

Marcia Marília Fagian

INIBIÇÃO DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA POR Ca^{2+} E Sr^{2+}
INTRAMITOCONDRIAS.

Tese de Mestrado

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

Campinas - São Paulo

1986

Este exemplar corresponde a versão final da
Tese defendida pela aluna Marcia Marília Fagian e
aprovada pela Comissão Julgadora

Auf. F. L. S.
30/07/86

INIBIÇÃO DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA POR
 Ca^{2+} E Sr^{2+} INTRAMITOCONDRIAS.

Marcia Marília Fagian

Por grande e digno que seja o ideal a que se dedique, sô terá valor quando conseguido se o foi de maneira honesta.

Von Dongen.

Aos meus pais,
dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, pela valiosa colaboração para a minha formação e como orientador deste trabalho.

À Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva pelo auxílio na realização de alguns experimentos, na elaboração do manuscrito e pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

Aos Profs. Dra. Nilce Correa Meirelles e Dr. Antonio Ari Gonçalves pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

À Profa. Dra. Martha Sorenson do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelos cálculos realizados em computação.

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

À Prof. Dra. Ione Salgado Martins pelo apoio e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP que por diversas maneiras colaboraram neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecno-

lógico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo Auxílio Financeiro.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial à Srta. Regina Célia Rosseto pela colaboração técnica.

À minha família e ao Vitor pelo incentivo e compreensão demonstrados.

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

À "DEUS" por nos ter dado a vida.

Abreviaturas

ADP	- Adenosina - 5' - difosfato
ATP	- Adenosina - 5' - trifosfato
CAT	- Carboxiatractilato
DL	- Desidrogenase lática
EGTA	- Ácido etileno glicol bis (β - aminoetil eter) N, N' - tetracético.
FCCP	- p-trifluoro - metoxycarbonil ciano fenil hidrazina
Hepes	- ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-etano-sulfônico
Mit	- Mitochondrias de fígado de rato
NADH	- Nicotina adenina dinucleotídeo reduzido
NEM	- N-etil maleimida
PCA	- Ácido perclórico
PEP	- Fosfoenolpiruvato
PK	- Piruvato quinase
$\Delta\Psi$	- Potencial elétrico de membrana mitocondrial
PSM	- Partículas submitocondriais invertidas.

Índice

I. INTRODUÇÃO.....	1
- Inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} intramitocondrial.....	5
II. MATERIAIS E MÉTODOS	
- Isolamento de mitocôndrias.....	10
- Isolamento de partículas submitocôndriais.....	10
- Respiração.....	11
- Transporte de Ca^{2+}	11
- Transporte de Sr^{2+}	11
- Fosforilação oxidativa em mitocôndrias intactas.....	12
- Determinação do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) de membrana mitocôndrial.....	12
- Efeito do Sr^{2+} sobre a atividade do transportador de nucleotídeos de adenina.....	13
- Determinação da atividade ATPásica de partículas submitocôndriais.....	14
- Determinação potenciométrica da atividade ATPásica.....	15
- Cálculo das concentrações das espécies (metais e seus complexos) nos meios de reações.....	16
- Dosagem de nucleotídeos de adenina mitocôndriais.....	16
III. RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO.	
- Efeitos da captação de Ca^{2+} e Sr^{2+} sobre o consumo de oxigênio e o volume de mitocôndrias hepáticas.....	18
- Efeito da captação de Ca^{2+} e Sr^{2+} sobre o potencial elétrico ($\Delta\Psi$) de membrana de mitocôndrias hepáticas.....	21

- Inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} intramitocondrial.....	21
- A inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} não é prevenida por ATP e Mg^{2+}	23
- Efeito da concentração de Sr^{2+} sobre a velocidade de estado respiratório-3 induzido por ADP.....	26
- Efeito da concentração de fosfato sobre a inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+}	28
- Titulação da fosforilação oxidativa por oligomicina ou carboxiatractilato na presença de Sr^{2+}	28
- Inibição da atividade ATPásica de partículas submitocondriais invertidas.....	33
- Inibição da atividade ATPásica determinada por método potenciométrico.....	39
- Conteúdo de nucleotídeos de adenina em mitocôndrias hepáticas após a captação de Ca^{2+} : efeito de ATP e Mg^{2+} exógenos.....	39
- Inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} em mitocôndrias suspensas em meio de reação contendo ATP e Mg^{2+} exógenos.....	42
IV. DISCUSSÃO.....	47
V. RESUMO.....	52
VI. SUMMARY.....	53
VII. REFERÊNCIAS.....	54

I. Introdução

O transporte ativo de Ca^{2+} por mitocôndria foi descoberto por VASINGTON & MURPHY (1962), em mitocôndrias isoladas de rins de rato. Estes autores observaram que o Ca^{2+} era acumulado por este tipo de mitocôndria, contra gradiente de concentração, às expensas de energia respiratória ou hidrólise de ATP.

Sabe-se atualmente que mitocôndrias de quase todos tecidos animais e de alguns fungos, assim como de alguns tecidos vegetais captam Ca^{2+} do meio externo por processo ativo (LEHNINGER et al, 1967; LEHNINGER, 1970; BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et al, 1978; SARIS & ÅKERMAN, 1980; MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS et al, 1986).

Dado a alta velocidade e afinidade, bem como ao fato do transporte ativo de Ca^{2+} em algumas condições experimentais preceder a fosforilação oxidativa na demanda da energia respiratória (ROSSI & LEHNINGER, 1964; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1973; VERCESI et al, 1978), postula-se que mitocôndrias de determinados tecidos, em adição ao seu papel na produção de ATP, desempenham uma importante função na regulação da concentração tanto do Ca^{2+} livre no citoplasma (CARAFOLI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et al, 1978; SARIS & ÅKERMAN, 1980 e JOSEPH et al, 1983) quanto na matriz mitocondrial (DENTON et al, 1980; McCORMACK & DENTON, 1980; HANSFORD, 1981; CROMPTON et al, 1983).

Como o Ca^{2+} livre exerce inúmeras funções na re-

gulação da fisiologia celular, o transporte do íon por mitocondria tem despertado grande interesse no sentido de esclarecer o possível papel dessa organela na distribuição do Ca^{2+} celular. Além disso, o transporte de Ca^{2+} em membrana mitocondrial é uma expressão do processo de conversão de energia, o que torna seu estudo relevante com respeito à elucidação do mecanismo da fosforilação oxidativa.

A captação de Ca^{2+} , bem como de Sr^{2+} , ocorre por um mecanismo de transdução de energia semelhante ao utilizado no processo de fosforilação oxidativa. De acordo com a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa, esses íons entram na mitocondria por mecanismo eletroforético em resposta ao potencial elétrico da membrana, negativo internamente (MITCHELL, 1961, 1966). Segundo esta hipótese, a respiração ou hidrólise de ATP pela ATPase mitocondrial induz transporte vetorial de H^+ para o exterior da mitocondria, com consequente alcalinização da matriz mitocondrial. Esse processo gera um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana ($\Delta\mu\text{H}^+$), constituído por um componente químico (ΔpH) e pelo potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) que se relacionam de acordo com a equação:

$$\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\Psi - 60 \Delta\text{pH}$$

Como existe uma relação inversa entre velocidade de respiração e potencial de membrana (MITCHELL, 1961, 1966), a entrada de Ca^{2+} na mitocondria causa um decréscimo no valor de $\Delta\Psi$, com consequente estímulo da respiração e ejeção

de H^+ , para compensar o valor de ΔuH^+ às custas de aumento de ΔpH . Assim, o aumento de ΔpH passa a limitar a entrada de Ca^{2+} , a menos que exista no meio de reação ânions lipofílicos, tais como: acetato, propionato, β -hidroxibutirato etc, que são capazes de passar pela membrana na forma protonada e acumular-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 termo ΔpH (LEHNINGER, 1974) permitindo que a respiração restaure o valor de $\Delta \Psi$.

O ânion fosfato ($H_2PO_4^-$), também é transportado para o interior da mitocondria em co-transporte com prótons (H^+) (COTY & PEDERSEN, 1975) através do transportador específico sensível a NEM e mersalil, impedindo o aumento de ΔpH . Assim, na presença de fosfato a mitocondria é capaz de acumular grandes quantidades de Ca^{2+} (ROSSI & LEHNINGER, 1964).

Evidências experimentais indicam que o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial é eletroneutro e mediado por um transportador insensível a vermelho de rutênio, que troca um íon Ca^{2+} interno por dois íons Na^+ externos em mitocondrias de tecidos excitáveis (CARAFOLI et al, 1974; CROMPTON et al, 1976) ou um íon Ca^{2+} por dois íons H^+ em mitocondrias de tecidos não excitáveis (ÅKERMAN, 1978; NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1979). Resultados mais recentes indicam que a troca $Ca^{2+}/2Na^+$ também ocorre em mitocondrias hepáticas com atividade de menor que aquela observada em mitocondrias de tecidos ex

citáveis (NEEDGARD, 1984). Assim, a distribuição de Ca^{2+} livre entre os compartimentos intra e extra mitocondriais em condições de "steady-state" seria regulada cineticamente pela operação simultânea de duas vias de transporte independentes o que gera um movimento cíclico do íon através da membrana. Desta forma as concentrações de Ca^{2+} na matriz e no citosol dependeriam das velocidades relativas de influxo e efluxo e poderiam ser alteradas pela inibição ou ativação de uma ou ambas as vias (NICHOLLS, 1978).

Este movimento cíclico de Ca^{2+} através da membrana ocorre a uma baixa velocidade ($v < 1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) devido ao alto K_m (3 a $10 \mu\text{M}$) para influxo, maior que a concentração de Ca^{2+} livre no citosol ($0,1 - 0,2 \mu\text{M}$) e baixo $V_{\text{máx}}$ ($5 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) para efluxo e mantém uma concentração de Ca^{2+} livre externa na faixa de $0,3$ a $0,5 \mu\text{M}$ sob condições fisiológicas (HANSFORD, 1985).

O papel deste sistema integrado de transporte de Ca^{2+} localizado na membrana mitocondrial ainda não está elucidado. Alguns autores acreditam que a mitocondria tampona a concentração de Ca^{2+} livre no compartimento extramitocondrial regulando assim a atividade de uma série de funções dependentes de Ca^{2+} no citosol (ver revisão FISKUM & LEHNINGER, 1982; ÅKERMAN & NICHOLLS, 1983). Outros autores defendem a idéia de que este sistema de transporte de Ca^{2+} regula a concentração de Ca^{2+} intramitocondrial na faixa de $0,1$ a $1,0 \mu\text{M}$, regulando assim a atividade de pelo menos três desidrogenases intramitocondriais envolvidas no metabolismo energético

da célula: complexo piruvato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, oxoglutarato desidrogenase (HANSFORD, 1981; McCORMACK & DENTON, 1980; DENTON et al, 1980; HANSFORD, 1985).

Esta última hipótese é baseada no fato de que mitocôndrias "in situ" possuem baixas concentrações de Ca^{2+} endógeno (0 a $3,0 \text{ nmol mg}^{-1}$), faixa de concentração que permite a modulação da atividade das referidas desidrogenases (ver revisão de HANSFORD, 1985).

Inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} intra mitocondrial.

Vários trabalhos com mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos como: mitocôndria de tumor (VILLALOBO & LEHNINGER, 1980; ABOU-KHALIL et al, 1981), músculo liso (VALLIÈRES et al, 1975), coração (SORDHAL, 1974; JACOBUS et al, 1975), útero (MALMSTROM & CARAFOLI, 1977), cérebro (ROMAN et al, 1981) e fígado (MORENO-SÁNCHEZ, 1985) mostram que altas concentrações de Ca^{2+} intramitocondrial ($50 - 200 \text{ nmol mg}^{-1}$) inibem a fosforilação oxidativa.

VILLALOBO & LEHNINGER, (1980) e ABOU-KHALIL et al, (1981) observaram que mitocôndrias isoladas de células tumorais de tumor ascítico de Ehrlich e hepatoma AS30-D possuíam conteúdo relativamente alto de Ca^{2+} endógeno suficiente para causar importante inibição da fosforilação oxidativa nas condições "in situ". Baseados nestes resultados estes autores

propuseram que a inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} em células tumorais poderia explicar uma série de alterações metabólicas características de tecidos tumorais tal como a alta taxa de glicólise aeróbica.

Apesar da alta concentração de Ca^{2+} necessária para inibir a fosforilação oxidativa este fenômeno tem despertado grande interesse pelo fato de ser reversível e pelo seu potencial significado em condições patológicas associadas à perturbação da homeostase do Ca^{2+} intracelular tais como aquelas revistas por CARAFOLI et al, (1974),

Com relação ao mecanismo de inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} existem várias propostas na literatura. Assim, algumas observações (MALMSTROM & CARAFOLI, 1977; GÓMEZ-PUYOU et al, 1979) sugerem que o Ca^{2+} intramitocondrial inibiria esse processo por inibir a troca de ADP externo por ATP intramitocondrial catalizada pela translocase situada na membrana interna (KLINGENBERG & ROTTENBERG, 1977).

Esta proposta de inibição está em contradição com os resultados de SPENCER & BYGRAVE, (1972), mostrando que o Ca^{2+} estimula a translocase de nucleotídeos de adenina em mitocôndrias de fígado de rato em determinadas condições experimentais. GÓMEZ-PUYOU et al, (1979) propõe que esta diferença entre os dois resultados seja explicada com base no fato de que nos experimentos realizados por SPENCER & BYGRAVE, o Ca^{2+} e os nucleotídeos de adenina foram adicionados simultaneamente à preparação mitocondrial incubada a 49°C, condições em que o transporte de Ca^{2+} é muito lento. Assim a translo-

case muito provavelmente estaria respondendo ao Ca^{2+} externo enquanto que nas condições experimentais utilizadas por GÓMEZ-PUYOU et al, (1979) o Ca^{2+} foi acumulado antes de iniciar a troca ADP/ATP.

Foi também observado que em mitocôndrias de coração e fígado, o acúmulo de Ca^{2+} causa efluxo de nucleotídeos de adenina por uma via insensível a atractilato, inibidor específico da translocase de nucleotídeos de adenina (MORENO-SÁNCHEZ, 1983). Assim, o Ca^{2+} acumulado, por diminuir a concentração interna de nucleotídeos de adenina, levaria a uma diminuição na velocidade de troca de nucleotídeos através da membrana e consequente diminuição na velocidade de fosforilação oxidativa.

Um dos mecanismos propostos para explicar a inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} é a de que o acúmulo de Ca^{2+} na matriz mitocondrial estaria agindo sobre o complexo F_0F_1 -ATPase (GÓMEZ-PUYOU et al, 1980). Este inibidor de natureza proteica foi primeiramente isolado por PULLMAN & MONROY, (1963) e mostrou ter seu efeito aumentado na presença de Ca-ATP (GÓMEZ-PUYOU et al, 1980). Assim, foi sugerido que o complexo Ca-ATP resultante do acúmulo de Ca^{2+} pela mitocôndria, favoreceria a associação do inibidor ao complexo F_0F_1 -ATPase (GÓMEZ-PUYOU et al, 1980).

Outro mecanismo proposto na tentativa de explicar a inibição da fosforilação oxidativa causada pelo Ca^{2+} seria o de que o Ca^{2+} acumulado pela mitocôndria inibe a síntese de ATP competindo com o Mg^{2+} para a formação do comple

xo MgATP (ROMAN et al , 1981) o verdadeiro substrato da ATPsintetase (SELWYN, 1967). A quantidade de Ca^{2+} acumulada excede o conteúdo de Mg^{2+} interno de 2 - 6 vezes sendo então possível ao Ca^{2+} deslocar o Mg^{2+} do complexo com os nucleotídeos de adenina (ROMAN et al, 1981).

ABOU-KHALIL et al, 1981 propõem ainda que a inibição da fosforilação oxidativa seria causada pela diminuição de fosfato livre devido à precipitação de sal de fosfato de Ca^{2+} na matriz mitocondrial.

No presente trabalho compararam-se algumas características do transporte de Ca^{2+} e Sr^{2+} por mitocondrias hepáticas, bem como estudou-se o efeito do acúmulo destes cátions sobre as seguintes funções mitocondriais (Figura 1), envolvidas no processo de fosforilação oxidativa:

- a) Transporte de elétrons na cadeia respiratória.
- b) Formação do gradiente eletroquímico de prótons.
- c) Transporte de fosfato.
- d) Atividade da ATPsintetase.
- e) Transporte de nucleotídeos de adenina através da membrana mitocondrial (ADP e ATP).
- f) Possível complexação de nucleotídeos de adenina (ADP e ATP) mitocondriais.

Com este estudo acreditamos ter elucidado o mecanismo de inibição da fosforilação oxidativa causada pelos referidos cátions.

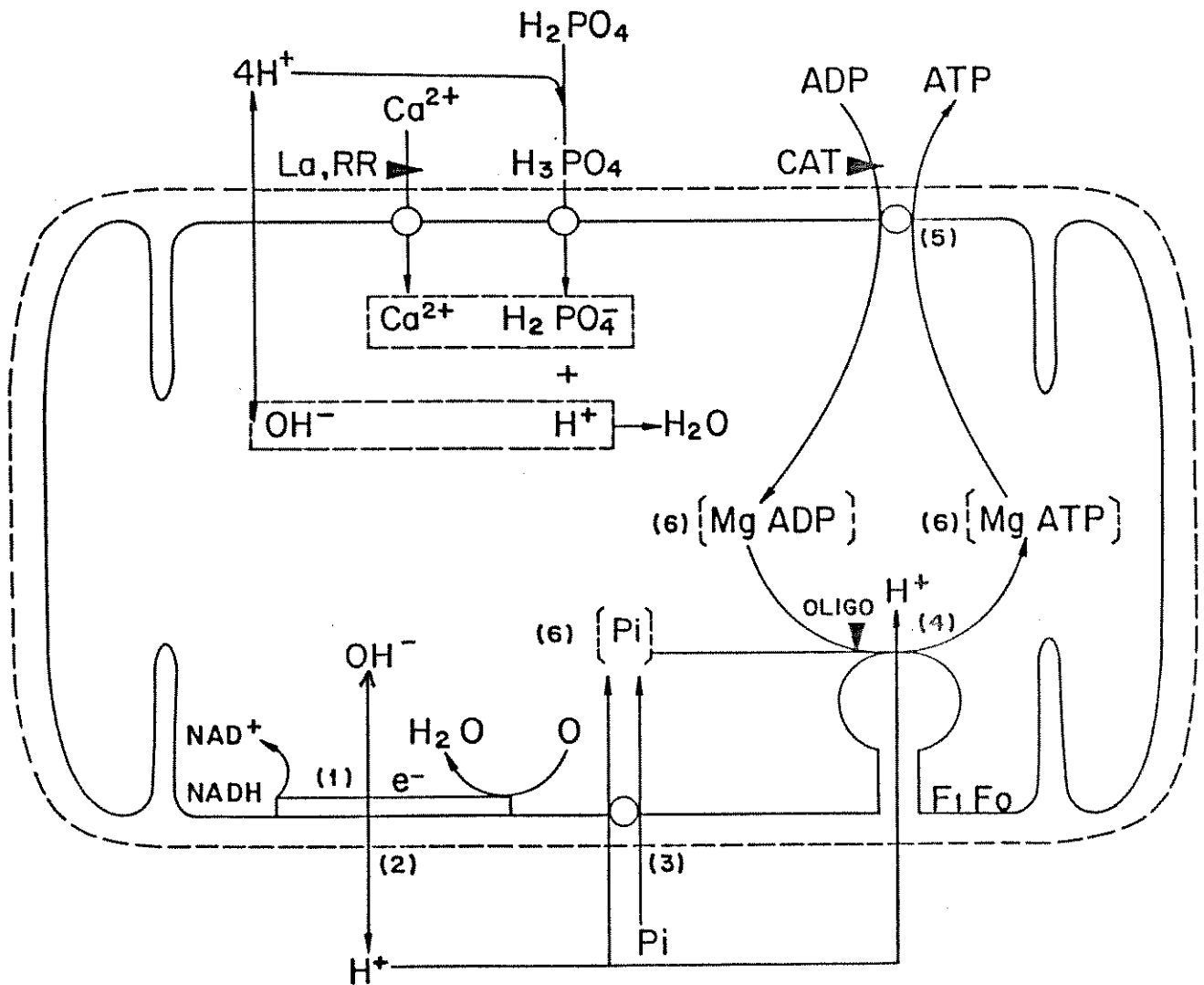


Figura 1 - Possíveis sítios de inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} e Sr^{2+} intramitocondriais.

- 1) Transporte de elétrons na cadeia respiratória.
- 2) Formação do gradiente eletroquímico de prótons.
- 3) Transporte de fosfato.
- 4) Atividade da ATP sintetase.
- 5) Transporte de nucleotídeos de adenina através da membrana mitocondrial (ADP e ATP).
- 6) Complexação de nucleotídeos de adenina (ADP e ATP) mitocondriais.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Isolamento de mitocôndrias (SCHNEIDER & HOGEBOOM, 1950)

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de rato, por centrifugação fracionada após jejum de 12 hs. O homogeneizado de fígado era preparado em sacarose 250 mM tamponada com Hepes 2,0 mM pH 7,2 contendo EGTA 0,5 mM. A fração mitocondrial era lavada três vezes nesta solução sendo que na última vez o EGTA era omitido. A suspensão mitocondrial estoque continha cerca de 100mg de proteína por ml, determinada pelo método de KIES & MURPHY, (1960), e era usada dentro de 5 horas após o término do tratamento

Os ensaios foram feitos em câmaras de vidro termotatizadas, com agitação contínua.

2 - Isolamento de partículas submitocondriais (PEDERSEN et al, 1978) .

As partículas submitocondriais foram obtidas a partir de mitocôndrias intactas por tratamento com lubrol WX (0,16mg de lubrol WX mg^{-1} de proteína mitocondrial), durante 15 minutos a 0°C. Após esse tratamento as vesículas eram sedimentadas por centrifugação a 105.000xg durante 1 hora em centrífuga Beckman modelo LS-65. Em seguida o sedimento era ressuspenso em sacarose 250mM e novamente centrifugado a 105.000xg durante 1 hora. O sobrenadante era desprezado e o sedimento contendo as partículas submitocon -

driais era ressuspensão em sacarose 250mM. A dosagem de proteína era feita pelo método de KIES & MURPHY, (1960).

3 - *Respiração*

O consumo de oxigênio foi determinado com eletrodo de Clark (Yellow Spring Instrument Co) conectado a oxígrafo Gilson.

4 - *Transporte de Ca^{2+}* (MADEIRA, 1975)

Variações nas concentrações de Ca^{2+} livre no meio de reação foram determinadas usando-se eletrodo específico de Ca^{2+} (Calcium Selectrode F2112, Radiometer) cujos sinais eram amplificados através de um acessório de alta impedância (Sargent-Welch Scientific Co), conectado a um registrador potenciométrico. O eletrodo de Ca^{2+} era calibrado com adições de solução padrão do íon ao meio de reação após o término de cada experimento.

5 - *Transporte de Sr^{2+}* (COELHO & VERCESI, 1980)

A captação de Sr^{2+} foi determinada indiretamente pela determinação da acidificação do meio de reação, uma vez que existe estequiometria definida entre influxo do mesmo e efluxo de H^+ .

6 - Fosforilação oxidativa em mitocôndrias intactas (VILLA LOBO & LEHNINGER, 1980).

A velocidade de fosforilação oxidativa em mitocôndrias intactas foi determinada pelo estímulo da respiração mitocondrial e alcalinização do meio de reação induzidos pela adição de ADP (MITCHELL, 1961). As variações de pH no meio de reação foram determinadas usando-se medidor de pH Beckman Expandomatic SS-2 ligado a um registrador pontenciométrico.

7 - Determinação do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) de membrana mitocondrial (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976).

A medida do potencial de membrana em mitocôndrias isoladas pode ser feita através da utilização do corante safranina, que apresenta um deslocamento no espectro visível associado a sua ligação à membrana de mitocôndrias energizadas. Esse deslocamento está linearmente relacionado com o potencial produzido por gradiente de prótons ou de íons K^+ . Mitocôndrias recém isoladas foram incubadas sob diferentes condições em presença de safranina e as diferenças de absorbância $A_{511}-A_{533nm}$ eram determinados em espectrofotômetro de duplo feixe (Perkin-Elmer, modelo 356) acoplado a um registrador pontenciométrico. A partir da comparação dos valores obtidos com os de uma curva de calibração $\Delta A=f(\Delta\Psi)$, obtinha-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 120mM, (ROSSI & AZZONE, 1969) e $[K^+]_{ex}$ é a concentração do íon no meio de incubação.

8 - Efeito do Sr^{2+} sobre a atividade do transportador de nucleotídeos de adenina.

O transportador de nucleotídeos de adenina pode ser inibido especificamente por atractilato (SCHERER & KLINGENBERG, 1974). Quando a fosforilação oxidativa está inibida em uma etapa diferente do transporte de nucleotídeos de adenina, uma quantidade significativa do inibidor atractilato pode ligar ao transportador sem produzir um correspondente acréscimo na inibição (LEMASTERS & SOWERS, 1979). Assim, os dados cinéticos obtidos quando se titula a velocidade de fosforilação oxidativa com atractilato em mitocôndrias controle ou em mitocôndrias cuja velocidade de fosforilação está 50% inibida por Ca^{2+} ou Sr^{2+} indicam se a inibição causada pelos referidos cátions, ocorre ou não a nível do transporte de nucleotídeos de adenina.

Nestes experimentos a velocidade de fosforilação oxidativa foi determinada indiretamente pelo estímulo do con

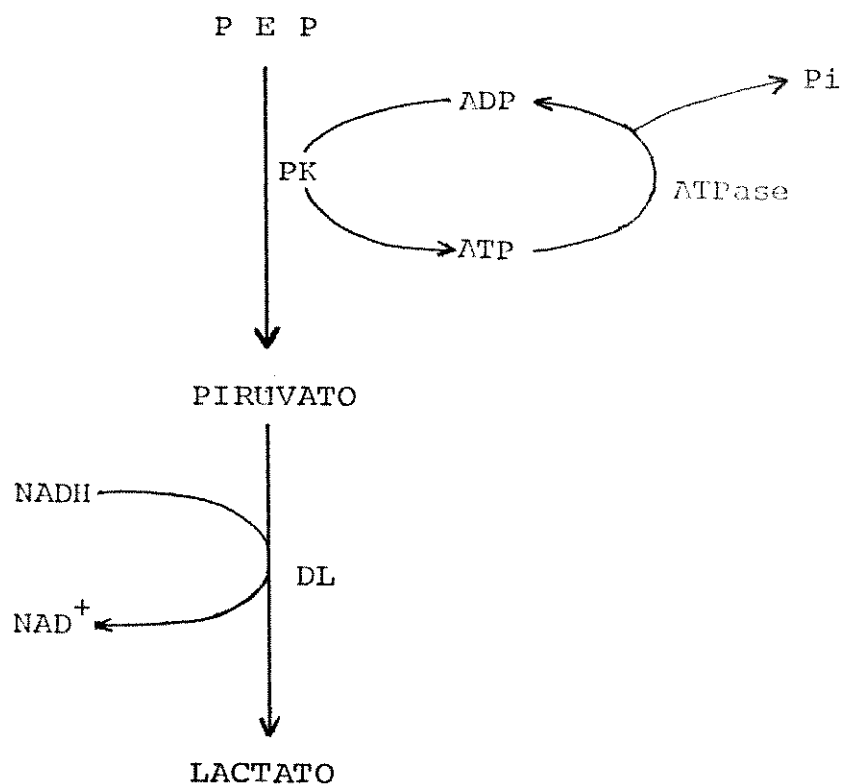
sumo de O_2 ou pela velocidade do influxo de H^+ ao interior da mitocôndria (alcalinização do meio de reação), após a adição de ADP. Os experimentos foram realizados em câmaras de vidro de 2,0ml, termostatizadas a 25°C, em meio de reação contendo: KCl 130mM, tampão Hepes 3,0mM pH 7,2, rotenona 5,0µM, fosfato 3,0mM e succinato 5,0mM. Após 4 a 5 minutos de incubação das mitocôndrias (2,0mg de proteína mitocondrial/ml), a reação era iniciada pela adição de 500nmoles de ADP.

9 - *Determinação da atividade ATPásica de partículas submitocondriais.*

A atividade ATPásica de partículas submitocondriais era medida como descrito por PULLMAN et al, 1960, acoplando-se a reação de hidrólise de ATP com o sistema enzimático regenerador destes nucleotídeos contendo piruvato quinase/desidrogenase láctica e seguindo-se fluorimetricamente a oxidação do NADH (vide esquema abaixo).

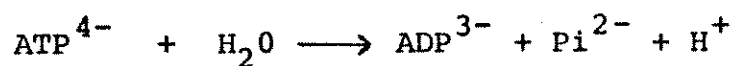
O meio de reação num volume final de 1,0ml pH 7,4 e 32°C continha KCl 130mM, tampão Hepes 2,0mM, ATP 2,0mM, fosfoenolpiruvato 0,5mM, NADH (200nmoles), piruvato quinase (3,7 unidades), lactato desidrogenase (9,6 unidades) e partículas submitocondriais (0,131mg).

Os resultados eram expressos em nmoles de ATP hidrolisado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, já que 1 mol de ATP hidrolisado corresponde a 1 mol de NADH oxidado de acordo com o seguinte esquema.



10 - Determinação potenciométrica da atividade ATPásica.

É baseada na acidificação do meio de reação devido à liberação de prótons correspondente à hidrólise do fosfato terminal do ATP de acordo com a equação:



A quantidade de ATP hidrolisado pode ser estimada por comparação com variações de pH obtidas por adições de HCl padrão ao meio de reação. Estas variações de pH no meio de reação eram monitoradas com eletrodo de pH combinado, ligado a um medidor de pH Beckman (Expandomatic SS-2)

e este a um registrador potenciométrico linear (série 1200).

11 - Cálculo das concentrações das espécies (metais e seus complexos) nos meios de reações

As concentrações das espécies presentes nos meios de reação foram estabelecidas usando-se as constantes de as socição determinadas por FABIATO & FABIATO, (1979). Os cál culos foram feitos no laboratório da Dra. Martha Sorenson (Depto. de Bioquímica, Univ. Federal do Rio de Janeiro) a- trav és do programa de computador desenvolvido por Mark Kurz- mac k (Dept. Biochemistry; Univ. Maryland, Baltimore, USA) u tilizado pela primeira vez por INESI et al, (1980).

12 - Dosagem de nucleotídeos de adenina mitocondriais.

Mitocondrias de fígado de rato eram incubadas em meio de reação contendo KCl 130mM, tampão Hepes 2,0mM (pH 7,2). Após 2 minutos, amostras de 1,5ml eram colhidas e centrifugadas durante 2 minutos em centrífuga Eppendorf (mo- delo 3200). O sedimento era ressuspenso em 1,0ml do meio de reação acima, ao qual era adicionado 0,5ml de PCA 3% man ten- do-se em banho de gelo por 15 minutos.

No final deste tempo, as amostras eram cent rifu- ga das novamente e as absorbâncias dos sobrenadantes eram deter minadas no comprimento de onda de 260nm, correspondendo a concentração total de nucleotídeos de adenina e piridina

(BOCK et al, 1957).

Para a determinação específica dos nucleotídeos de adenina, o conteúdo dos nucleotídeos de piridina nas formas oxidadas e reduzidas foram determinadas em 325nm e 340nm respectivamente (CIOTTI & KAPLAN, 1957). As formas oxidadas dos nucleotídeos de piridina eram determinadas na presença de KCN onde a absorbância em 325nm é devido à formação dos complexos NAD(P)-CN (CIOTTI & KAPLAN, 1957).

III. RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO

Efeitos da captação de Ca^{2+} e Sr^{2+} sobre o consumo de oxigênio e o volume de mitocôndrias hepáticas.

A figura 2 mostra as alterações na velocidade de consumo de oxigênio, no pH do meio de reação e no volume mitocondrial induzidas pelas adições de Ca^{2+} (A) e Sr^{2+} (B). As adições destes cátions induzem simultaneamente estímulo transitório da respiração e acidificação do meio de reação indicando que os mesmos estão sendo acumulados pela mitocôndria (MITCHELL, 1961). A captação de Ca^{2+} induziu um posterior aumento na velocidade de respiração e diminuição da absorbância da suspensão mitocondrial, seguidos de alcalinização do meio de reação que precedeu o estado de anaerobiose. No caso do acúmulo de Sr^{2+} , ambas a respiração do estado-4 e a absorbância da suspensão mitocondrial foram mantidas praticamente inalteradas até a exaustão do oxigênio, quando uma lenta alcalinização do meio de reação teve início. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de COELHO & VERCESI, (1980) que indica que o acúmulo de altas concentrações de Ca^{2+} , ao contrário do acúmulo de Sr^{2+} tem efeitos deletérios sobre a mitocôndria causando alterações inespecíficas da membrana, seguida de sua liberação. Esta interpretação é comprovada pelo experimento da figura 3, onde o transporte de Ca^{2+} era monitorado por eletrodo específico. A figura 3 mostra que nas condições do

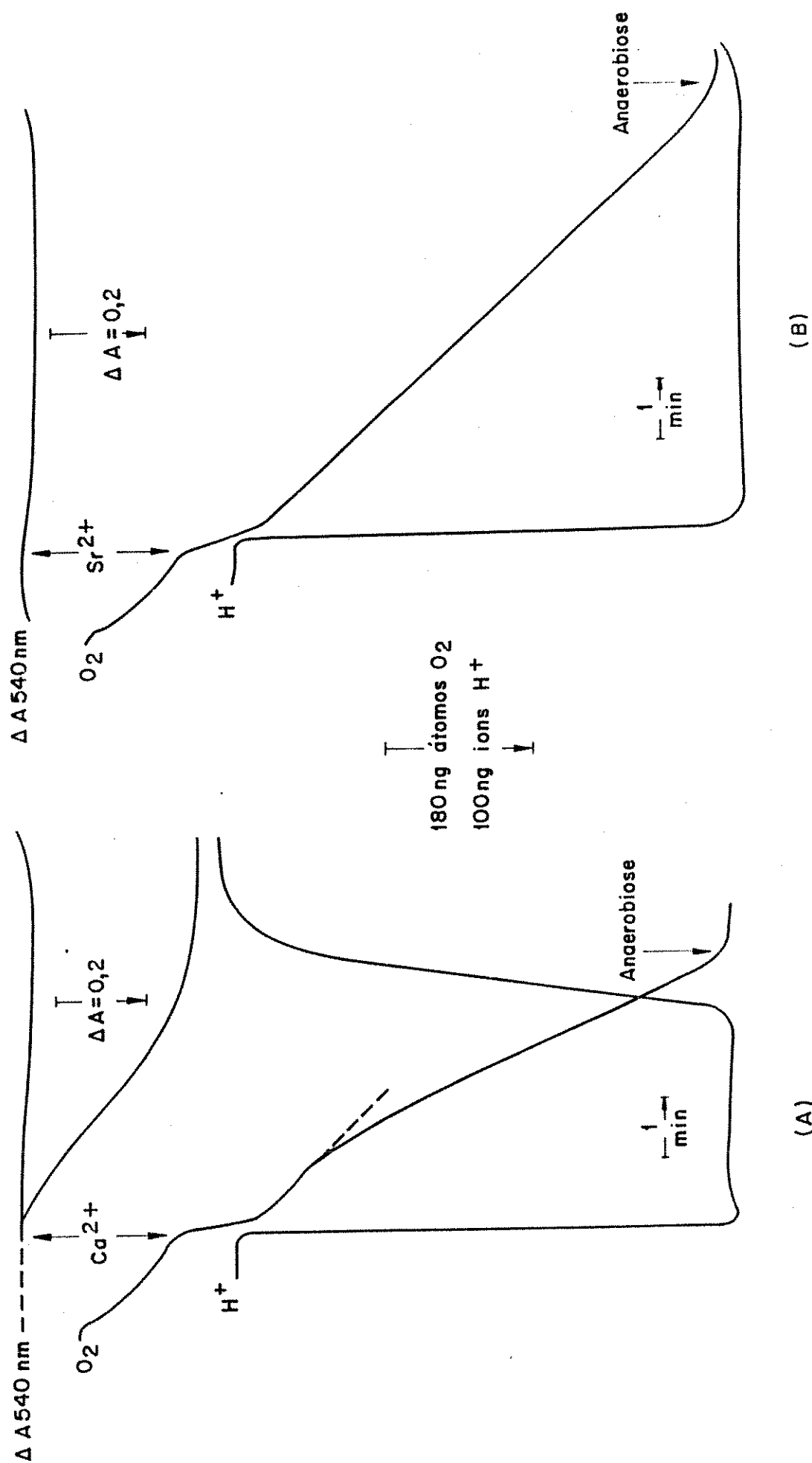


Figura 2 - Efeito da captação de Ca^{2+} e Sr^{2+} sobre o consumo de oxigênio e o volume de mitocôndrias hepáticas. O meio de reação (2,0ml, 25°C) continha KCl 130mM, tampão Hepes 3,0mM (pH7,1), fosfato 3,0mM, succinato 2,0mM e rotenona 5,0μM. A reação foi iniciada com a adição de mitocôndrias de fígado de rato (2,0mg/ml). Em (A) Ca^{2+} (300nmol/ml) e em (B) Sr^{2+} (300nmol/ml) foram adicionados onde indicado. O inchamento mitocondrial era determinado em função do decréscimo de absorbância ($\Delta A_{540\text{nm}}$) da suspensão mitocondrial.

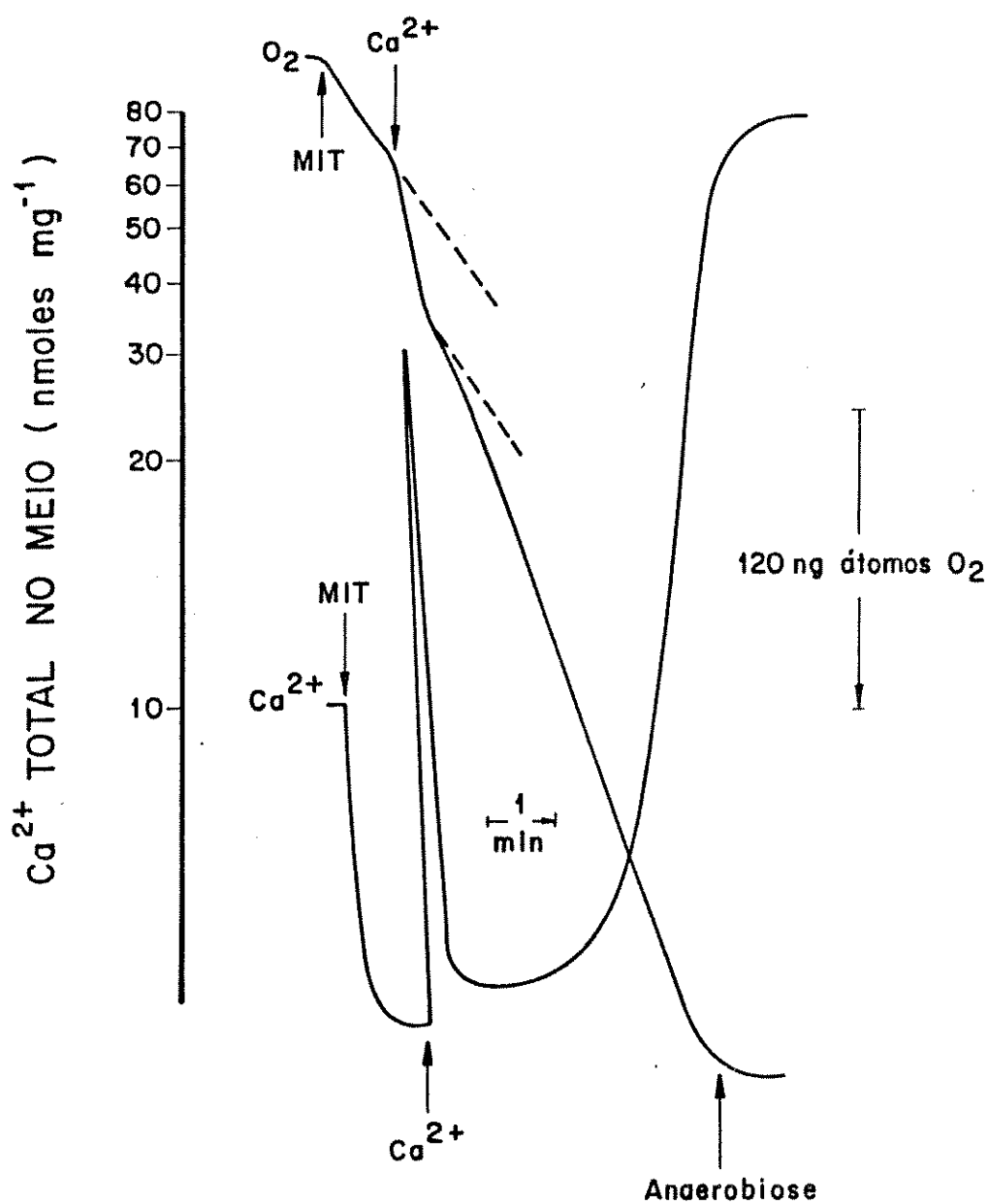


Figura 3 - Fluxo de Ca^{2+} e consumo de oxigênio em mitocôndrias hepáticas.
 O meio de reação era idêntico ao da figura 2.
 Ca^{2+} (300 nmoles) foi adicionado onde indicado

experimento da figura 2A o Ca^{2+} é captado e mantido na matriz mitocondrial apenas transitoriamente.

Efeito da captação de Ca^{2+} e Sr^{2+} sobre o potencial elétrico ($\Delta\Psi$) de membrana de mitocôndrias hepáticas.

A figura 4A mostra que a adição de 50nmols de Ca^{2+} mg^{-1} de proteína induz uma diminuição transitória do potencial elétrico de membrana que todavia não retorna aos níveis iniciais e é seguida de uma diminuição progressiva, atingindo o colapso dentro de 2 minutos após a adição do íon. A figura 4B mostra que mesmo após duas adições consecutivas de grandes concentrações de Sr^{2+} o potencial elétrico de membrana retorna aos valores iniciais e se mantém por longo período de tempo. Isto indica que este íon, ao contrário do Ca^{2+} , não altera as propriedades de permeabilidade da membrana permitindo que o gradiente de H^+ seja mantido após sua captação. Estes resultados nos induziram a usar inicialmente o Sr^{2+} nestes estudos, com o objetivo de esclarecer o mecanismo de inibição da fosforilação oxidativa em condições em que a integridade funcional da mitocôndria era preservada.

Inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} intra mitocondrial.

A figura 5A mostra o estímulo da respiração e al

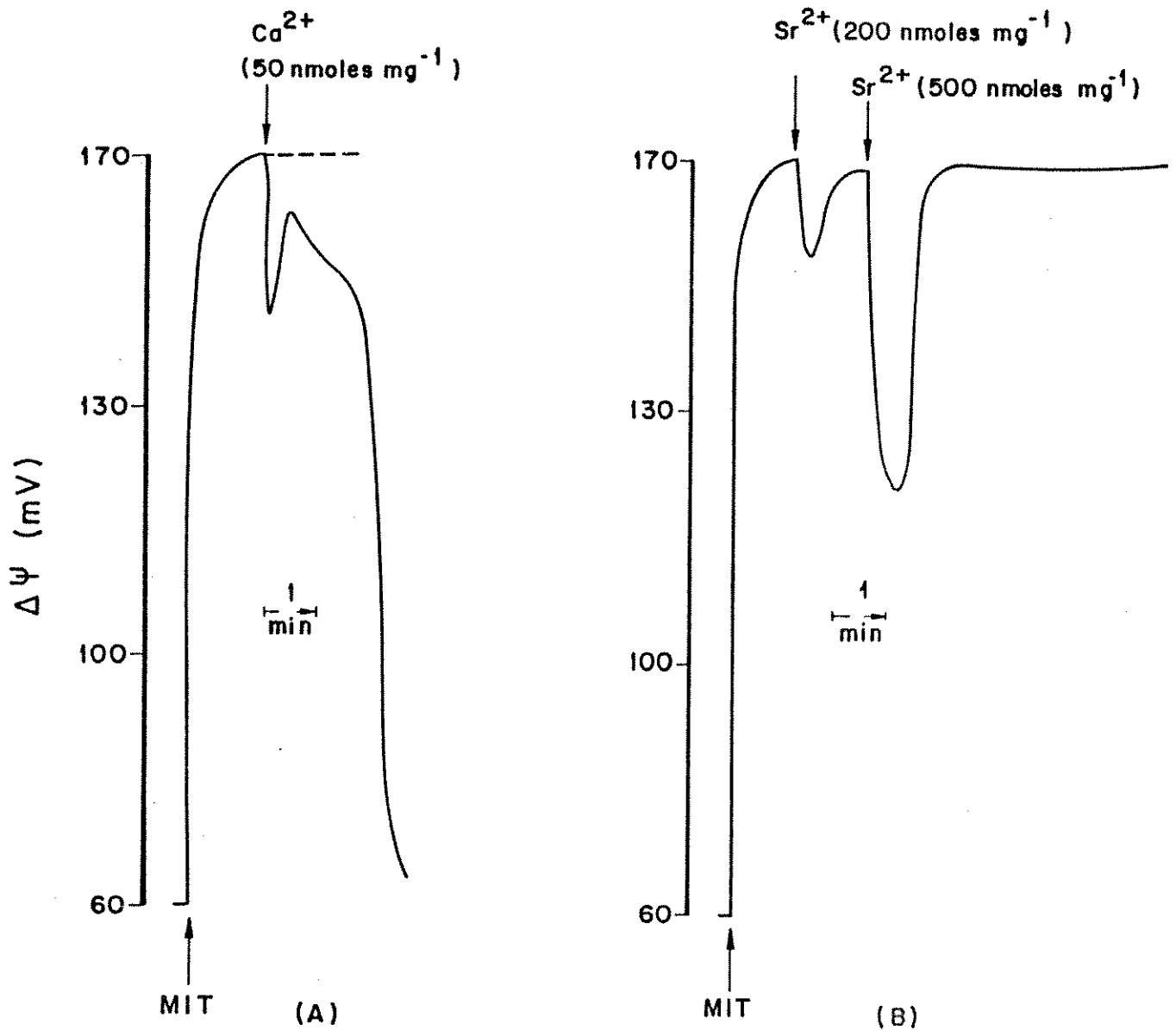


Figura 4 - Efeito da captação de Ca^{2+} e Sr^{2+} sobre o potencial elétrico ($\Delta\Psi$) de membrana mitocondrial. O meio de reação (2,0ml, 25°C) continha sacarose 125mM, KCl 65mM, tampão Hepes 3,0mM (pH 7,1), fosfato 2,0mM, succinato 2,0mM, rotenona 5,0 μM , safranina 10,0 μM . A reação foi iniciada com a adição de mitocondrias (1,0mg/ml). Em (A) foi adicionado 50nmoles de Ca^{2+} mg^{-1} de proteína mitocondrial. Em(B) foram feitas duas adições de Sr^{2+} .

calinização do meio de reação induzidos pela adição de ADP, de acordo com a hipótese quimiosmótica da fosforilação oxidativa proposta por MITCHELL, (1961). A figura 5B mostra o estímulo transitório da respiração e acidificação simultânea do meio de reação induzidos pela adição de Sr^{2+} . Após a captação do Sr^{2+} adicionado como evidenciado pelas alterações da respiração e do pH do meio, a adição de ADP não causou estímulo da respiração e alcalinização do meio como observado na figura 5A, indicando que o Sr^{2+} intramitocondrial como no caso do Ca^{2+} , inibe a fosforilação oxidativa. A posterior adição de Sr^{2+} foi acompanhada de novo estímulo da respiração e acidificação do meio, indicando que o transporte de fosfato e a capacidade da mitocôndria em gerar o potencial eletroquímico de H^+ estavam preservados já que a captação desta quantidade de Sr^{2+} é dependente do potencial elétrico de membrana e do movimento simultâneo de fosfato ao interior da mitocôndria (LEHNINGER, 1974).

A inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} não é prevenida por ATP e Mg^{2+} .

VILLALOBO & LEHNINGER, (1980) demonstraram que ATP na presença de Mg^{2+} previne ou mesmo reverte a inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} . A figura 6A mostra o padrão de estímulo da respiração induzida por ADP e FCCP, na presença de ATP e Mg^{2+} , enquanto que a figura 6B mostra que após adição de Sr^{2+} não houve estímulo da respi

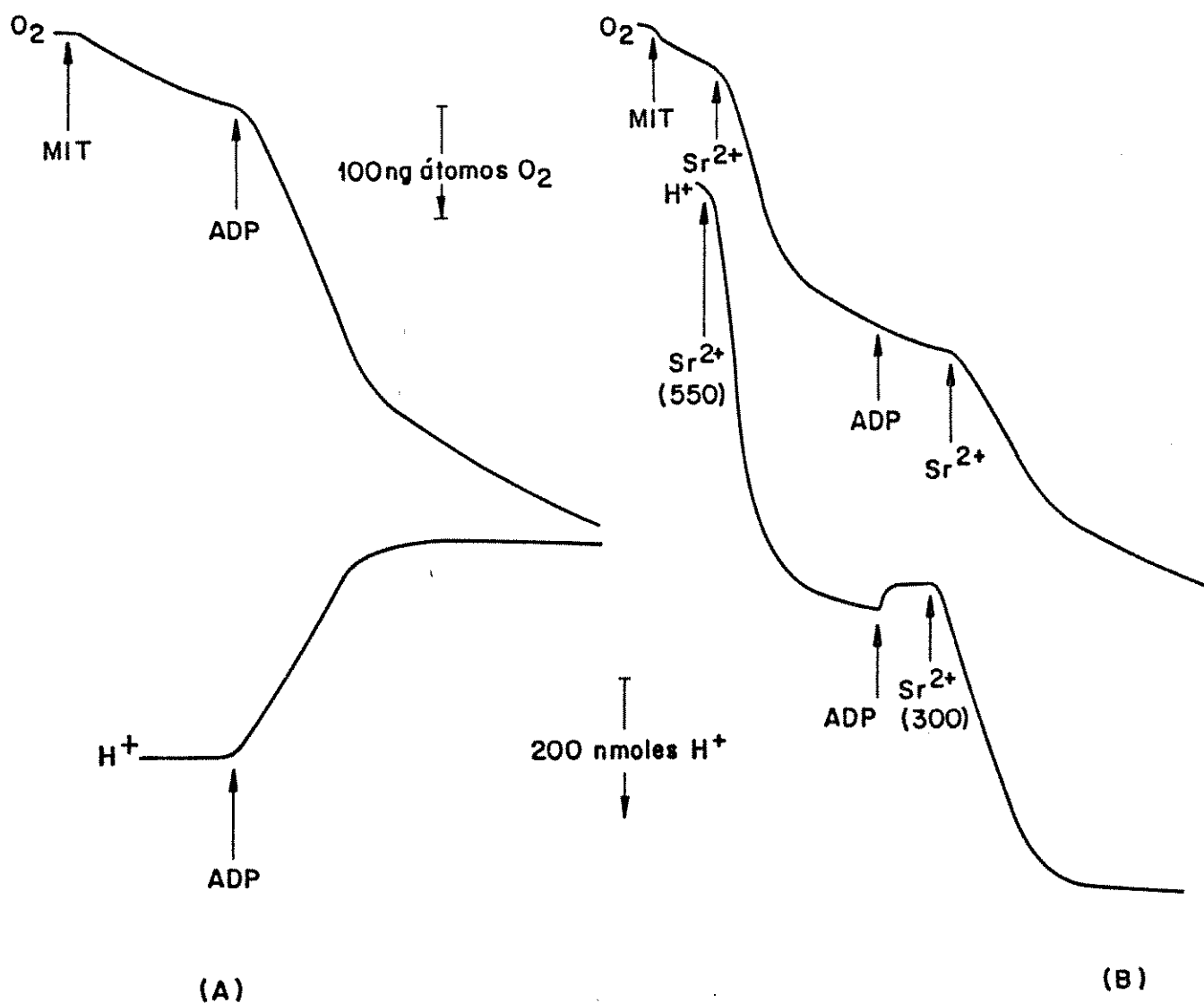


Figura 5 - Inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} intramitocondrial. O meio de reação (2,0ml, 25°C) era idêntico ao da figura 2. A reação foi iniciada com a adição de mitocôndrias (1,0mg/ml) seguida das adições de ADP (700nmoles) e Sr^{2+} (550 e 300nmoles mg^{-1}) respectivamente como indicado na figura.

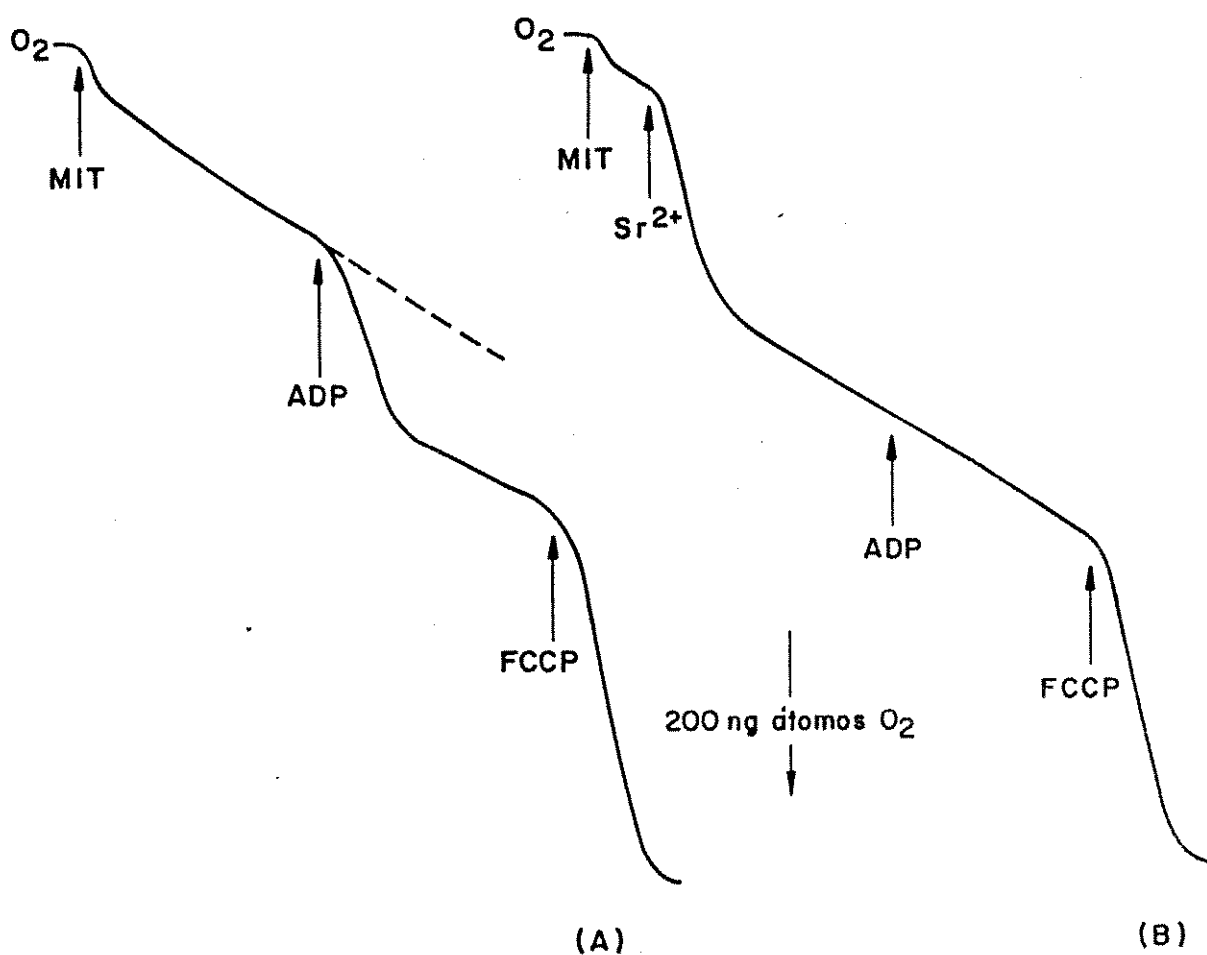


Figura 6 - A inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} não é prevenida por ATP e Mg^{2+} .
 O meio de reação (2,0ml, 25°C) continha os mesmos componentes da figura 2, além de ATP (345nmol) e Mg^{2+} (5,0mM). A reação era iniciada com mitocôndrias (1,5mg/ml). ADP (300nmol) e Sr^{2+} (500nmol mg^{-1} proteína) e FCCP (0,3 μ M) eram adicionados onde indicado na figura.

ração quando da adição de ADP nas mesmas condições. Este resultado indica que a inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} não é prevenida por ATP e Mg^{2+} . Como pode ser observado, o estímulo da respiração induzido por FCCP foi preservado na figura 6B indicando que o acúmulo de Sr^{2+} não afeta o transporte de elétrons na cadeia respiratória.

Efeito da concentração de Sr^{2+} sobre a velocidade de estado respiratório-3 induzido por ADP.

A figura 7 mostra o efeito da concentração de Sr^{2+} sobre a inibição do estado respiratório-3 induzido por ADP (fosforilação oxidativa) em mitocôndria de fígado de rato, usando-se succinato como substrato. Verifica-se que com a adição de cerca de 120nmoles de $\text{Sr}^{2+} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, houve inibição de aproximadamente 50% da respiração de estado-3 induzido por ADP. Cerca de 450nmoles de $\text{Sr}^{2+} \text{ mg}^{-1}$ de proteína eram necessários para causar uma completa inibição de estado respiratório-3 induzido por ADP. Foi observado que a concentração de Sr^{2+} necessária para causar 100% de inibição do estímulo da respiração induzido por ADP varia de preparação para preparação. Assim, a inibição de 100% era obtida em diferentes preparações mitocondriais com concentrações de Sr^{2+} que variavam de 400 à 600nmoles mg^{-1} de proteína.

Efeito da concentração de fosfato sobre a inibi-

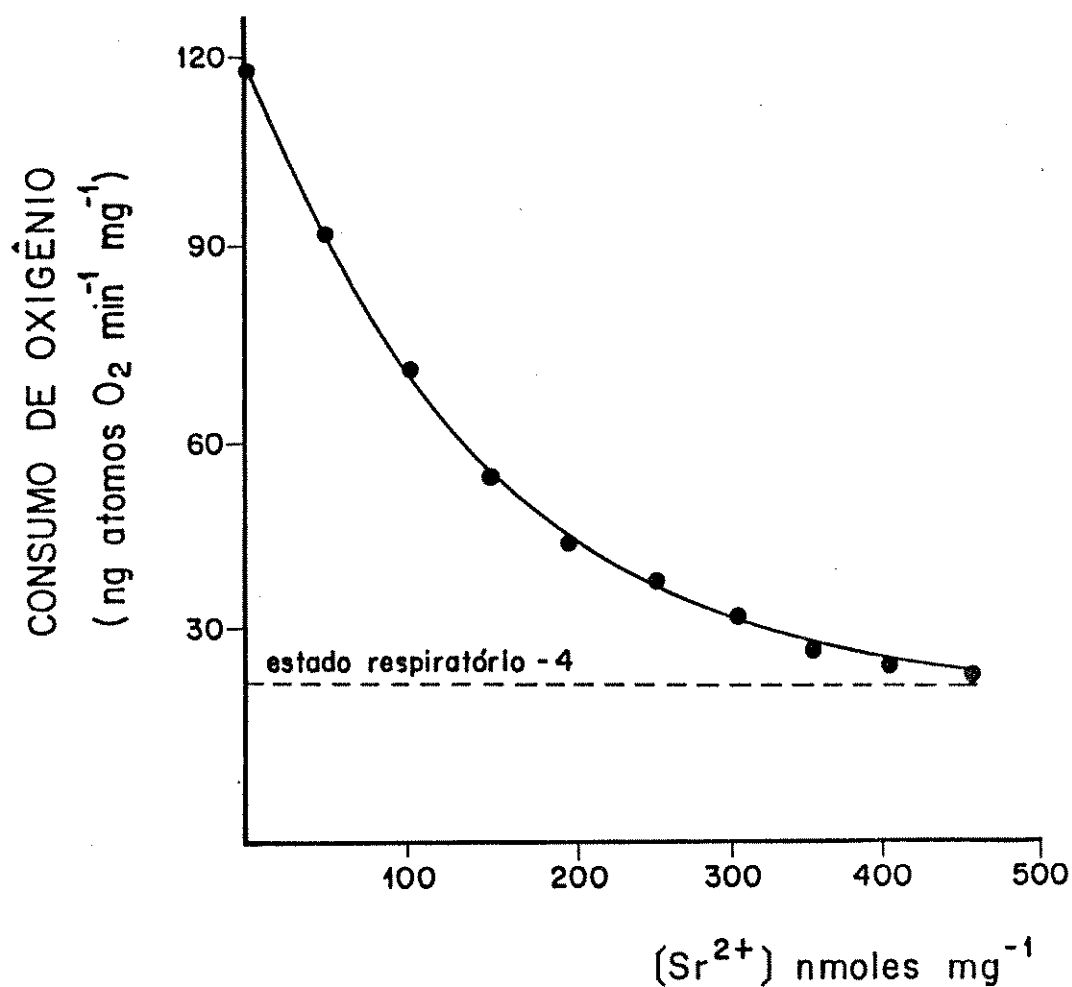


Figura 7 - Efeito da concentração de Sr^{2+} sobre a velocidade de estado respiratório-3 induzido por ADP. O meio de reação (2,0ml, 30°C) era idêntico ao da figura 2. Mitocondrias (1,25mg/ml) era incubada durante 1 minuto, e Sr^{2+} era então adicionado nas concentrações indicadas. Após o retorno da respiração ao estado-4 adicionava-se 300nmoles de ADP.

ção da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} .

Os experimentos das figuras 5 e 6 indicaram que o efeito do Sr^{2+} sobre a fosforilação oxidativa era independente de alterações a nível do transporte de elétrons e fosfato, bem como do acoplamento mitocondrial. O experimento da figura 8 testa a possibilidade da velocidade de fosforilação oxidativa na presença de Sr^{2+} estar sendo limitada pela concentração de fosfato livre na presença do referido cation. Assim, mitocôndrias eram incubadas na presença de diferentes concentrações de fosfato e o ADP era adicionado após captação de cerca de 150 nmoles de Sr^{2+} mg^{-1} proteína. Nessas condições a inibição da respiração de estado-3 induzida por ADP diminuía linearmente de 60% a aproximadamente 40% quando a concentração de fosfato no meio de reação variava de 2,0 a 10,0 mM. O pequeno efeito da concentração de fosfato indica que não este, mas outros fatores devem estar limitando a velocidade de fosforilação oxidativa na presença de Sr^{2+} intramitocondrial.

Titulação da fosforilação oxidativa por oligomicina ou carboxiatractilato na presença de Sr^{2+} .

Os experimentos das figuras 9 e 10 testam a hipótese do Sr^{2+} intramitocondrial estar inibindo especificamente uma das enzimas: translocase de nucleotídeos de adenina ou ATPsintetase. Assim, a velocidade de fosforilação oxidativa

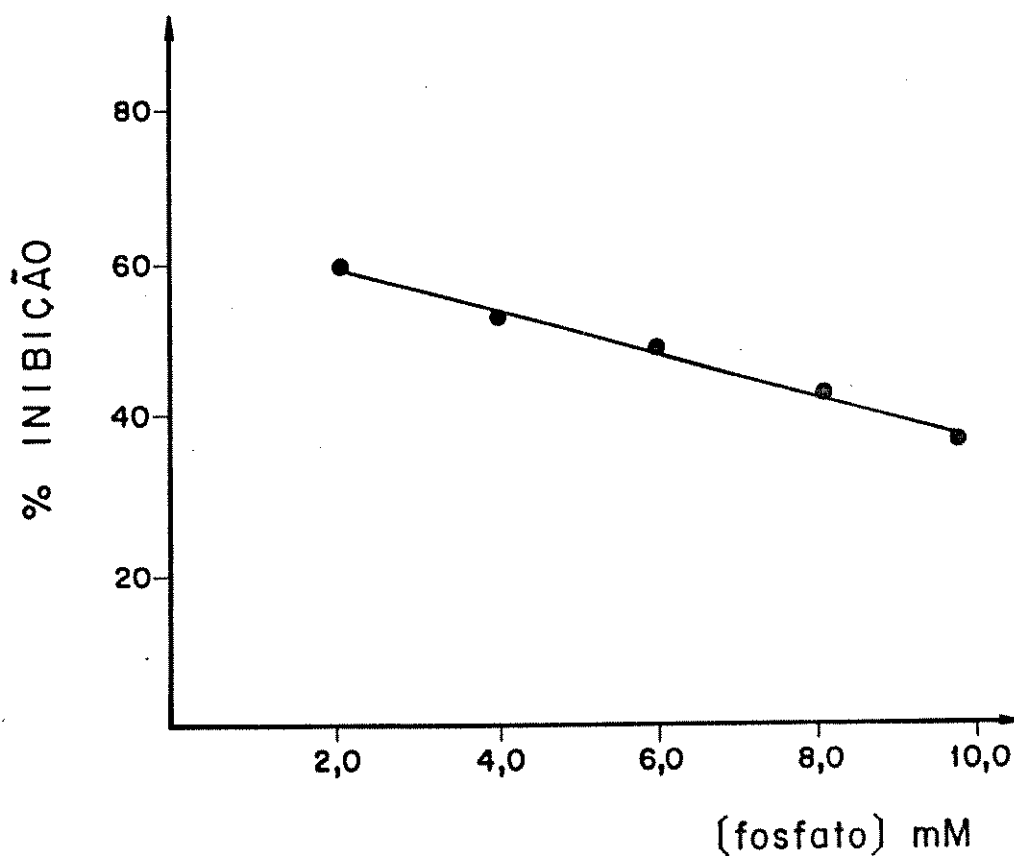


Figura 8 - Efeito da concentração de fosfato sobre a inibição da fosforilação oxidativa por Sr^{2+} . O meio de reação (2,0ml, 25°C) continha KCl 130mM, tampão HEPES 2,0mM (pH 7,1), succinato 1,0mM, rotenona 5,0 μ M, e diferentes concentrações de fosfato. As reações eram iniciadas com adições de mitocôndrias (1,5mg/ml) seguidas das adições de Sr^{2+} (150nmoles mg^{-1} proteína). As velocidades respiratórias de estado-3 eram medidas após adições de 300nmoles de ADP.

era inicialmente inibida pela captação de Sr^{2+} (curvas B) e em seguida a atividade remanescente era titulada com carboxiatractilato (inibidor específico da translocase de nucleotídeos de adenina), ou oligomicina (inibidor específico da ATPsintetase). As curvas (A) mostram as respectivas titulações na ausência de Sr^{2+} . Em ambos os experimentos a velocidade de fosforilação oxidativa era estimada indiretamente através da velocidade de influxo de H^+ ao interior da mitocôndria após a adição de ADP (MITCHELL, 1961). Pode ser observado que as concentrações de carboxiatractilato e oligomicina responsáveis pela inibição de cerca de 10% na velocidade de influxo de prótons nos experimentos controles (A) eram também responsáveis por incrementos da mesma ordem na inibição causada por Sr^{2+} . Estes resultados indicam que nestas condições as duas reações (translocação de nucleotídeos de adenina e síntese de ATP) são de primeira ordem em relação a ATPMg e ADPMg respectivamente. Caso apenas uma enzima estivesse limitando a velocidade de fosforilação oxidativa inibida por Sr^{2+} não haveria acréscimo desta inibição quando a outra fosse ligeiramente inibida por carboxiatractilato ou oligomicina. Isto indica que o Sr^{2+} não se liga a nenhuma destas enzimas, mas provavelmente a seus substratos, diminuindo suas concentrações efetivas. Como o fosfato não parece ser o fator limitante da velocidade de fosforilação oxidativa inibida por Sr^{2+} (figura 8), é possível que a complexação deste cátion pelo ATP interno estivesse limitando a velocidade de entrada de ADP na mitocôndria, o que por sua vez limitaria também a velocidade da rea

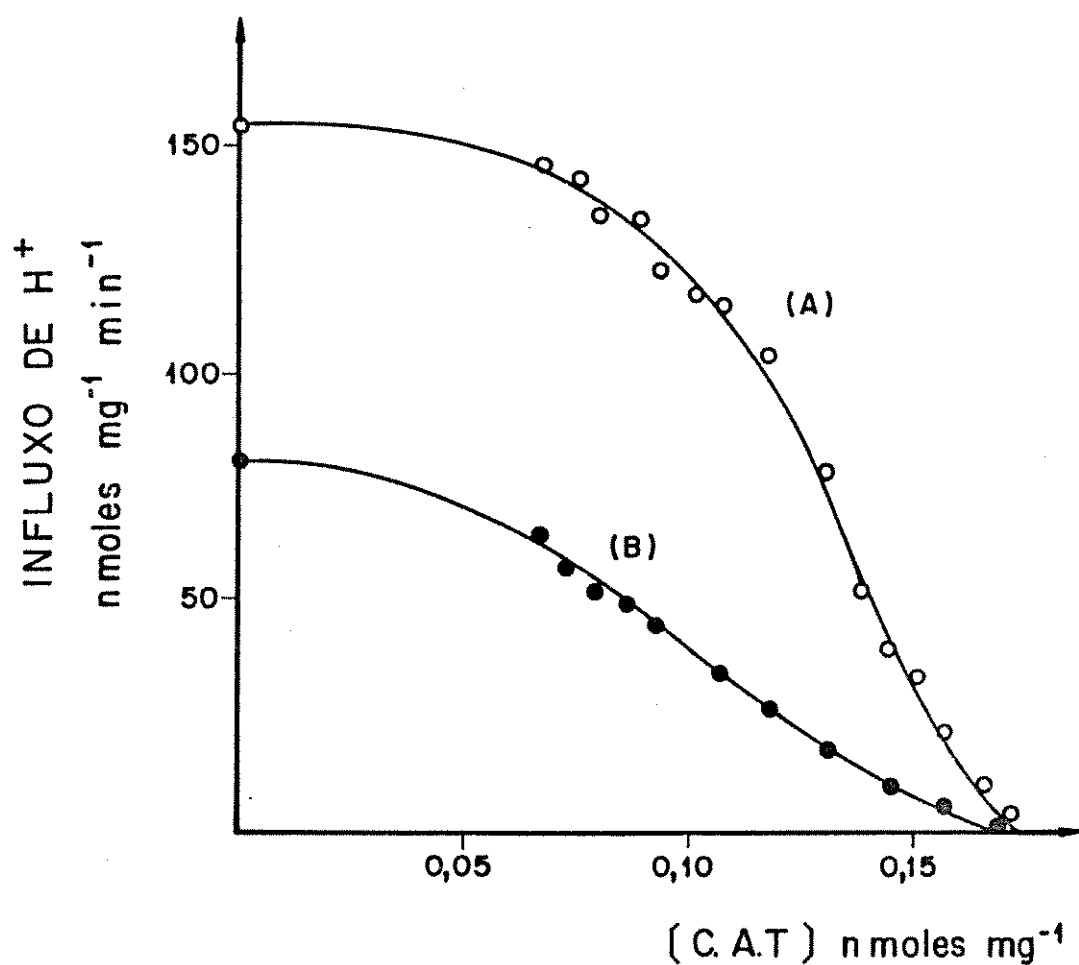


Figura 9 - Titulação da fosforilação oxidativa por carboxiatractilato. (C.A.T.).

O meio de reação (2,0ml, 25°C) continha os mesmos componentes da figura 2, e diferentes concentrações de carboxiatractilato estavam presentes antes da adição de mitocôndrias (1,25mg/ml). A curva (B) representa as velocidades de fosforilação quando as adições de 500nmoles de ADP eram precedidas pela captação de 200nmoles de Sr^{2+} mg⁻¹ proteína mitocondrial. Em (A) o Sr^{2+} era omitido.

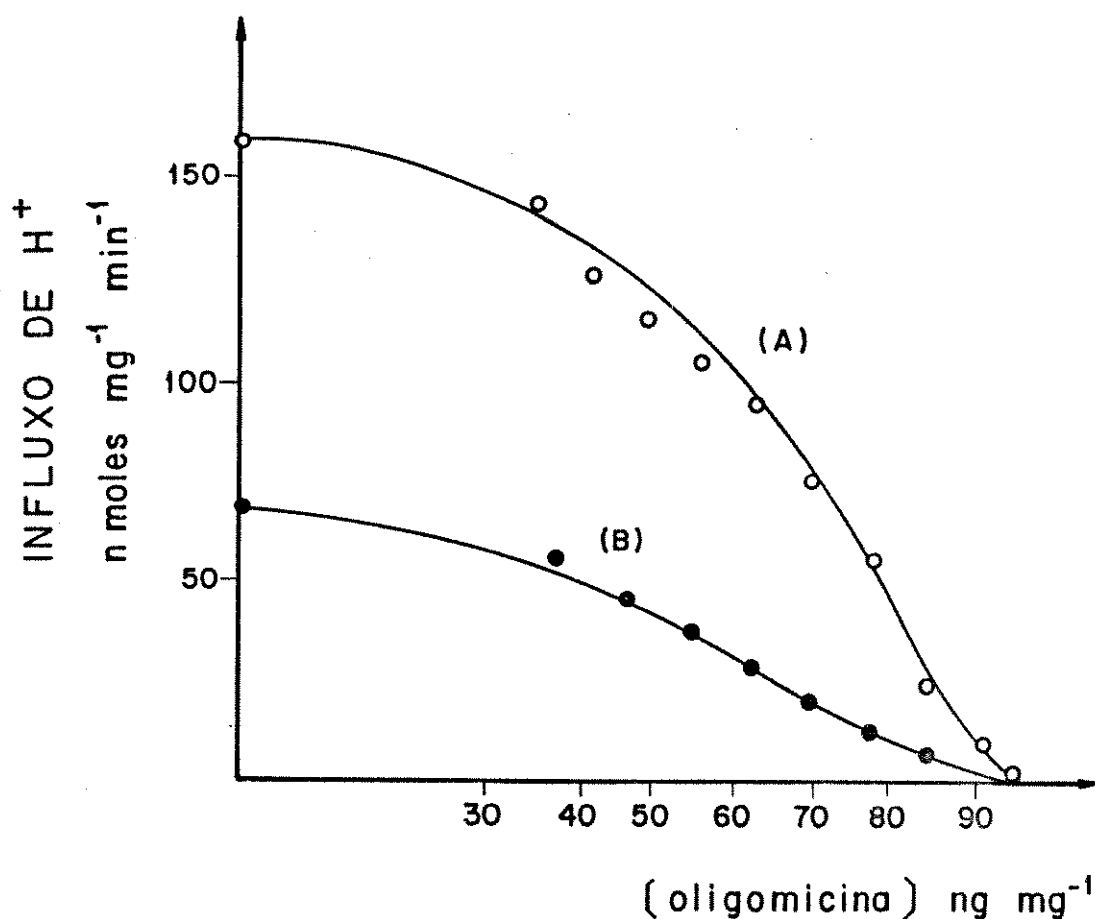


Figura 10- Titulação da fosforilação oxidativa por oligomicina.

O meio de reação (2,0ml, 25°C) continha os mesmos componentes da figura 2, e diferentes concentrações de oligomicina estavam presentes antes da adição de mitocôndrias (2,6mg/ml). A curva (B) representa as velocidades de fosforilação quando adições de 1.250nmoles de ADP eram precedidas pela captação de 110nmoles Sr^{2+} mg⁻¹ proteína mitocondrial. Em (A) o Sr^{2+} era omitido.

ção catalizada pela ATPsintetase.

Inibição da atividade ATPásica de Partículas Submitocondriais invertidas.

Devido à dificuldade na determinação das concentrações das espécies envolvidas neste mecanismo de inibição, o problema foi abordado utilizando-se partículas submitocondriais onde a enzima ATPsintetase fica exposta, eliminando-se a necessidade de transporte dos nucleotídeos através da membrana. Além disso, as concentrações das espécies envolvidas (nucleotídeos e cátions), nas suas formas livres e ligadas, podem ser determinadas nos meios de reação.

A figura 11 mostra a atividade ATPásica de partículas submitocondriais invertidas na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} ou Sr^{2+} . Uma significativa inibição da atividade ATPásica era observada com o aumento das concentrações dos cátions no meio. Uma inibição de 50% da atividade de ATPásica era observada pela presença de 5,0mM de Sr^{2+} ou 2,5mM de Ca^{2+} . Uma inibição de aproximadamente 90% era observada com concentrações de 50,0mM de Sr^{2+} ou 25,0mM de Ca^{2+} .

A tabela 1 mostra as concentrações de MgATP, o verdadeiro substrato da ATPase (SELWYN, 1967; KAGAWA, 1984), na ausência de Ca^{2+} ou Sr^{2+} ou na presença desses cátions, nas concentrações que causaram 50% e 90% de inibição. Pode-se observar que em ambos os casos, 50% de inibição ocorria quan-

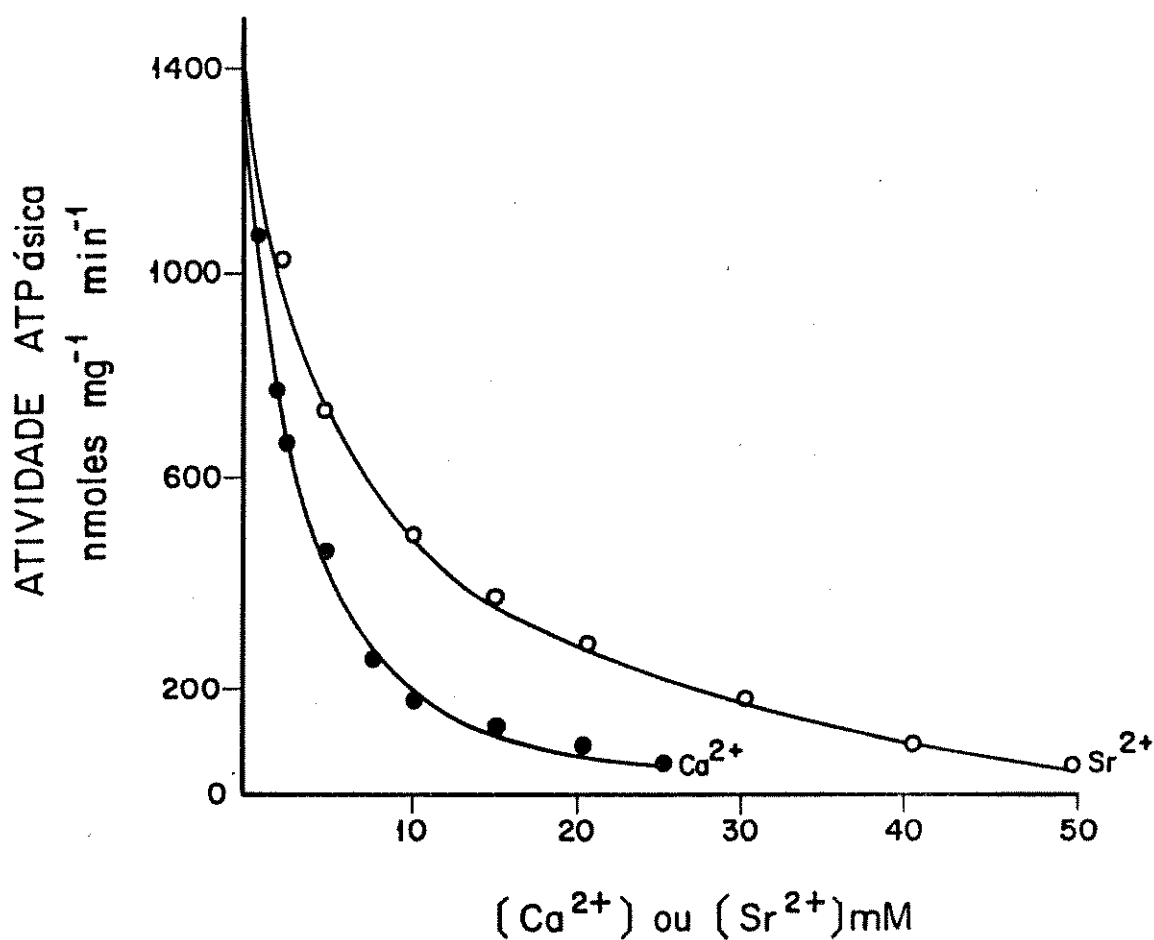


Figura 11- Inibição da atividade ATPásica de partículas submitocondriais invertidas por Sr^{2+} .
 O meio de reação (1,0ml, 32°C) continha KCl 130mM, tampão Hepes 2,0mM (pH 7,4), fosfoenolpiruvato 0,5mM, NADH 200nmoles, piruvato quinase 3,7 unidades, desidrogenase lática 9,6 unidades, partículas submitocondriais 0,131mg e diferentes concentrações de Ca^{2+} e Sr^{2+} . Após 3 minutos de incubação a reação foi iniciada pela adição de Mg^{2+} 1,0mM.

Tabela 1

Efeito da concentração de Ca^{2+} e Sr^{2+} na complexação de Mg^{2+} por ATP

	$[\text{c\~{a}tion}]_{\text{total}}$ mM	$[\text{c\~{a}tion-ATP}]$ mM	$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{total}}$ mM	$[\text{MgATP}]$ mM	$[\text{ATP}]_{\text{total}}$ mM	Inibição ATPase %
ausência de c\~{a}tions	-	-	1	0,91	2	0
Ca^{2+}	2,5	1,12	1	0,65	2	~ 50
	25,0	1,83	1	0,15	2	~ 90
Sr^{2+}	5,0	1,20	1	0,62	2	~ 50
	50,0	1,82	1	0,16	2	~ 90

do cerca de 1,2mM do ATP total presente no meio (2,0mM) estava ligado ao Sr^{2+} ou Ca^{2+} . Sob estas condições a concentração de MgATP caía de 0,91mM para cerca de 0,62mM. Com 50,0mM de Sr^{2+} total ou 25,0mM de Ca^{2+} total que causaram 90% de inibição da atividade ATPásica, somente cerca de 0,15mM de ATP estava na forma de MgATP, e o ATP restante estava complexado com Sr^{2+} ou Ca^{2+} .

Estes resultados indicam fortemente que esses cations inibem a atividade ATPásica competindo com o Mg^{2+} para a formação do complexo MgATP. A figura 12 mostra a dependência da atividade ATPásica das partículas submitocondriais em relação à concentração de Mg^{2+} no meio de reação. Nas condições do experimento da figura 12 a atividade máxima era obtida para uma concentração de Mg^{2+} total de aproximadamente 2,0mM (MgATP=1,58mM). Concentrações superiores a 2,5mM de Mg^{2+} total causam inibição da atividade ATPásica devido a uma ação direta do Mg^{2+} livre sobre a enzima (SELYN, 1967). Pode ainda ser observado na figura 12 que Sr^{2+} ou Ca^{2+} não substituem o Mg^{2+} ou seja que os complexos SrATP ou CaATP não são substratos da enzima.

A figura 13 mostra que quando as partículas são incubadas na presença de concentrações constantes de Ca^{2+} ou Sr^{2+} e concentrações crescentes de Mg^{2+} existe uma gradual remoção da inibição da atividade ATPásica indicando o caráter competitivo na formação dos referidos complexos com ATP. A figura 14 mostra os resultados de experimentos onde o efeito da concentração de Ca^{2+} era estudado na presença

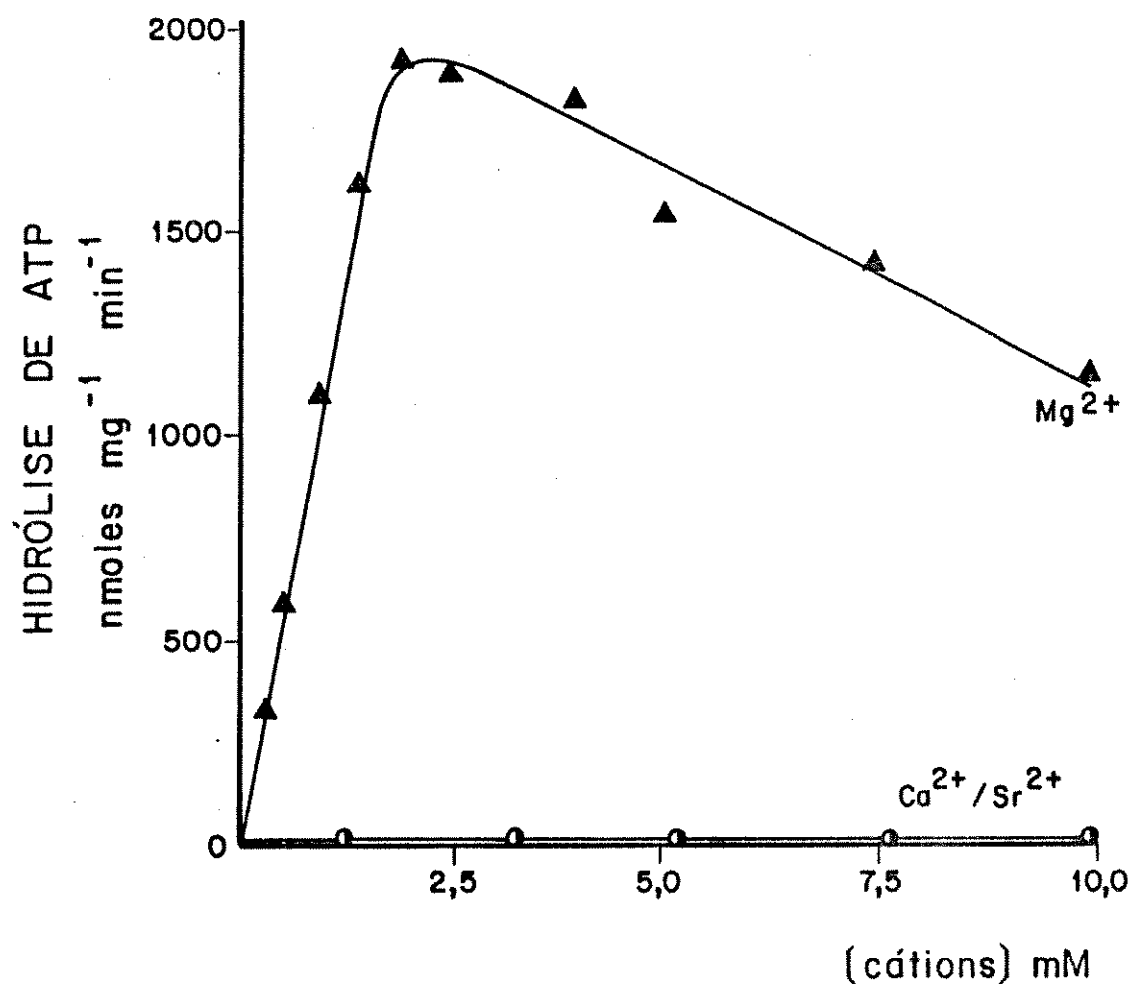


Figura 12 - Atividade ATPásica de partículas submitocondriais invertidas na presença de diferentes cátions. O meio de reação (1,0ml, 32°C) continha os mesmos componentes da figura 11. Após 3 minutos de incubação, a reação foi iniciada pela adição de diferentes concentrações de Mg²⁺ (▲), Ca²⁺ (○), Sr²⁺ (●).

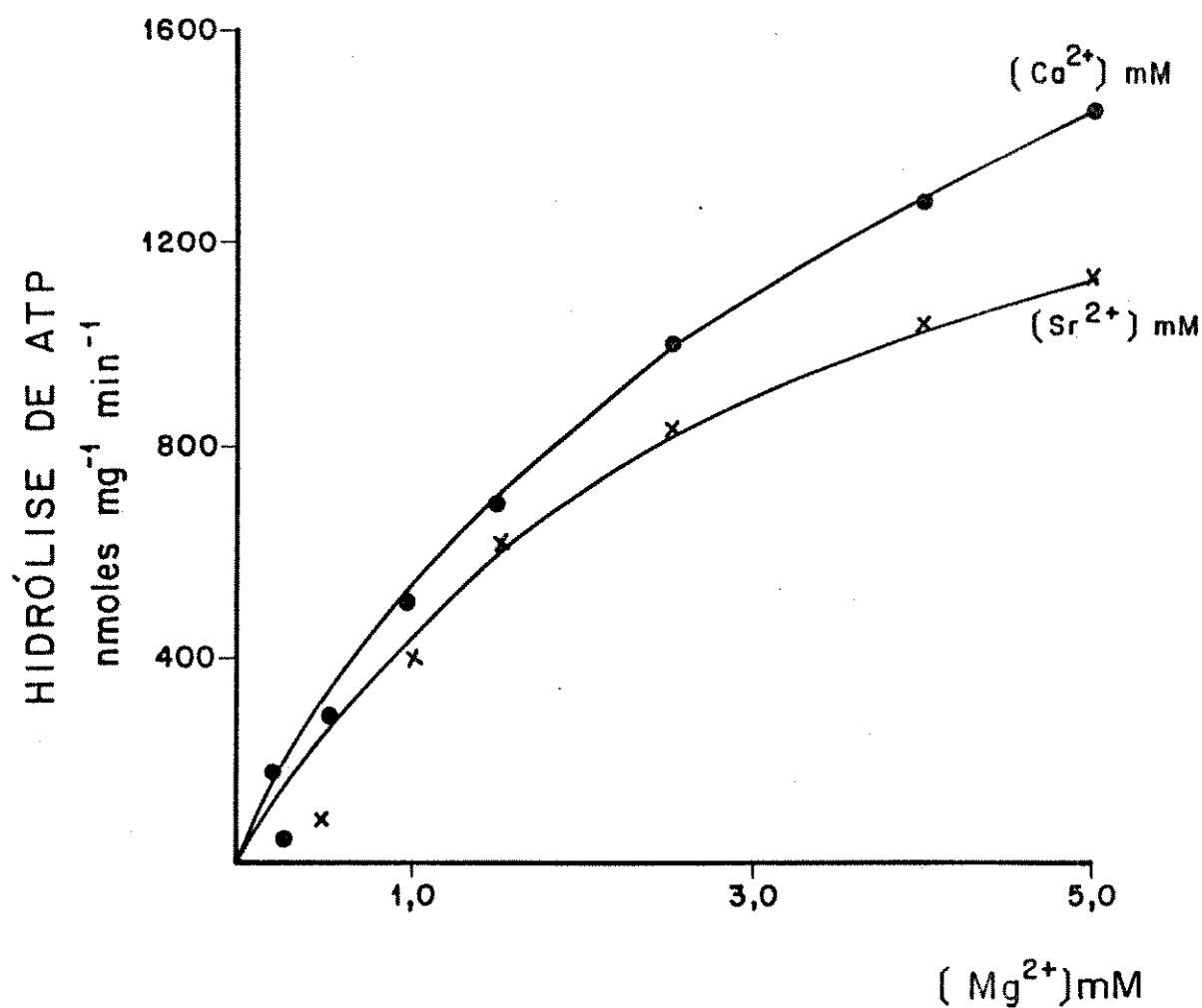


Figura 13 - A inibição da atividade por Sr^{2+} e Ca^{2+} decresce na presença de concentrações crescentes de Mg^{2+} .
O meio de reação (1,0ml, 32°C) continha os mesmos componentes da figura 11, na presença de Sr^{2+} 10,0mM (x) ou Ca^{2+} 2,5mM (●).

de diferentes concentrações de Mg^{2+} . O gráfico dos inversos das velocidades de reação ($1/v$) em função dos inversos das concentrações de substrato ($1/S$) mostra que todas as retas obtidas correspondentes às diferentes concentrações de Ca^{2+} interceptam a ordenada no mesmo ponto, confirmando a natureza competitiva do mecanismo.

Inibição da atividade ATPásica determinada por método potenciométrico.

O experimento da figura 15 foi realizado na ausência do sistema regenerador de ATP (fosfoenol piruvato/piruvato quinase) que é também dependente de Mg^{2+} . A figura 15A mostra que a adição de partículas submitocondriais ao meio de reação ocasiona uma rápida acidificação do meio sensível a oligomicina, inibidor específico da enzima ATP sintetase. De acordo com os dados da figura 11, a atividade de ATPásica determinada por esse método era quase totalmente inibida pela presença de Sr^{2+} 40,0mM (fig.15B). A subsequente adição de Mg^{2+} 20,0mM revertia parcialmente a atividade da enzima, como esperado com base nos resultados das figuras 13 e 14. Estes resultados eliminam a possibilidade de que a atividade do sistema regenerador de ATP, também dependente de Mg^{2+} , estivesse interferindo nos nossos resultados.

Conteúdo de nucleotídeos de adenina em mitocon-

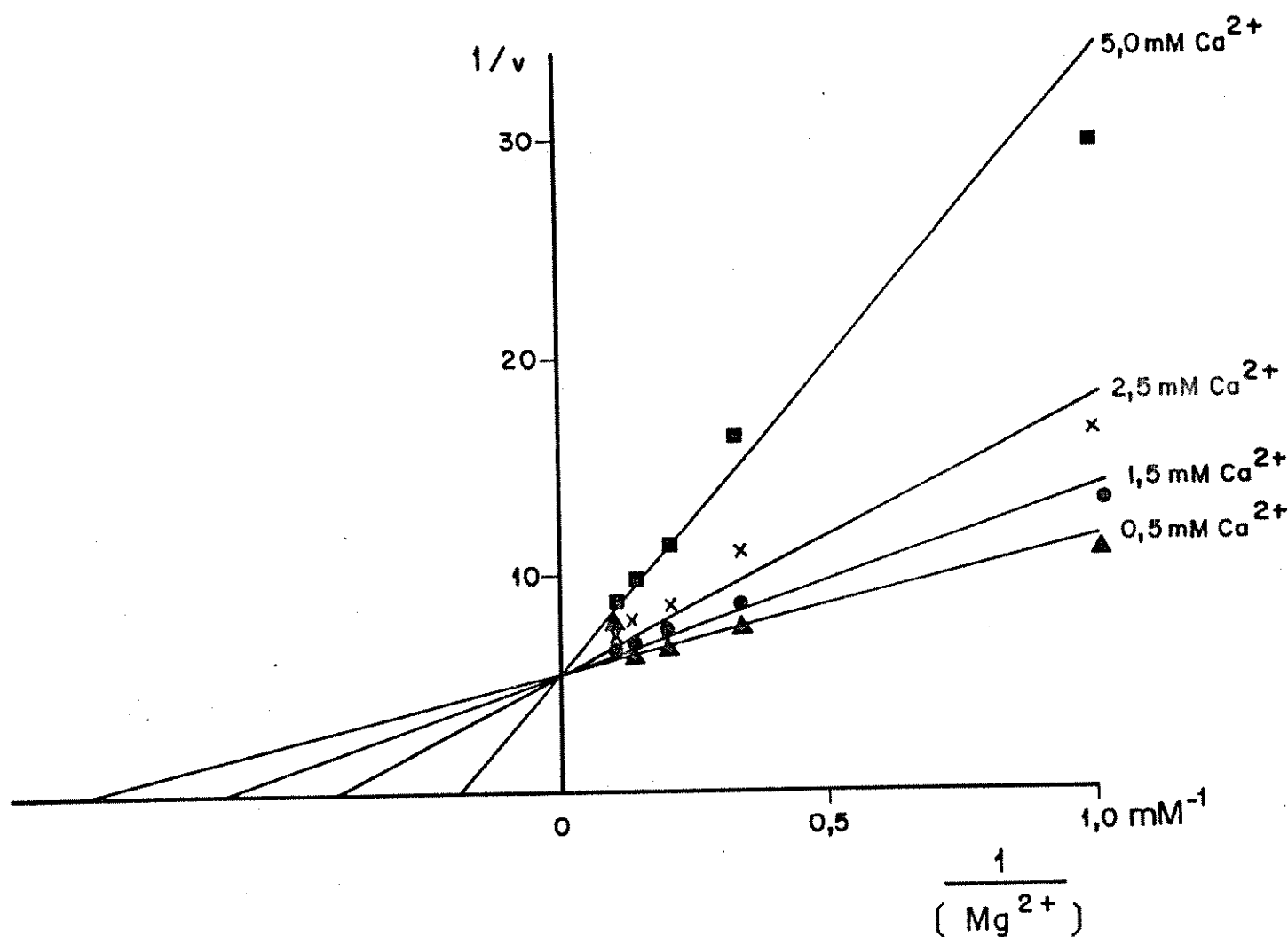


Figura 14- Efeito da concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre a atividade ATPásica de partículas submitocondriais invertidas. O meio de reação (1,0ml, 32°C) continha os mesmos componentes da figura 11, em presença de varias concentrações de Ca^{2+} . Após 3 minutos de incubação, a reação foi iniciada pela adição de Mg^{2+} nas concentrações indicadas acima.

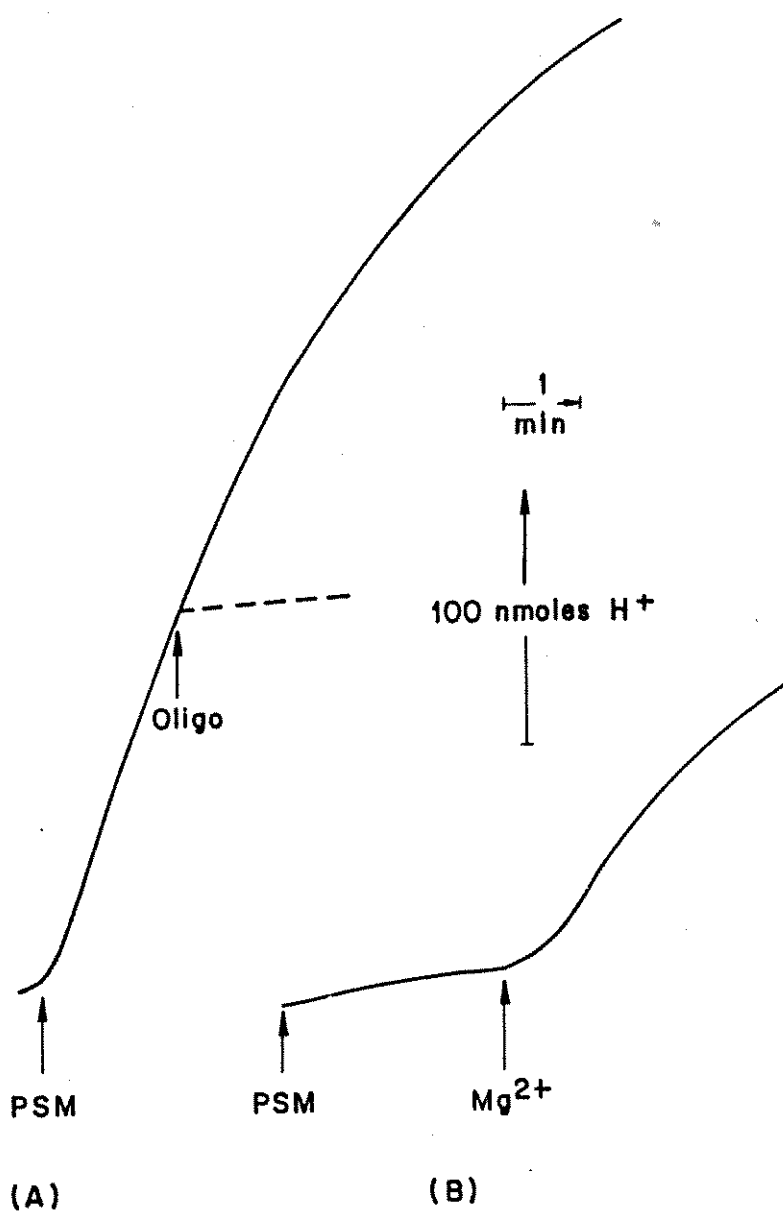


Figura 15 - Inibição da atividade ATPásica determinada por método potencio-métrico.

O meio de reação (2,2ml, 30°C) continha KCl 130mM, tampão Hepes 1,0mM (pH 7,2), ATP 1,3mM, Mg^{2+} 1,0mM. Em (A) Sr^{2+} era omitido e em (B) Sr^{2+} 40,0mM estava presente. Após 1 minuto de incubação a reação foi iniciada pela adição de PSM 0,6mg. Oligomicina 3,3 μ g e Mg^{2+} 20,0mM foram adicionados onde indicado.

drias hepáticas após captação de Ca^{2+} : efeito de ATP e Mg^{2+} exógenos.

Um dos mecanismos propostos para explicar a inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} intramitocondrial é a perda de nucleotídeos endógenos associada ao acúmulo de Ca^{2+} pela organela (MORENO-SANCHEZ, 1983). Tem sido descrito que esta perda de nucleotídeos pode ser prevenida quando a captação de Ca^{2+} é efetuada por mitocôndrias incubadas em meio de reação contendo ATP e Mg^{2+} exógenos (ZOCCARATO et al, 1981). Os resultados apresentados na tabela 2 mostram os conteúdos de nucleotídeos de adenina totais (AMP, ADP e ATP) em mitocôndrias em condições controle (Ca^{2+} ausente) e após a captação de 200nmoles Ca^{2+} mg^{-1} de proteína mitocondrial. Quando as mitocôndrias eram incubadas na ausência de ATP e Mg^{2+} exógenos, seu conteúdo de nucleotídeos de adenina diminuía aproximadamente 25% dois minutos após sua adição ao meio de reação contendo Ca^{2+} . Por outro lado, quando este experimento era efetuado na presença de ATP e Mg^{2+} havia um aumento no conteúdo de nucleotídeos mitocondriais. Este aumento era mais acentuado na presença de Ca^{2+} , o que está de acordo com resultados anteriores demonstrando acúmulo de Mg^{2+} e ATP pela mitocôndria nesta condição experimental (CARAFOLI et al, 1964 e AUSTIN & APRILLE, 1984).

Inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} em

Tabela 2 - Dosagem de nucleotídeos de adenina mitocondriais

Mitocondrias de fígado de rato (5,0mg) foram incubadas em meio de reação (2,7ml, 25°C) contendo KCl 130mM tampão Hepes 2,0mM (pH 7,2) succinato 2,0mM, fosfato 2,0mM rotenona 5,0μM, BSA 0,1mg%, EGTA 0,5mM na presença ou não de 200nmoles de Ca^{2+} mg^{-1} de proteína.

(A) Mg^{2+} e ATP ausentes

(B) Mg^{2+} (4,0mM) e ATP (3,0mM) presentes no meio de reação

CONDIÇÕES	NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA INTRAMITOCONDRIAIS (nmoles mg^{-1})	
	CONTROLE	Ca^{2+} (200nmoles)
(A) - (ATP; Mg^{2+})	12,8*	9,9
(B) + (ATP; Mg^{2+})	13,4	17,16

*Os valores apresentados representam a média aritmética de dois experimentos.

mitocondrias suspensas em meio de reação contendo ATP e Mg^{2+} .

A figura 16A mostra que a adição de ADP à suspensão mitocondrial respirando no estado de repouso (respiração de estado 4 (CHANCE, 1955)) causa um aumento transitório na velocidade de respiração (respiração de estado 3 (CHANCE, 1955)). A figura 16B mostra que a adição de Ca^{2+} à suspensão mitocondrial também induz um estímulo similar da respiração indicando que o Ca^{2+} adicionado está sendo acumulado pela mitocondria (CARAFOLI et al, 1964). A posterior adição de ADP causa um pequeno estímulo respiratório indicando que o Ca^{2+} intramitocondrial inibe a fosforilação oxidativa mesmo na presença de ATP e Mg^{2+} exógenos.

A figura 17 mostra o efeito da concentração de Ca^{2+} sobre a inibição do estado respiratório 3 induzido por ADP, na presença de ATP e Mg^{2+} . É possível observar que a inibição aumenta com o aumento da concentração de Ca^{2+} . Porém esta inibição é apenas parcial e atinge um máximo a uma concentração de Ca^{2+} de aproximadamente $130 \text{ nmoles } mg^{-1}$.

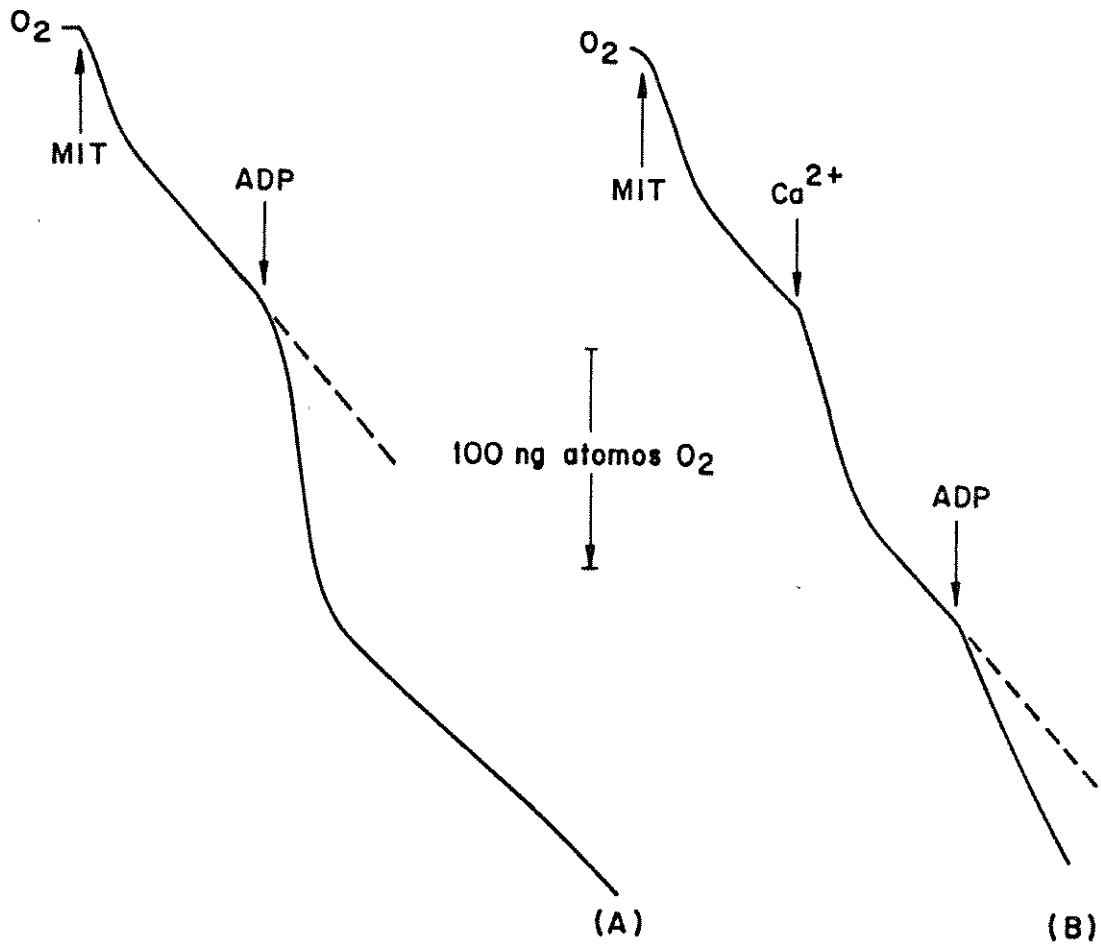


Figura 16 - Inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} em mitocôndrias suspensas em meio de reação contendo ATP e Mg^{2+} . O meio de reação (2,0ml, 25°C) continha KCl 130mM, tampão Hepes 2,0mM (pH 7,2), fosfato 3,0mM, succinato 2,0mM, rotenona 5,0 μ M, ATP 3,0mM e Mg^{2+} 4,0mM. A reação foi iniciada com adição de mitocôndrias (1,0mg/ml). ADP (300 η moles) e Ca^{2+} (200 η moles mg^{-1} de proteína), eram adicionados onde indicado na figura. (A) controle; (B) Ca^{2+} (200 η moles mg^{-1}).

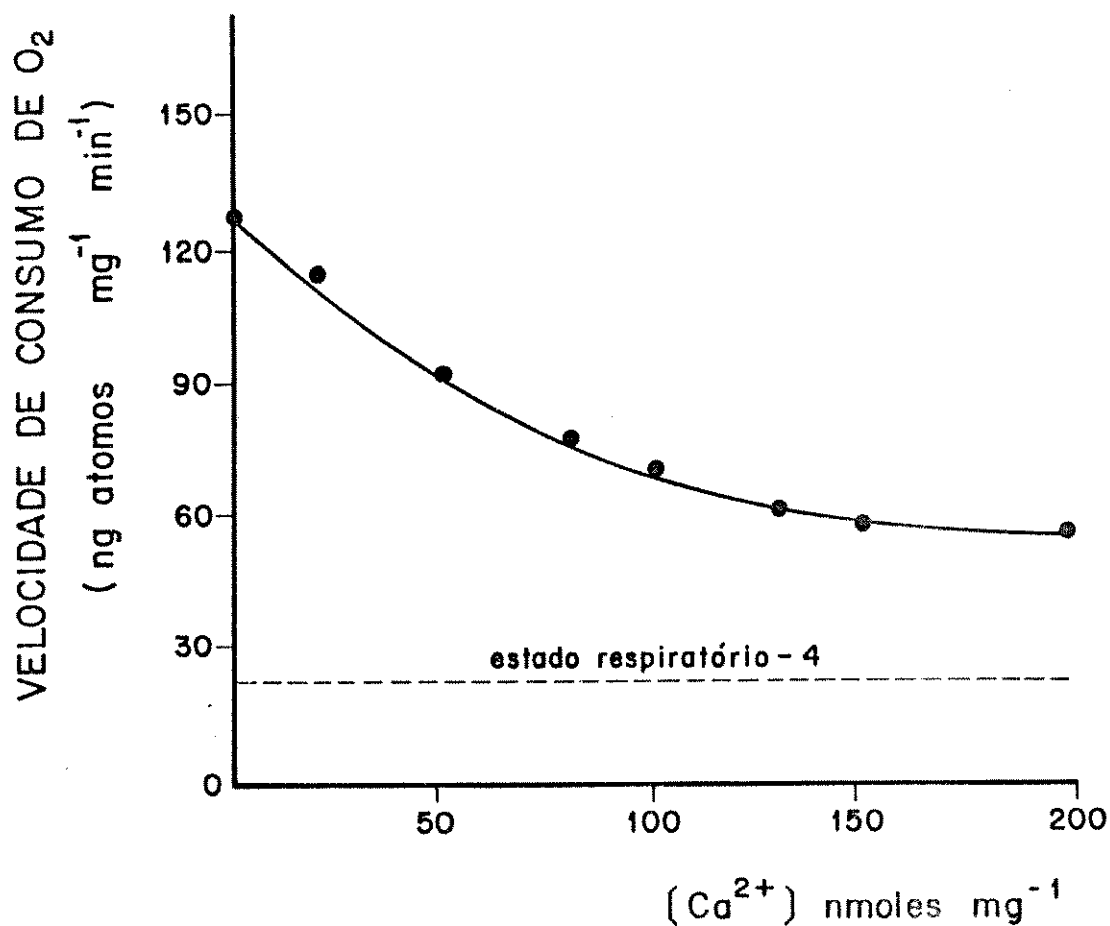


Figura 17 - Efeito da concentração de Ca^{2+} sobre a velocidade de consumo de oxigênio na presença de ATP e Mg^{2+} .
 O meio de reação (1,3ml, 30°C) continha KCl 130mM, tampão Hepes 2,0mM (pH 7,2), succinato 2,0mM, fosfato 3,0mM, rotenona 5,0 μ M ATP 3,0mM, Mg^{2+} 4,0mM e EGTA 0,5mM para a condição controle. Mitochondrias de fígado de rato (1,0mg/ml) era incubada durante 1 minuto e Ca^{2+} era então adicionado nas concentrações indicadas. Após o retorno da respiração ao estado-4 adicionavam-se 200nmoles de ADP (ver figura 15).

IV. Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a inibição da fosforilação oxidativa em mitocôndrias hepáticas intactas bem como da atividade ATPásica de partículas submitocôndriais por Ca^{2+} e Sr^{2+} possa ser explicada em grande parte, senão totalmente, pela complexação de nucleotídeos de adenina pelos referidos cátions. Esta complexação limitaria cineticamente a fosforilação oxidativa em mitocôndrias intactas a nível das reações catalizadas pela translocase de nucleotídeos de adenina e F_0F_1 -ATPase.

A primeira reação limitaria a velocidade de entrada de ADP externo para o interior da mitocôndria. Este transporte é catalizado pela translocase específica que troca um ADP^{3-} externo por um ATP^{4-} interno nas suas formas livres (KLINGENBERG & ROTTENBERG, 1977). Na forma de complexo com Ca^{2+} ou Sr^{2+} o ATP interno certamente não é transportado pela translocase. A reação catalizada pela F_0F_1 -ATPase estaria ainda limitada na presença de altas concentrações de Sr^{2+} ou Ca^{2+} uma vez que seus substratos são MgADP ou MgATP nas reações de síntese ou hidrólise de ATP respectivamente.

A estimativa das concentrações de MgATP nas condições em que a reação de hidrólise de ATP era inibida em cerca de 90% por Sr^{2+} ou Ca^{2+} mostra a existência de cerca de apenas 0,15mM deste complexo, concentração esta muito inferior ao $K_m = 0,4\text{mM}$ da enzima (KOZLOV & SKULACHEV, 1977).

Os resultados da literatura indicam que mitocon-

drias isoladas de diferentes tecidos possuem sensibilidades diferentes ao Ca^{2+} quanto ao seu efeito sobre a fosforilação oxidativa. Estas diferenças seriam explicadas em função de diferenças no conteúdo de Mg^{2+} endógeno bem como diferenças nas propriedades de transporte deste íon através da membrana destas mitocôndrias. Sabe-se que algumas mitocôndrias captam Mg^{2+} ativamente em algumas condições experimentais (BRIERLEY, 1976). Uma condição que merece destaque é a captação de Mg^{2+} por mitocôndrias hepáticas incubadas na presença de ADP e ATP onde tanto o cátion quanto os nucleotídeos são acumulados no interior da mitocôndria por processo pouco esclarecido e que é estimulado na presença de Ca^{2+} (MEISNER & KLINGENBERG, 1968; CARAFOLI et al, 1964; AUSTIN & APRILLE, 1984)

Estes resultados poderiam explicar a ausência de inibição total da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} em nossos experimentos com mitocôndrias hepáticas incubadas na presença de Mg^{2+} e ATP bem como a ausência de inibição ou reversão da inibição observada por VILLALOBO & LEHNINGER, (1980) e ABOU-KHALIL, (1981) em mitocôndrias tumorais. Nossos resultados com Sr^{2+} indicam todavia que a inibição causada por este íon não é afetada pela presença de Mg^{2+} e ATP no meio de reação. Certamente o acúmulo de Mg^{2+} e ATP não ocorre ou é muito lento na presença de Sr^{2+} .

Outras diferenças observadas entre o transporte de Ca^{2+} e Sr^{2+} em mitocôndrias hepáticas, tais como inchamento mitocondrial, estão de acordo com dados anteriores de nosso laboratório (COELHO & VERCESI, 1980) bem como de outros (CA

RAFOLI, 1965; CAPLAN & CARAFOLI, 1965).

O emprego de Sr^{2+} em nossos experimentos teve grande importância em dois pontos fundamentais: a) permitiu o estudo da inibição da fosforilação oxidativa em mitocôndrias cujo acoplamento e integridade estrutural estavam preservados; b) fortaleceu a hipótese de que a inibição da fosforilação aqui estudada se deve à complexação entre estes cátions e os nucleotídeos de adenina uma vez que o grau de inibição nos dois casos está de acordo com as constantes de associação destes complexos. Assim, 50% de inibição da atividade hidrolítica da ATPase era obtida na presença de cerca de 2,5mM de Ca^{2+} e 5,0mM de Sr^{2+} , condições em que as concentrações do complexo MgATP eram quase idênticas e próximas de 0,6mM.

Os estudos com partículas submitocondriais, além de permitirem a determinação das espécies em contacto direto com o complexo enzimático F_0F_1 -ATPase, eliminaram a possibilidade de envolvimento de outros fatores no mecanismo desta inibição tais como a inibição das translocases de nucleotídeos de adenina e de fosfato.

A reversão da inibição da atividade ATPásica induzida por incrementos na concentração de Mg^{2+} quando as concentrações de Ca^{2+} ou Sr^{2+} eram mantidas constantes, indicavam claramente a existência de competição entre Mg^{2+} e estes inibidores na formação de complexos com ATP. Esta hipótese era depois comprovada nos experimentos cinéticos onde os dados representados na forma de duplas recíprocas for

neceram retas interceptando o eixo das ordenadas no mesmo ponto, indicando que o K_m para Mg^{2+} era aumentado na presença de Ca^{2+} .

Alguns autores propõem que a inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} pode ter um importante papel na regulação do metabolismo celular (CARAFOLI et al, 1964; MEISNER & KLINGERBERG, 1968; VALLIERES et al, 1975; JACOBUS et al, 1975; SORDHAL, 1975; MALMSTROM & CARAFOLI, 1977; ROMAM et al, 1981; AUSTIN & APRILLE, 1984; MORENO-SÁNCHEZ, 1985). Contudo, nossos resultados indicam que esta inibição não deve ocorrer nas condições fisiológicas normais da célula, onde o conteúdo total de Ca^{2+} mitocondrial certamente não excede $10 \text{ nmoles mg}^{-1}$ (WILLIAMSON et al, 1981) podendo, segundo alguns autores, estar na faixa de 0 - 3 nmoles mg^{-1} (ver revisão de HANSFORD, 1985).

É importante lembrar que 50% de inibição da fosforilação oxidativa por Ca^{2+} era de 200 nmoles quando mitocôndrias intactas eram incubadas na presença de concentrações fisiológicas de Mg^{2+} e ATP. Esta concentração é cerca de 100 vezes superior a aquelas encontradas em mitocôndrias "in situ" nas condições normais. Entretanto, pode ser atingida em algumas condições patológicas, onde a homeostase do Ca^{2+} intracelular pode estar alterada devido, entre outros fatores, à diminuição de ATP necessário ao bombeamento de Ca^{2+} para o exterior da célula pela ATPase Ca^{2+} -dependente da membrana celular ou a alterações na permeabilidade desta membrana (MALMSTROM & CARAFOLI, 1977). Nes-

tas condições o grande aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol permite o acúmulo de altas concentrações de Ca^{2+} pela mitocôndria. Assim, a inibição da fosforilação oxidativa pelo Ca^{2+} acumulado pode ser um fator de complicação da patologia primária, dificultando ainda mais a reversão da mesma devido à diminuição da produção aeróbica de ATP.

V. Resumo

Nossos resultados mostram que Sr^{2+} intramitocondrial, similarmente ao Ca^{2+} , inibe a fosforilação oxidativa em mitocôndria de fígado de rato. Ambos, Ca^{2+} e Sr^{2+} também inibem a atividade hidrolítica da ATPase em partículas submitocondriais. Metade da inibição máxima dessa atividade ATPásica foi encontrada numa concentração de 2,5mM de Ca^{2+} ou 5,0mM de Sr^{2+} , quando a concentração de Mg^{2+} no meio era 1,0mM. A inibição da atividade ATPásica por ambos os cátions foi rapidamente decrescida com o aumento da concentração de Mg^{2+} no meio de reação. Dados cinéticos, na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} ou Sr^{2+} , e a determinação nessas condições da concentração de MgATP, o substrato da ATPase, indicam fortemente que estes cátions inibem a hidrólise de ATP competindo com Mg^{2+} para a formação do complexo MgATP. Com base na concordância entre estes resultados obtidos em partículas submitocondriais e os resultados de titulações da fosforilação oxidativa com carboxiatractilato ou oligomicina, em mitocôndrias carregadas com Sr^{2+} , concluímos que Ca^{2+} ou Sr^{2+} intramitocondrial inibem a fosforilação oxidativa em mitocôndrias intactas pelo decréscimo da disponibilidade de nucleotídeos de adenina tanto para o translocador ADP/ATP quanto para a ATPsintetase.

VI. Summary

Intramitochondrial Sr^{2+} , similarly to Ca^{2+} , inhibits oxidative phosphorylation in intact rat liver mitochondria. Both Ca^{2+} and Sr^{2+} also inhibits the hydrolytic activity of the ATPase in submitochondrial particles. Half-maximal inhibition of ATPase activity was attained at a concentration of 2,5mM Ca^{2+} or 5,0mM Sr^{2+} when the concentration of Mg^{2+} in the medium was 1,0mM. The inhibition of ATPase activity by both cations was rapidly decreased by increasing the Mg^{2+} concentrations in the reaction medium. In addition, kinetical data and the determination of the concentrations of MgATP, the substrate of the ATPase, in the presence of different concentration of Ca^{2+} or Sr^{2+} strongly indicate that these cations inhibit ATP hydrolysis by competing with Mg^{2+} for the formation of MgATP. On the basis of a good agreement between these results with submitochondrial particles and the results of titrations of oxidative phosphorylation with carboxyatractyloside or oligomycin in mitochondria loaded with Sr^{2+} it can be concluded that intramitochondrial Ca^{2+} or Sr^{2+} inhibits oxidative phosphorylation in intact mitochondria by decreasing the availability of adenine nucleotides to both the ADP/ATP carrier and the ATP synthase.

Referências

- 1 - ABOU-KHALIL, S., ABOU-KHALIL, W.H. & YUNIS, A.A. Inhibition by Ca^{2+} of oxydative phosphorylation in myeloid tumor mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 209, 460-464, 1981.
- 2 - ÅKERMAN, K.E.O. Effect of pH and Ca^{2+} on the retention of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 189, 256-262, 1978.
- 3 - ÅKERMAN, K.E.O. & NICHOLLS, D.G. Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 95, 149-201, 1983.
- 4 - ÅKERMAN, K.E.O. & WIKSTROM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential, FEBS Lett., 68, 191-197, 1976.
- 5 - AUSTIN, J. & APRILLE, J.R. Carboxyatractiloside insensitive influx and efflux of adenine nucleotides in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 259, 154.160, 1984.
- 6 - BOCK, R.M., MORELL, S.A., LING, N.S. & LIPTON, S.H. Extraction and concentration of the nucleoside diphosphates and triphosphates. In: Methods in Enzymology. Academic Press. vol. III, 890-891, 1957.

- 7 - BRIERLEY, G.P. The uptake and extrusion of monovalent cations by isolated heart mitochondria. Mol. Cell. Biochem. 10, 41-60, 1976.
- 8 - BYGRAVE, F.L. Mitochondrial calcium transport. Curr. Top. Bioenerg. 6, 259-318, 1977.
- 9 - CAPLAN, A.I. & CARAFOLI, E. Sr^{2+} and mitochondrial swelling and contraction. Biochim.Biophys.Acta 104, 317-329, 1965.
- 10- CARAFOLI, E. Active accumulation of Sr^{2+} by rat liver mitochondria. III. Stimulation of respiration by Sr^{2+} and its stoichiometry. Biochim. Biophys. Acta. 97, 107-117, 1965.
- 11- CARAFOLI, E. & CROMPTON, M. The regulation of intracellular calcium. Curr. Top. Transp. 10, 151-216, 1978.
- 12- CARAFOLI, E., ROSSI, C.S., & LEHNINGER, A.L. Cation and anion balance during active accumulation of Ca^{2+} and Mg^{2+} by isolated mitochondria. J.Biol.Chem. 239, 3055-3061, 1964.
- 13- CARAFOLI, E., TIOZZO, R., LUGLI, G., CROVETTI, F. & KRATZING, C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 361-371, 1974.

- 14- CHANCE, B. Quantitative aspects of control of oxygen utilization. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. and O'CONNOR, C.M. Regulation of cell metabolism. CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM, Boston, Little Brow and Company, 1959.
- 15- CIOTTI, M.M. & KAPLAN, N.O. Procedures for determination of pyridine nucleotides. In: Methods in Enzymology. Academic Press. vol. III, 890-891, 1957.
- 16- COELHO, J.L.C. & VERCESI, A.E. Retention of Ca^{2+} by rat liver and heart mitochondria - Effect of phosphate, Mg^{2+} and NAD(P) redox state. Arch. Biochem. Biophys. 204, 141-147, 1980.
- 17- COTY, W.A. & PEDERSEN, P.L. Phosphate transport in rat liver mitochondria; Kinetics inhibition sensitivity, energy requirements and labelled components. Mol. Cell. Biochem. 9, 109-126, 1975.
- 18- CROMPTON, M., CAMPANO, M. & CARAFOLI, E. The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria; a possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J. Biochem. 69, 453-462, 1976.
- 19- CROMPTON, M., KESSAR, P. & AL-NASSER, I. The adrenergic-mediated activation of the cardiac mitochondrial Ca^{2+} uniporter and its role in the control of intramitochondrial

- drial Ca^{2+} in vivo. Biochem. J. 216, 333-342, 1983.
- 20- DENTON, R.M., McCORMACK, J.C. & EDGELL, N.J. Role of calcium ions in the regulation in intramitochondrial metabolism: effects of Na^+ , Mg^{2+} and ruthenium red on the Ca^{2+} stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. Biochem. J. 190, 107-117, 1980.
- 21- FABIATO, A. & FABIATO, F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metal and ligands used for experiments in skinned muscle cells. J. Physiol. Paris, 75, 463-505, 1979.
- 22- FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ antiport. J. Biol. Chem. 254, 6236-6239, 1979.
- 23- FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. Mitochondrial regulation of intracellular calcium. In: Calcium and cell function. vol. 2 Ed. Wy Cheung. New York, Academic, pp 39-80, 1982.
- 24- FOLDES, M. & BARRIT, G.J. Regulation by calcium ions of pyruvate carboxylation, pyruvate transport, and adenine nucleotide transport in isolated rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 252, 5372-5380, 1977.

- 25- GÓMEZ-PUYOU, M.T., GAVILANES, M., GÓMEZ-PUYOU, A. & ERNST, L. Control of activity states of heart mitochondrial ATPase. Role of the proton-motive force and Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta.* 592, 396-405, 1980.
- 26- GÓMEZ-PUYOU, A., GÓMEZ-PUYOU, M.T., KLAPP, M. & CARAFOLI, E. The effect of calcium on the translocation of adenine nucleotides in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 194, 399-404, 1979.
- 27- GRINDEY, B.G. & NICHOL, C.A. Micro procedure for determination of pyrophosphate and orthophosphate. *Anal. Biochem.* 33, 114-119, 1970.
- 28- HANSFORD, R.G. Effect of micromolar concentration of free Ca^{2+} ions on pyruvate dehydrogenase interconversion in intact rat heart mitochondria. *Biochem. J.* 194, 721-732, 1981.
- 29- HANSFORD, R.G. Relation between mitochondrial calcium transport and total of energy metabolism. *Rev. Physiol. Pharmacol.* 102, 1-72, 1985.
- 30- INESI, G., KURZMACK, M., COAN, C. & LEWIS, D.E. Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* 255, 3025-3031, 1980.

- 31- JACOBUS, W.E., TIOZZO, R., LUGLI, G., LEHNINGER, A.L. & CARAFOLI, E. Aspects of energy-linked calcium accumulation by rat heart mitochondria. J. Biol. Chem. 250, 7863-7870, 1975.

- 32- JOSEPH, S.K., COLL, K.E., COOPER, R.H., MARKS, J.S. & WILLIAMSON, J.R. Mechanisms underlying calcium homeostasis in isolated hepatocytes. J. Biol. Chem. 258, 731-741, 1983.

- 33- KIES, M.W. & MURPHY, J.B. Spectrophotometric determination of protein in dilute solutions. Biochim. Biophys. Acta. 45, 382-384, 1960.

- 34- KLINGENBERG, M. & ROTTENBERG, H. Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and membrane potential across the mitochondria membrane. Eur. J. Biochem. 73, 125-130, 1977.

- 35- LEHNINGER, A.L., CARAFOLI, E. & ROSSI, C.S. Energy-linked movements in mitochondrial systems. Adv. Enzymol. 29, 259-321, 1967.

- 36- LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport: the fifth jubille lecture. Biochem. J. 119, 129-138, 1970.

- 37- LEHNINGER, A.L. Role of phosphate and other proton donating anions in respiration coupled transport of calcium

- by mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. 1520-1524, 1974.
- 38- LEHNINGER, A.L., REYNAFARJE, B., VERCESI, A.E. & TEW, W. Transport and accumulation of calcium in mitochondria. Ann. N. Y. Acad. Sci. 307, 160-176, 1978.
- 39- LEMASTERS, J.J. & SOWERS, A.E. Phosphate dependence and atractyloside inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 254, 1248-1251, 1979.
- 40- MADEIRA, V.M.C. A rapid and ultrasensitive method to measure Ca^{2+} movements across biological membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 870-876, 1975.
- 41- MALMSTROM, K. & CARAFOLI, E. The interaction of Ca^{2+} with mitochondria from human myometrium. Arch. Biochem. Biophys. 182, 657-666, 1977.
- 42- MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 943-948, 1985.
- 43- MARTINS, I.S., CARNIERI, E.G.S. & VERCESI, A.E. Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 00, 000, 1986.
- 44- McCORMACK, J.G. & DENTON, R.M. 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, 1980.
- 45- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, Lond. 191, 144-148, 1961.
- 46- MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidation and photo synthetic phosphorylation. Biol. Rev. 41, 445-502, 1966.
- 47- MORENO-SÁNCHEZ, R. Inhibition of oxidative phosphorylation by a Ca^{2+} -induced diminution of the adenine nucleotide translocation. Biochim.Biophys.Acta. 724, 278-285, 1983.
- 48- MORENO-SÁNCHEZ, R. Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free concentration. J. Biol. Chem. 260, 4028-4034, 1985.
- 49- NEDEGAARD, J. Na^{+} -dependent regulation of extramitochondrial Ca^{2+} by rat-liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 144, 159-168, 1984.
- 50- NICHOLLS, D.G. The regulation of extra mitochondrial free calcium in liver mitochondria. Biochem.J., 176, 463-474, 1978.
- 51- PEDERSEN, P.L., GREENAWALT, J.W., REYNAFARJE, B., HULLIHEN, J., DECKER, G.L., SOPER, J.W. & BUSTAMENTE, E. Preparation

- and characterization of mitochondria and liver derived tissue. Acad. Press. Co. 20, 411-481, 1978.
- 52- PULLMAN, M.E., PENEFSKY, H.S., DATTA, A. & RACKER, E. Purification and properties of soluble dinitrophenol stimulated adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 235, 3322-3329, 1960.
- 53- REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A.L. Ca^{2+} transport from L1210 mouse ascites tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 1744-1748, 1973.
- 54- ROMAN, I., CLARK, A. & SWANSON, P.D. The interaction of calcium transport and ADP phosphorylation in brain mitochondria. Membr. Biochem. 4, 1-9, 1981.
- 55- ROSSI, E. & AZZONE, F. Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K^+ translocation. Eur. J. Biochem. 7, 418-426, 1969.
- 56- ROSSI, C.S. & LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of respiratory stimulation accumulation of calcium and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 239, 3971-3980, 1964.
- 57- SARIS, N.E. & AKERMAN, K.E.O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Curr. Top. Bioenerg. 10, 130-171, 1980.
- 58- SELWYN, M.J. Preparation and general properties of a soluble adenosine triphosphatase from mitochondria. Biochem. J. 105, 279-288, 1967.

- 59- SCHERER, B. & KLINGENBERG, M. Demonstration of the relationship between the adenine nucleotide carrier and the structural changes of mitochondria as induced by adenosine 5'-diphosphate. *Biochemistry* 13, 161-170, 1974.
- 60- SCHNEIDER, W.C. & HOGEBOON, G.H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 183, 123-128, 1950.
- 61- SORDAHL, L.A. Effects of magnesium, ruthenium red and antibiotic ionophore A-23187 on initial rates of calcium uptake and release by heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 104-115, 1974.
- 62- SPENCER, T. & BYGRAVE, F.L. Modification by calcium ions of adenine nucleotide translocation in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 129, 355-365, 1972.
- 63- THORNE, R.F.W. & BYGRAVE, F.L. Inhibition by calcium of adenine nucleotide translocation in mitochondria isolated from Erhlich ascites tumor cells. *FEBS Lett.*, 41, 118-121, 1974.
- 64- VALLIÈRES, J., SCARPA, A. & SOMLYO, A.P. Subcellular fractions of smooth muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 170, 659-669, 1975.

- 65- VERCESI, A.E., REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of H^+ ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem. 253, 6379-6385, 1978.
- 66- VILLALOBO, A. & LEHNINGER, A.L. Inhibition of oxidative phosphorylation in ascites tumor mitochondria and cells by intramitochondrial Ca^{2+} . J. Biol. Chem. 255, 2457-2464, 1980.
- 67- WILLIAMSON, J.R., COOPER, R.H. & HOEK, J.B. Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism. Biochim. Biophys. Acta. 639, 243-295, 1981.
- 68- ZOCCARATO, F., RUGOLO, M., SILIPRANDI, D. & SILIPRANDI, N. Correlated effluxes of adenine nucleotides, Mg^{2+} and Ca^{2+} induced in rat liver mitochondria by external Ca^{2+} and phosphate. Eur. J. Biochem. 114, 195-199, 1981.