transportador propriamente dito (Bragadin *et al.*, 1979).

A dificuldade de se determinar a concentração de Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial tem limitado o estudo dos parâmetros cinéticos da via de efluxo. A Vmax para o "antiporter" $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ ou $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^{+}$ varia de 5 a 20 nmoles/min por mg de proteína (Crompton *et al.*, 1976b; Nicholls, 1978a; Crompton *et al.*, 1978; Nicholls & Crompton, 1980). É importante observar que a velocidade máxima de efluxo de Ca^{2+} em troca eletroneutra por H^{+} é da ordem de 100 vezes menor do que a observada para a captação de Ca^{2+} pela via de influxo. Assim, quando se trabalha com altas concentrações de Ca^{2+} externo a atividade da via de efluxo pode ser desprezada. Entretanto, quando a concentração de Ca^{2+} externo livre se aproxima de $1\mu\text{M}$ a atividade da via de in-

fluxo e da via de efluxo são comparáveis.

O Km para o efluxo de Ca^{2+} está na faixa de 5 a 10 μM tanto para a via que troca $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^{+}$ em mitocôndrias de coração como para a troca $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ em mitocôndrias de fígado de rato (Coll *et al.*, 1982).

1.c. Significado Fisiológico do Transporte de Ca^{2+} Mitochondrial

A descoberta de que a distribuição de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna é o resultado do equilíbrio dinâmico entre a captação contínua do íon através do "uniporter" e seu efluxo pela via independente (Vasington *et al.*, 1972 ; Sordahl, 1974; Puskin *et al.*, 1976; Crompton *et al.*, 1978 ; Lehninger *et al.*, 1978b; Caroni *et al.*, 1978) ajudaram a elucidar as implicações fisiológicas deste processo. Várias evidências tem sido apresentadas numa tentativa de demonstrar que as características cinéticas do transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias são importantes na regulação do metabolismo intra e extra mitocondrial. A idéia inicial era de que o Ca^{2+} mitocondrial teria um papel fundamental na regulação de vários processos citoplasmáticos (Bygrave, 1978b; Crompton *et al.*, 1978; Nicholls, 1978a). Porém, algumas desidrogenases envolvidas nas reações e regulação do ciclo de Krebs, localizadas exclusivamente na matriz mitocondrial, são ativadas por Ca^{2+} , o que torna discutível se o papel do sistema de transporte de Ca^{2+} localizado na membrana mitocondrial regula a concentração de Ca^{2+} na matriz, no citosol ou em ambos (McCormack & Denton, 1979; 1980). Sabe-se atualmente que o Ca^{2+} intramitocondrial pode ser mediador de vários

efeitos hormonais (Williamson *et al.*, 1981). Estas descobertas contribuíram para fortalecer a importância do sistema transportador de Ca^{2+} em regular também o metabolismo intramitocondrial.

Quando mitocôndrias energizadas são incubadas na presença de Ca^{2+} este íon é rapidamente captado. A captação ocorre até que a concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial tenha caído para um nível onde a atividade da via de influxo é balanceada pela via de efluxo. Os valores de concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial, durante esta situação de equilíbrio dinâmico ("steady state") estão na faixa de 0,4 a 0,8 μM de Ca^{2+} para mitocôndrias de fígado (Nicholls, 1978a; Becker, 1980; Becker *et al.*, 1980; Pereira da Silva *et al.*, 1984). Para mitocôndrias isoladas de cérebro (Nicholls & Scott, 1980) ou coração (Brand & DeSelincourt, 1980) o "steady state" está na faixa de 0,2 a 0,3 μM de Ca^{2+} livre, quando Mg^{2+} e Na^+ não estão presentes no meio de reação. Uma vez atingido o "steady state" a mitocôndria é capaz de responder a qualquer perturbação na concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial. Influxo ou efluxo líquido de Ca^{2+} são observados até que o nível inicial seja restabelecido. Assim, um aumento na concentração de Ca^{2+} livre externo faz a via de influxo operar mais rapidamente que a via de efluxo. Por outro lado, uma diminuição na concentração de Ca^{2+} livre externo tornará a atividade da via de influxo mais lenta que a da via de efluxo (Becker, 1980). Estes experimentos sugerem que o papel da mitocôndria no transporte de Ca^{2+} seria tamponar o Ca^{2+} livre extramitocondrial. Entretanto, estudos recentes sobre efeitos de hormônios mostram a importância do sistema transportador de Ca^{2+} em tamponar o Ca^{2+} livre intramitocon-

drial (Crompton *et al.*, 1983).

2. TRANSPORTE DE Ca^{2+} EM MITOCÔNDRIAS VEGETAIS

Em contraste com o considerável volume de literatura disponível sobre o transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias animais muito pouco se conhece sobre este processo no reino vegetal. Os primeiros trabalhos que sugeriram a capacidade de mitocôndrias vegetais captarem Ca^{2+} por um processo ativo foram apresentados por Hanson e seu grupo (Hodges & Hanson, 1965; Kenefick & Hanson, 1966; Hanson & Hodges, 1967; Miller & Koeppe, 1971; Earnshaw *et al.*, 1973; Johnson & Wilson, 1973). Porém estes resultados foram interpretados como um evento secundário relacionado com a formação de um intermediário fosforilado da fosforilação oxidativa.

Tem sido mostrado que o transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias vegetais difere em muitos aspectos nas diferentes espécies estudadas (Chen & Lehninger, 1973; Dieter & Marmé, 1980a) e varia numa mesma espécie, entre os diferentes tecidos ou dentro de um mesmo tecido depende da idade da planta (Dieter & Marmé, 1980a). Os dados disponíveis até o momento, não eliminam a possibilidade de que as diferenças na integridade da membrana mitocondrial possam ser responsáveis pelas variações observadas. Além disto, a maioria dos estudos com mitocôndrias vegetais tem envolvido longos períodos de incubação da organela com Ca^{2+} marcado isotopicamente, seguida da análise do Ca^{2+} acumulado após centrifugação ou filtração das mitocôndrias. Embora estes trabalhos tenham fornecido algumas informações com respeito às pro -

priedades de alguns tipos de mitocôndrias vegetais em transportar Ca^{2+} , pouco tem sido estudado com respeito às características cinéticas desse transporte. Informações limitadas também tem sido obtidas quando se estima indiretamente a capacidade de mitocôndrias vegetais em transportar Ca^{2+} analisando-se o estímulo no consumo de oxigênio provocado pela adição de Ca^{2+} às suspensões mitocondriais (Miller *et al.*, 1970; Chen & Lehninger, 1973; Moore & Bonner, 1977).

Nos trabalhos sobre transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias vegetais, raras são as informações sobre o efluxo do íon. Existem porém indicações de que EGTA e alguns herbicidas induziriam o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de trigo e milho (Zaitsiva & Zubkova, 1980; Hertel *et al.*, 1980).

O presente trabalho descreve algumas das propriedades do transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias de milho comparando-as com as características do transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias de fígado de rato, já bastante estudadas. Mostra-se também que mitocôndrias isoladas de folhas de repolho são incapazes de captar Ca^{2+} apesar da habilidade destas em estabelecer e manter um potencial elétrico transmembrana da mesma magnitude que mitocôndrias de milho e fígado de rato.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Fonte e Preparo de Material

Sementes de milho (*Zea mays* L.Maia/Normal) pertencentes ao Banco de Germoplasma do Departamento de Genética , IB UNICAMP foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,2% por 60 min, lavadas três vezes com água destilada e deixadas por duas horas em água para embebição. As sementes foram colocadas para germinar sobre papel de filtro umedecido e mantidas no escuro a 28°C. Raízes ou coleóptiles de plântulas de três dias de idade foram utilizadas para extração de mitocôndrias.

Folhas brancas de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) comprado em mercado e fígados de rato (linhagem Wistar, pesando aproximadamente 250 g, deixados em jejum por doze horas) também foram utilizados como fonte de mitocôndrias.

2. Isolamento de Mitocôndrias

Tecidos de milho foram picados finamente com tesoura e suspensos em meio de extração (manitol 0,5M; BSA 0,1%; Hepes 10 mM; EGTA 2 mM pH 7,6) na proporção de 1g de tecido/5 ml de meio. As mitocôndrias foram extraídas por tratamento com ultrassom (Polytron PT 10/35, nº 5) durante 3 a 4 segundos. Após filtração em gaze (8 camadas) e ajuste do pH para 7,2 com KOH 1 N a suspensão foi centrifugada a 1085g por 10 min. As mitocôndrias foram coletadas por centrifugação da fração sobrenadante a

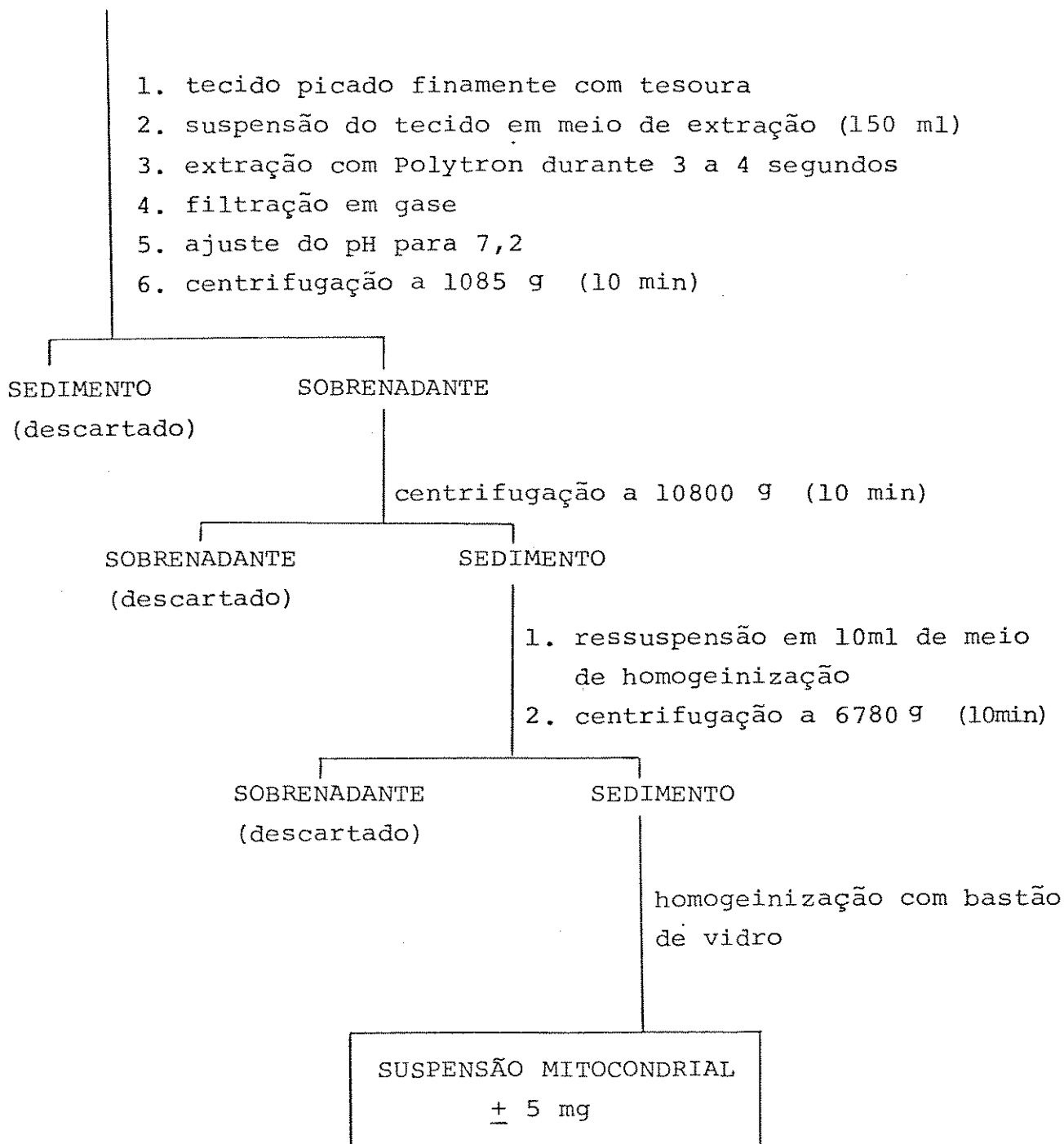
10800g por 10 min. As mitocôndrias sedimentadas foram suspensas em 10 ml de meio de homogeinização (manitol 0,3 M; BSA 0,1%; Hepes 2 mM pH 7,2) e submetidas a uma segunda sedimentação a 6780g durante 10 minutos. O sedimento mitocondrial resultante foi homogeinizado com bastão de vidro obtendo-se uma suspensão mitocondrial com 30 a 50 mg proteína/ml, determinado pelo método de Kies & Murphy (1960). Todo o procedimento foi conduzido entre 0 - 4°C (Figura 1). Mitocôndrias de repolho foram isoladas pela mesma técnica. Mitocôndrias de fígado de rato também foram isoladas por centrifugação diferencial. O homogeinizado foi preparado em sacarose 0,25 M tamponada com Hepes 2 mM pH 7,2 na presença de EGTA 0,5 mM. A fração mitocondrial foi lavada duas vezes no mesmo meio sem EGTA e então suspensa em solução contendo sacarose 0,25 M a uma concentração de cerca de 100 mg de proteína/ml.

3. Meios de Reação

Os meios de reação continham: manitol 0,3M; BSA 0,1%; Hepes 2 mM pH 7,2; KCl 20 mM; fosfato de potássio 2 mM; succinato 5 mM e rotenona 5 µM. Os experimentos foram realizados a 30°C. Quando as mitocôndrias foram energizadas por substratos de sítio I, succinato e rotenona foram substituídos por malato 12,5 mM e glutamato 20 mM. Algumas alterações nos meios de reação estão especificadas nas legendas das Figuras. Os resultados apresentados são os mais representativos de uma série de pelo menos cinco experimentos.

FIGURA 1. Diagrama da técnica de isolamento de mitocôndria de milho.

30 g de tecido (coleoptiles estiolados ou raízes de milho)



4. Consumo de Oxigênio

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

5. Potencial Elétrico de Membrana

A medida do potencial de membrana em mitocôndrias isoladas foi feita utilizando-se o corante safranina, que apresenta um deslocamento no espectro visível associado à sua ligação às membranas de mitocôndrias energizadas (Akerman & Wikstrom, 1976.) Este deslocamento está linearmente relacionado com o potencial produzido por gradientes de prótons ou de íons potássio. Mitocôndrias recém isoladas foram incubadas sob diferentes condições, em presença de safranina, e as diferenças de absorbância $A_{511}-A_{533\text{nm}}$ foram determinadas em espectrofotômetro de duplo feixe (Perkin-Elmer, modelo 356) acoplado a um registrador potenciométrico. A partir da comparação dos valores obtidos com os de uma curva de calibração $\Delta A = f(\Delta\psi)$ obteve-se o valor do potencial em cada caso. Na obtenção da curva de calibração, a partir de adições sucessivas de quantidades conhecidas de KCl, o potencial foi calculado através da relação $\Delta\psi = 60 \log \frac{[K^+]_{in}}{[K^+]_{ex}}$ onde $[K^+]_{in}$ é a concentração do íon no interior da mitocôndria, assumida como sendo 120 mM (Rossi & Azzzone, 1969) e $[K^+]_{ex}$ é a concentração do íon no meio de incubação.

6. Determinação da Concentração de Ca^{2+} Livre

Variações nas concentrações de Ca^{2+} nos meios de reação foram acompanhadas utilizando-se eletrodo seletivo de Ca^{2+} (Calcium Selectrode F2112, Radiometer). Sinais do eletrodo de Ca^{2+} foram amplificados através de um acessório de alta impedância (Sargent-Welch Scientific Co) conectado a um registrador potenciométrico.

A calibração para a faixa de concentração de Ca^{2+} livre de 0,25 a 5 μM foi obtida pela adição de uma mistura Ca^{2+} -EGTA ao meio de reação usando-se o valor de $4,7 \times 10^{-6}$ ou $4,5 \times 10^{-6}$ para a constante de dissociação do complexo Ca^{2+} -EGTA, na ausência ou presença de Mg^{2+} (1 mM), respectivamente, a pH 7,2 e 30°C (Becker *et al.*, 1983). A calibração para as concentrações de Ca^{2+} livre acima de 5 μM foi obtida pelas adições de quantidades conhecidas de Ca^{2+} ao final de cada experimento. As quantidades de Ca^{2+} complexadas pelos diferentes componentes dos meios de reação foram calculadas em experimentos paralelos. O íon cálcio foi sempre adicionado na forma de cloreto de cálcio.

A concentração total de Ca^{2+} intramitocondrial, bem como a concentração de Ca^{2+} contaminante do meio de reação foram determinadas por espectroscopia de absorção atômica (Atomic Absorption Perkin Elmer, Modelo 303). As amostras foram diluídas em uma mistura de óxido de lantânio: HCl: n-butanol: H_2O segundo Gochman & Givelber (1970) e lidas contra uma solução padrão de Ca^{2+} .

7. Ejeção de H^+

As variações de pH nos meios de reação foram determinadas utilizando medidor de pH Beckman modelo Expandomatic SS-2 conectado a um registrador potenciométrico. As calibrações foram feitas titulando-se a mistura de reação com solução padrão de HCl, após cada experimento.

III . RESULTADOS

1. CONTROLE RESPIRATÓRIO E RAZÃO ADP/O DE MITOCÔNDRIAS DE MILHO E REPOLHO.

As velocidades de oxidação de malato/glutamato e succinato nos estados respiratórios 3 e 4 para mitocôndrias isoladas de folhas de repolho e coleoptiles de milho são apresentadas na Tabela I. Os controles respiratórios de mitocôndrias de repolho foram de 4,8 e 4,0 para substratos de sítio I e II, respectivamente. Nas mesmas condições as mitocôndrias de milho apresentaram controles respiratórios igual a 3,8 e 3,2. As razões ADP/O, calculadas a partir do consumo de oxigênio extra provocado pela adição de ADP, forneceu valores de 2,4 para mitocôndrias de repolho e 2,6 para mitocôndrias de milho quando se utilizou malato/glutamato como substratos respiratórios. Na presença de succinato as razões ADP/O foram de 1,7 para ambos os tipos de mitocôndrias.

2. POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA DE MITOCÔNDRIAS DE REPOLHO ($\Delta\psi$)

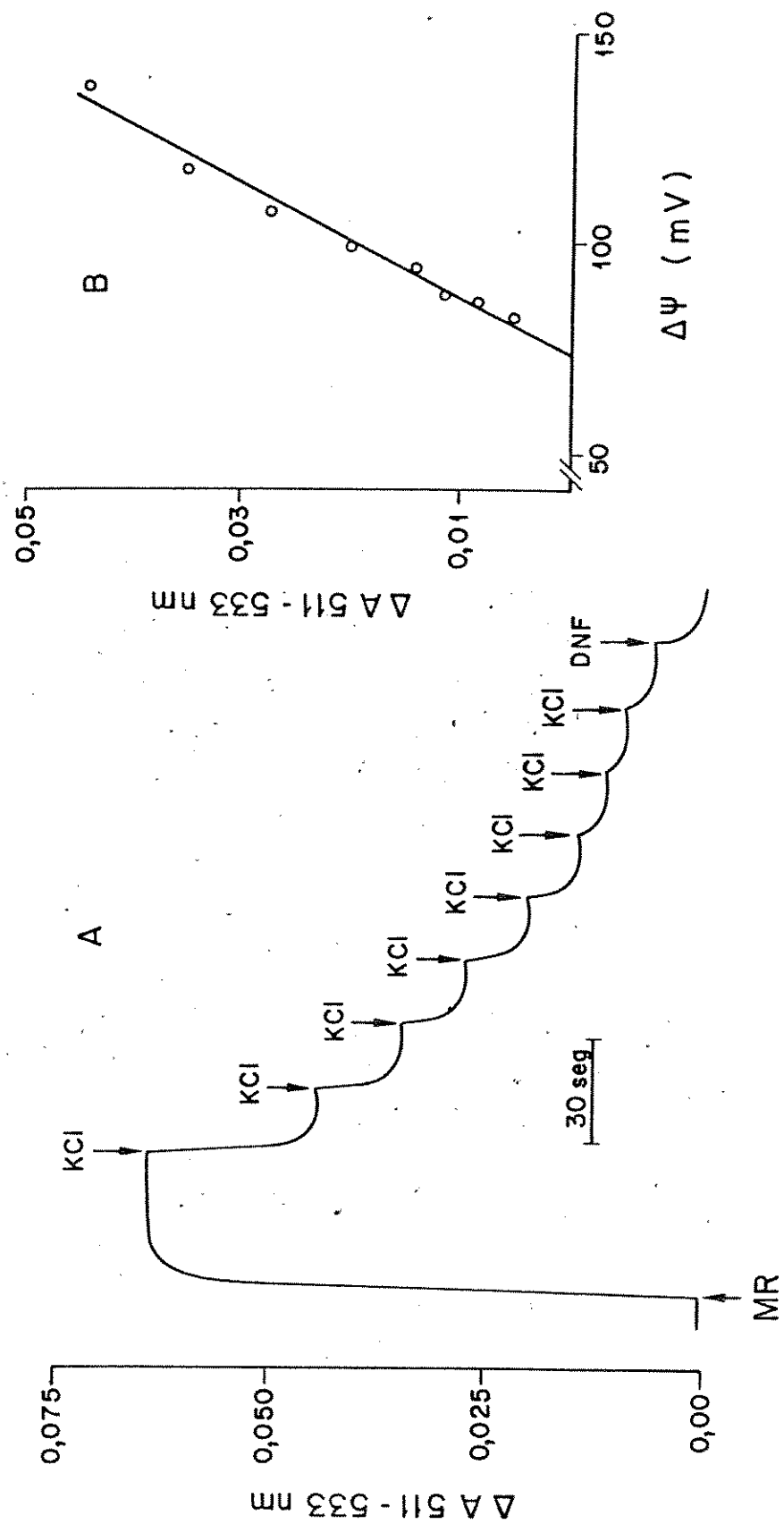
Safranina, um corante carregado positivamente, foi utilizado como indicador do potencial elétrico ($\Delta\psi$) da membrana mitocondrial, segundo técnica descrita por Akerman & Wikstrom (1976). A Figura 2 mostra o teste de calibração feito com mitocôndrias de folhas de repolho. A adição de mitocôndrias ao meio de reação livre de K^+ , na presença de succinato e valinomicina,

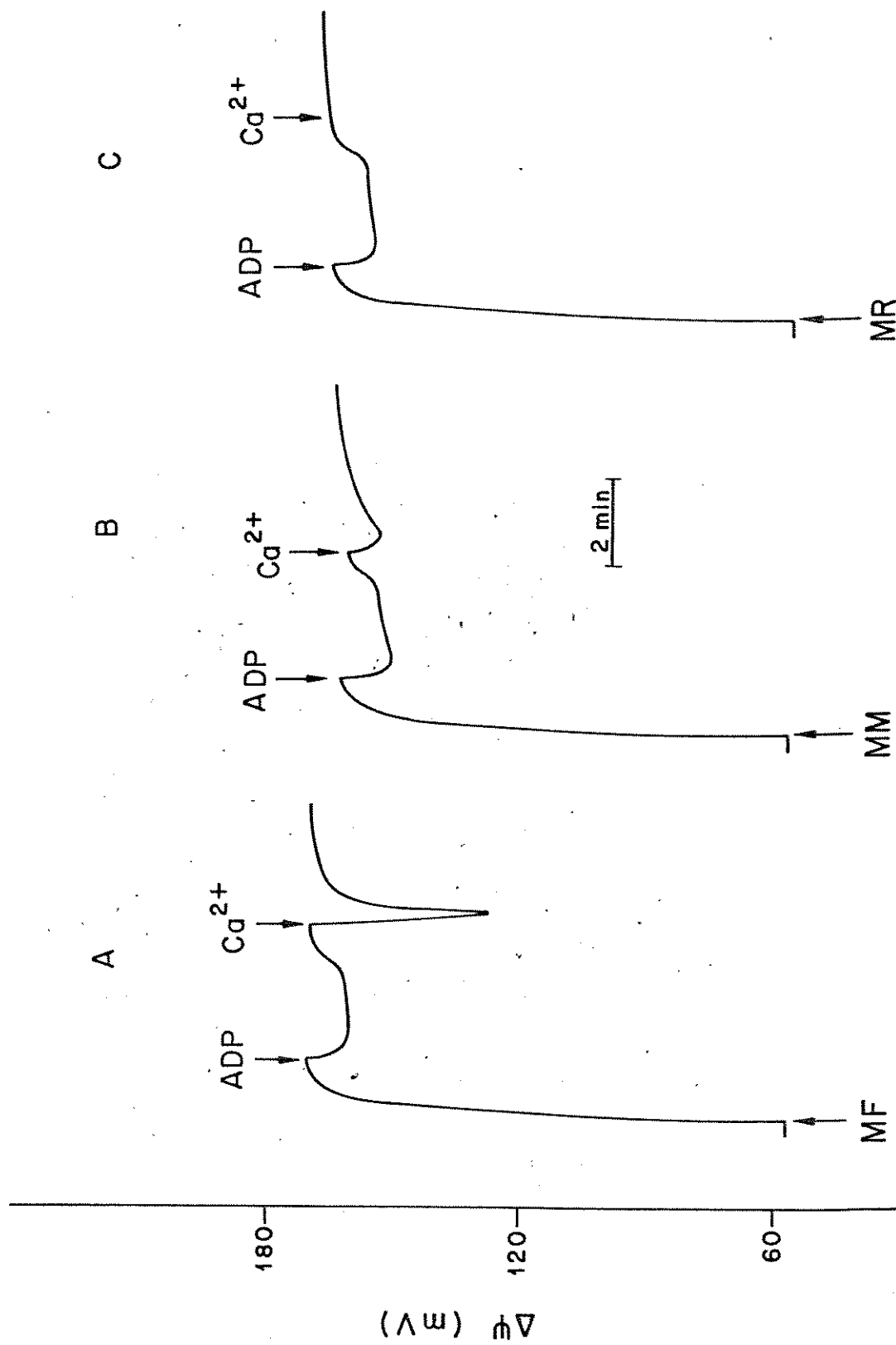
TABELA I. Controle respiratório e razão ADP/O de mitocôndrias de milho e repolho.*

tecido	substrato respiratório	Velocidade de consumo de O ₂		controle respiratório	razão ADP/O
		estado 3 (ng atom O ₂ .min ⁻¹ .mg ⁻¹)	estado 4 (ng atom O ₂ .min ⁻¹ .mg ⁻¹)		
Folhas de repolho	malato/glutamato	59,2	12,3	4,8	2,4
	succinato	126,8	31,7	4,0	1,7
Coleoptiles de <u>ml</u> lho	malato/glutamato	92,9	24,5	3,8	2,6
	succinato	149,7	46,4	3,2	1,7

* As reações foram iniciadas pelas adições de 1 mg de proteína mitocondrial a 2 ml do meio contendo malato/glutamato ou succinato/rotenona. Nestes experimentos a concentração de fosfato foi de 5 mM. ADP foi adicionado em pulsos de 200 nmoles. As taxas respiratórias foram obtidas a partir da segunda adição de ADP. As razões ADP/O foram calculadas a partir do consumo de oxigênio extra provocado pela adição do segundo pulso de ADP.

FIGURA 2. Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial pela técnica da safranina. A, Alterações na absorbância da safranina induzidas pelo potencial de difusão de potássio. B, Curva de calibração em função das variações de absorbância da safranina. Mitocôndrias de folhas de repolho (0,8mg/ml) foram suspensas em meio de reação sem KCl, acrescido de oligomicina (1 ug/mg proteína), safranina 10 μ M e valinomicina (38,5 ng/ml). Adições de KCl 0,65 mM e DNF 50 μ M foram feitas onde indicado. O potencial elétrico foi calculado de acordo com a equação de Nernst, como descrito em Material e Métodos.





um ionóforo para K^+ , induziu um aumento na diferença de absorbância do corante no par de comprimentos de onda de 511 e 533 nm (Figura 2A). Isto indica uma ligação das moléculas do corante na face interna da membrana interna mitocondrial (Colonna *et al.*, 1973; Akerman, 1978b; Zanotti & Azzone, 1980) e corresponde ao estabelecimento de um potencial de membrana (Akerman & Wikstrom, 1976). Adições sucessivas de íons K^+ , na presença de valinomicina, resultaram numa diminuição progressiva na absorbância da safranina (Figura 2A). O K^+ adicionado penetra na matriz mitocondrial neutralizando a carga interna negativa, causando assim uma diminuição na diferença de potencial elétrico da membrana. Como consequência, menos moléculas de safranina estarão ligadas à membrana. Uma relação linear foi obtida entre o grau de mudança espectral da safranina e o potencial de membrana induzido na faixa de 70 a 170 mV (Figura 2B). Observa-se que a intersecção ocorre num potencial de aproximadamente 70 mV. Este valor corresponde a um potencial de Donnan, independente de energia (Moore & Bonner, 1982) e está de acordo com os valores encontrados por Akerman & Wikstrom (1976) em mitocôndrias de fígado de rato.

3. EFEITO DE ADP E Ca^{2+} SOBRE $\Delta\psi$ EM DIFERENTES TIPOS DE MITOCÔNDRIAS.

A Figura 3 apresenta as alterações provocadas pelas adições de ADP e Ca^{2+} no potencial elétrico de membrana de mitocôndrias de fígado de rato, coleoptiles de milho e folhas de repolho. A adição de suspensão mitocondrial (0,8 mg/ml) ao meio de reação contendo succinato como substrato respiratório resultou em

FIGURA 3. Efeito de adições de ADP e Ca^{2+} sobre o potencial elétrico da membrana mitocondrial. A, Mitocôndrias de fígado de rato. B, Mitocôndrias de coleoptiles de milho. C, Mitocôndrias de folhas de repolho. As mitocôndrias (2 mg/2,5 ml) foram suspensas em meio de reação acrescido de safranina 10 μM . Adições de 300 nmoles de ADP e 600 nmoles de Ca^{2+} foram feitas onde indicado. As mitocôndrias de fígado eram incubadas em meio de reação contendo Mg^{2+} 2 mM e fosfato 1 mM.

uma rápida mudança espectral da safranina indicando estabelecimento do potencial de membrana. Com base na curva de calibração o potencial estabelecido foi da ordem de 170 mV para todas as espécies de mitocôndrias estudadas. A adição de ADP resultou numa rápida queda de cerca de 15 mV no potencial elétrico provocando a transição para o estado respiratório 3. O restabelecimento subsequente do potencial indica a volta ao estado 4. Esta alteração é consistente com a idéia de que a síntese de ATP utiliza a energia derivada da força próton motriz (Mitchell, 1966). Assim uma diminuição transitória do gradiente de prótons é observada durante o período de fosforilação do ADP adicionado. A volta aos valores iniciais permite a respiração retornar ao estado respiratório 4. A adição de 600 nmoles provocou uma queda no potencial elétrico de membrana de cerca de 30 mV em mitocôndrias de fígado de rato (Figura 3A) e de cerca de 10 mV em mitocôndrias de coleoptiles de milho (Figura 3B). No caso de mitocôndrias de folhas de repolho, não se observou queda no potencial elétrico pela adição de Ca^{2+} (Figura 3C). A queda no potencial de membrana de mitocôndrias de fígado e milho, pela adição de Ca^{2+} , sugere que o íon estaria sendo captado eletroforéticamente, ou seja, em resposta à carga elétrica da membrana, negativa internamente sendo o potencial restabelecido após a captação do Ca^{2+} adicionado. O resultado observado com mitocôndrias isoladas de repolho indica que estas preparações não tem a habilidade de captar Ca^{2+} em resposta ao potencial elétrico de membrana.

4. TRANSPORTE DE Ca^{2+} POR DIFERENTES TIPOS DE MITOCÔNDRIAS

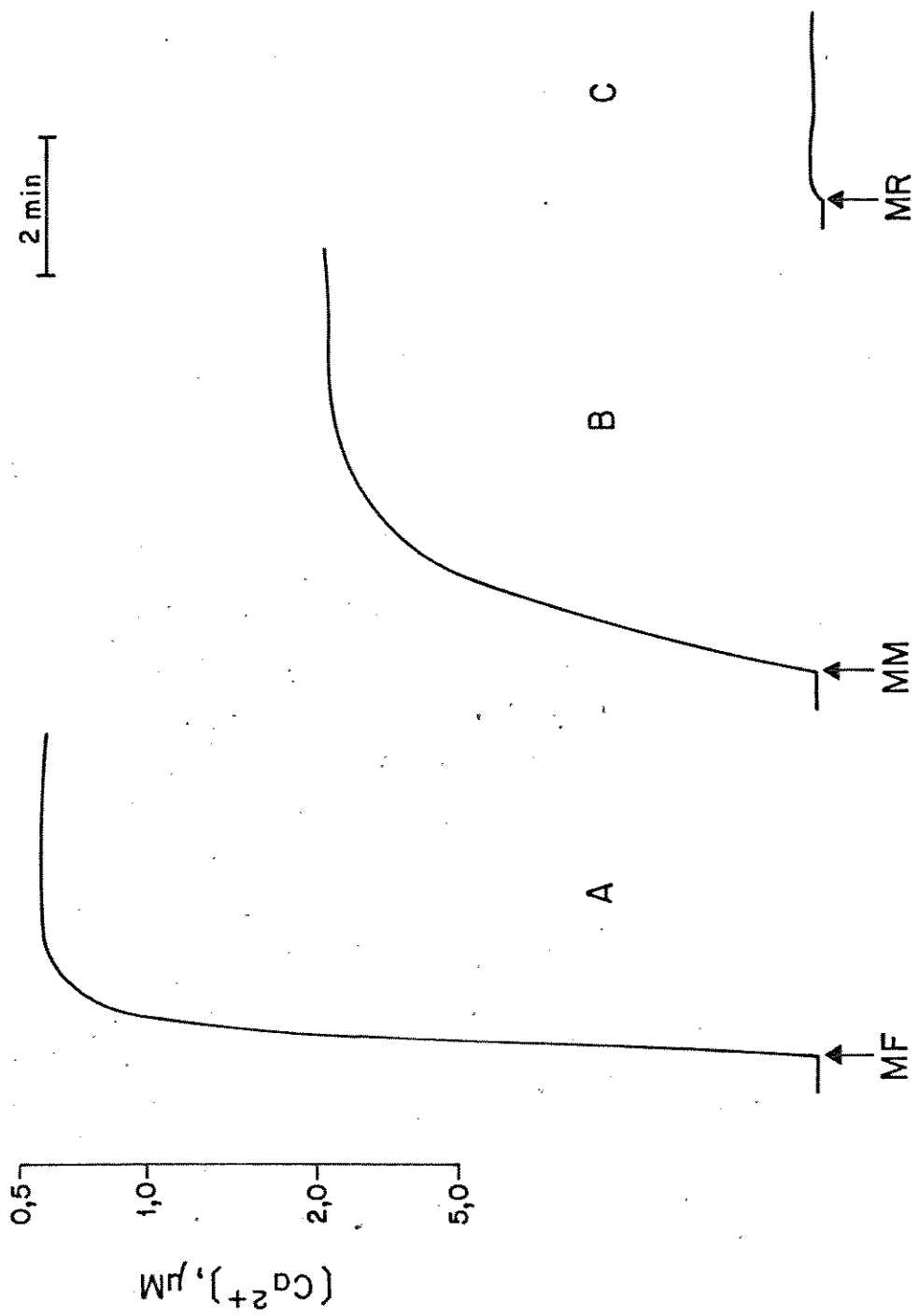
Os experimentos da Figura 4 comparam as habilidades de mitocôndrias de fígado de rato, coleoptiles de milho e folhas de repolho em captar e tamponar a concentração de Ca^{2+} externo. A Figura 4A mostra que a adição de mitocôndrias de fígado, a um meio aeróbico contendo succinato como substrato respiratório, resultou em uma rápida diminuição do Ca^{2+} livre do meio, até que uma concentração de Ca^{2+} externo na faixa de $0,5 \mu\text{M}$ foi alcançada e mantida, concordando com dados de literatura (Becker, 1980; Becker *et al.*, 1980; Pereira da Silva *et al.*, 1984; Nicchita & Williamson, 1984). A Figura 4B mostra que a adição de mitocôndrias de milho a um meio similar provocou uma captação de Ca^{2+} com uma menor velocidade sendo o "steady state" alcançado numa concentração de Ca^{2+} livre de $2 \mu\text{M}$. Mitocôndrias de repolho quando adicionadas ao meio de incubação não apresentaram captação de Ca^{2+} (Figura 4C). Deve ser enfatizado que este experimento foi repetido com diferentes preparações de mitocôndrias de repolho apresentando controles respiratórios de pelo menos 3,0.

5. TRANSPORTE DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS DE MILHO

5.1. Cinética de captação de Ca^{2+}

O transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de coleoptiles de milho foi inicialmente estudado utilizando-se eletrodo específico de Ca^{2+} , com a finalidade de serem obtidas

FIGURA 4. Resposta de diferentes tipos de mitocôndrias ao Ca^{2+} externo. A, Mitocôndrias de fígado de rato. B, Mitocôndrias de coleoptiles de milho. C, Mitocôndrias de folhas de repolho. As mitocôndrias foram suspensas em meio de reação contendo 65 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína.



informações quantitativas sobre as características cinéticas do processo de captação. A Figura 5A apresenta o gráfico das velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias energizadas com succinato, em função da concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação. Observa-se uma curva sigmoideal com uma velocidade máxima de captação em torno de 150 nmoles de Ca^{2+} . min^{-1} . mg^{-1} , para uma concentração de Ca^{2+} livre igual a 150 μM . Linearizando-se os dados da Figura 5A, através do Gráfico de Hill, obteve-se uma reta com inclinação n de 2,69 e um $K_{0,5}$ igual a 53,7 μM de Ca^{2+} livre (Figura 5B).

A cinética de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de coleoptiles de milho foi também estudada indiretamente utilizando-se eletrodo específico de H^+ (Figura 6). A velocidade máxima de ejeção de H^+ foi igual a 282 nmoles. min^{-1} . mg^{-1} para uma concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação da ordem de 150 μM (Figura 6A). A mesma cinética com comportamento sigmoideal foi observada obtendo-se um $K_{0,5}$ igual a 77,6 μM de Ca^{2+} livre e n igual a 2,65 (Figura 6B).

5.2. Efeito de Mg^{2+} e fosfato sobre o fluxo de Ca^{2+}

A presença de Mg^{2+} no meio de reação provocou uma diminuição na velocidade de captação de Ca^{2+} com um efeito máximo na presença de 4 mM de Mg^{2+} (Figura 7). Estes resultados, são semelhantes aos encontrados com mitocôndrias isoladas de coração de rato (Crompton *et al.*, 1976b).

Na ausência de fosfato exógeno, as mitocôndrias isoladas de raízes de milho apresentaram uma capacidade limitada

FIGURA 5. Cinética de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coleoptiles de milho, utilizando-se eletrodo específico de Ca^{2+} . A, Efeito da concentração de Ca^{2+} livre sobre a velocidade inicial de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias energizadas com succinato. As reações foram iniciadas pela adição de mitocôndrias (1,2 mg/ml) ao meio de reação. B, Gráfico de Hill obtido a partir da Figura 4A.

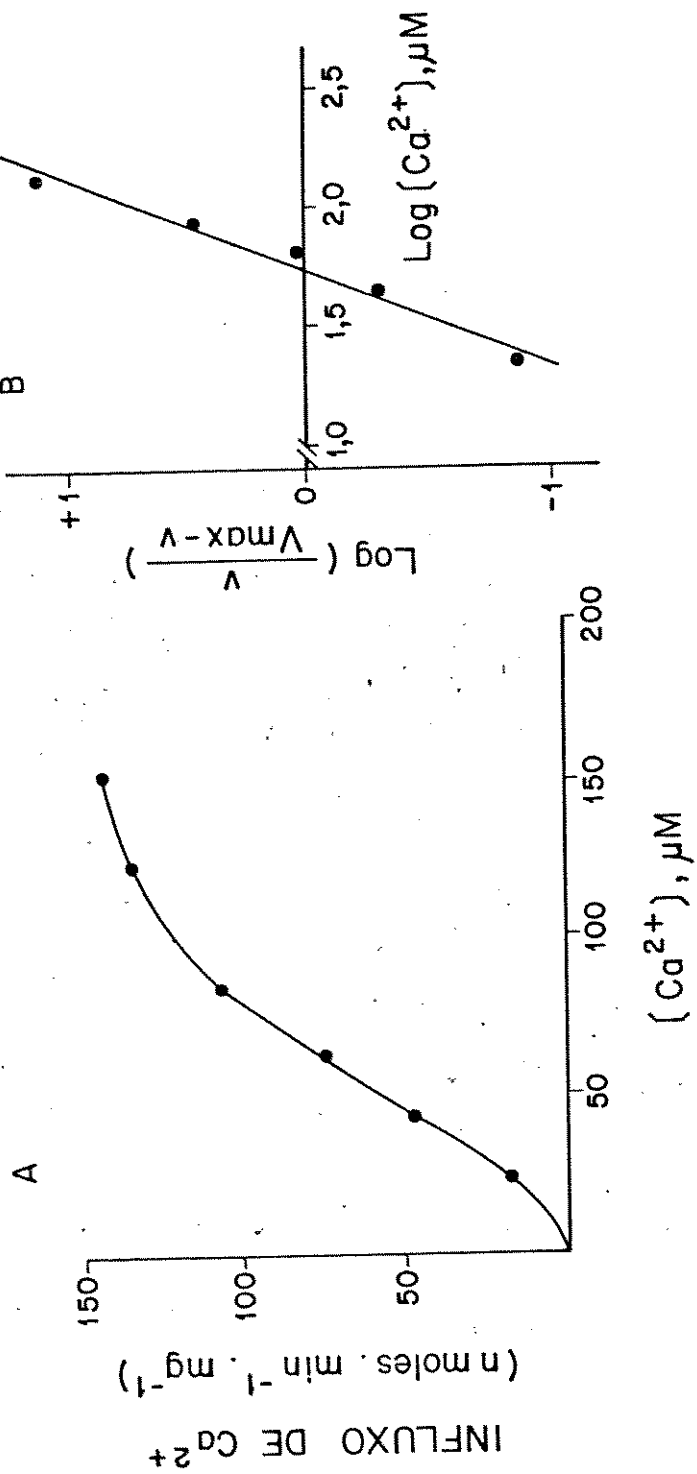


FIGURA 6 . Cinética de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coleoptiles de milho, determinada em função da ejeção de H^+ . A, Efeito da concentração de Ca^{2+} livre sobre a velocidade inicial de ejeção de H^+ por mitocôndrias energizadas com succinato. As reações foram iniciadas pela adição de mitocôndrias (1,4 mg/ml) ao meio de reação. B, Gráfico de Hill obtido a partir da Figura 5A.

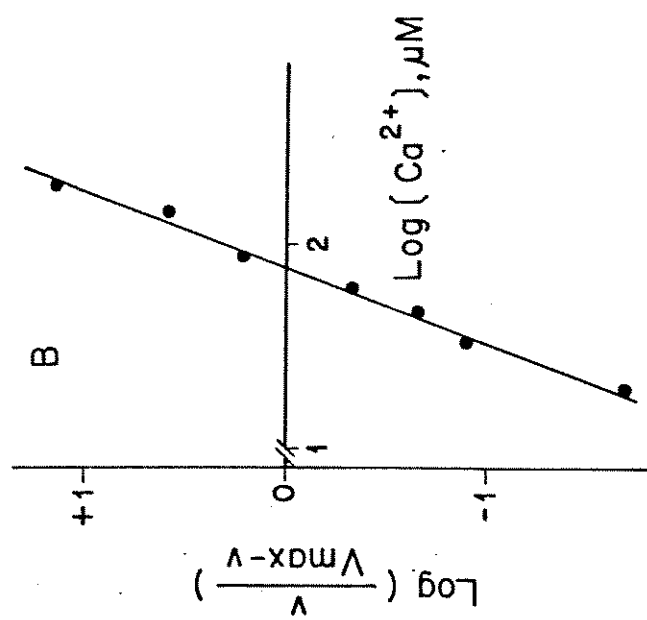
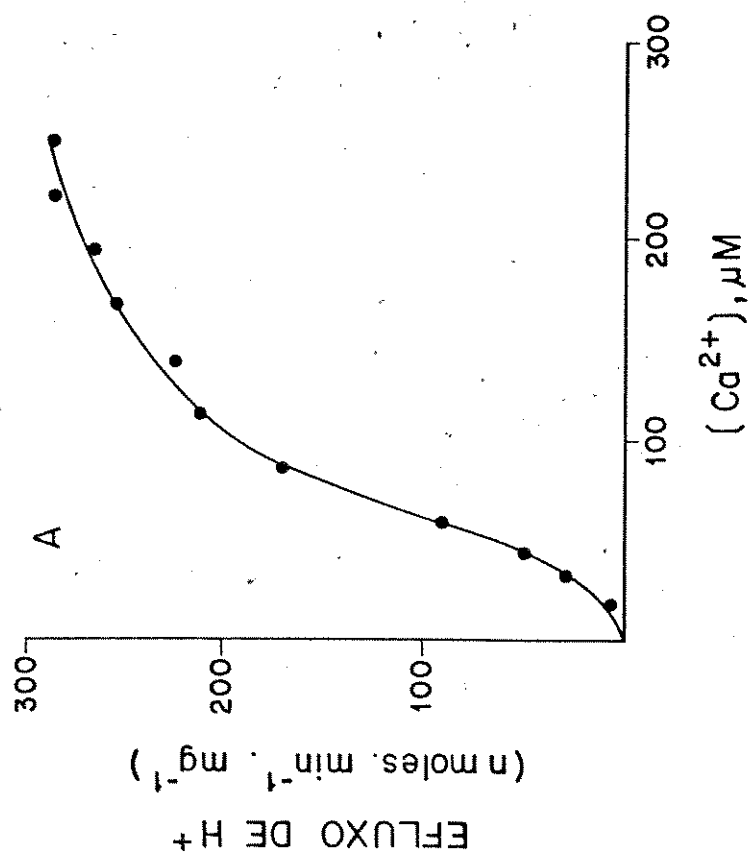
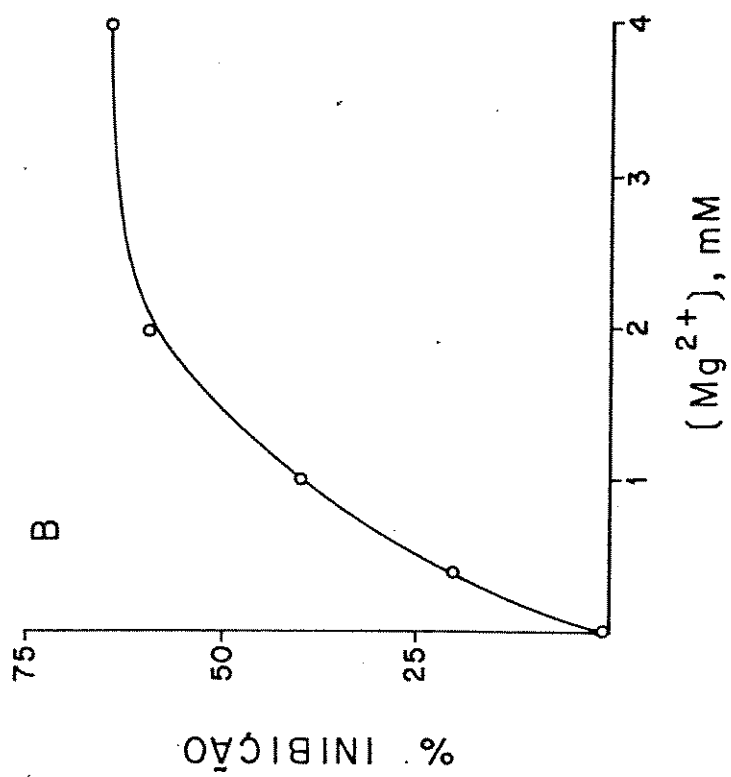
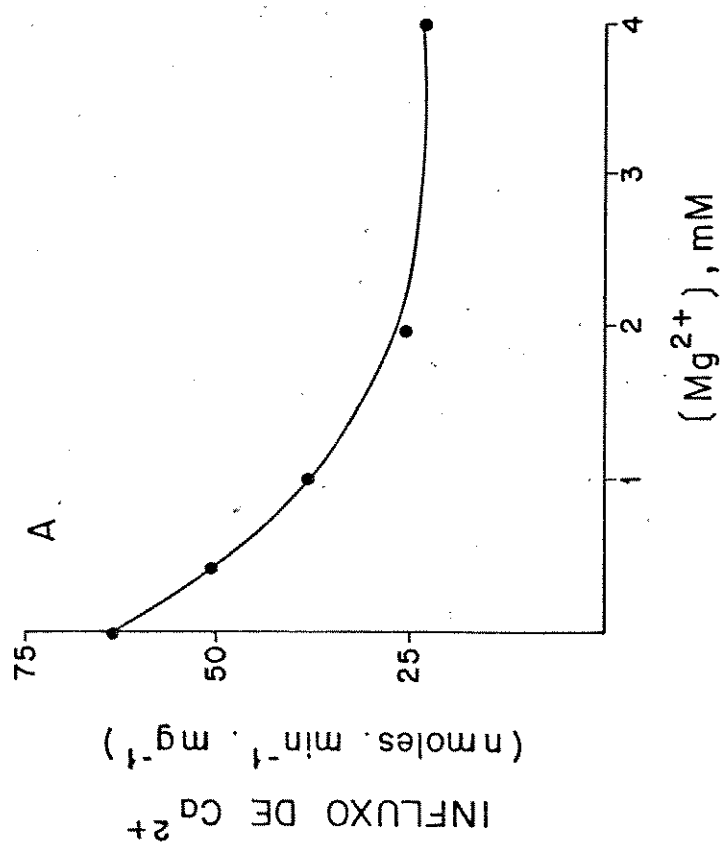


FIGURA 7. Inibição por Mg^{2+} da captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coleoptiles de milho. A, velocidade de captação de Ca^{2+} (80 μM) na presença de diferentes concentrações de Mg^{2+} . B, Porcentagem de inibição da captação de Ca^{2+} por Mg^{2+} calculada a partir dos dados obtidos em A. As reações foram iniciadas pelas adições de mitocôndrias (1,2 mg/ml).



de captação de Ca^{2+} (Figura 8). Com a adição de fosfato (2 e 5 mM) um grande incremento na captação foi observado (Figura 8). É interessante observar que na presença de alta concentração de fosfato (5mM) as mitocôndrias de milho foram capazes de reter o Ca^{2+} acumulado, em contraste com o comportamento de mitocôndrias de fígado de rato que liberam todo o Ca^{2+} captado nestas condições (Figura 9).

5.3. Efeito de inibidores e desacopladores sobre o transporte de Ca^{2+}

Adições de Antimicina-A (4 μM), DNF (100 μM) ou vermelho de rutênio (10 μM) após as mitocôndrias de milho terem acumulado Ca^{2+} do meio de reação, provocaram uma liberação do Ca^{2+} captado (Figura 10). Controles com mitocôndrias de fígado de rato apresentaram a mesma resposta à Antimicina-A e DNF. As mitocôndrias de milho, no entanto, demonstraram uma menor sensibilidade a vermelho de rutênio. A velocidade máxima de efluxo de Ca^{2+} por mitocôndrias de milho foi observada com uma concentração bem maior do que a de 0,5 μM do inibidor, usada para mitocôndrias de fígado.

5.4. Comparação da habilidade de tamponamento do Ca^{2+} externo por mitocôndrias de milho e fígado.

Mitocôndrias de coleoptiles de milho foram capazes de captar Ca^{2+} do meio de reação tamponando o Ca^{2+} extramitochondrial na faixa de 2 μM (Figura 11). Nas mesmas condições, mito-

FIGURA 8. Efeito de fosfato sobre a captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de raízes de milho. As reações foram iniciadas pelas adições de mitocôndrias (1 mg/ml) aos meios de reação contendo 30 μM de Ca^{2+} livre, na ausência ou presença de fosfato exógeno 2 ou 5 mM conforme indicado.

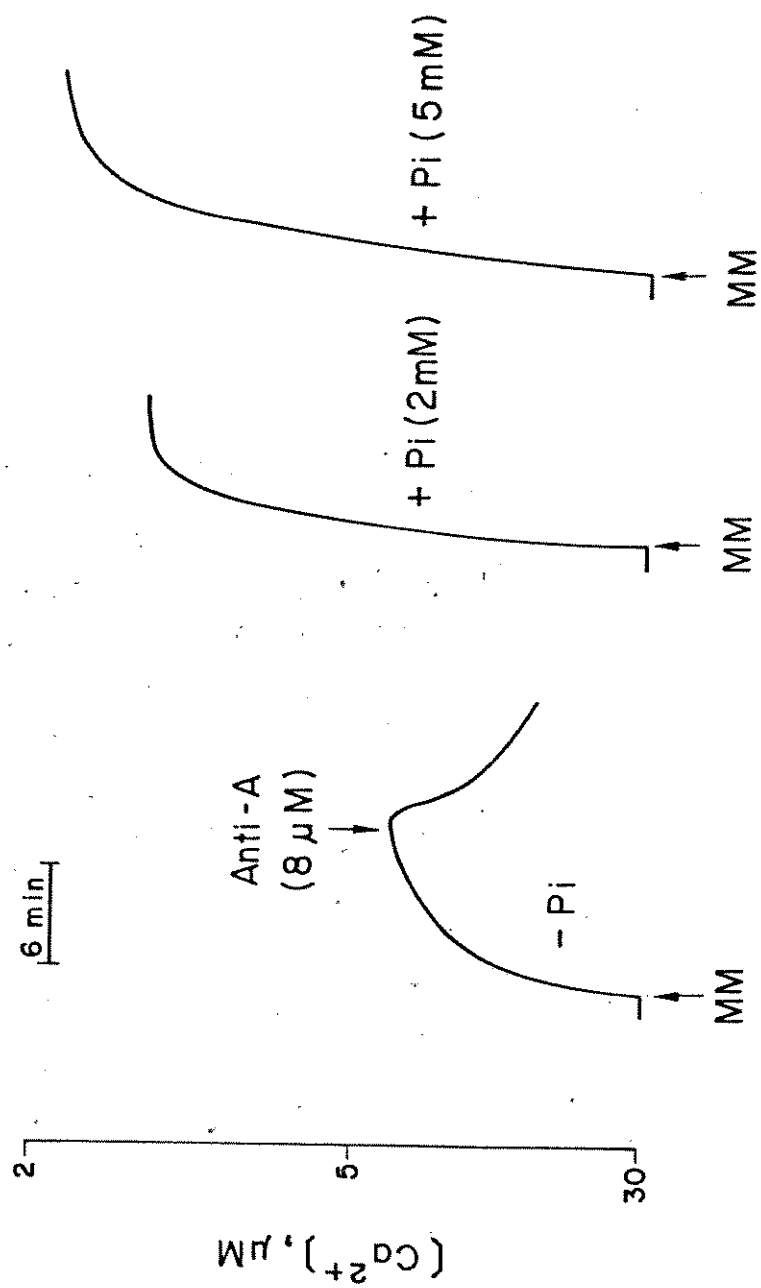


FIGURA 9. Habilidade de mitocôndrias de milho em reter Ca^{2+} na presença de alta concentração de fosfato. Mitocôndrias de coleoptiles de milho ou de fígado de rato (1,2 mg/ml) foram adicionadas aos meios de reação acrescidos de Mg^{2+} 1 mM; ADP 200 μM ; oligomicina (1,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$) e Ca^{2+} livre 100 μM na presença de 0,3 mM (...) ou 5 mM (—) de fosfato de potássio.

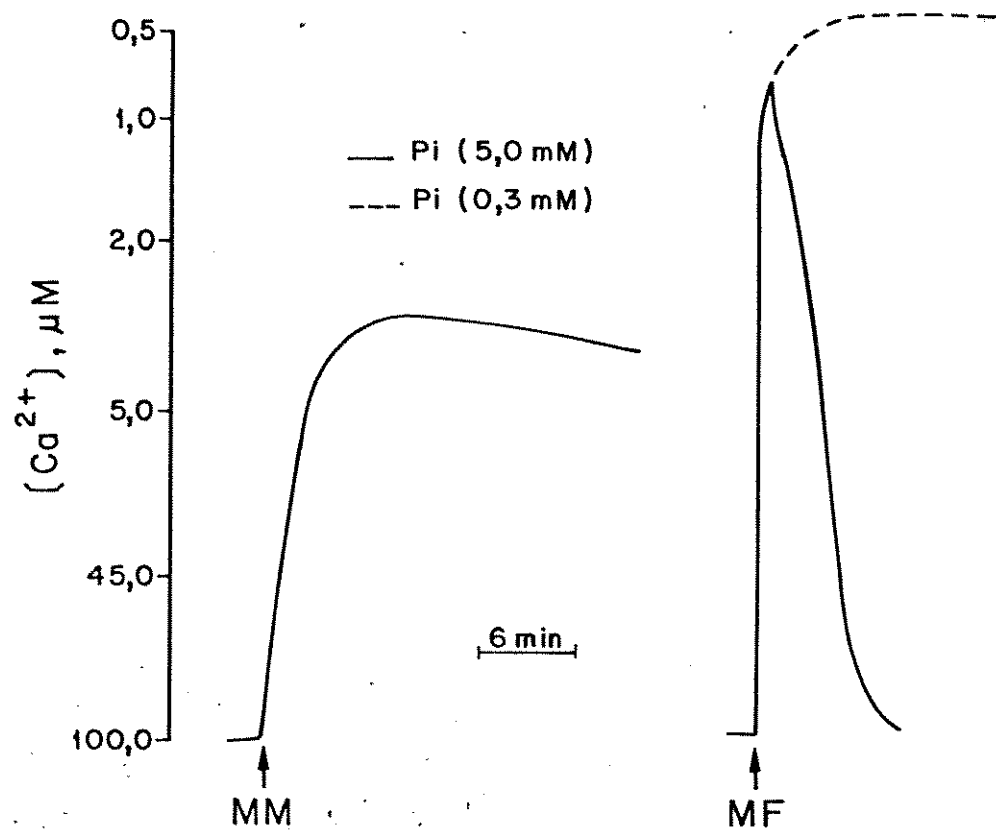


FIGURA 10. Efeito de Antimicina-A, dinitrofenol e vermelho de rutênio sobre o fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de milho. Mitocôndrias (2 mg/ml) de coleoptiles de milho ou fígado de rato foram incubadas na presença de fosfato 1 mM, Mg^{2+} 1 mM; ADP 200 μM ; oligomicina (1 $\mu\text{g}/\text{mg}$) e Ca^{2+} livre 40 μM . Adições de Antimicina-A 4 μM ; dinitrofenol 100 μM e vermelho de rutênio foram feitas onde indicado.

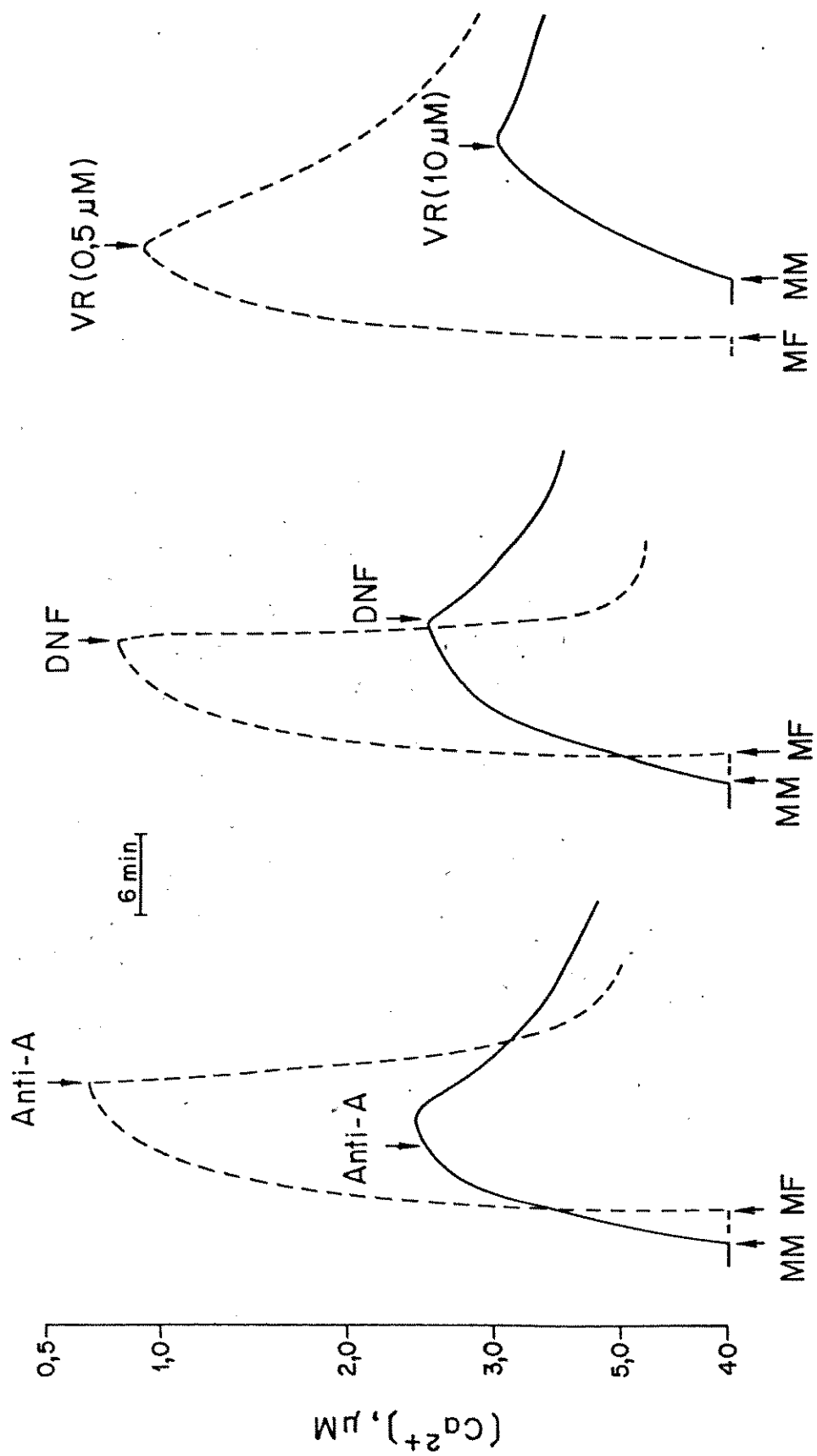
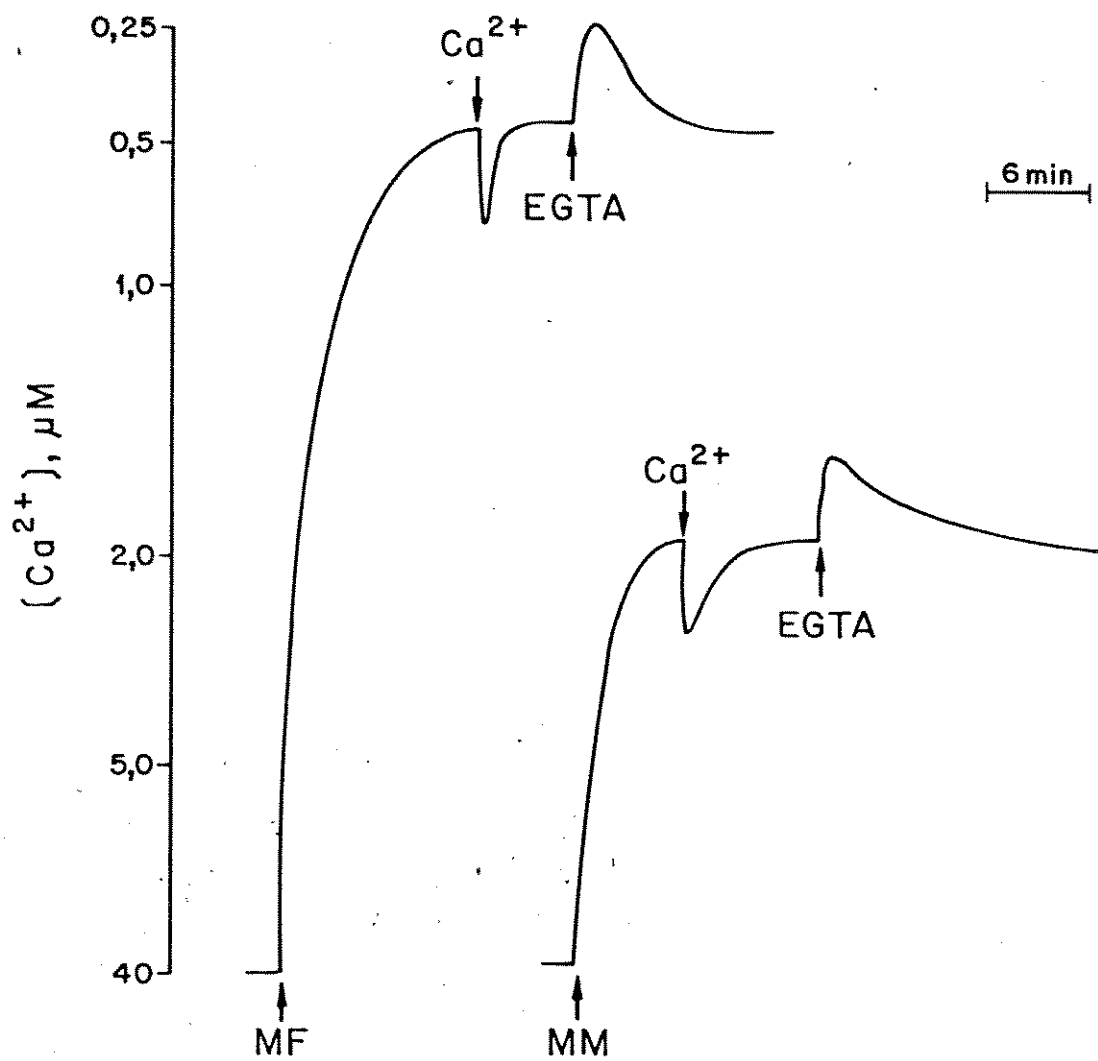


FIGURA 11. Características de tamponamento de Ca^{2+} externo por mitocôndrias de fígado de rato e coleoptiles de milho. Mitocôndrias (2 mg/ml) foram adicionadas aos meios de reação contendo 1 mM de fosfato e 40 μM de Ca^{2+} livre. Adições de Ca^{2+} 10 nmoles/mg) ou EGTA (10 nmoles/ml) foram feitas onde indicado.



côndrias de fígado mantêm o Ca^{2+} livre no meio de reação na faixa de $0,5 \mu\text{M}$. Uma vez atingido este equilíbrio ambos os tipos de mitocôndrias mantêm o tamponamento por vários minutos. Se durante este estado de equilíbrio forem feitas adições de Ca^{2+} ou EGTA observa-se uma captação ou liberação de Ca^{2+} , respectivamente, por ambos os tipos de mitocôndrias, até que os valores originais de Ca^{2+} livre nos meios de reação sejam restaurados (Figura 11). As respostas de mitocôndrias de milho a estas perturbações foram mais lentas do que as de mitocôndrias de fígado de rato. As mesmas respostas a perturbações no equilíbrio de tamponamento do Ca^{2+} extramitocondrial por adições de Ca^{2+} ou EGTA, foram também observadas utilizando-se mitocôndrias isoladas de raízes de milho (Figura 12). Quando as mitocôndrias de raízes de milho foram incubadas na presença de Mg^{2+} (1 mM) a velocidade de influxo de Ca^{2+} era muito menor e o "steady state" era atingido quando a concentração de Ca^{2+} externo era maior (cerca de $3,5 \mu\text{M}$) do que na ausência do íon (Figura 13). Uma outra observação importante é de que após a adição de EGTA nas condições de "steady state" o efluxo de Ca^{2+} era mais lento na presença de Mg^{2+} do que na sua ausência e a situação de equilíbrio era atingida em um valor de concentração de Ca^{2+} bem próximo ao original, fato que nem sempre acontece na ausência de Mg^{2+} principalmente após longos períodos de preincubação mitocondrial. Esta observação também é feita quando se trabalha com mitocôndrias hepáticas (Becker, 1980).

A Figura 14 mostra o efeito da concentração inicial de Ca^{2+} livre no meio de reação sobre a capacidade de tamponamento de Ca^{2+} externo por mitocôndrias isoladas de raízes de

FIGURA 12. Fluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de raízes de milho. Mitocôndrias (1 mg/ml) foram incubadas na presença de 1 mM de fosfato e 40 μM de Ca^{2+} livre. Adições de Ca^{2+} (10 nmoles/mg); EGTA (2 e 4 nmoles/mg respectivamente) e Antimicina-A 4 μM foram feitas onde indicado.

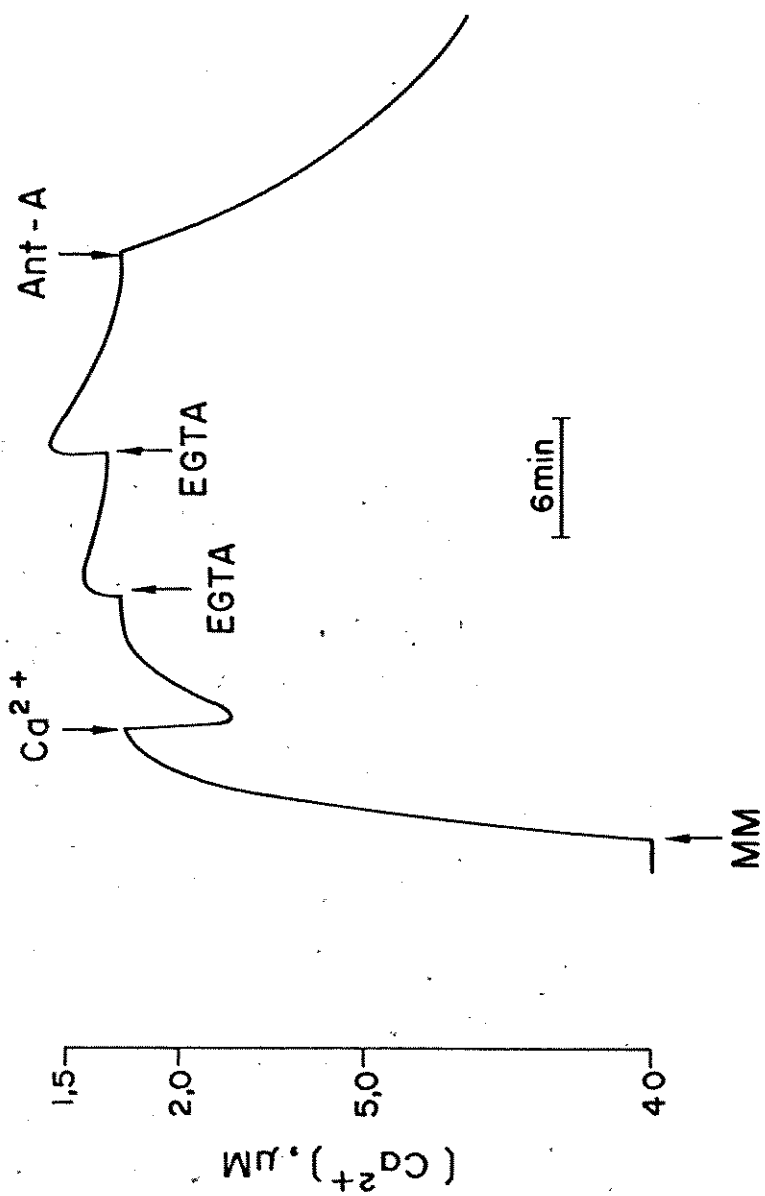


FIGURA 13. Efeito de Mg^{2+} sobre o tamponamento de Ca^{2+} livre extramitocondrial. Mitocôndrias de raízes de milho (1 mg/ml) foram incubadas com 17 μM de Ca^{2+} livre, na ausência (A) ou presença (B) de 1 mM de Mg^{2+} . Adições de Ca^{2+} (10 nmoles/mg) ou EGTA (8 nmoles/mg) foram feitas onde indicado.

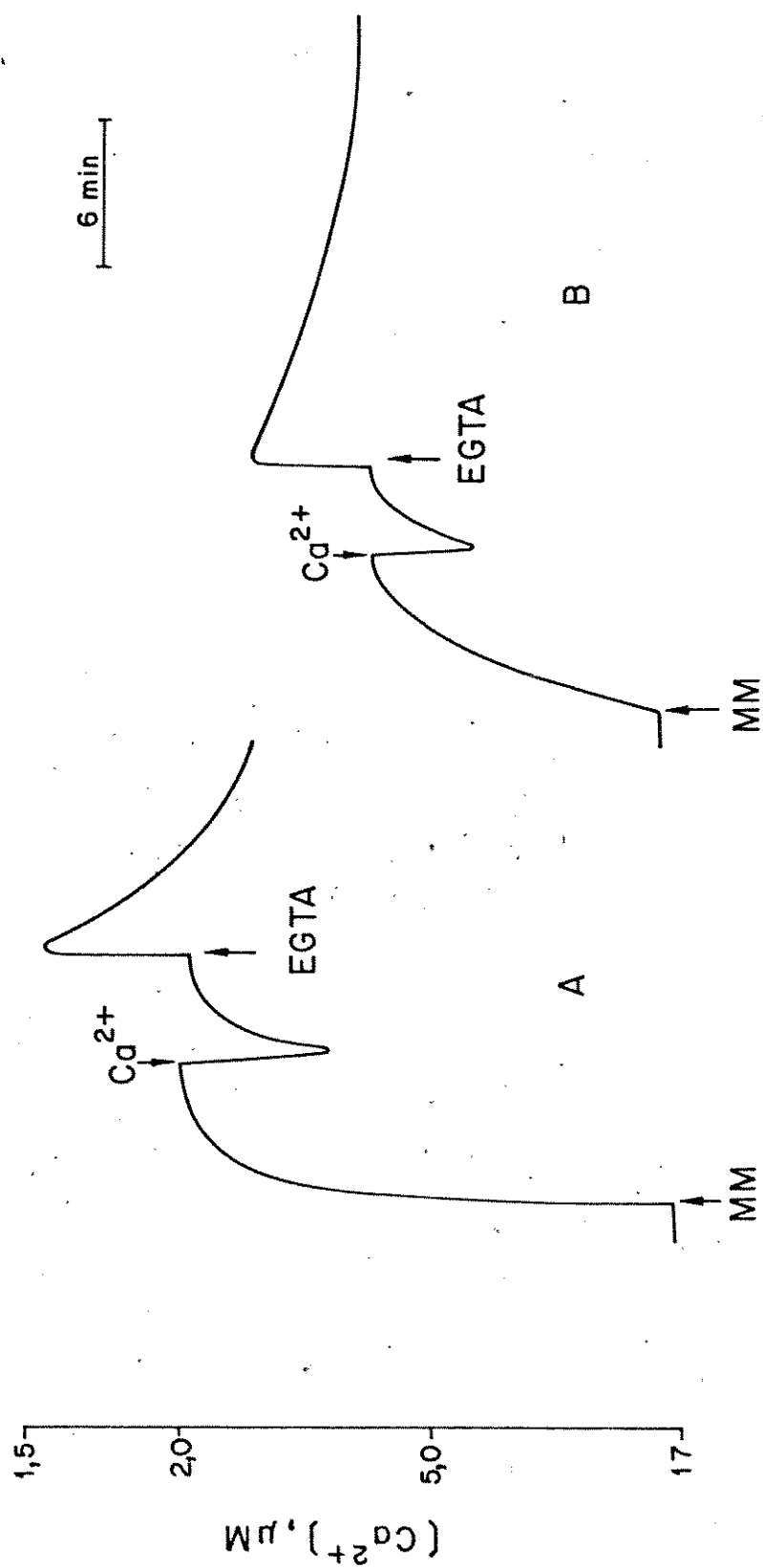
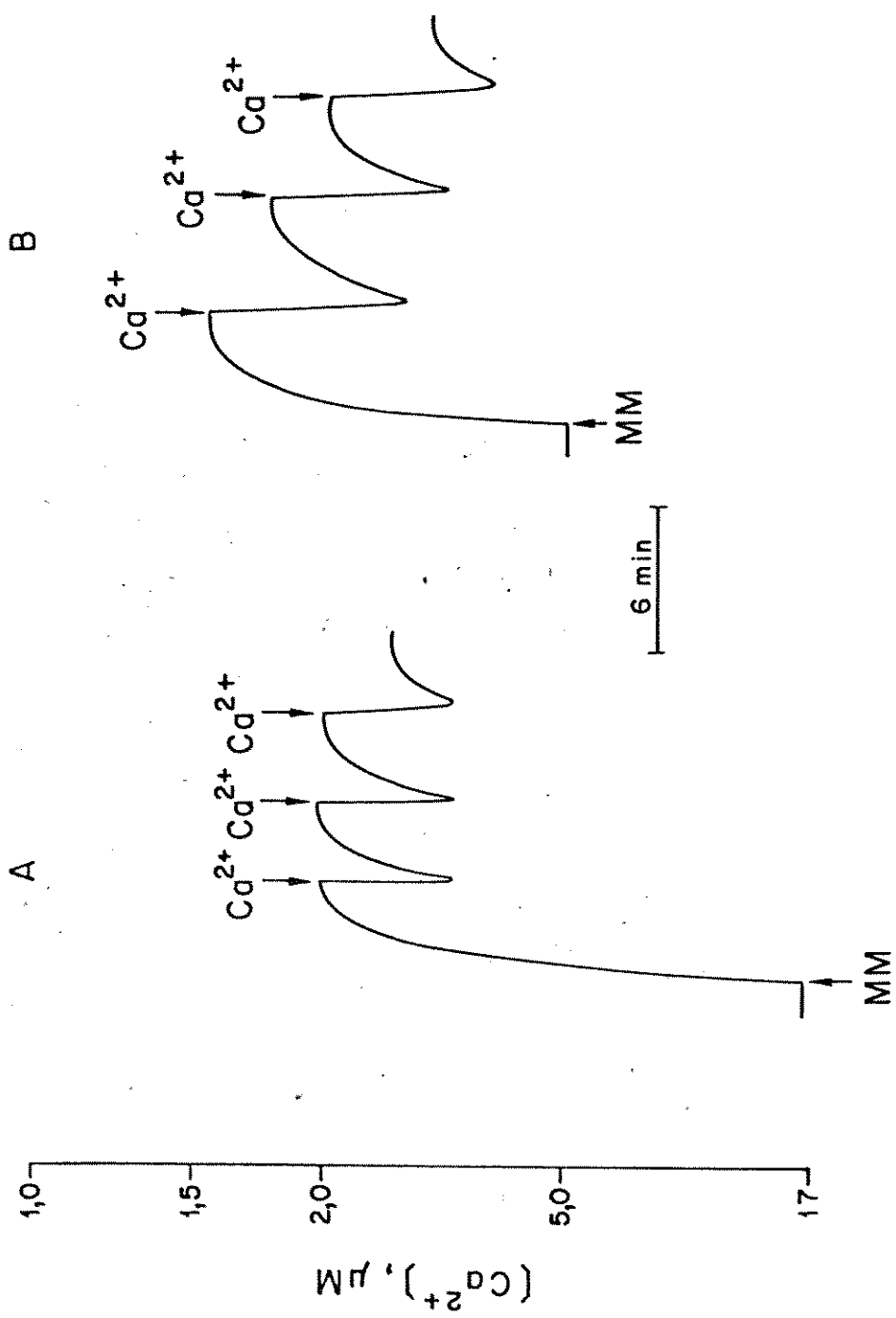


FIGURA 14 . Efeito de adições sucessivas de Ca^{2+} sobre a concentração de tamponamento de Ca^{2+} livre extramitocondrial em mitôcondrias isoladas de raízes de milho. Mitôcondrias (1 mg/ml) foram adicionadas aos meios de reação acrescidos de uma concentração de Ca^{2+} livre inicial de 17 μM (A) ou 5 μM (B). Adições de 10 nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína foram feitas onde indicado.



milho. Mitocôndrias incubadas na presença de $17\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} livre foram capazes de captar o íon atingindo o equilíbrio de tamponamento a uma concentração de Ca^{2+} externo próxima de $2\ \mu\text{M}$. Pode-se observar que esta concentração de Ca^{2+} externo livre foi mantida relativamente constante após duas edições de $10\ \text{nmoles}$ de Ca^{2+} /mg de proteína (Figura 14A). Porém, quando as mesmas adições de Ca^{2+} foram feitas a mitocôndrias incubadas na presença de uma concentração de Ca^{2+} livre da ordem de $5\ \mu\text{M}$ a situação de "steady state" foi alcançada em concentrações de Ca^{2+} próximas de $1,5\ \mu\text{M}$ havendo um aumento progressivo na concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial a cada adição de Ca^{2+} extra (Figura 14B). É importante enfatizar que as mitocôndrias utilizadas nestes experimentos continham cerca de $3\ \text{nmoles}$ de Ca^{2+} endógeno por mg de proteína determinado através de absorção atômica.

IV. DISCUSSÃO

A captação de Ca^{2+} por mitocôndrias ocorre por um mecanismo eletroforético, em resposta ao potencial elétrico de membrana. Assim, a obtenção de mitocôndrias acopladas é uma condição essencial para o estudo deste processo. Em células vegetais a existência da parede celular e de vacúolos ácidos contribuem para o baixo rendimento e dificuldade na obtenção de mitocôndrias integras. Além disto, quando se trabalha com tecidos fotossintetisantes existe a dificuldade em se separar as membranas tilacóides da fração mitocondrial. Talvez estas se - jã algumas das razões pelas quais muito pouco tem sido publi- cado sobre o transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias vegetais.

Para se estudar o transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias vegetais procurou-se , numa primeira etapa deste trabalho, es- tabelecer uma metodologia para o isolamento de mitocôndrias acopladas. Visando eliminar o problema de contaminação da fra- ção mitocondrial por membranas tilacóides utilizou-se material vegetal não fotossintetisante. Como primeira escolha utiliza - mos folhas brancas de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) pela facilidade de obtenção do material. Como as mitocôndrias isoladas deste tecido não se mostraram capazes de captar Ca^{2+} passamos então a utilizar tecidos de milho (*Zea mays* Maia/Nor- mal), uma espécie filogeneticamente distante do repolho. O iso- lamento de mitocôndrias por tratamento com ultrassom permitiu a obtenção de suspensões mitocondriais acopladas e com boa capa- cidade fosforilativa. Mitocôndrias vegetais normalmente apre - sentam controles respiratórios em torno de 2 quando são energiu

zadas com succinato (Chen & Lehninger, 1973; Moore & Bonner, 1977). A razão ADP/O calculada com base no consumo extra de oxigênio, causado pela adição de ADP, se aproximou dos valores teóricos esperados de 3 para a oxidação de malato/glutamato e 2 para a oxidação de succinato (Tabela I). O potencial elétrico de membrana desenvolvido por estas mitocôndrias foi comparável ao de mitocôndrias de fígado de rato (Figura 3).

Segundo Mitchell (1966) durante a síntese de ATP o gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_{H^+}$) está diminuído pois a síntese é impulsionada de alguma maneira pela entrada de prótons no interior da mitocôndria resultando em uma queda no potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) e no gradiente químico de prótons (ΔpH). A adição de ADP a suspensões de mitocôndrias de folhas de repolho ou coleoptiles de milho provocou uma queda no valor de $\Delta\psi$ (Figura 2), confirmando a capacidade fosforilativa destas preparações. Testou-se então a capacidade destas preparações em captar Ca^{2+} do meio de incubação. Mitocôndrias de folhas de repolho não apresentaram captação de Ca^{2+} (Figura 4) mesmo utilizando-se concentrações da ordem de 1 mM de Ca^{2+} no meio de reação (dados não apresentados). Ao contrário, mitocôndrias de coleoptiles de milho captaram Ca^{2+} do meio de reação tornando o mesmo numa concentração maior que mitocôndrias de fígado de rato (Figura 4). Observa-se assim uma diferença marcante na propriedade de captação de Ca^{2+} entre as mitocôndrias estudadas, uma vez que mitocôndrias de repolho parecem não conter o transportador do íon enquanto que as de milho o transportam, porém com uma velocidade menor que mitocôndrias de fígado de rato, aqui usadas para comparação, uma vez que são as melhores caracterizadas quanto a estas propriedades. Não se pode deixar de considerar entretanto, até que ponto a idade fisiológica do te-

cido seria responsável por estas diferenças, uma vez que as folhas de repolho eram coletadas de plantas já desenvolvidas enquanto que as de milho eram obtidas a partir de tecidos recém germinados.

Os resultados observados nos experimentos onde foram feitas adições de Ca^{2+} a estes três tipos de mitocôndrias enquanto seus potenciais de membrana eram monitorados através da safranina estão de pleno acordo com aqueles da Figura 4. Assim, a menor queda no potencial elétrico de membrana causada pela adição de Ca^{2+} em mitocôndrias de coleoptiles de milho do que nas de fígado de rato refletem uma menor atividade da via de influxo nas mitocôndrias de milho. Este resultado está de acordo também com os dados de literatura mostrando que a adição de Ca^{2+} a preparações de mitocôndrias de coleoptiles de milho causam pequeno aumento na velocidade de respiração (Earnshaw *et al.*, 1973). Isto é explicado pelo fato de que se a V_{max} de captação do íon é baixa, também será pequeno o incremento na velocidade de consumo de O_2 para repor o valor de $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ utilizado no transporte. A ausência de resposta do potencial de membrana à adição de Ca^{2+} a mitocôndrias de folhas de repolho confirmam os resultados da Figura 4 sugerindo que estas mitocôndrias não possuem o sistema de transporte eletroforético de Ca^{2+} .

Informações quantitativas sobre o transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias de coleoptiles de milho puderam ser monitoradas utilizando-se eletrodo específico de Ca^{2+} . Quando estas foram incubadas na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} o gráfico das velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} em função da concentração do íon apresentou uma curva sigmoidal (Figura 5), indicando que a atividade do "uniporter" não aumenta de uma forma linearmente propor

cional à concentração de Ca^{2+} livre. O coeficiente de Hill calculado foi igual a 2,69 sugerindo a existência de pelo menos dois sítios de ligação de Ca^{2+} na membrana interna da mitocôndria. O valor de $K_{0,5}$ representa a concentração livre do íon quando metade dos sítios do transportador estão ligados. O tipo de cinética obtido sugere que estes sítios ligariam Ca^{2+} com diferentes afinidades.

Uma vez que existe uma estequiometria definida entre a captação de Ca^{2+} e a ejeção de H^+ (Lehninger *et al.*, 1978a) a cinética de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de coleoptiles de milho foi também estudada utilizando-se eletrodo específico de H^+ (Figura 6). Neste sistema os valores de $K_{0,5}$ e coeficiente de Hill foram próximos aos encontrados utilizando-se eletrodo de Ca^{2+} . Os resultados cinéticos obtidos através das duas técnicas diferentes sugerem uma estequiometria de próton ejetado por Ca^{2+} captado próximo de $2 \text{ H}^+ / 1 \text{ Ca}^{2+}$, nas nossas condições experimentais. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para mitocôndrias de fígado de rato (Lehninger *et al.*, 1978a) e contrariam os resultados com mitocôndrias de milho indicando que o Ca^{2+} entraria em co-transporte com fosfato levando apenas uma carga positiva (Earnshaw *et al.*, Day *et al.*, 1978).

A afinidade do "uniporter" por Ca^{2+} em mitocôndrias de milho mostrou-se consideravelmente menor quando comparada com mitocôndrias animais. Dados de literatura mostram um K_m aparente em torno de $5 \mu\text{M}$ tanto para mitocôndrias de coração (Crompton *et al.*, 1976b) quanto para mitocôndrias de fígado de rato (Carafoli & Azzi, 1972). Para mitocôndrias animais a determinação de $K_{0,5}$ é de pouca importância quando a energização

das mitocôndrias é feita com substratos respiratórios uma vez que a V_{max} para o "uniporter" é limitada pela capacidade da cadeia respiratória. No caso de mitocôndrias de coleoptiles de milho, onde a atividade do "uniporter" é cerca de seis vezes mais baixa que em mitocôndrias de fígado, isto não acontece e a V_{max} observada nas nossas condições reflete uma saturação do mesmo, o que torna válido nosso cálculo de $K_{0,5}$.

Fukumoto & Nagai (1982) estudando o transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de frutos de maçã encontraram uma curva sigmoidal quando a atividade da via de influxo era graficada em função das concentrações de Ca^{2+} total do meio de reação, com um K_m aparente de 350 μM . Nestes estudos foram utilizadas mitocôndrias de maçã com controle respiratório de apenas 1,7 além do que a quelação de Ca^{2+} pelos componentes do meio de incubação parece não ter sido considerada. Acredita-se que o uso de mitocôndrias com maior capacidade fosforilativa pudesse fornecer parâmetros cinéticos mais acurados. Os valores de $K_{0,5}$ encontrados na literatura para mitocôndrias animais variam de 10^{-6} a 10^{-4} M (Bygrave, 1977; Carafoli & Crompton, 1978; Saris & Akerman, 1980) porém geralmente os valores mais elevados são expressos em termos de concentração de Ca^{2+} total, negligenciando-se os efeitos da quelação. Nas condições por nós adotadas para se estudar o transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias de milho houve 40% de quelação do Ca^{2+} adicionado. Este valor foi considerado para se calcular a concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação.

Mitocôndrias de raízes de milho apresentaram uma capacidade limitada para a captação de Ca^{2+} na ausência de fosfato exógeno (Figura 8). Esta limitação certamente ocorre em fun

ção da despolarização da membrana uma vez que o acúmulo de Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial converte $\Delta\psi$ em ΔpH que limita a atividade respiratória da mitocôndria. Maior captação de Ca^{2+} ocorreu na presença deste ânion (Figura 8), que é transportado para o interior da mitocôndria em co-transporte com H^+ (ou em troca por OH^-). O co-transporte com H^+ dissipa o ΔpH e permite a restauração de $\Delta\psi$ pela cadeia respiratória.

Como o Ca^{2+} mitocondrial, dentro de certos limites, está em equilíbrio com o potencial elétrico de membrana, qualquer fator capaz de dissipar o $\Delta\psi$, induz efluxo de Ca^{2+} mitocondrial através do reverso da via de influxo eletroforética. Assim, quando a captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coleoptiles ou raízes de milho foi energizada pela respiração, seu efluxo pode ser induzido por Antimicina-A (Figuras 8, 10, 12), um inibidor do transporte de elétrons ou por DNF, desacoplador da fosforilação oxidativa que dissipa $\Delta\mu\text{H}^+$ devido a sua propriedade de funcionar especificamente como um protonôforo (Figura 10).

Quando mitocôndrias isoladas de coleoptiles de milho foram incubadas na presença de $40\text{ }\mu\text{M}$ de Ca^{2+} livre observou-se uma diminuição do Ca^{2+} do meio de reação até se atingir uma concentração de "steady state" na faixa de $2\text{ }\mu\text{M}$ (Figura 11). Neste ponto a atividade de via de influxo estaria decrescida o suficiente para ser balanceada pela atividade da via de efluxo. Sabe-se que este ponto de equilíbrio estacionário entre as velocidades de influxo e efluxo depende de uma série de efeitos que as condições de incubação tem sobre as cinéticas das duas vias, estando na faixa de $0,3$ a $3\text{ }\mu\text{M}$ para mitocôndrias animais (Nicholls, 1978a; Affolter & Sigel, 1979; Nicholls & Scott, 1980; Becker ,

1980; Becker *et al.*, 1980; Brand & DeSelincourt, 1980). Uma vez atingida a situação de "steady state" as mitocôndrias de coleoptiles de milho foram capazes de responder a perturbações de maneira semelhante a mitocôndrias de fígado de rato (Figura 11). Assim, um aumento na concentração de Ca^{2+} extramitocondrial, provocado pela adição de Ca^{2+} exógeno induziu uma maior atividade da via de influxo que passou a operar mais rapidamente que a via de efluxo restaurando a concentração de Ca^{2+} ao nível inicial. Ao contrário, quando se utilizou EGTA, para diminuir a concentração de Ca^{2+} extramitocondrial, a via de influxo tornou-se mais lenta que a via de efluxo observando-se um efluxo líquido de Ca^{2+} até que o "steady state" fosse novamente atingido (Figura 11). Estas respostas às variações nas concentrações de Ca^{2+} extramitocondrial quando a mitocôndria atingiu o "steady state" são interpretadas como devido a alterações na atividade do "uniporter" pois nas nossas condições de incubação (presença de fosfato (1 mM) e Ca^{2+} (40 μM) relativamente altos no início do experimento) a via de efluxo estaria saturada devido a altas concentrações de Ca^{2+} na matriz mitocondrial e assim atuando na sua velocidade máxima (Nicholls & Akerman, 1982). Os resultados experimentais obtidos com mitocôndrias de coleoptiles ou raízes de milho são compatíveis com o modelo aceito para mitocôndrias animais no qual a distribuição de Ca^{2+} nas condições de "steady state" é definida em termos cinéticos pela operação simultânea de duas vias separadas catalisando o influxo e o efluxo através da membrana mitocondrial interna. Uma característica da mitocôndria de milho que a difere da mitocôndria de fígado de rato é a resposta mais lenta da primeira a perturbações na concentra -

ção de Ca^{2+} livre extramitocondrial após o "steady state" ter sido atingido. Isto é interpretado em função da menor atividade do "uniporter" em mitocôndria de milho, como observado em seu estudo cinético.

A capacidade de tamponamento do Ca^{2+} externo bem como o restabelecimento deste equilíbrio após perturbações com Ca^{2+} ou EGTA também foram observadas utilizando-se mitocôndrias isoladas de raízes de milho (Figura 12). Estes resultados contrariam dados anteriores da literatura (Dieter & Marmê, 1980a) que mostraram que mitocôndrias isoladas deste tipo de tecido não tem capacidade de captar Ca^{2+} . Na verdade não foi observada nenhuma diferença entre mitocôndrias isoladas de coleoptiles ou de raízes de milho quanto às características do transporte Ca^{2+} .

Como acontece no caso de mitocôndrias animais e principalmente em mitocôndrias de coração de rato (Crompton *et al.*, 1976b) o Mg^{2+} causou uma importante inibição na velocidade de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de milho (Figura 7) e um aumento na concentração de Ca^{2+} extramitocondrial nas condições de "steady state" (Figura 13). O aumento na concentração de Ca^{2+} externo nas condições de "steady state" é explicado em função da inibição da via de influxo (Becker, 1980) uma vez que, como discutido anteriormente, esta situação de equilíbrio resulta de uma condição em que as velocidades de influxo e efluxo de Ca^{2+} são iguais. Assim, a diminuição na velocidade de influxo determina esta mudança observada na Figura 13A. Além disso o Mg^{2+} externo parece também apresentar efeito estabilizante sobre a membrana mitocondrial uma vez que após a adição de EGTA o equilíbrio se estabelece e se mantém exatamente no ponto ante

rior (Figura 13B).

Quando mitocôndrias de raízes de milho foram incubadas na presença de $5\text{ }\mu\text{M}$ de Ca^{2+} livre o "steady state" foi alcançado numa concentração de Ca^{2+} livre menor que $2\text{ }\mu\text{M}$. Adições posteriores de pequenas quantidades de Ca^{2+} provocaram um aumento consecutivo nas concentrações de Ca^{2+} extramitocondrial (Figura 14A). No início do experimento o conteúdo de Ca^{2+} intramitocondrial seria insuficiente para provocar a velocidade máxima da via de efluxo, uma vez que o Ca^{2+} total acumulado nesta situação é de cerca de 8 a 10 nmoles/mg de proteína, determinado através de absorção atômica. Adições de Ca^{2+} externo provocariam um aumento do Ca^{2+} intramitocondrial estimulando a via de efluxo até que esta atinja a saturação. Neste ponto, quando a velocidade máxima de efluxo é balanceada pelo influxo, a concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial é igual a $2\text{ }\mu\text{M}$. Joseph *et al.* (1983) trabalhando com mitocôndrias de fígado de rato observaram que nas condições de "steady state" a concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial foi essencialmente independente do conteúdo de Ca^{2+} intramitocondrial acima de 4 nmoles/mg de proteína. Abaixo deste valor, uma diminuição no conteúdo de Ca^{2+} intramitocondrial foi acompanhada por um decréscimo na concentração de Ca^{2+} livre extramitocondrial.

Apesar de nossos estudos envolverem a utilização de apenas duas espécies de vegetais os resultados sugerem que no reino vegetal as propriedades de transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias variam amplamente uma vez que as mitocôndrias aqui estudadas, ou são totalmente incapazes em transportar o íon, ou apresentam um sistema que apesar de menos ativo é tão evoluído

quanto ao de mitocôndrias hepáticas, apresentando duas vias in dependentes de influxo e efluxo de Ca^{2+} . A concentração em que mitocôndrias de coleoptiles ou raízes de milho tamponam o Ca^{2+} externo livre é relativamente maior quando comparada com mitocôndrias de fígado de rato. Entretanto, os dados não descartam a importância destas mitocôndrias em tamponar a concentração de Ca^{2+} citoplasmático livre uma vez que, até o presente, não foi determinada a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma de células vegetais. Pode também ser possível que a inclusão de algum componente citosólico ainda desconhecido ao meio de reação alteraria o valor do "steady state" para uma concentração de Ca^{2+} menor, como recentemente mostrado com espermina, no caso de mitocôndrias de fígado de rato (Nicchita & Williamson, 1984).

V. RESUMO

Mitocôndrias acopladas isoladas de folhas brancas de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) apresentaram-se in capazes de captar Ca^{2+} quando energizadas por respiração, em con traste com mitocôndrias isoladas de coleoptiles ou raízes de mi lho (*Zea mays* L.) que apresentaram a habilidade de captar Ca^{2+} do meio, embora com uma atividade muito menor do que mitocôndrias de fígado de rato. A curva de velocidade inicial de captação de Ca^{2+} ou ejeção de H^+ por mitocôndrias de coleoptiles de milho em função da concentração de Ca^{2+} mostrou ser sigmoidal e sugeriu u ma estequiometria de $2\text{H}^+/\text{lCa}^{2+}$ como ocorre em mitocôndrias animais. Na presença de baixas concentrações de Ca^{2+} livre no meio de in cubação as mitocôndrias de coleoptiles ou raízes de milho foram capazes de captar o íon atingindo uma concentração de "steady state" na faixa de $2\text{ }\mu\text{M}$ e de manter este equilíbrio por vários mi nutos. Perturbação deste equilíbrio pela adição de Ca^{2+} ou EGTA foi seguida pela captação ou liberação de Ca^{2+} , respectivamente, até que o equilíbrio fosse novamente atingido com a concentração livre de Ca^{2+} extramitocondrial original. A concentração de Ca^{2+} extramitocondrial na qual o "steady state" era atingido mostrou ser dependente do conteúdo de Ca^{2+} intramitocondrial e da presen ça de Mg^{2+} no meio de reação. Os resultados indicam que mitocôn drias de coleoptiles ou raízes de milho, assim como mitocôndrias animais, tem a habilidade de tamponar o Ca^{2+} externo e talvez es tejam envolvidas na manutenção da homeostase do Ca^{2+} na célula.

VI. ABSTRACT

Coupled mitochondria isolated from the white leaves of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) were inactive in respiration-coupled Ca^{2+} accumulation, in contrast to mitochondria isolated from etiolated corn (*Zea mays* L.) which showed the ability to take up Ca^{2+} from the medium, although with a much lower activity than liver mitochondria. The rate of Ca^{2+} uptake or H^+ ejection by corn mitochondria plotted versus Ca^{2+} concentration showed a sigmoidal curve and the $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ratio was very close to 2.0 as occurs in animal mitochondria. The addition of corn coleoptile or root mitochondria to a medium containing a low free Ca^{2+} concentration resulted in Ca^{2+} uptake with a decrease in free Ca^{2+} concentration until a steady state of about 2.0 μM was reached and maintained constant for several minutes. Perturbation of this steady state by the addition of Ca^{2+} or EGTA was followed by Ca^{2+} uptake or release, respectively, until the steady state was attained at the original extramitochondrial free Ca^{2+} concentration. The steady state free Ca^{2+} concentration was dependent of the intramitochondrial Ca^{2+} content and external Mg^{2+} . These results indicate that corn but not cabbage mitochondria, as some animal mitochondria, have the ability to buffer external Ca^{2+} and may be involved in the maintenance of Ca^{2+} homeostasis in the cell.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Affolter, H. and Sigel, E. (1979). A simple system for the measurement of ion activities with solvent polymeric membrane electrodes. *Anal. Biochem.* 97, 315-319.
- Akerman, K.E.O. (1978a). Effect of pH and Ca^{2+} on the retention of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 189, 256-262.
- Akerman, K.E.O. (1978b). Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 502, 359-366.
- Akerman, K. E. O. and Wikstrom, M. K. F. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68, 191-197.
- Azzone, G. F., Bragadin, M. Pozzan, T., Dell'Antone, P. (1976). Proton eletrochemical potential in steady state rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 459, 96-109.
- Azzone, G.F., Pozzan, T., Massari, S., Bragadin, M. and Dell'Antone, P. (1977). H^+ /site ratio and steady state distribution of divalent cations in mitochondria. *FEBS Lett.* 78, 21-24.
- Becker, G.L. (1980). Steady state regulation of extramitochondrial Ca^{2+} by rat liver mitochondria. Effects of Mg^{2+} and ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 591, 234-239.
- Becker, G. L., Fiskum, G. and Lehninger, A. L. (1980). Regulation of free Ca^{2+} by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 255, 9009-9012.
- Bragadin, M., Pozzan, T. and Azzone, G. F. (1979). Kinetics of Ca^{2+} carrier in rat liver mitochondria. *Biochemistry* 18, 5972-5978.

- Brand and DeSelincourt. (1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 1377-1382 (citado In: Williamson *et al.*, 1981).
- Brand, M. D., Chen, C. H. and Lehninger, A. L. (1976a). Stoichiometry of H^+ ejection during respiration-dependent accumulation of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 251, 968-974.
- Brand, M. D., Reynafarje, B. and Lehninger, A. L. (1976b). Re-evaluation of the H^+ /site ratio of mitochondrial electron transport with oxygen pulse technique. J. Biol. Chem. 251, 5670-5679.
- Bygrave, F. L. (1977). Mitochondrial calcium transport. Curr. Top. Bioenerg. 6, 259-318.
- Bygrave, F. L. (1978a). Calcium movements in cells. TIBS 3, 175-178.
- Bygrave, F. L. (1978b). Mitochondria and the control of intracellular calcium. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 53, 43-79.
- Brown, E.G., Al-Najafi, T. and Newton, R.P. (1977). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in *Phaseolus vulgaris*. Phytochemistry 16, 1333-1337.
- Burgess, G. M., McKinney, J. S., Fabiato, A., Leshie, B. A. and Putney Jr., J. W. (1983). Calcium pools in saponin-permeabilized guinea pig hepatocytes. J. Biol. Chem. 258, 15336-15345.
- Caldogno, F.R., De Michells, M. I. and Pugliarello, M. C. (1982). Active transport of Ca^{2+} in membrane vesicles from pea. Evidence for a H^+/Ca^{2+} antiport. Biochim. Biophys. Acta 693, 287-295.

- Carafoli, E. (1974). Mitochondrial uptake of calcium ions and the regulation of cell function. *Biochem. Soc. Symp.* 39, 89-109.
- Carafoli, E. (1979). The calcium cycle of mitochondria. *FEBS Lett.* 104, 1-5.
- Carafoli, E. and Lehninger, A. L. (1971). A survey of the interaction of calcium with mitochondria from different tissues and species. *Biochem. J.* 122, 681-690.
- Carafoli, E. and Azzi, A. (1972). The affinity of mitochondria for Ca^{2+} . *Experientia* 28, 906-908.
- Carafoli, E. and Crompton, M. (1978). The regulation of intracellular calcium. *Curr. Top. Membr. Trans.* 10, 151-216.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetti, F. and Kratzing, C. (1974). The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J. Molec. Cell Cardiol.* 6, 361-371.
- Caroni, P., Schwerzmann, K. and Carafoli, E. (1978). Separate pathways for Ca^{2+} uptake and release in liver mitochondria. *FEBS Lett.* 96, 339-342.
- Charles, S. A. and Halliwell, B. (1980). Action of calcium ions on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphate and other enzymes of the Calvin cycle. *Biochem. J.* 188, 775-779.
- Chen, C. H. and Lehninger, A. L. (1973). Ca^{2+} transport activity in mitochondria from some plant tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 183-196.
- Coll, K. E., Joseph, S. K., Corkey, B. E. and Williamson, J. R. (1982). Determination of the matrix free Ca^{2+} concentration and kinetics of Ca^{2+} efflux in liver and heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 8696-8704.
- Colonna, R., Massari, S. and Azzone, G. F. (1973). The problem

- of cation-binding sites in the energized membrane of intact mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 34, 577-585.
- Cormier, M. J., Charbonneau, H. and Jarret, W. (1981). Plant and fungal calmodulin: Ca^{2+} - dependent regulation of plant NAD kinase. *In: Cell Calcium* 2, 313-331.
- Coty, W. A. and Pedersen, P. L. (1975). Phosphate transport in rat liver mitochondria; kinetics, inhibitor sensitivity, energy requirements and labelled components. *Mol. Cell Biochem.* 9, 102-124.
- Crompton, M. and Heid, I. (1978). The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 91, 599-608.
- Crompton, M., Capano, M. and Carafoli, E. (1976a). The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria; a possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. *Eur. J. Biochem.* 69, 453-462.
- Crompton, M. Sigel, E., Salzmann, M. and Carafoli, E. (1976b). A kinetic study of the energy linked influx of Ca^{2+} into heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 69, 429-434.
- Crompton, M., Moser, R., Ludi, H. and Carafoli, E. (1978). The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.* 82, 25-31.
- Crompton, M., Heid, I., Baschera, C. and Carafoli, E. (1979). The resolution of calcium fluxes in heart and liver mitochondria using the lanthanide series. *FEBS Lett.* 104, 352-354.
- Crompton, M., Kessar, P. and Al-Nasser, I. (1983). The-adrenergic-mediated activation of the cardiac mitochondrial Ca^{2+} uniporter and its role in the control of intramitochondrial Ca^{2+} *in vivo*. *Biochem. J.* 216, 333-342.

- Day, D. A., Bertagnolli, B. L. and Hanson, J. B. (1978). The effect of calcium on the respiratory responses of corn mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 502, 289-297.
- Debise, R., Gachon, P. and Durand, R. (1978). Correlation between glutamate and Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 85, 25-29.
- Denton, R.M., McCormack, J. G. and Edgell, N. J. (1980). Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism: effects of Na^+ , Mg^{2+} and ruthenium red on the Ca^{2+} stimulate oxidation of oxoglutarate and pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. *Biochem. J.* 190, 107-117.
- Dieter, P. and Marmé, D. (1980a). Ca^{2+} transport in mitochondrial and microsomal fractions. *Planta* 150, 1-8.
- Dieter, P. and Marmé, D. (1980b). Calmodulin activation of plant microsomal Ca^{2+} uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7311-7314.
- Drahota, Z., Carafoli, E., Rossi, C. S., Gamble, R. L. and Lehninger, A. L. (1965). The steady state maintenance of accumulated Ca^{2+} in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 240, 2712-2720.
- Earnshaw, M. J., Madden, D. M. and Hanson, J. B. (1973). Calcium accumulation by corn mitochondria. *J. Exp. Bot.* 24, 828-840.
- Elder, J. A. and Lehninger, A. L. (1973). Respiration dependent transport of carbon dioxide into rat liver mitochondria. *Biochemistry* 12, 976-982.
- Fiskum, G. and Lehninger, A. L. (1979). Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ antiport. *J. Biol. Chem.* 254, 6236-6239.
- Fiskum, G. and Lehninger, A. L. (1981). *In: Calcium and Cell*

- Functions (Cheung, W. Y., ed.) Vol. 2, pp. 39-80, Academic Press, New York.
- Fukumoto, M. and Nagai, K. (1982). Effects of calmodulin antagonists of the mitochondrial and microsomal Ca^{2+} uptake in apple fruit. *Plant Cell Physiol.* 23, 1435-1441.
- Gochman, N. and Givelber, H. (1970). Automated, simultaneous microdetermination of calcium and magnesium by atomic absorption. *Clin. Chem.* 16, 229-234.
- Gross, J. and Marmé, D. (1978). ATP-dependent Ca^{2+} uptake into plant membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1232-1236.
- Hales, C. N., Luzio, J. P., Chandler, J. A. and Herman, K. (1974). Localization of calcium in the smooth endoplasmic reticulum of rat isolated fat cells. *J. Cell Sci.* 15, 1-15.
- Hansdorf, R. G. (1981). Effect of micromolar concentrations of free Ca^{2+} ions on pyruvate dehydrogenase interconversions in intact rat heart mitochondria. *Biochem. J.* 194, 721-732.
- Hanson, J. B. and Hodges, T. K. (1967). Energy-linked reaction of plant mitochondria. *Curr. Top. Bioen.* 2, 65-98.
- Hayama, T., Shimmen, T. and Tazawa, M. (1979). Participation of Ca^{2+} in cessation of cytoplasmic streaming induced by membrane excitation in *Characeae* intermodel cells. *Protoplasma* 99, 305-321.
- Hertel, C., Quader, H., Robinson, D. G. and Marmé, D. (1980). Antimicrotubular herbicides and fungicides affect Ca^{2+} transport in plant mitochondria. *Planta* 149, 336-340.
- Hodges, T. K. and Hanson, J. B. (1965). Calcium accumulation by maize mitochondria. *Plant Physiol.* 40, 101-108.
- Hutson, S.M., Pfeiffer, D. R. and Lardy, H. A. (1976). Effect of cations and anions on the steady state kinetics of energy

- dependent Ca^{2+} transport in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 251, 5251-5258.
- Jaffe, L. A., Weisenseel, M. H. and Jaffe, L. F. (1975). Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes. J. Cell Biology 67, 488-492.
- Johnson, H. M. and Wilson, R. H. (1973). The accumulation and the release of divalent cations across mitochondrial membranes. Amer. J. Bot. 60, 858-862.
- Joseph, S. K., Coll, K. E., Cooper, R. H., Marks, J. S. and Williamson, J. R. (1983). Mechanisms underlying calcium homeostasis in isolated hepatocytes. J. Biol. Chem. 258, 731-741.
- Kenefick, D. G. and Hanson, J. B. (1966). Contracted state as an energy source for Ca binding and Ca + inorganic phosphate accumulation by corn mitochondria. Plant Physiol. 41, 1601-1609.
- Kies, M. W. and Murphy, J. B. (1960). Spectrophotometric determination of protein in dilute solutions. Biochim. Biophys. Acta 45, 382-384.
- Kindt, R., Pahlich, E. and Rasched, I. (1980). Glutamic dehydrogenase from peas: Isolation, quaternary structure and influence of cations on activity. Eur. J. Biochem. 112, 533-540.
- Lehninger, A. L. (1970). Mitochondria and calcium ion transport: the fifth jubilee lecture. Biochem. J. 119, 129-138.
- Lehninger, A. L. (1974). Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration coupled transport of calcium by mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1520-1524.
- Lehninger, A. L., Carafoli, E. and Rossi, C. S. (1967). Energy-linked movements in mitochondrial systems. Adv. Enzymol. 29, 259-321.
- Lehninger, A. L., Reynafarje, B., Vercesi, A. E. and Tew, W.

- (1978a). Transport and accumulation of calcium in mitochondria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 307, 160-176.
- Lehninger, A. L., Vercesi, A. E. and Bababunmi, E. A. (1978b). Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1690-1694.
- Martonosi, A. (1972). Biochemical and clinical aspects of sarcoplasmic reticulum function: *In*: Current topics in membrane transport, vol. 3 (eds. F. Bonner and A. Kleinzeller), pp. 83-197. Academic Press, New York London.
- Massari, S. and Pozzan, T. (1976). The accumulation ratio of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and tetrapropylammonium in steady state mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 332-340.
- McCormack, J. G. and Denton, R. M. (1979). The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 180, 533-544.
- McCormack, J. G. and Denton, R. M. (1980). Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism: properties of the Ca^{2+} -sensitive dehydrogenase within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat. *Biochem. J.* 190, 95-105.
- Miller, R. J. and Koeppe, D. E. (1971). The effect of calcium and inhibitors on corn mitochondrial respiration. *Plant Physiol.* 47, 832-835.
- Miller, R. J., Dumford, S. W., Koeppe, D. E. and Hanson, J. B. (1970). Divalent cation stimulation of substrate oxidation by corn mitochondria. *Plant Physiol.* 45, 649-653.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature, Lond.* 191, 144-148.

- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.* 41, 445-502.
- Mitchell, P. (1976). Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: Power transmission by proticity. *Biochem. Soc. Trans.* 4, 399-430.
- Moore, A. L. and Bonner Jr., W. D. (1977). The effect of calcium on the respiratory responses of mung bean mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 460, 455-466.
- Moore, A. L. and Bonner, Jr., W. D. (1982). Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranine method. *Plant Physiol.* 70, 1271-1276.
- Murphy, E., Coll, K., Rich, T. L. and Williamson, J. R. (1980). Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 255, 6600-6608.
- Nicchitta, C. V. and Williamson, J. R. (1984). Spermine. A regulator of mitochondrial calcium cycling. *J. Biol. Chem.* 259, 12978-12983.
- Nicholls, D. G. (1974). The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-eletrochemical gradient across the inner membrane of rat liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur. J. Biochem.* 50, 305-315.
- Nicholls, D. G. (1978a). The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 176, 463-474.
- Nicholls, D. G. (1978b). Calcium transport and proton eletrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. *Biochem. J.* 170, 511-522.
- Nicholls, D. G. and Crompton, M. (1980). Mitochondrial calcium transport. *FEBS Lett.* 111, 261-268.
- Nicholls, D. G. and Scott, I. D. (1980). The regulation of brain mitochondrial calcium-ion transport. *Biochem. J.* 186,

833-839.

- Nicholls, D. and Akerman, K. E. O. (1982). Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta* 683, 57-88.
- Noack, E. A. and Heinen, E. M. (1977). A kinetic study of calcium transport by heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 79, 245-250.
- Nultsch, W. (1979). Effect of external factors on phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Microbiol.* 123, 93-99.
- Pereira da Silva, L., Bernardes, C. F. and Vercesi, A. E. (1984). Inhibition of ruthenium red-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria by the antibiotic X-537A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 80-86.
- Pozzan, T., Bragadin, M. and Azzone, G. F. (1977). Disequilibrium between steady state Ca^{2+} accumulation ratio and membrane potential in mitochondria: Pathway and role of Ca^{2+} efflux. *Biochemistry* 16, 5618-5625.
- Puskin, J. S., Gunter, T. E., Gunter, K. K. and Russell, P. R. (1976). Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria. *Biochemistry* 15, 3834-3842.
- Rasmussen, H. and Goodman, D. B. P. (1977). Relationship between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. *Physiol. Rev.* 57, 421-509.
- Reed, K. C. and Bygrave, F. L. (1974). Inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. *Biochem. J.* 140, 143-155.
- Reed, K. C. and Bygrave, F. L. (1975). A kinetic study of mitochondrial calcium transport. *Eur. J. Biochem.* 55, 497-504.
- Reiss, H. D. and Herth, W. (1979). Calcium ionophore A23187 affects localized wall secretion in the tip region of pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Planta* 145, 225-232.

- Reynafarje, B. and Lehninger, A. L. (1973). Ca^{2+} transport from L1210 mouse ascites tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1744-1748.
- Reynafarje, B. and Lehninger, A. L. (1977). Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1273-1279.
- Rossi, C. S. and Lehninger, A. L. (1964). Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of calcium and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 239, 3971-3980.
- Rossi, E. and Azzone, F. (1969). Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K^+ translocation. Eur. J. Biochem. 7, 418-426.
- Rottenberg, H. and Scarpa, A. (1974). Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. Biochemistry 13, 4811-4817.
- Saris, N. E. (1959). Suom. Kimistiseuran Tied. 68, 98-107. Apud Saris, N. E. and Akerman, K. E. O. (1980). Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Curr. Top. Bioenerg. 10, 103-171.
- Saris, N. E. and Akerman, K. E. O. (1980). Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Curr. Top. Bioenerg. 10, 103-171.
- Scarpa, A. and Azzone, G. (1970). The mechanism of ion translocation in mitochondria. Eur. J. Biochem. 12, 328-335.
- Schatzman, H. (1966). ATP-dependent Ca^{2+} extrusion from human red cells. Experientia 22, 364-365.
- Scott, I. D., Akerman, K. E. O. and Nicholls, D. G. (1980). Calcium ion transport by intact synaptosomes. Intrasyntosomal compartmentation and the role of the mitochondrial membrane potential. Biochem. J. 192, 873-880.

- Selwyn, M. J., Dawson, A. P. and Dunnett, S. J. (1970). Calcium transport in mitochondria. FEBS Lett. 10, 1-5.
- Siekevitz, P. and Potter, V. R. (1955). Biochemical structure of mitochondrial I. Intramitochondrial components of oxidative phosphorylation J. Biol. Chem. 215, 221-235.
- Slater, E. C. and Cleland, K. W. (1953). The effects of Ca^{2+} on the respiration and phosphorylative activities of heart muscle sarcosomes. Biochem. J. 55, 566-572.
- Sordahl, L. A. (1974). Effects of magnesium, ruthenium red and the antibiotic ionophore A-23187 on initial rates of calcium uptake and release by heart mitochondria. Arch. Biochem. 167, 104-115.
- Tedeschi, H. (1981). The transport of cations in mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 639, 157-196.
- Van den Driessche, T. (1978). The molecular mechanism of *Mimosa* leaf seismonastic movement. Arch. Biol. Sci. 89, 435-449.
- Vasington, F. D. and Murphy, J. V. (1962). Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem. 237, 2670-2676.
- Vasington, F. D., Gazzoti, P., Tiozzo, R. and Carafoli, E. (1972). The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Acta 256, 43-54.
- Veldhuis, J. D. and Klase, P. A. (1982). Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. Biochem. J. 202, 381-386.
- Vercesi, A. E. (1984). Transporte de Ca^{2+} por mitocôndria - Características do efluxo induzido por NAD(P)^+ . Arq. Biol. Tecnol. 27(4), 477-494

- Vercesi, A. E., Reynafarje, B. and Lehninger, A. L. (1978). Stoichiometry of H^+ ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol.Chem. 253, 6379-6385.
- Vinogradov, A. and Scarpa, A. (1973). The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 248, 5527-5531.
- Weisenseel, M. H. and Ruppert, H. K. (1977). Phytochrome and calcium ions are involved in light-induced depolarization in *Nitella*. Planta 137, 225-229.
- Wilson, R. H. and Graesser, R. J. (1976). Ion transport in plant mitochondria. In: Encyclopedia of plant physiology, New Series, Vol. 3, pp. 377-397. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Williamson, J. R., Cooper, R. H. and Hoek, J. B. (1981). Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism. Biochim. Biophys. Acta 639, 243-295.
- Zaitseva, M. G. and Zubkova, N. K. (1980). Accumulation and losses of cations by mitochondria in changing metabolic states. Fisiol. Rast. (Mosc.) 26, 1085-1092.
- Zanotti, A., Azzone, G. F. (1980). Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 201, 255-265.