

ESTUDO DA ATIVIDADE RESPIRATÓRIA, DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA E  
DA TRANSLOCAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM MITOCÔNDRIAS DE  
SORGO (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

DIRCE FERNANDES DE MELO

---

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários  
à obtenção do grau de  
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

1 9 7 8



Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

\_\_\_\_\_  
DIRCE FERNANDES DE MELO

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

\_\_\_\_\_  
MARIA DA GUIA SILVA LIMA  
Orientadora da Dissertação

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
RENATO DE AZEVEDO MOREIRA

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
IRACEMA LIMA AINOZ

\_\_\_\_\_  
Data

À memória de meu pai e irmão,  
à minha mãe e irmãos  
e ao meu marido

## AGRADECIMENTOS

De modo especial sou grata a professora MARIA DA GUIA SILVA LIMA, pela sua valiosa orientação e estímulo permanente na execução deste trabalho.

Aos professores RENATO DE AZEVEDO MOREIRA, IRACEMA LIMA AINOZ, PETRÔNIO AUGUSTO PINHEIRO e NANCY DERRICK DENSLOW, agradeço as importantes sugestões e discussões apresentadas durante a realização desta dissertação.

A todos os professores e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, agradeço pelo ambiente de trabalho, cooperação e incentivo.

Ao professor CARLOS ALBERTO PONTES agradeço pela revisão do texto.

Finalmente agradeço aos meus pais, irmãos e marido, que direta ou indiretamente, prestaram inestimável contribuição para execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-Graduação.

Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Organização dos Estados Americanos (OEA), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi preparada.

## ÍNDICE

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....  | viii          |
| DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS .....                                       | xi            |
| REAGENTES .....   | xii           |
| RESUMO .....  | xiv           |
| INTRODUÇÃO .....  | 1             |
| A mitocôndria e a respiração celular .....                            | 1             |
| A cadeia respiratória .....   | 2             |
| Acoplamento entre respiração e fosforilação ....                      | 4             |
| Hipóteses explicativas do mecanismo da fosforilação oxidativa .....   | 7             |
| Controle respiratório .....   | 8             |
| Mitocôndrias vegetais .....   | 8             |
| Translocação .....  | 10            |
| Objetivos do trabalho .....   | 11            |
| MATERIAL E MÉTODOS .....  | 13            |
| Condições de germinação .....   | 13            |
| Preparação mitocondrial .....   | 13            |
| Dosagem de proteínas .....  | 16            |
| Atividade oxidativa .....   | 16            |
| Dosagem da adenilatoquinase .....                                     | 17            |
| Cálculo do consumo de oxigênio .....                                  | 18            |
| Cálculo do controle respiratório .....                                | 19            |
| Cálculo da relação ADP/O .....  | 20            |
| RESULTADOS .....  | 21            |
| Caracterização da fração mitocondrial .....                           | 21            |
| Utilização de substratos pela cadeia transportadora de elétrons ..... | 25            |

Í N D I C E

(continuação)

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| Determinação do $K_m$ do ADP .....  | 29            |
| Determinação do $K_m$ do succinato e L-malato .....   | 32            |
| Translocação de nucleotídeos de adenina (ADP) ...   | 36            |
| Atividade adenilatoquinásica .....  | 36            |
| Inibidores da translocação de ADP .....   | 36            |
| Efeito do ATR .....   | 39            |
| Efeito do CAT .....   | 39            |
| DISCUSSÃO .....   | 52            |
| Técnica de isolamento da preparação mitocondrial<br>de sorgo .....                                  | 52            |
| Influência da concentração de proteína mitocon-<br>drial na velocidade de consumo de oxigênio ..... | 54            |
| Integridade funcional .....   | 54            |
| Permeabilidade da membrana mitocondrial interna .   | 56            |
| Translocação de substratos .....  | 56            |
| Translocação de nucleotídeos de adenina ..  | 58            |
| CONCLUSÕES .....  | 63            |
| BIBLIOGRAFIA .....  | 64            |
| PUBLICAÇÕES .....   | 74            |
| Comunicações .....  | 74            |
| Artigos .....   | 78            |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| FIGURA |   | <u>Página</u> |
|--------|---|---------------|
| 1      | Traçado polarográfico da atividade respiratória e fosforilante de mitocôndrias de sorgo em presença de succinato .....            | 22            |
| 2      | Traçado polarográfico da atividade respiratória e fosforilante de mitocôndrias de sorgo em presença de NADH e L-malato .....      | 23            |
| 3      | Estabilidade da preparação mitocondrial de sorgo em função do tempo .....   | 24            |
| 4      | Substratos não oxidados por mitocôndrias de sorgo: L-glutamato e $\alpha$ -cetogluturato .....                                    | 26            |
| 5      | Substratos não oxidados por mitocôndrias de sorgo: fumarato e oxalacetato .....   | 27            |
| 6      | Substratos não oxidados por mitocôndrias de sorgo: piruvato e DL- $\beta$ -hidroxibutirato .....                                  | 28            |
| 7      | Traçado polarográfico padrão da atividade oxidativa de mitocôndrias de sorgo em presença de diferentes concentrações de ADP ..... | 30            |
| 8      | Gráfico de Lineweaver-Burk - Análise cinética da translocação de ADP. Determinação da constante de afinidade ( $K_m$ ) .....      | 31            |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

(continuação)

| FIGURA |  | <u>Página</u> |
|--------|--|---------------|
| 9      | Traçado polarográfico da atividade oxidativa de mitocôndrias de sorgo utilizado na determinação das constantes de afinidade ( $K_m$ ) dos substratos: succinato e L-malato ..... | 33            |
| 10     | Gráfico de Lineweaver-Burk - Determinação da constante de afinidade ( $K_m$ ) para succinato .....   | 34            |
| 11     | Gráfico de Lineweaver-Burk - Determinação da constante de afinidade ( $K_m$ ) para L-malato .....  | 35            |
| 12     | Gráfico de Lineweaver-Burk - Determinação da constante de afinidade ( $K_m$ ) da enzima adenilatoquina se pelo ADP .....   | 37            |
| 13     | Gráfico da atividade adenilatoquinásica em função de diferentes concentrações de ADP .....   | 38            |
| 14     | Traçado polarográfico mostrando o efeito inibitório do ATR na respiração estimulada por ADP em mitocôndrias de sorgo tendo succinato como substrato .....                        | 40            |
| 15     | Gráfico de Lineweaver-Burk - Análise cinética do efeito inibitório do ATR na respiração estimulada por ADP. Determinação da constante de inibição ( $K_i$ ) .....                | 41            |
| 16     | Gráfico de Dixon ilustrando o efeito do ATR na inibição da respiração estimulada por ADP .....   | 42            |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

(continuação)

| FIGURA |  | <u>Página</u> |
|--------|--|---------------|
| 17     | Efeito do ATR na velocidade de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias de sorgo .....   | 43            |
| 18     | Gráfico semilogarítmico mostrando a diferença de susceptibilidade a ação dos inibidores - ATR e CAT - da translocação de ADP em mitocôndrias de sorgo .            | 44            |
| 19     | Traçado polarográfico mostrando o efeito inibitório do CAT na respiração estimulada por ADP em mitocôndrias de sorgo em presença de succinato como substrato ..... | 45            |
| 20     | Gráfico de Lineweaver-Burk - Análise cinética do efeito inibitório do CAT na respiração estimulada por ADP em mitocôndrias de sorgo .....                          | 46            |
| 21     | Análise cinética da inibição da translocação de ADP por CAT .....  | 48            |
| 22     | Gráfico de Dixon ilustrando o efeito do CAT na inibição da respiração estimulada por ADP .....   | 49            |
| 23     | Efeito do CAT na velocidade de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias de sorgo .....   | 50            |
| 24     | Variação do índice de inibição $(CAT/ADP)_{0,5}$ em função dos inversos das concentrações de ADP ....  | 51            |

## DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

|                           |   |
|---------------------------|---|
| ADP                       | - Adenosina-5'-difosfato.   |
| ADP/O                     | - Relação entre moles de ADP adicionados ao sistema e moles de oxigênio consumidos. |
| ATR                       | - Atractilosídeo.   |
| ATP                       | - Adenosina-5'-trifosfato.  |
| BKA                       | - Ácido bongcrêquico.   |
| BSA                       | - Albumina sérica bovina.   |
| CAT                       | - Carboxiatractilosídeo = gumiferina.   |
| Cit                       | - Citocromo.  |
| CcQ                       | - Coenzima Q.   |
| C.R.                      | - Controle respiratório.  |
| EDTA                      | - Ácido etilenodiaminotetracético.  |
| FAD, FADH <sub>2</sub>    | - Flavina adenina dinucleotídeo e sua forma reduzida.                               |
| Fe.S                      | - Proteína ferro-enxofre.   |
| FP                        | - Flavoproteína.  |
| FPha                      | - Flavoproteína - "high absorbance".  |
| GSPHD                     | - Glicose 6-fosfato desidrogenase.  |
| HK                        | - Hexoquinase.  |
| NAD <sup>+</sup> , NADH   | - Nicotinamida adenina dinucleotídeo e sua forma reduzida.                          |
| NADP <sup>+</sup> , NADPH | - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato e sua forma reduzida.                  |
| Pi                        | - Fosfato inorgânico.   |
| QO <sub>2</sub>           | - Consumo de oxigênio.  |
| TRIS                      | - Tris-(hidroximetil)-aminometano.  |
| UQ                        | - Ubiquinona.   |
| V <sub>MAX</sub>          | - Velocidade máxima.  |
| K <sub>i</sub>            | - Constante do inibidor.  |
| K <sub>m</sub>            | - Constante de Michaelis-Menten.  |
| K <sub>s</sub>            | - Constante do substrato.   |

## REAGENTES

Foram utilizados os reagentes abaixo relacionados com as respectivas procedências:

E. Merk Ag. Darmstadt

Ácido succínico

D-(+)-Glucose

EDTA

Fosfatomonobásico de potássio

TRIS

NBCo. (Nutritional Biochemical Corporation)

Ácido cólico

Ácido  $\alpha$ -cetoglutárico

Ácido L-málico

Ácido oxalacético

Carlo Erba

Cloreto de potássio

Manitol

Sacarose

Sigma Chemical Company

Ácido DL- $\beta$ -hidroxibutírico

Ácido fumárico

Ácido L-glutâmico

Ácido pirúvico

ADP

ATR

REAGENTES  
(continuação)

BSA  
CAT  
HK  
NADH

C.F. Boehringer & Soehne GmbH Mannheim

G6PDH  
NADP

## RESUMO

O presente trabalho é um estudo das características funcionais da fração mitocondrial de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), uma gramínea de interesse econômico para região nordeste do Brasil.

A fração mitocondrial foi isolada do epicótilo da plântula segundo princípios utilizados por Sarkissian & Srivastava (44) no isolamento de mitocôndrias de trigo, e modificados, segundo as peculiaridades do sorgo. A estabilidade da preparação foi testada em um período de 5 horas, no que tange a controle respiratório, e relação ADP/O, cujos valores foram utilizados como critério de integridade bioquímica e funcional. A capacidade oxidativa destas mitocôndrias pela cadeia transportadora de elétrons foi estudada através da utilização de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico: succinato, L-malato,  $\alpha$ -cetogluturato, oxalacetato e intermediários de outras rotas metabólicas: NADH, piruvato, L-glutamato e DL- $\beta$ -hidroxibutirato. As afinidades de succinato, L-malato e ADP pelo seus carreadores, foram determinadas através da análise gráfica de Lineweaver-Burk, obtendo-se os respectivos valores de  $K_m$ : 0,5 mM, 5 mM e 33  $\mu$ M. Os demais intermediários metabólicos não foram oxidados. Com a finalidade de estudar a translocação de ADP, foram utilizados inibidores específicos - os glicosídeos: atractilosídeo (ATR) e carboxiatractilosídeo (CAT). Verificou-se que o ATR compete com a translocação de ADP ao nível da membrana mitocondrial interna, quando a relação ATR/ADP é inferior a 0,04, sendo o valor de  $K_i$  obtido pelos métodos gráficos de Lineweaver-Burk e Dixon de 0,5  $\mu$ M. A translocação de ADP 141  $\mu$ M é inibida de 50% quando se tem, aproximadamente, 2  $\mu$ M de ATR. Por sua vez, o CAT comportou-se como inibidor aparentemente competitivo, quando se usou concentrações de ADP maiores que

41  $\mu\text{M}$  e concentrações de CAT inferiores a 0,05  $\mu\text{M}$ . A afinidade do CAT pelo translocador, quando comparada a do ATR, em condições aproximadamente semelhantes, revelou ser significativamente mais elevada. Com o intuito de estabelecer o papel da adenilatoquinase como enzima capaz de utilizar o ADP presente no meio de reação, determinou-se a afinidade de esta enzima para o ADP, tendo sido encontrado um  $K_m$  de 333  $\mu\text{M}$ .

## INTRODUÇÃO

Uma das características dos seres vivos superiores é a respiração celular. Esta pode ser definida como um processo envolvido no transporte de elétrons e prótons, provenientes de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico ou outras rotas metabólicas, através de uma cadeia constituída de cofatores enzimáticos (transportadores) até o oxigênio molecular. Durante o transporte de elétrons para o oxigênio molecular, há produção de uma grande quantidade de energia livre, sendo parte conservada como energia de ligação a ser utilizada para executar trabalho na célula. Predominantemente, esta energia é armazenada numa ligação fosfato, do tipo adenosina trifosfato (ATP), constituindo o fenômeno da fosforilação oxidativa. Segundo Vignais (1), este processo foi identificado em 1939-40 e suscitou imediatamente um grande interesse pelo assunto devido a sua importância na economia celular. Numerosos estudos foram dedicados ao seu completo esclarecimento, como sejam: localização intracelular do fenômeno, rendimento energético, regulação e mecanismo.

### A mitocôndria e a respiração celular

Lehninger (2) cita que Kingsbury, em 1912, já sugeria que a mitocôndria era a sede da oxidação celular. O desenvolvimento das técnicas de microscopia eletrônica possibilitou a comprovação de que as mitocôndrias estão universalmente presentes em células aeróbicas de animais e vegetais. As mitocôndrias mais intensamente estudadas foram as de fígado de rato, as quais possuem  $2\mu$  de comprimento e pouco menos de  $1\mu$  de largura (4). O número de mitocôndrias por célula varia de 20 a  $5 \times 10^5$ , dependendo do organismo considerado, como variam também seu tamanho e forma (5). As imagens fornecidas pela microscopia

eletrônica permitem dar com precisão a estrutura fina dessas organelas. A mitocôndria é limitada por duas membranas, sendo ambas constituídas de uma camada lipídica, inserida entre duas camadas proteicas monomoleculares, com espessura de 75 Å (1). A membrana externa é lisa e determina a forma da mitocôndria, variável segundo seu estado metabólico. Palade (6), em 1953, verificou que a membrana interna apresentava invaginações denominadas cristas, e Moran (8), em 1962, evidenciou que era dotada de subunidades esféricas regularmente espaçadas e ligadas à mesma por uma pequena haste. Green (9) relacionou tais partículas esféricas a "conjuntos respiratórios", que seriam, hipoteticamente, responsáveis pelas atividades oxidativas. Posteriormente, verificou-se que os eventos ligados à respiração aconteciam na parte basal da membrana interna, e Racker (10) evidenciou que as partículas esféricas de Moran eram uma proteína de peso molecular 284.000, que catalisava a hidrólise de ATP a ADP e  $P_i$ , por ele chamada  $F_1$ . A haste que estabelecia a conexão entre as partículas esféricas e a membrana interna, chamada de  $F_0$ , foi, igualmente, demonstrada ser uma proteína que confere a  $F_1$  sensibilidade a oligomicina.

#### A cadeia respiratória

No começo deste século foram iniciadas as primeiras tentativas de estabelecimento do mecanismo da oxidação celular. Wieland (11, 12), em 1912, sugeria que as oxidações primárias dentro da célula eram mediadas através da ativação do hidrogênio, idéia confirmada posteriormente por Thunberg (13, 14), em 1917, quando descobriu as desidrogenases. Warburg (15, 16) acreditava que esse processo ocorria numa participação direta com o oxigênio, através de uma enzima transportadora "Atmungsferment". Keilin (17), em 1925, nas suas investigações clássicas, mostrou que o elo entre as desidrogenases de Wieland e Thunberg e a oxidase de Warburg consistia de citocromos que são hemoproteínas. O estudo da constituição e do funcionamento da cadeia

respiratória, em mitocôndrias animais, vem se apresentando como um problema extremamente complexo. Certos aspectos deste problema puderam ser analisados graças à introdução, por Chance (18), de métodos espectrofotométricos finos e sensíveis, permitindo seguir numa preparação mitocondrial as mudanças dos estados de óxido-redução dos transportadores da cadeia respiratória, ao longo do seu funcionamento. Foi também possível determinar a sequência dos diferentes transportadores dessa cadeia, estando estes associados, linearmente, numa ordem que corresponde ao valor crescente do seu potencial de óxido-redução. Tais resultados confirmam e completam aqueles obtidos pela ajuda de inibidores específicos da respiração, os quais permitem definir a posição de certos transportadores. Assim, admite-se, atualmente, que a cadeia respiratória possui três diferentes e principais tipos de componentes: desidrogenases ligadas a piridina, flavoproteínas e citocromos. Estes componentes já não são mais questionáveis no que diz respeito à estrutura, localização e potencial de óxido-redução. Outros, porém, já foram identificados como proteínas ferro-enxofre e quinonas. As proteínas ferro-enxofre são transportadores que, diferentemente dos citocromos, possuem ferro sob a forma não-hêmica em sua estrutura e funcionam como carreadores de elétrons, sofrendo transições reversíveis Fe(II)-Fe(III). Grupos ferro-enxofre também ocorrem em certas flavoproteínas. Apesar de desempenharem um papel importante no transporte de elétrons, ainda não se sabe a sua função exata. As quinonas são coenzimas que participam, também, como transportadores de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria. Essas coenzimas foram denominadas de ubiquinonas devido a ocorrência ubiquitária em animais, plantas e microorganismos. São conhecidas várias ubiquinonas, diferindo apenas no comprimento da cadeia lateral isoprenóide. A introdução de novas técnicas tem possibilitado determinar a natureza, o comportamento e a localização de constituintes da cadeia respiratória com maior precisão. Pesquisas recentes têm objetivado ao conhecimento da cadeia respiratória de diferentes organismos, e, atualmente, atribui-se que seja a seguinte a sequência desta, em mamíferos (4):



experimentais de que o transporte de elétrons do NADH até o oxigênio era a fonte direta da energia usada para a fosforilação acoplada ao ADP. Considerando-se o processo da respiração mitocondrial do ponto de vista termodinâmico, verifica-se que, quando os elétrons são transferidos ao longo da cadeia respiratória até o oxigênio, ocorrem reações de óxido-redução, cujos sentidos podem ser determinados através do potencial padrão de óxido-redução. Os elétrons fluem de potenciais mais negativos, acarretando um decréscimo na variação de energia livre, que é dada por:

$$\Delta G' = -nFE_0'$$

Onde:

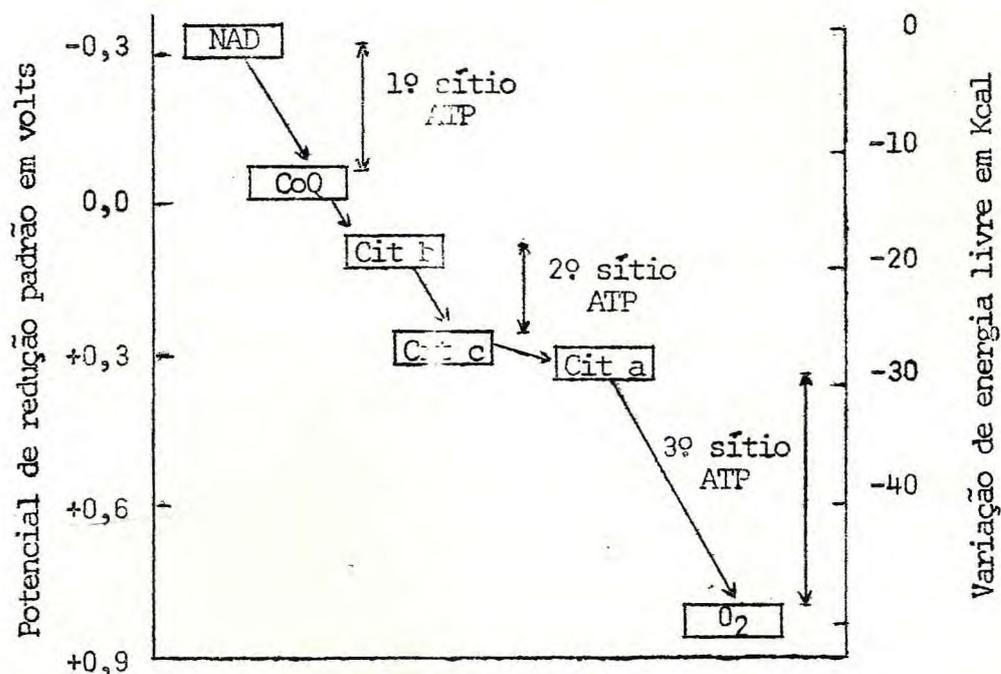
$\Delta G'$  = variação de energia livre padrão

n = número de elétrons envolvidos na reação

F = constante de Faraday

$\Delta E_0' = (E_0'$  da semi-reação contendo agente oxidante) - ( $E_0'$  da semi-reação contendo agente redutor).

Quando um par de elétrons move-se através de toda cadeia transportadora, isto é, do NADH até o oxigênio ( $\text{NADH} + \text{H}^+ + 1/2 \text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ), verifica-se uma variação de energia livre ( $\Delta G'$ ) de - 52 Kcal. Segundo valores calculados da liberação de energia livre ao longo da cadeia respiratória, foram determinados três sítios que são suficientemente exergônicos, dando condições a fosforilação do ADP em ATP, como mostra o esquema a seguir (21):



Para formação de cada molécula de ATP, necessita-se, de pelo menos, 7,3 Kcal. Portanto, a fosforilação oxidativa de três moléculas de ADP conserva 42% da energia total quando uma molécula de NADH é oxidada em presença de oxigênio. Pode-se, então, entender como relação ADP/O a razão de moles de ADP transformados em ATP por átomo de oxigênio consumido. Uma das condições necessárias para que uma preparação mitocondrial tenha uma boa relação ADP/O é a sua integridade estrutural. Apesar desta condição, já foi possível verificar o fenômeno da fosforilação oxidativa em partículas submitocondriais. Contudo, tais subpartículas consistem fundamentalmente de vesículas membranosas, resultantes de fragmentos da membrana interna, associadas as esferas da mesma membrana, isto é, fator  $F_1$  de Racker (10, 22).

### Hipóteses explicativas do mecanismo da fosforilação oxidativa

Apesar do desenvolvimento de técnicas cada vez mais sofisticadas, ainda não se tem um conhecimento completo do fenômeno da fosforilação oxidativa. Várias hipóteses têm sido postuladas, sendo as mais importantes:

- (1) Hipótese do acoplamento químico (23).
- (2) Hipótese do acoplamento conformacional (24).
- (3) Hipótese do acoplamento quimiosmótico (25).

A hipótese do acoplamento químico tem como fundamento a existência de um composto intermediário comum, rico em energia, gerado pelo transporte eletrônico, utilizado para formar ATP. Esta hipótese é criticada uma vez que ainda não se isolou o referido intermediário químico e não justifica a necessidade de uma membrana mitocondrial interna, íntegra e contínua, para que se processe a fosforilação oxidativa.

A hipótese do acoplamento conformacional é uma variante da hipótese do acoplamento químico, sugerindo que a energia liberada durante o transporte eletrônico seja conservada numa alteração conformacional de uma macromolécula proteica, cuja forma energizada seja utilizada como intermediário para sintetizar ATP. Uma evidência favorável ao acoplamento conformacional é a observação de que a membrana mitocondrial sofre alterações físicas rápidas quando os elétrons se deslocam ao longo da cadeia respiratória.

A hipótese quimiosmótica, proposta por Mitchell (25), postula que a membrana mitocondrial interna deve estar íntegra e contínua, para que ocorra o acoplamento entre fosforilação e oxidação. Sendo esta membrana permeável a prótons, a energia liberada pelo transporte de elétrons é utilizada para promover a saída de íons  $H^+$  da matriz mitocondrial. Assim, um gradiente de prótons é usado para dirigir a síntese de ATP.

Dentre estas hipóteses, a última é a que melhor explica a maior parte dos dados experimentais concernentes a oxidação fosforilante.

### Controle respiratório

A respiração e o estado de óxido-redução dos transportadores da cadeia respiratória variam em função das concentrações de ADP, oxigênio e substrato oxidável, podendo cinco estados respiratórios ser caracterizados numa preparação mitocondrial (18). Destes estados dois são importantes para caracterizar o fenômeno do controle respiratório. Em presença de oxigênio, substrato oxidável e excesso de ADP, verifica-se que o transporte de elétrons se processa numa velocidade máxima, havendo um aumento abrupto no consumo de oxigênio. Este estado de respiração ativa, no qual ADP é fosforilado, também é conhecido como estado 3. Quando todo ADP é consumido, a velocidade de consumo de oxigênio diminui, sendo este estado de respiração lenta em presença de substrato e ausência de ADP denominado estado 4. O controle respiratório consiste numa relação entre as velocidades dos estados 3 e 4. Os valores de controle respiratório em mitocôndrias animais intactas geralmente são elevados, alcançando valores até superiores a 10. Contudo, se estas mitocôndrias estão danificadas ou envelhecidas, elas perdem a capacidade de fosforilar ADP, atingindo a referida relação valor igual a unidade, o que significa que as mitocôndrias estão desacopladas. Portanto, o controle respiratório é um critério indicativo do estado da integridade da preparação mitocondrial.

### Mitocôndrias vegetais

Durante muito tempo, a oxidação fosforilante foi essencialmente estudada com mitocôndrias isoladas a partir de tecidos animais. Assim, partindo-se de técnicas padronizadas de isolamento, foram caracterizados o comportamento bioquímico e propriedades destas mitocôndrias, permitindo, então, uma abordagem uniforme por diferentes

pesquisadores. Somente num período mais recente é que se começou a dar ênfase ao estudo de mitocôndrias vegetais, motivado, sobretudo, pelas dificuldades apresentadas pelos tecidos vegetais diante dos processos de disrupção celular. Ainda hoje é um problema crítico a não uniformidade nas técnicas de isolamento das frações subcelulares de vegetais. Nos últimos anos, muitas pesquisas foram feitas com o intuito de estabelecer parâmetros comparativos de mitocôndrias de diferentes origens. Muitas diferenças foram estabelecidas entre mitocôndrias de origem animal e vegetal, não deixando, entretanto, de serem questionadas na base de artefatos experimentais, tendo em vista os problemas relacionados com a preparação (20, 26). Num trabalho de revisão mais recente, Ikuma (27) constatou que mitocôndrias de plantas superiores apresentam estrutura básica e função semelhantes àquelas de mitocôndrias de origem animal, salientando, entretanto, que há diferenças que resistem, a despeito das críticas imputadas à metodologia. As diferenças frequentemente encontradas nas mitocôndrias vegetais (20, 26, 27, 28) são:

- (1) oxidação rápida de L-malato, mesmo em ausência de glutamato ou piruvato;
- (2) oxidação do NADH exógeno;
- (3) citocromos bastante diferentes, especialmente na natureza do componente b;
- (4) a presença de uma via respiratória alternativa cianeto-resistente;
- (5) relações ADP/O e C.R. inferiores aos valores teóricos, fazendo supor que as mitocôndrias são menos acopladas;
- (6) a membrana externa apresenta perfurações e a membrana interna um número pequeno de invaginações aleatórias.

Atualmente, diferenças vêm sendo constatadas não apenas entre mitocôndrias de origem animal e vegetal, mas também entre mitocôndrias de diferentes tecidos de uma mesma espécie e mitocôndrias de um mesmo tecido em espécies semelhantes (26). Isto se tornou evidente quando se verificou que a velocidade e eficiência da utilização de diferentes substratos variava na dependência das espécies ou tecidos de origem. Estas diferenças manifestam-se, principalmente, devido aos diversos tipos de desidrogenases em diferentes tipos de mitocôndrias e a presença de translocadores específicos para vários tipos de células. O mecanismo de ação destes carreadores ainda não é bem conhecido, sendo este mais um aspecto de relevante importância na fisiologia mitocondrial.

### Translocação

A membrana mitocondrial externa é facilmente permeável a um grande número de moléculas. Entretanto, a membrana interna apresenta uma permeabilidade bastante seletiva, que permite reconhecer e transferir apenas certas moléculas ou íons. Um dos sistemas carreadores mais intensamente estudados é aquele responsável pela translocação de ADP-ATP e que está situado ao nível da membrana mitocondrial interna. A função desta translocase mitocondrial de nucleotídeos de adenina na célula é importar o ADP do citossol e exportar para o mesmo o ATP produzido durante a fosforilação oxidativa, indispensável a economia celular. Três inibidores específicos da translocação de ADP - atractilosídeo, carboxiatractilosídeo e ácido bongocréuico - são basicamente utilizados em experimentos relacionados com o transporte de nucleotídeos de adenina (29, 30, 31, 32). Atractilosídeo e carboxiatractilosídeo são inibidores não permeantes na membrana interna mitocondrial e suas estruturas químicas são de glicosídeos, cuja aglicona é um diterpeno. Ambos possuem dois resíduos sulfato e um resíduo de ácido isovalérico. O carboxiatractilosídeo difere do atractilosídeo

por possuir uma carboxila a mais na porção diterpênica. O ácido bong crequico, inibidor da translocação por penetração através da membrana mitocondrial interna, é uma longa cadeia poli-insaturada de ácido graxo. A maioria dos trabalhos relacionados com o mecanismo dos sistemas responsáveis pela translocação de ADP utiliza como material biológico mitocôndrias de origem animal, vez que estas foram as mais estudadas. Como as mitocôndrias vegetais apresentam um baixo teor de nucleotídeos endógenos de adenina, este material constitui uma ótima escolha para estudar-se não só as propriedades ligantes destes translocadores, como a cinética da translocação de nucleotídeos de adenina em mitocôndrias (29). Somente pesquisas recentes melhor situaram este problema em mitocôndrias vegetais, sendo ainda um assunto muito controvertido em virtude do grau variável de sensibilidade exibido pelas mitocôndrias vegetais, de diferentes origens, a tais inibidores (33, 34, 35, 36, 37, 38).

#### Objetivos do trabalho

Tendo em vista as dificuldades apresentadas no isolamento de mitocôndrias vegetais (20, 39) e a existência de peculiaridades nestas preparações, no que se refere à oxidação de substratos (40, 41, 42), ao funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (20, 27, 43), à capacidade fosforilante (1, 4, 41) e ao funcionamento de translocadores específicos (29, 30, 31, 32), o presente trabalho se propõe a:

- (1) apresentar uma técnica de isolamento da fração mitocondrial de uma gramínea, sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench);
- (2) por em evidência a utilização de substratos pela cadeia de transportadores de elétrons;

- (3) mostrar o grau de acoplamento e a capacidade fosforilante da preparação mitocondrial, através dos parâmetros de controle respiratório e relação ADP/O;
- (4) estudar o fenômeno da translocação de nucleotídeos de adenina, especificamente o ADP, através do uso de inibidores específicos, atractilosídeo e carboxiatractilosídeo.

## MATERIAL E MÉTODOS

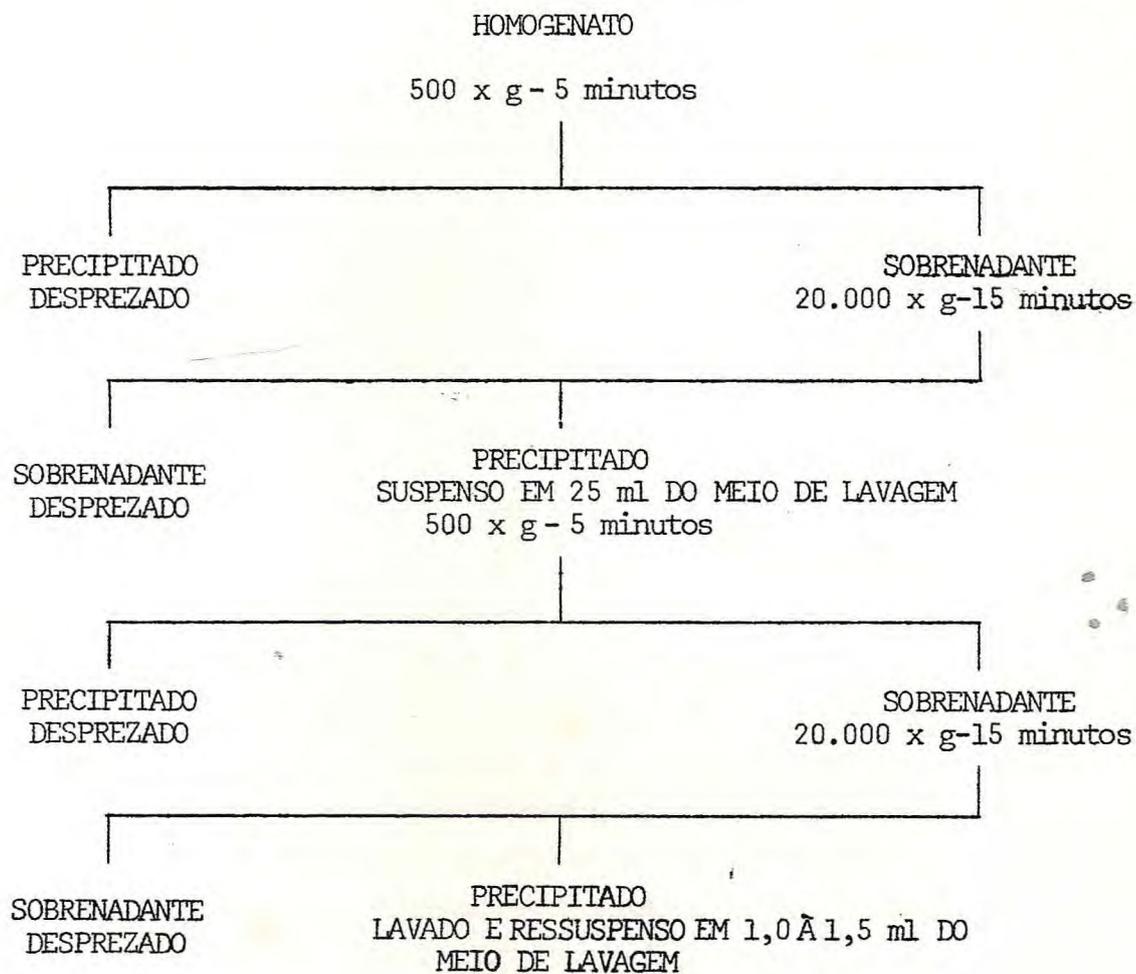
### Condições de germinação

No presente trabalho foram utilizadas sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Mbench) fornecidas pelo Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará. Cerca de 1000 sementes foram selecionadas para germinação, sendo previamente esterilizadas durante 5 minutos, em solução de hipoclorito de sódio com teor de 5,2% de cloro ativo (Água Sanitária Brilux, Raymundo da Fonte Indústria S/A, Recife-Pe). Em seguida, estas sementes foram lavadas em excesso de água corrente e água destilada e germinadas em depósitos de plástico, contendo vermiculite também esterilizada (200°C durante 12 horas) e água na proporção de 2:1. A germinação foi feita no escuro, a uma temperatura de 26°C, aproximadamente, e durante 7 dias.

### Preparação mitocondrial

Nesta preparação tomou-se como base a técnica de Sarkissian & Srivastava (44) para o isolamento de mitocôndrias de trigo, no que diz respeito aos meios de homogeneização, de lavagem e de fosforilação. Contudo, as condições de separação dos epicótilos, embebição, homogeneização e esquema para centrifugação diferencial, foram estabelecidos, tentativamente, levando-se em conta o uso de diferente material vegetal, no caso o sorgo. Epicótilos estiolados da plântula de sorgo, após 7 dias de germinação, foram usados para o isolamento da fração mitocondrial. Todas as etapas necessárias para a obtenção da referida preparação foram realizadas em câmara fria, a temperatura de  $\pm 6^{\circ}\text{C}$ , usando-se material e meios previamente resfriados. Depois da separação de raízes e folhas, os epicótilos foram cortados em seções

de 2 a 3 cm de comprimento, lavados duas vezes com água destilada e incubados com 120 a 200 ml do meio de homogeneização, na proporção de 1:4 (p:v), durante 30 minutos. Posteriormente, este material foi macerado em gral de porcelana, merecendo, esta etapa, um cuidado especial, para evitar danos físicos à preparação, obtendo-se, assim, uma fração mitocondrial íntegra. A composição do meio de homogeneização foi: sacarose 0,5 M, EDTA 0,001 M, tampão fosfato de potássio 0,067 M pH 7,2 e BSA 0,5 mg/ml. O pH do homogenato manteve-se em torno de 7,0, não sendo necessário adicionar-se KOH como é comum em outras preparações de origem vegetal (39, 45, 46). O homogenato foi filtrado em tela de nylon e logo após submetido a centrifugação diferencial em centrífuga refrigerada IEC (International Equipment Company - Modelo HR-1), segundo esquema exposto no diagrama I. O homogenato foi submetido a uma força de 500xg durante 5 minutos, o que permitiu sedimentar amido, núcleos e restos celulares. O sobrenadante contendo a fração mitocondrial foi submetido a uma força de 20.000xg durante 15 minutos, provocando a sedimentação de mitocôndrias. O precipitado mitocondrial então obtido foi suspenso em 25 ml, aproximadamente, de meio de lavagem, cuja composição foi: manitol 0,3 M, tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,2 e BSA 1 mg/ml. A suspensão mitocondrial foi homogeneizada manualmente em um homogeneizador de Potter-Elvehjem, rápida e suavemente. Esta suspensão foi novamente centrifugada durante 5 minutos a 500xg, com a finalidade de eliminar contaminações porventura resultantes de insuficiência da primeira centrifugação. O sobrenadante foi submetido a uma última centrifugação durante 15 minutos a 20.000xg, obtendo-se um precipitado mitocondrial, o qual foi lavado suavemente com o meio de lavagem, para deslocar uma camada frouxa e amarelada composta de fragmentos da membrana mitocondrial externa, rompida por choque osmótico ou vesículas de Golgi (39), que se depositava na superfície do precipitado mitocondrial. Tal precipitado foi ressuspenso em 1 a 1,5 ml do meio de lavagem e conservado a temperatura de aproximadamente 4°C, ao longo da experiência.

DIAGRAMA ICENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL

### Dosagem de proteínas

A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pelo método do biureto modificado por Gornall (47), cuja variação consistiu na adição de colato de sódio, o qual solubilizou as proteínas membranares. Em um tubo de ensaio colocou-se, sucessivamente, homogeneizando-se após cada adição: 0,25% de colato de sódio, preparação mitocondrial, 8% de hidróxido de sódio e 0,1% de sulfato de cobre. Deixava-se uma coloração violeta se desenvolver durante 15 minutos. A leitura foi feita no espectrofotômetro Beckman DU, a 540 nm contra um branco de reagentes sem proteínas. A concentração de proteína foi estimada em relação a uma curva padrão de BSA, na qual foi determinada que 1 mg de proteína tinha uma absorbância média de 0,081, nas mesmas condições de ensaio a 540 nm.

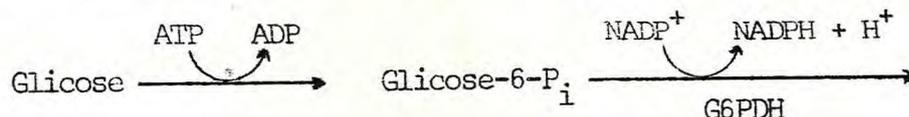
### Atividade oxidativa

A atividade oxidativa das mitocôndrias foi medida polarograficamente a 26°C, em um oxígrafo Gilson Modelo K-IC, polarizado a 0,8 V, acoplado-se um eletrodo de Clark a câmara de reação. Este é constituído de um catodo de platina e um anodo de prata ligados por uma ponte de KCl, a qual é isolada do meio por uma membrana de polietileno. O oxigênio atravessa esta membrana sofrendo redução na superfície do catodo, o qual está polarizado em uma voltagem dentro de uma faixa correspondente ao "plateau" da corrente, sendo, portanto, a des polarização do mesmo responsável pelo aparecimento de um fluxo eletrônico, o qual é diretamente proporcional a concentração de oxigênio. Esta corrente é amplificada e transmitida a um registrador. A velocidade de difusão de oxigênio depende do gradiente de pressão que há entre a amostra e a superfície do eletrodo, constituindo, então, uma medida direta da concentração de oxigênio do meio (48, 49). As diferentes adições foram feitas em uma câmara de reação com capacidade para 2 ml, sendo a homogeneização garantida por um pequeno agitador magnético. Na câmara de reação habitualmente colocou-se 1,4 ml do meio

fosforilante, cuja composição foi: manitol 0,3 M, KCl 0,01 M, tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,2, tampão tris-HCl 0,01 M pH 7,2,  $MgCl_2$  0,006 M, BSA 0,5 mg/ml e substrato oxidável em um volume final de 1,5 ml. A reação foi iniciada com a adição da fração mitocondrial, sendo as demais adições indicadas nas figuras correspondentes. A concentração de ADP foi calculada espectrofotometricamente, tendo como base o seu coeficiente de extinção milimolar de  $15,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 260 nm (46).

#### Dosagem da adenilatoquinase

A adenilatoquinase (5' -ATP:5' -AMP fosfotransferase) catalisa uma reação responsável pela produção de ATP ( $ADP + ADP \rightleftharpoons AMP + ATP$ ) independente da fosforilação oxidativa (50). A atividade desta enzima foi determinada indiretamente, através de ensaio espectrofotométrico, envolvendo reações enzimáticas associadas, segundo o esquema abaixo:



6-Fosfoglicona- $\delta$ -lactona.

O ATP oriundo da atividade adenilatoquinásica desencadeou aquela sequência de reações e o NADPH +  $H^+$  produzido foi responsável pela absorvância a 340 nm. Numa cubeta de quartzo colocou-se, sucessivamente, homogeneizando-se após cada adição: tampão tris-HCl 0,19 M pH 8,0, glicose 0,02 M, glicose-6-fosfatodesidrogenase 25  $\mu\text{g}$ ,  $MgCl_2$  0,002 M,  $NADP^+$  0,26 mM, hexoquinase 7  $\mu\text{g}$  e uma concentração da fração mitocondrial previamente determinada em um volume final de 1 ml (51). A reação foi iniciada após adição de ADP, cuja concentração variou de 0,04 mM a 2 mM, iniciando-se, então, as leituras ao longo de 3 minutos, em intervalos de 15 segundos, a temperatura de 22°C. Seguiu-se a

evolução da absorvância a 340 nm, tendo-se tampão tris-HCl 0,19 M pH 8,0 como referência (branco). As leituras foram corrigidas em relação aos testemunhos do ADP e da preparação mitocondrial. Tais controles consistiram na determinação de absorvância de todos os meios de reação, exceto ADP, ou preparação mitocondrial. Estas medidas espectrofotométricas foram indicativas de ADP contaminado com ATP e armazenamento de ATP pelas mitocôndrias, independente da atividade adenilatoquinásica. O coeficiente de extinção milimolar do NADPH foi de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 340 nm (46), podendo-se calcular indiretamente a quantidade de ADP transformado em ATP/mg/min pela adenilatoquinase. A atividade específica foi calculada a partir de:

$$\text{A.E.} = \text{tg}\alpha \times f \times 2/0,002, \quad \text{onde:}$$

$\text{tg}\alpha$  = unidades de absorvância/minuto (v), independente da concentração de substrato;

f = fator de correção para 1 mg de proteína;

2 = número de moléculas de ADP envolvidas na redução de uma molécula de  $\text{NADP}^+$ ;

0,002 = absorvância de 1 nmol de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  partindo-se de um coeficiente de extinção de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 340 nm (46).

#### Cálculo do consumo de oxigênio

A quantidade de oxigênio em uma solução pode ser calculada a partir do seu coeficiente de solubilidade, o qual depende da temperatura e da composição eletrolítica do meio (52). Os cálculos do consumo de oxigênio no presente trabalho foram obtidos partindo-se de valores encontrados em solução de diferentes concentrações de manitol (P.V. Vignais - resultados não publicados). Com estes dados, verificou-se que a concentração de oxigênio dissolvido no meio de reação foi de 222  $\mu\text{M}$ , sendo portanto a concentração de oxigênio de 333 nmoles/1,5 ml ou 666 nátomos/1,5 ml, cujo volume corresponde àquele contido

na câmara de reação. Sendo a altura do papel de 185 mm, calculou-se que cada milímetro representa o consumo de 1,8 nmoles de oxigênio ou 3,6 nãtomos de oxigênio. A velocidade de consumo de oxigênio foi calculada através da seguinte expressão:

$$V = C \times h/t, \quad \text{onde:}$$

V = velocidade de consumo de oxigênio em nmoles/min/1,5 ml do meio de reação;

C = constante indicativa de que a altura de 1 mm, percorrida no papel, corresponde ao consumo de oxigênio de 1,8 nmoles/1,5 ml;

h = altura em milímetros percorrida ao longo do papel, variável em função da origem e integridade da preparação mitocondrial, substrato e vigência ou não de ADP;

t = 1 minuto.

#### Cálculo do controle respiratório

O controle respiratório foi calculado a partir da expressão (18):

$$C.R. = V_3/V_4, \quad \text{onde:}$$

$V_3$  = consumo de oxigênio no estado 3, em presença de substrato e ADP.

$V_4$  = consumo de oxigênio em presença de substrato.

O segundo estado 4 foi sempre utilizado na determinação desta relação.

Cálculo da relação ADP/O

A relação ADP/O indica o número de moléculas de ATP acopladas ao consumo de oxigênio ao longo da cadeia respiratória. Partindo-se da premissa de que a preparação mitocondrial esteja íntegra, tal relação varia em função dos valores teóricos de 2 a 3, conforme o substrato oxidado. A relação ADP/O foi calculada segundo Chance & Williams (18) e Hagiara (49), através da expressão abaixo:

$$\text{ADP/O} = \text{ADP/h} \times \text{C}, \quad \text{onde:}$$

ADP = nmoles de ADP adicionados ao meio de reação;

h = altura em milímetros, percorrida ao longo do papel, na vigência de ADP, isto é, representativa do estado 3;

C = constante indicativa de que a altura de 1 mm corresponde ao consumo de oxigênio de 3,6 nátomos.

## RESULTADOS

### Caracterização da fração mitocondrial

Para a avaliação da integridade das mitocôndrias de sorgo, considerou-se os seguintes critérios: controle respiratório (C. R.), relação ADP/O e estabilidade dependente do tempo (20, 53, 54). Os valores de C.R. e relações ADP/O tendo succinato, NADH e L-malato como substratos oxidáveis, são mostrados nas figuras 1, 2 (A) e 2 (B), respectivamente. Os valores de C.R. para succinato (Fig. 1), são comparáveis aos encontrados em outras preparações mitocondriais vegetais (54, 55). O aumento de C.R. verificado no segundo ciclo de oxidação é devido à diminuição no consumo de oxigênio do segundo estado 4. Ambas as relações ADP/O de 1,8 evidenciaram a mesma capacidade fosforilante nos dois ciclos de oxidação, sugerindo o funcionamento de dois sítios de fosforilação de ATP, como é esperado com o uso de succinato como substrato oxidável. Os C.R. para NADH (Fig. 2 (A)) e L-malato (Fig. 2 (B)) são comparáveis ao primeiro C.R. na presença de succinato (Fig. 1). A relação ADP/O, usando-se NADH como substrato (Fig. 2 (A)) é 2,0, o que está de acordo com os valores teóricos obtidos pelo sistema da desidrogenase do NADH exógeno, encontrado em mitocôndrias vegetais (20, 56, 57, 58). Com L-malato (Fig. 2 (B)), observa-se uma relação ADP/O de 2,5, estando condizente com os dados esperados daqueles substratos que sofrem oxidação ao nível de nucleotídeos de piridina. A estabilidade da preparação mitocondrial foi testada com succinato como substrato, ao longo de 5 horas, tendo permanecido praticamente inalterada (Fig. 3). A maioria das experiências foi realizada na presença do mesmo substrato, em períodos inferiores a 5 horas, garantindo a estabilidade da referida preparação.

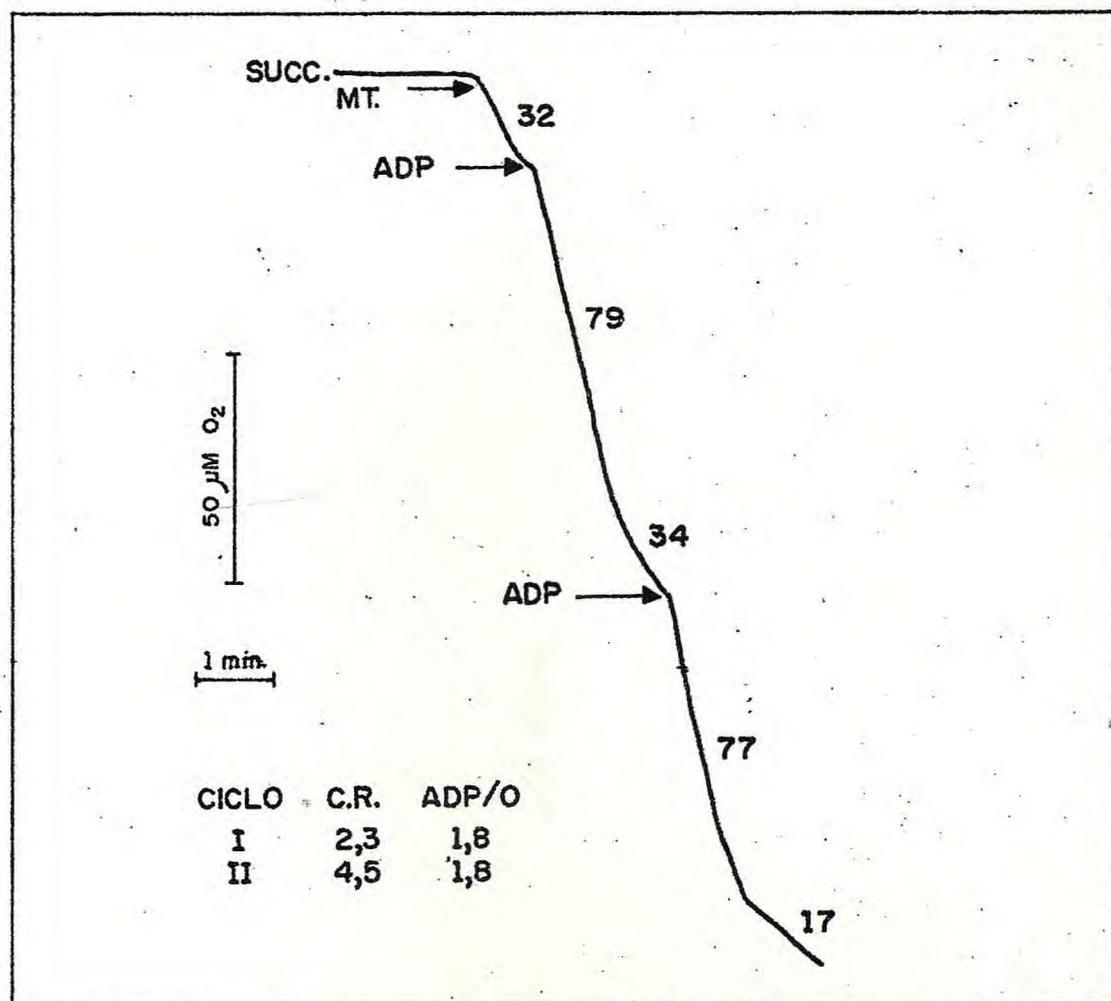


Fig. 1 - Traçado polarográfico da atividade mitocondrial com dois ciclos de fosforilação, tendo succinato 16 mM como substrato. A técnica de isolamento e o meio de reação estão descritos em material e métodos. A reação foi desencadeada pela fração mitocondrial 0,9 mg, seguida por adições sucessivas de ADP 220 μM, conforme indicações das setas, em volume final de 1,5 ml. Os números ao longo do traçado expressam o valor do consumo de oxigênio em nmoles de O<sub>2</sub>/min / 1,5 ml.

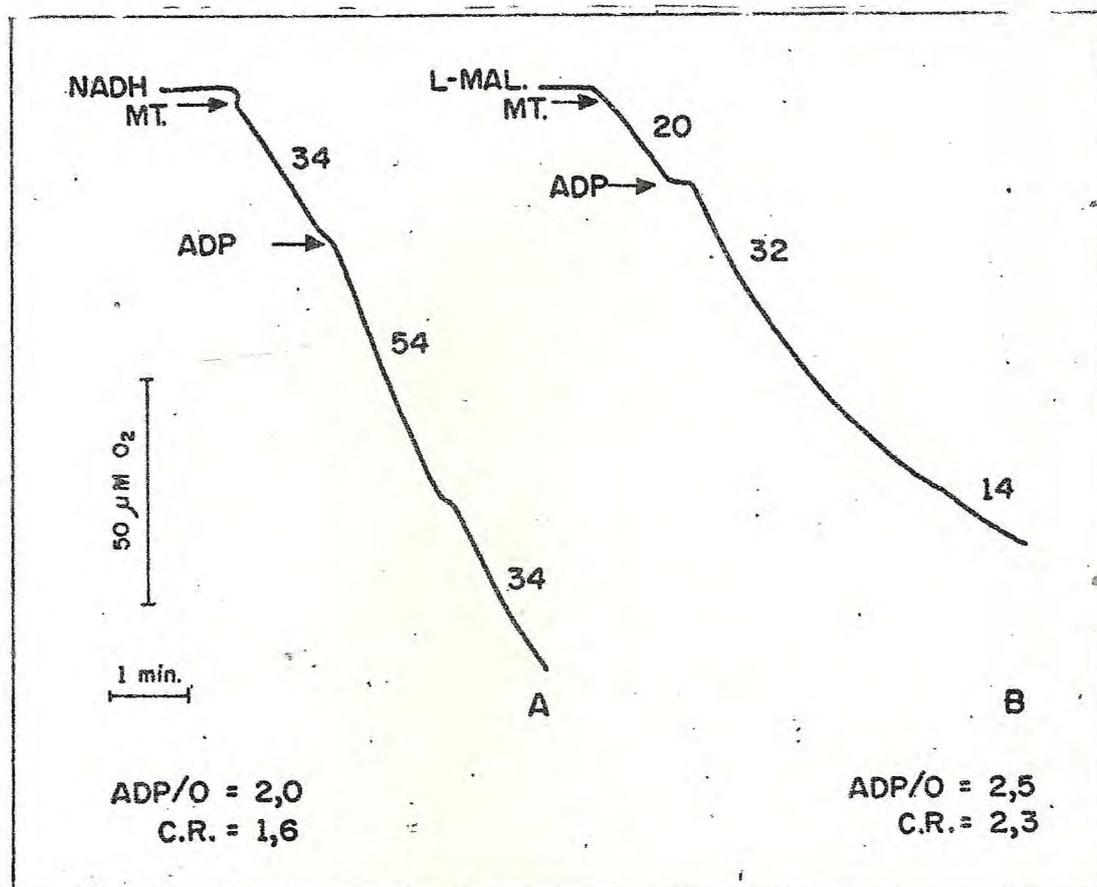


Fig. 2 - Traçado polarográfico da atividade mitocondrial em presença de: (A) NADH 0,2 mM e (B) L-malato 10 mM. Condições experimentais semelhantes às da fig. 1. (A) A concentração de proteína mitocondrial foi de 1,7 mg/1,5 ml e a de ADP foi 270  $\mu\text{M}$ . (B) A concentração de proteína mitocondrial foi de 1,0 mg/1,5 ml e a de ADP foi de 240  $\mu\text{M}$ .

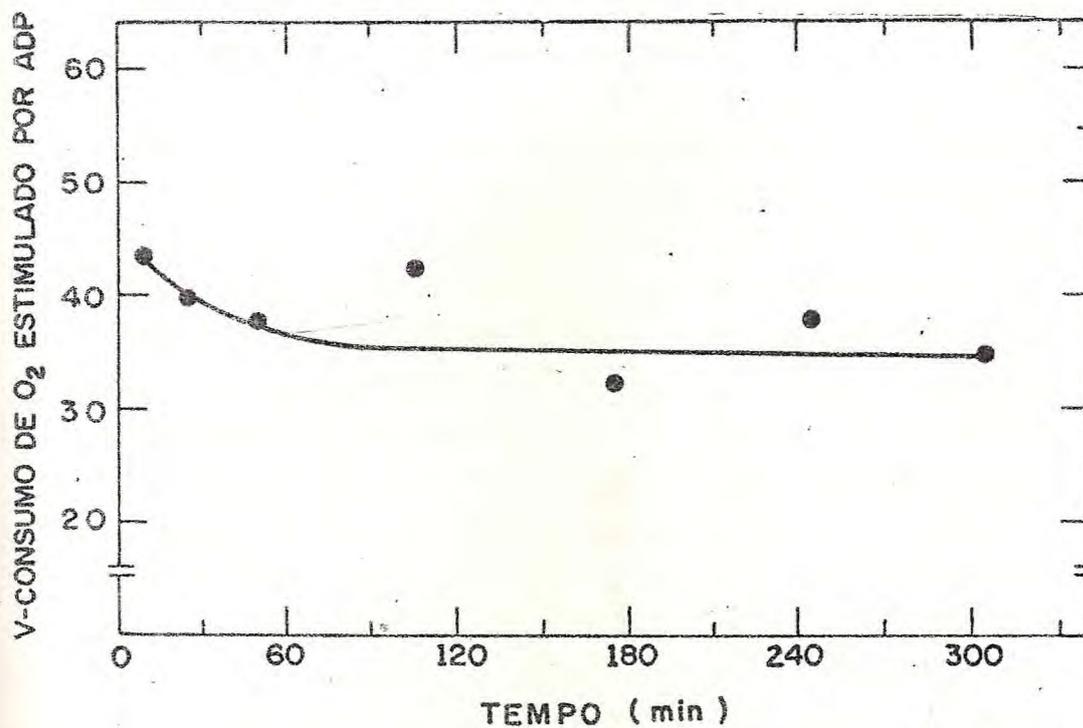


Fig. 3 - Estabilidade da preparação mitocondrial em função do tempo, na qual velocidade (V) é igual ao consumo de oxigênio expresso em nmoles de O<sub>2</sub>/min /1,5 ml em presença de ADP (estado 3), menos o consumo de oxigênio em ausência de ADP (estado 4). A concentração de proteína foi de 1,5 mg/1,5 ml. Condições experimentais idênticas às da fig. 1.

Utilização de substratos pela cadeia transportadora de elétrons

Diferentes intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, succinato (Fig. 1), L-malato (Fig. 2 (B)),  $\alpha$ -cetoglutaratato (Fig. 4 (B)), fumarato (Fig. 5 (A)), oxalacetato (Fig. 5 (B)) e de outras rotas metabólicas, NADH (Fig. 2 (A)), L-glutamato (Fig. 4 (A)), piruvato (Fig. 6 (A)) e DL- $\beta$ -hidroxibutirato (Fig. 6 (B)), foram testados para avaliar-se a capacidade oxidativa da cadeia transportadora de elétrons da fração mitocondrial de sorgo. Os perfis representativos do consumo de oxigênio, utilizando-se succinato como substrato, são mostrados na Fig. 1. Verifica-se, na vigência de ADP, um aumento na velocidade de consumo de oxigênio, comparáveis nos dois ciclos de oxidação de 79 e 77 nmoles de  $O_2$ /min/1,5 ml. Em ausência de ADP, a velocidade do consumo de oxigênio é lenta - 32, 34 e 17 nmoles/min/1,5 ml, característica do estado 4 - havendo, contudo, um decréscimo no valor do consumo de oxigênio após o segundo ciclo de fosforilação, quando comparado aos dois estados 4 anteriores. A Fig. 2 (A) mostra o consumo de oxigênio das mitocôndrias de sorgo em presença de NADH. Observa-se que o ADP estimula o consumo de oxigênio (54 nmoles/min/1,5 ml), sendo, entretanto, tal estímulo, inferior ao verificado quando succinato é o substrato utilizado. Ambas as velocidades do consumo de oxigênio em ausência de ADP são de 34 nmoles/min/1,5 ml. Com o L-malato (Fig. 2 (B)), o consumo de oxigênio é de 32 nmoles/min/1,5 ml durante o estado 3 e 20 e 14 nmoles/min/1,5 ml no primeiro e segundo estados 4, respectivamente. Como se vê, a velocidade de consumo de oxigênio é inferior em ambos os estados à velocidade encontrada quando se usa succinato e NADH como substratos. Verifica-se, ainda, que na transição do estado 3 para o segundo estado 4, há diminuição da velocidade do consumo de oxigênio, quando comparada àquela velocidade do primeiro estado 4. Tal fato é diferente também do que acontece com succinato (Fig. 1) e NADH (Fig. 2 (A)) como substratos. Foram igualmente testados L-glutamato (Fig. 4 (A)) e  $\alpha$ -cetoglutaratato (Fig. 4 (B)), os quais não foram praticamente oxidados pelas mitocôndrias de sorgo, apesar

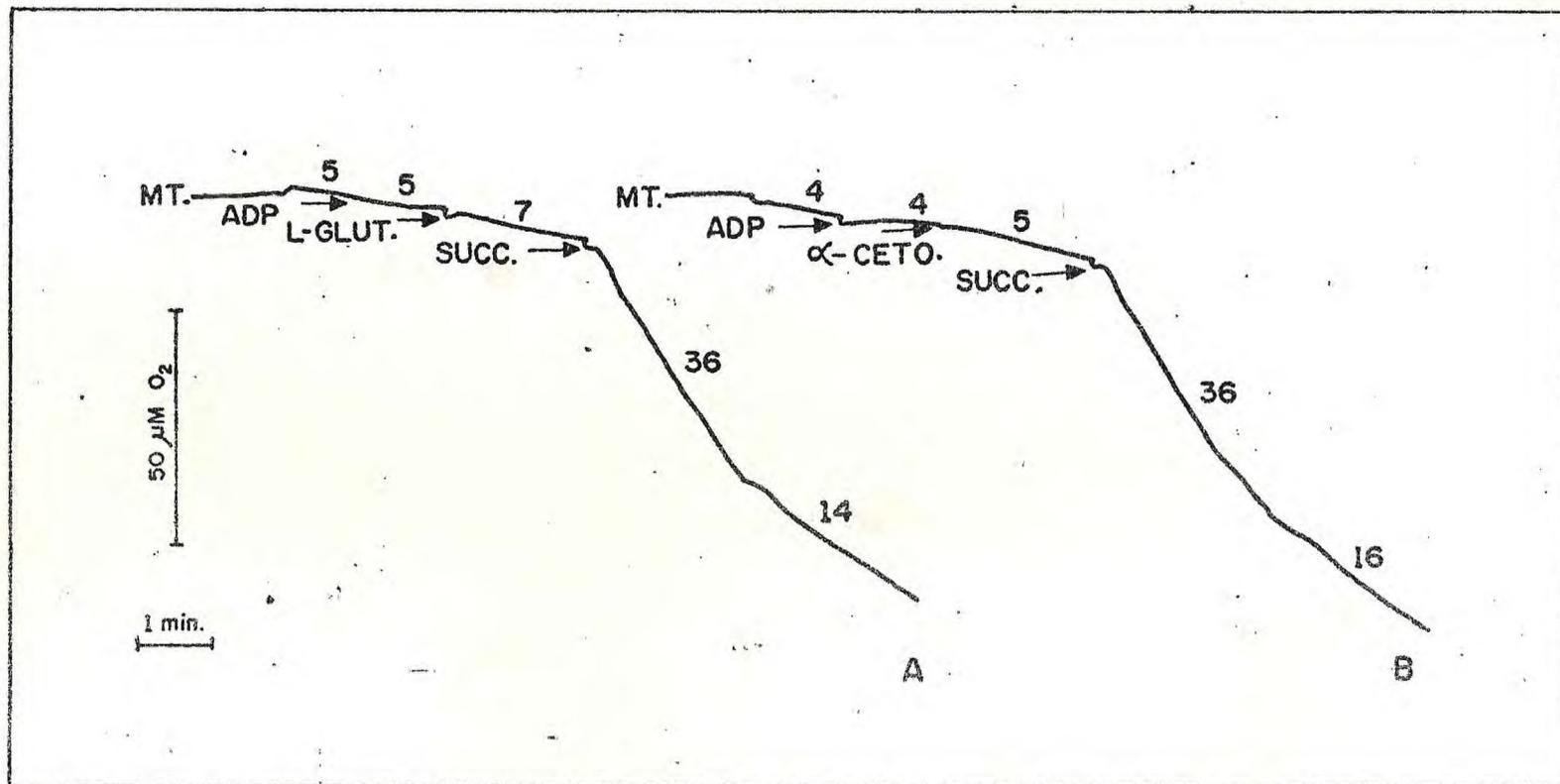


Fig. 4 - Traçado polarográfico da atividade mitocondrial em presença de: (A) L-glutamato 33 mM e (B)  $\alpha$ -cetogluturato 27 mM. Em ambos os traçados polarográficos, a concentração de proteína mitocondrial foi de 1,0 mg/1,5 ml e a concentração de ADP 204  $\mu$ M. Para testar as atividades oxidativas e fosforilantes, foi posteriormente adicionado succinato 16 mM. Condições experimentais iguais às da fig. 1.

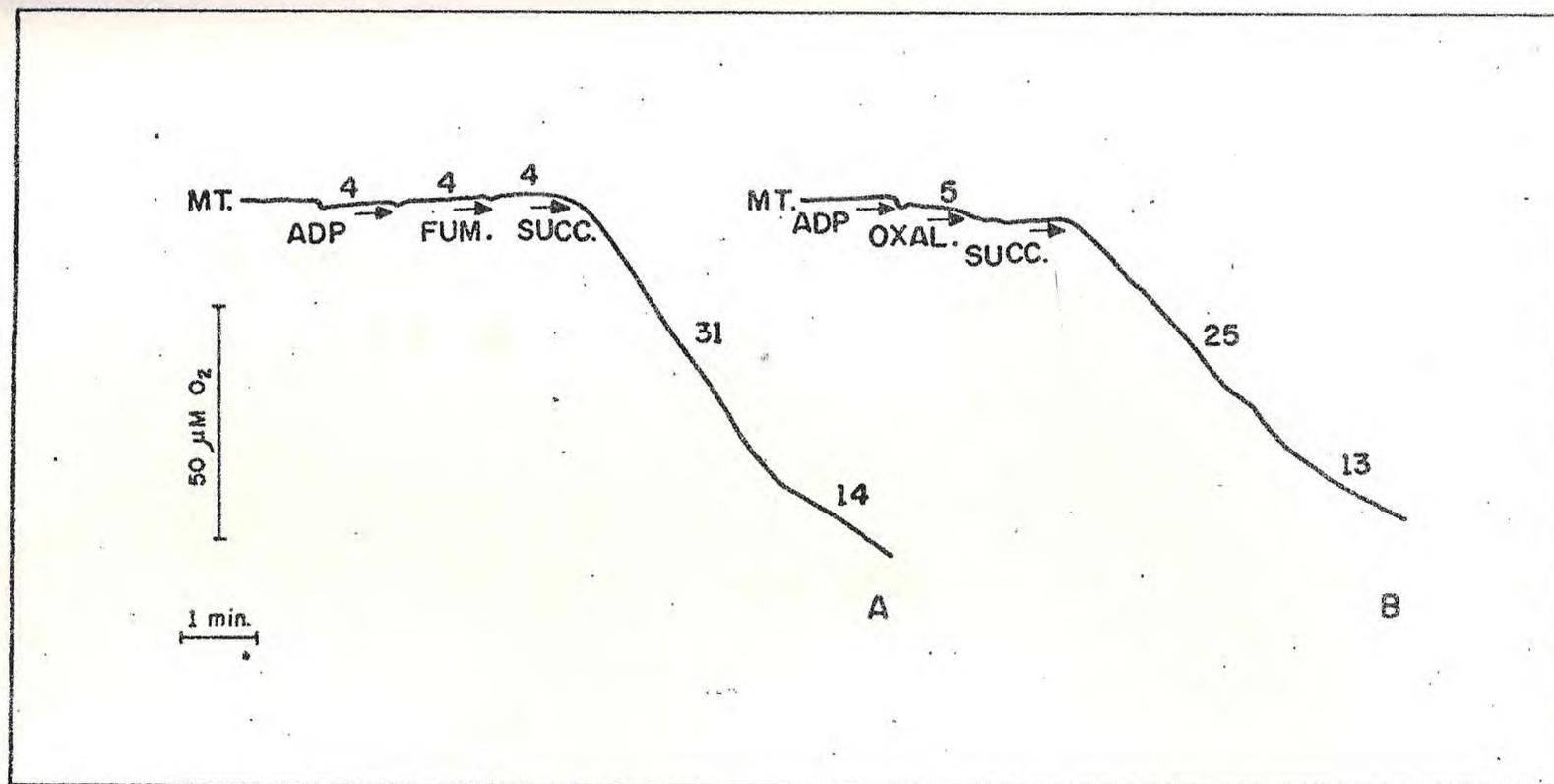


Fig. 5 - Traçado polarográfico da atividade mitocondrial em presença de: (A) Fumarato 33 mM e (B) Oxalacetato 33 mM. Nos pontos indicados, foram feitas adições de ADP 204 μM e succinato 16 mM, em condições semelhantes às da fig. 4. Em ambos os casos, (A e B), a concentração de proteína foi de 1,0 mg/1,5 ml.

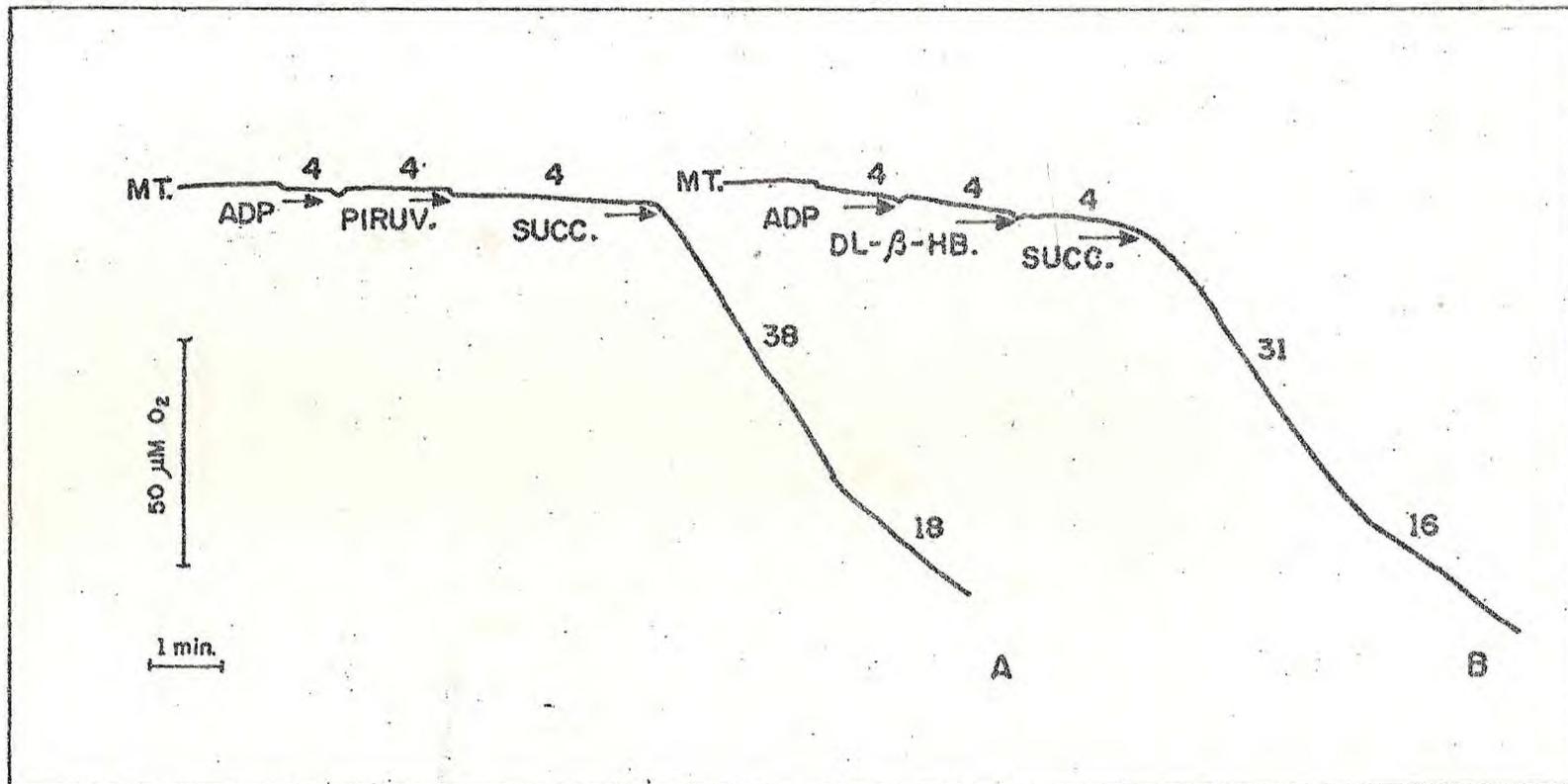


Fig. 6 - Traçado polarográfico da atividade mitocondrial em presença de: (A) Piruvato 33 mM e (B) DL- $\beta$ -hidroxibutirato 33 mM. Nos pontos indicados, foram feitas adições de ADP 204  $\mu\text{M}$  e succinato 16 mM, em condições iguais às fig. 4. Em ambos os casos, (A e B), a concentração de proteína foi de 1,0 mg/1,5 ml.

de serem oxidados por outros sistemas vegetais, como as mitocôndrias de *Phaseolus aureus* (59). A despeito da penetração de oxalacetato e piruvato em outras mitocôndrias vegetais (60, 61, 62), estes também foram substratos em cuja presença não foi evidenciada capacidade oxidativa nas mitocôndrias em estudo (Fig. 5 (B) e 6 (A)). DL- $\beta$ -hidroxi butirato também não foi oxidado pelas mitocôndrias de sorgo (Fig. 6 (B)), diferentemente do que acontece com mitocôndrias animais (54, 63). Verificou-se, ainda, o efeito do fumarato (Fig. 5 (A)), constando-se que este não é oxidado, o que igualmente ocorre com mitocôndrias quer de origem vegetal (41, 61) quer de origem animal (1, 64). Apesar da não oxidação pelas mitocôndrias de sorgo dos intermediários metabólicos referidos acima, deve-se ressaltar que estas organelas não perderam a capacidade oxidativa e fosforilante na presença destes substratos, o que é evidenciado pela adição posterior de succinato (Figs. 4 (A), 4 (B), 5 (A), 5 (B), 6 (A) e 6 (B)).

Determinação das constantes de afinidade ( $K_m$ ) do acceptor de fosfato ADP e dos substratos succinato e L-malato

Determinação do  $K_m$  do ADP

O substrato foi o succinato e a ordem das adições durante a medida polarográfica foi: substrato, mitocôndrias e ADP, como está indicada na figura 7. As velocidades do consumo de oxigênio em presença de ADP 221  $\mu$ M, 170  $\mu$ M, 107  $\mu$ M, 51  $\mu$ M e 17  $\mu$ M, foram subtraídas dos estados 4 subsequentes. Somente foram utilizadas para determinação do  $K_m$ , os valores do consumo de oxigênio estimulado por ADP a partir da segunda adição do mesmo, admitindo-se que um contacto prévio com ADP provocaria uma distribuição mais simétrica do translocador (31, 32), permitindo uma determinação mais exata do  $K_m$  (Fig. 7). Os inversos das velocidades do consumo de oxigênio estimuladas por ADP (estado 3 - estado 4) foram grafados versus os inversos das concentrações de ADP (Fig. 8). Esta figura mostra a reta que melhor representa a média de

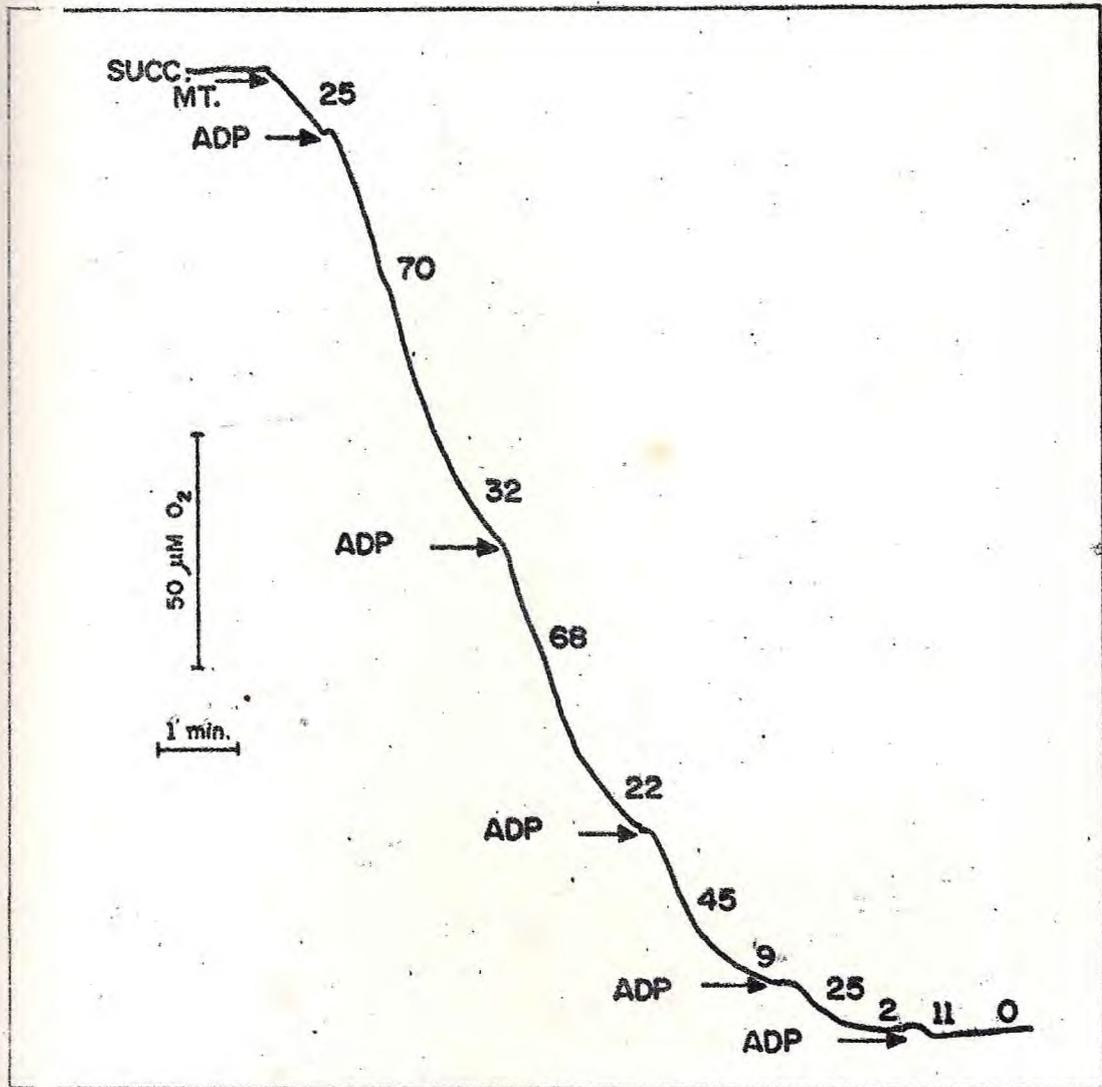


Fig. 7 - Traçado polarográfico padrão da atividade mitocondrial em presença de diferentes concentrações de ADP, utilizado na determinação da constante de afinidade do ADP ( $K_m$ ). Nos pontos indicados, foram feitas adições na seguinte ordem: succinato 16 mM, preparação mitocondrial 0,9 mg e ADP 221  $\mu\text{M}$ , 170  $\mu\text{M}$ , 107  $\mu\text{M}$ , 51  $\mu\text{M}$  e 17  $\mu\text{M}$ . Condições experimentais descritas em material e métodos e segundo as da fig. 1.

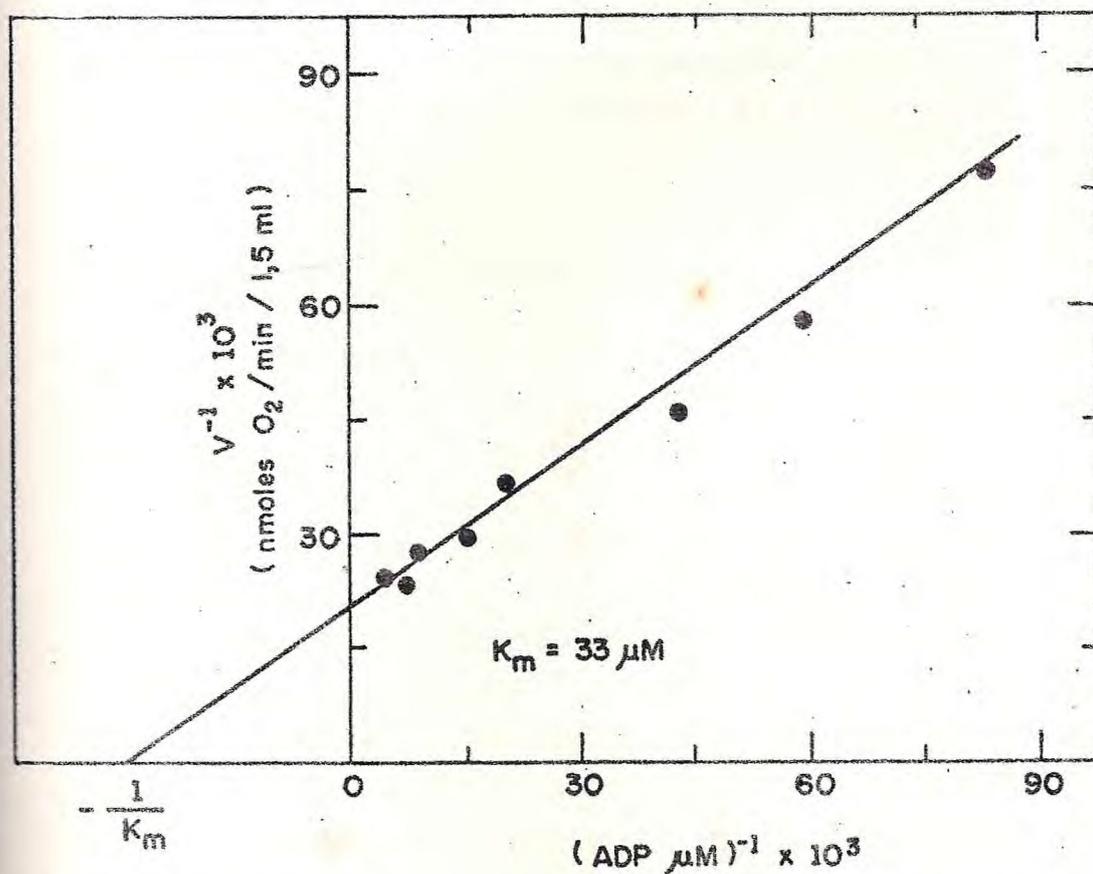


Fig. 8 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação da constante de afinidade ( $K_m$ ) de ADP. A concentração de proteína foi de 1,3 mg/1,5 ml. As condições de ensaio foram idênticas às da fig. 7.

cinco experiências, através da aplicação da análise de regressão linear. Nestas experiências foram usadas idênticas concentrações de proteína: 1,3 mg/1,5 ml em cada determinação, com uma concentração efetiva de ADP, variando de 12  $\mu\text{M}$  a 221  $\mu\text{M}$ . A velocidade do consumo de oxigênio, estimulada por ADP, alcança um valor máximo a partir de 100  $\mu\text{M}$ , valor este concordante com o obtido por Ikuma com mitocôndrias de *Phaseolus aureus* (54). A concentração de ADP, que causa metade da velocidade máxima, é de 33  $\mu\text{M}$ , sendo comparável ao valor determinado para as mitocôndrias de *Vigna sinensis* (38) e mitocôndrias de animal (65).

#### Determinação do $K_m$ do succinato e L-malato

Foi estudado o efeito da concentração destes substratos na variação do consumo de oxigênio no estado 3. A ordem de adição dos reagentes necessários a determinação foi: mitocôndrias, ADP e substratos, como é mostrado na figura 9 (A) e 9 (B). A diferença entre as velocidades do consumo de oxigênio posteriores e anteriores à adição dos substratos foi determinada, sendo os inversos destes valores versus os inversos das concentrações de ambos os substratos, grafados como indicam as figuras 10 e 11. Através do método dos mínimos quadrados, escolheu-se as retas representativas do efeito das concentrações dos substratos succinato e L-malato, sobre os valores de consumo de oxigênio, sendo encontradas as seguintes constantes de afinidade ( $K_m$ ): 0,5 mM para succinato e 5 mM para L-malato.

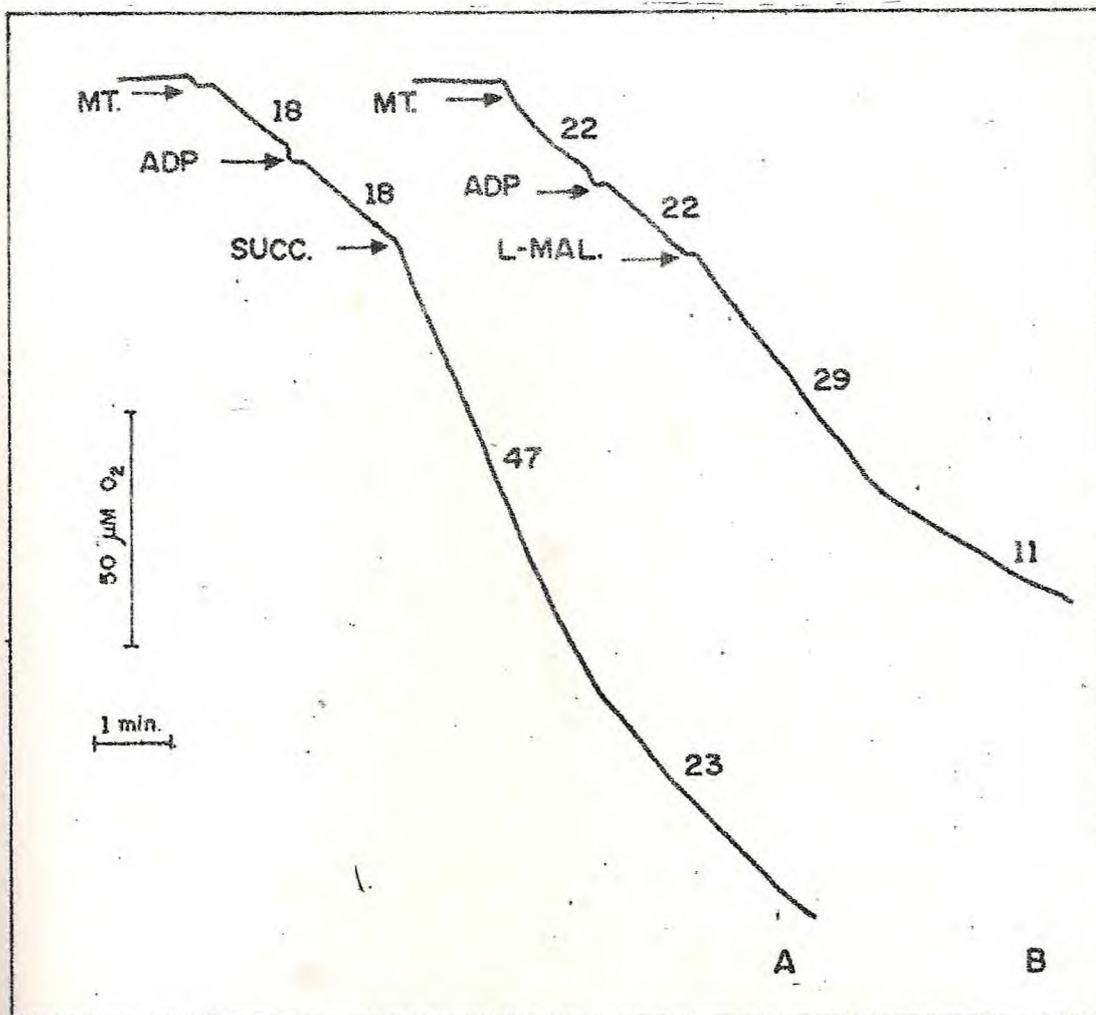


Fig. 9 - Traçado polarográfico da atividade mitocondrial com adição prévia de ADP  $204 \mu\text{M}$ , utilizado na determinação das constantes de afinidade ( $K_m$ ) dos substratos: (A) Succinato  $7 \text{ mM}$  e (B) L-malato  $7 \text{ mM}$ . A velocidade de consumo de oxigênio,  $V$  (nmoles de  $\text{O}_2/\text{min}/1,5 \text{ ml}$ ) é igual à velocidade determinada após adição de substrato, menos a velocidade em presença de ADP. Concentrações variadas dos mesmos substratos foram testadas em idêntico procedimento. A concentração de proteína mitocondrial foi de  $1,4 \text{ mg}/1,5 \text{ ml}$ . Condições experimentais descritas em material e métodos e na fig. 1.

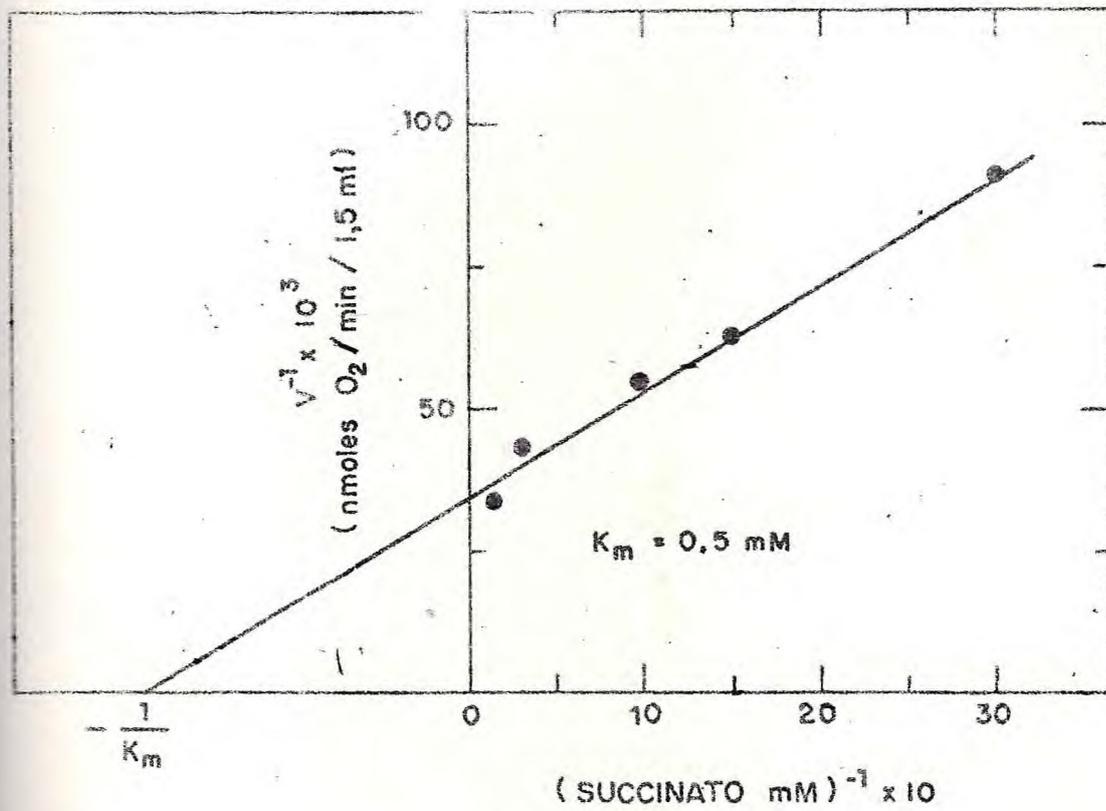


Fig. 10 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação da constante de afinidade ( $K_m$ ) de succinato como substrato. A concentração de proteína mitocondrial foi de 1,4 mg/1,5 ml. As condições de ensaio foram as mesmas da fig. 9 (A), sendo aplicadas diferentes concentrações de succinato.

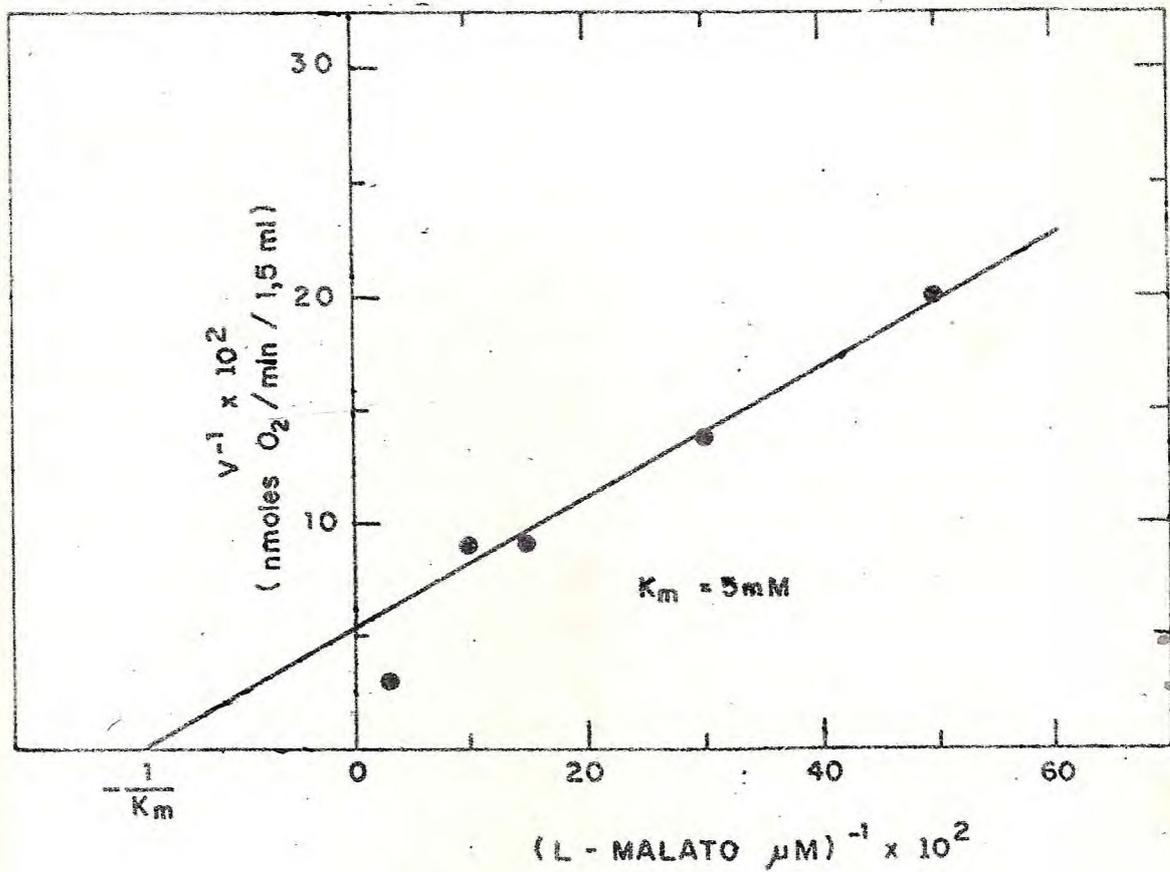


Fig. 11 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação da constante de afinidade ( $K_m$ ) de L-malato. A concentração de proteína mitocondrial foi de 1,4 mg/1,5 ml. As condições de ensaio foram as mesmas da fig. 9 (B), sendo aplicadas diferentes concentrações de L-malato.

### Translocação de nucleotídeos de adenina (ADP)

#### Atividade adenilatoquinásica

Para este estudo, foi feita a determinação de  $K_m$  da adenilatoquinase (Fig. 12) bem como a determinação de sua atividade (Fig. 13). A figura 12 representa a média de duas experiências com concentrações de proteína de 0,12 mg/ml, onde foram grafados os inversos dos valores das velocidades versus os inversos das concentrações de ADP. A equação da reta foi calculada através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, sendo determinado um  $K_m$  de 333  $\mu$ M. A partir da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) encontrada no gráfico da figura 12, foi determinada uma atividade específica para a adenilatoquinase da ordem de 750 nmoles de ADP transformados em ATP/minuto/mg de proteína (vide material e métodos). A figura 13 mostra a atividade desta enzima em função da concentração de ADP. Pode-se verificar que em presença de ADP 200  $\mu$ M, concentração habitualmente usada para as medidas de translocação, a atividade adenilatoquinásica exercida para subtrair ADP do meio de reação foi desprezível, quando comparada à do translocador.

#### Inibidores da translocação de ADP

Estudou-se a translocação de ADP em função da fosforilação oxidativa, isto é, a ação de inibidores da translocação (ATR e CAT) foi avaliada a partir da influência exercida pelos mesmos sobre o consumo de oxigênio estimulado por ADP (estado 3). Assim, a cinética do transporte de ADP e a ação dos inibidores foram avaliados indiretamente, a partir de dados de consumo de oxigênio.

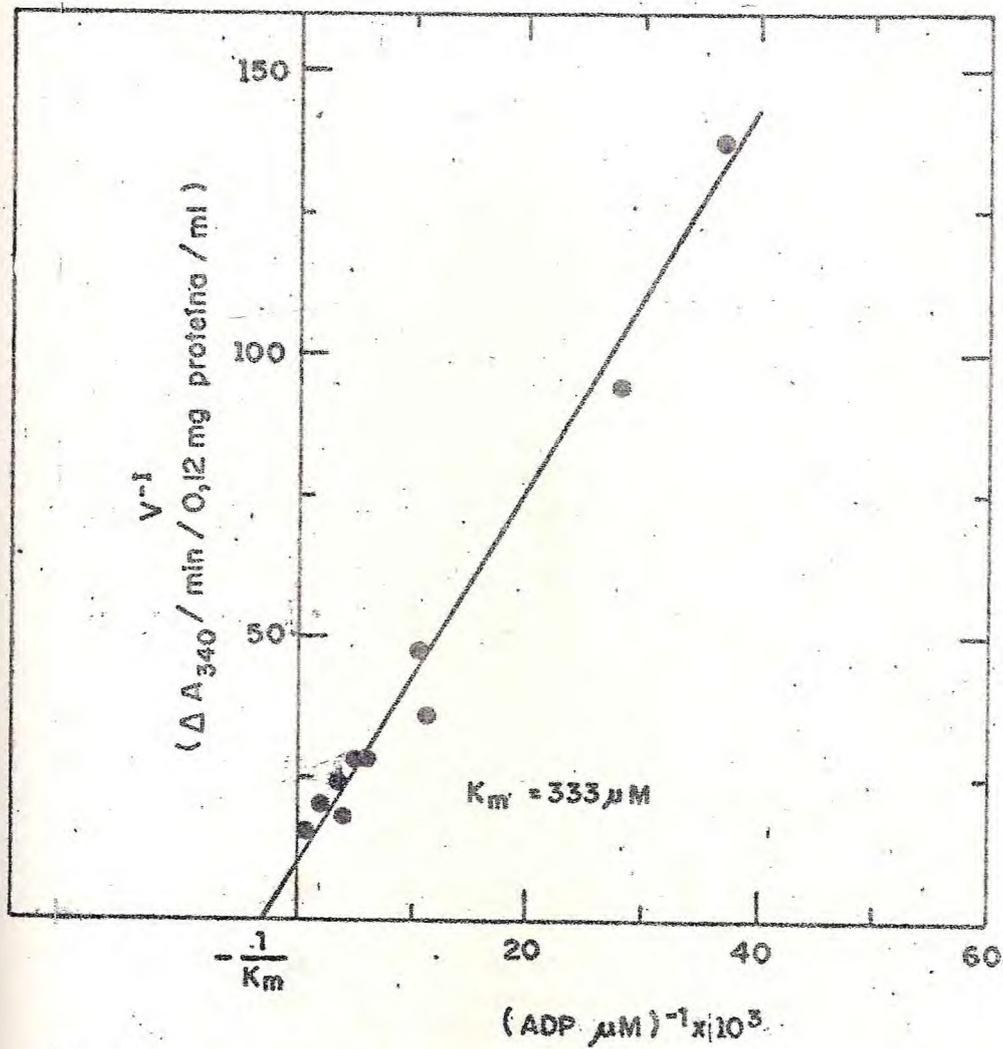


Fig. 12 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação da constante de afinidade ( $K_m$ ) da enzima adenilato quinase pelo ADP. O método de determinação e cálculo desta atividade está descrito em material e métodos.

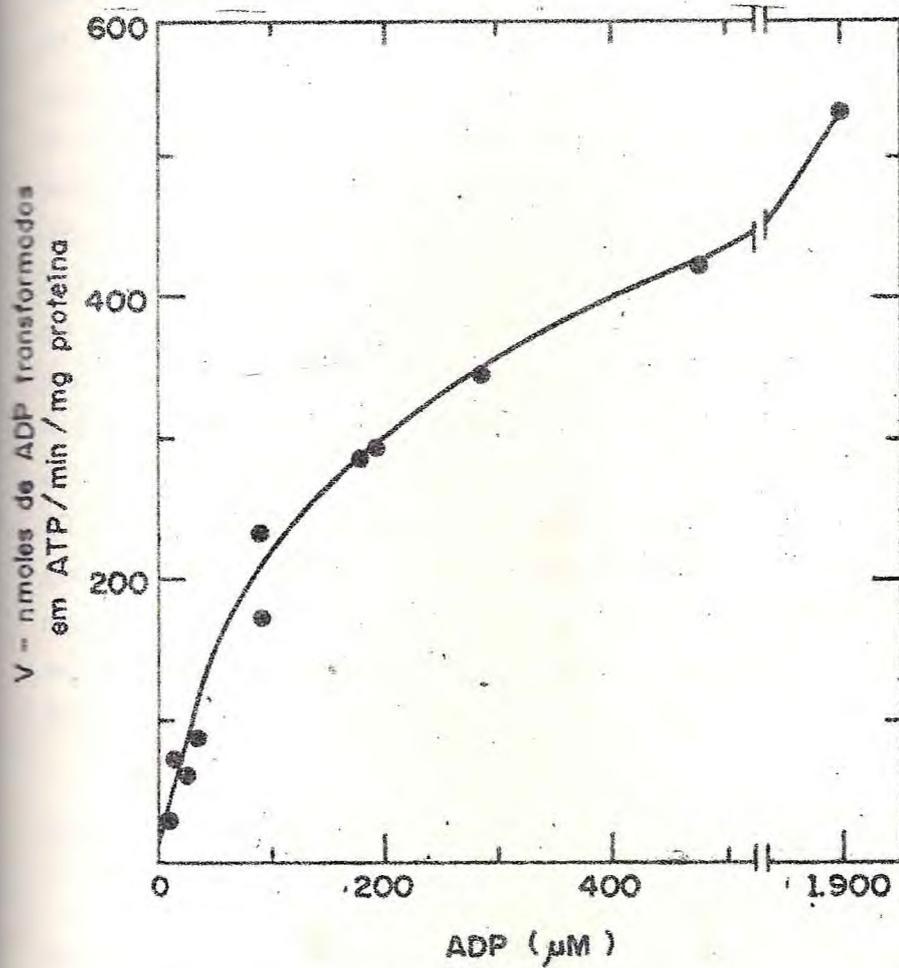


Fig. 13 - Gráfico da atividade adenilatoquinase. As condições experimentais são tão descritas em material e métodos e na fig. 12.

#### Efeito do ATR na translocação de ADP

O traçado polarográfico da figura 14 (A) mostra o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias de sorgo oxidando succinato 16 mM e o estímulo deste consumo mediante adições sucessivas de ADP 141  $\mu$ M, 67  $\mu$ M e 23  $\mu$ M, deixando de computar o estímulo provocado pela primeira adição de ADP e exibindo uma cinética de saturação clássica. A figura 14 (B) mostra um traçado polarográfico nas mesmas condições, mas em presença de ATR 10  $\mu$ M, evidenciando inibição completa do consumo de oxigênio estimulado por ADP. Os gráficos de Lineweaver - Burk (Fig. 15) e Dixon (Fig. 16) (66) demonstraram que o ATR compete com o ADP ao nível do translocador, quando a relação ATR/ADP é inferior a 0,04, sendo os valores de  $K_i$  obtidos pelos dois métodos de análise de 0,5  $\mu$ M. A figura 17 mostra, por um outro método de análise, que a inibição efetuada pelo ATR é competitiva. Com a concentração de ADP variando de 23  $\mu$ M a 141  $\mu$ M, verifica-se um mesmo perfil inibitório e a concentração de ATR que inibe a translocação de ADP 141  $\mu$ M de 50% é aproximadamente 2,0  $\mu$ M. Este valor é confirmado no gráfico de % de velocidade em ausência de ATR versus concentração de inibidor, indicado na figura 18 (B).

#### Efeito do CAT na translocação de ADP

A figura 19 (A) mostra um perfil do consumo de oxigênio em presença de succinato 16 mM e diferentes concentrações de ADP: 147  $\mu$ M, 77  $\mu$ M e 25  $\mu$ M, sem levar em consideração a adição prévia de ADP. A figura 19 (B) mostra um perfil do consumo de oxigênio nas mesmas condições, mas em presença de CAT 0,17  $\mu$ M, o qual indica que houve uma completa inibição do consumo de oxigênio estimulado pelo ADP. Como se vê no feixe de curvas no gráfico do tipo Lineweaver - Burk (Fig. 20), o CAT atua como inibidor aparentemente competitivo da translocação

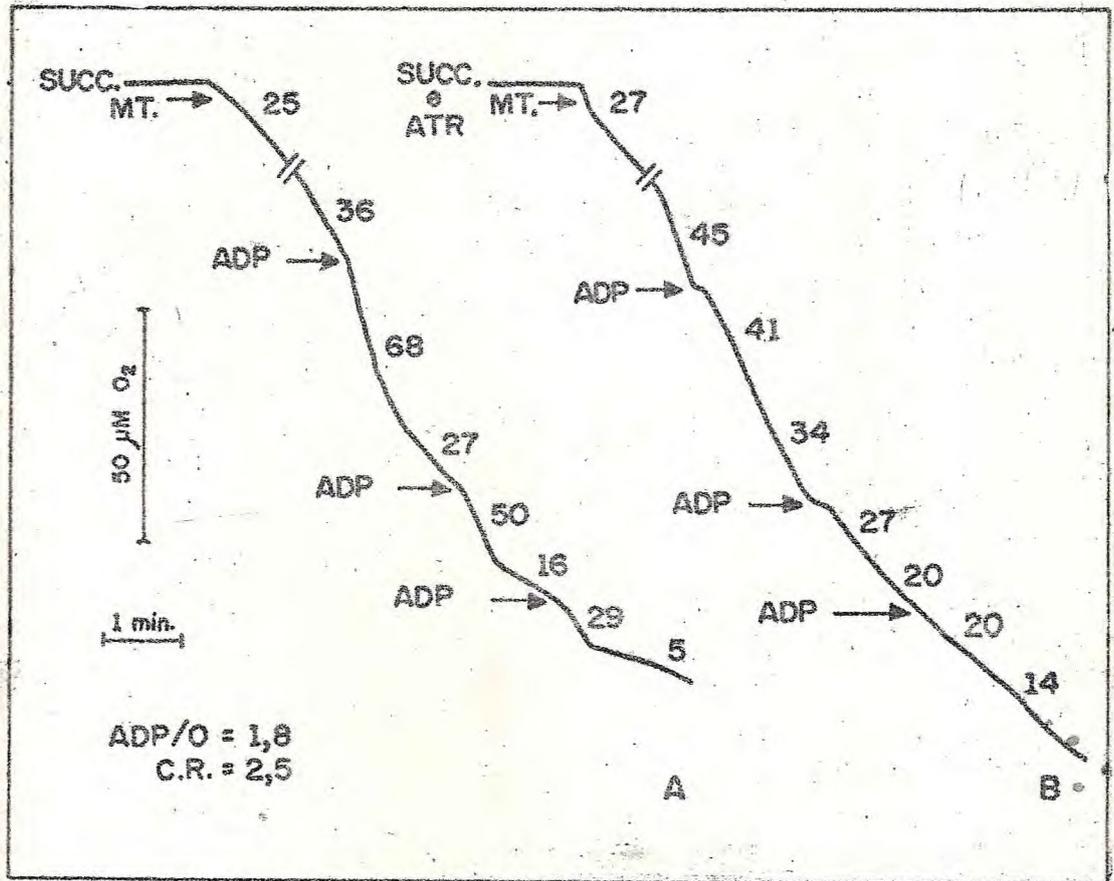


Fig. 14 - Traçado polarográfico da atividade mitocondrial, mostrando o efeito inibitório do ATR na respiração estimulada por ADP, em presença de succinato 16 mM como substrato. (A) Controle do consumo de oxigênio em presença de adições sucessivas de ADP nas concentrações de 141  $\mu\text{M}$ , 67  $\mu\text{M}$  e 23  $\mu\text{M}$ . (B) Consumo de oxigênio em presença de ATR 10  $\mu\text{M}$  e com as mesmas concentrações de ADP do controle. A concentração de proteína mitocondrial foi de 1,5 mg/1,5 ml e as demais condições experimentais estão descritas na fig. 1.

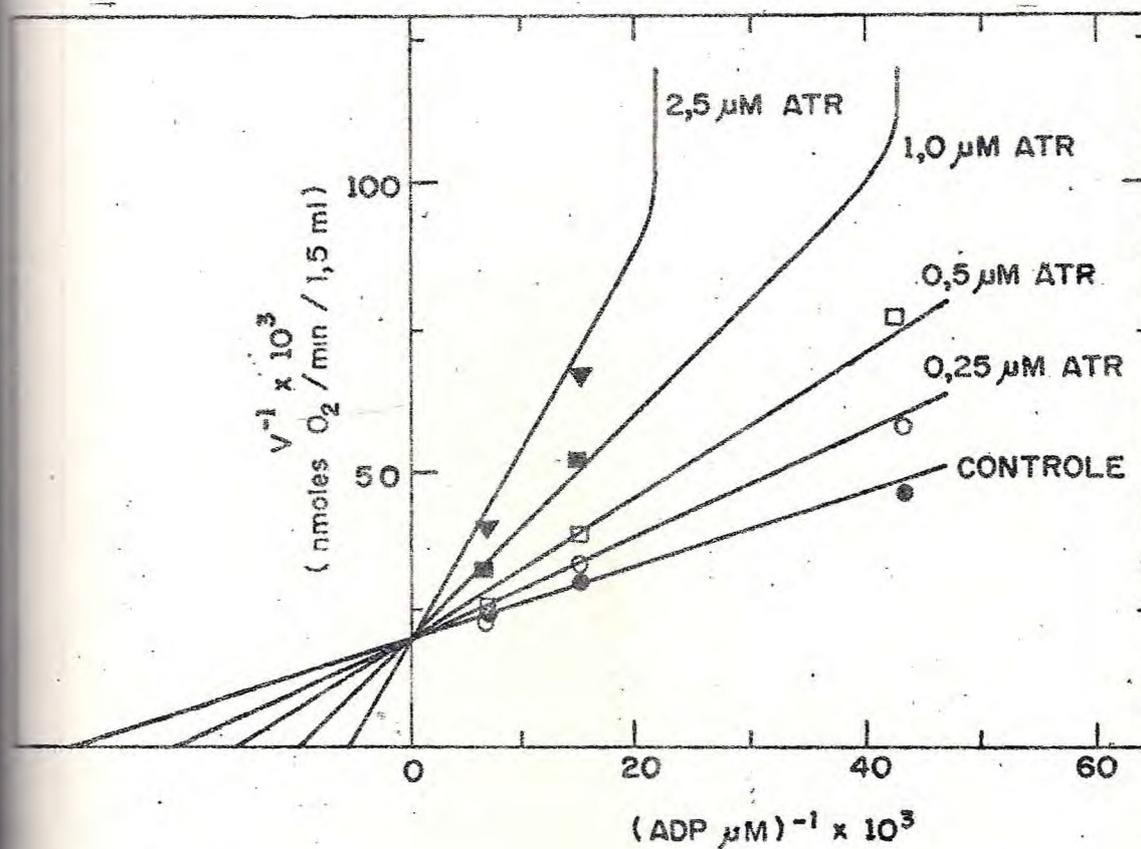


Fig. 15 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação da constante de inibição ( $K_i$ ) do ATR. A concentração de proteína mitocondrial foi de 1,5 mg/1,5 ml e as condições de ensaio estão descritas na fig. 14.

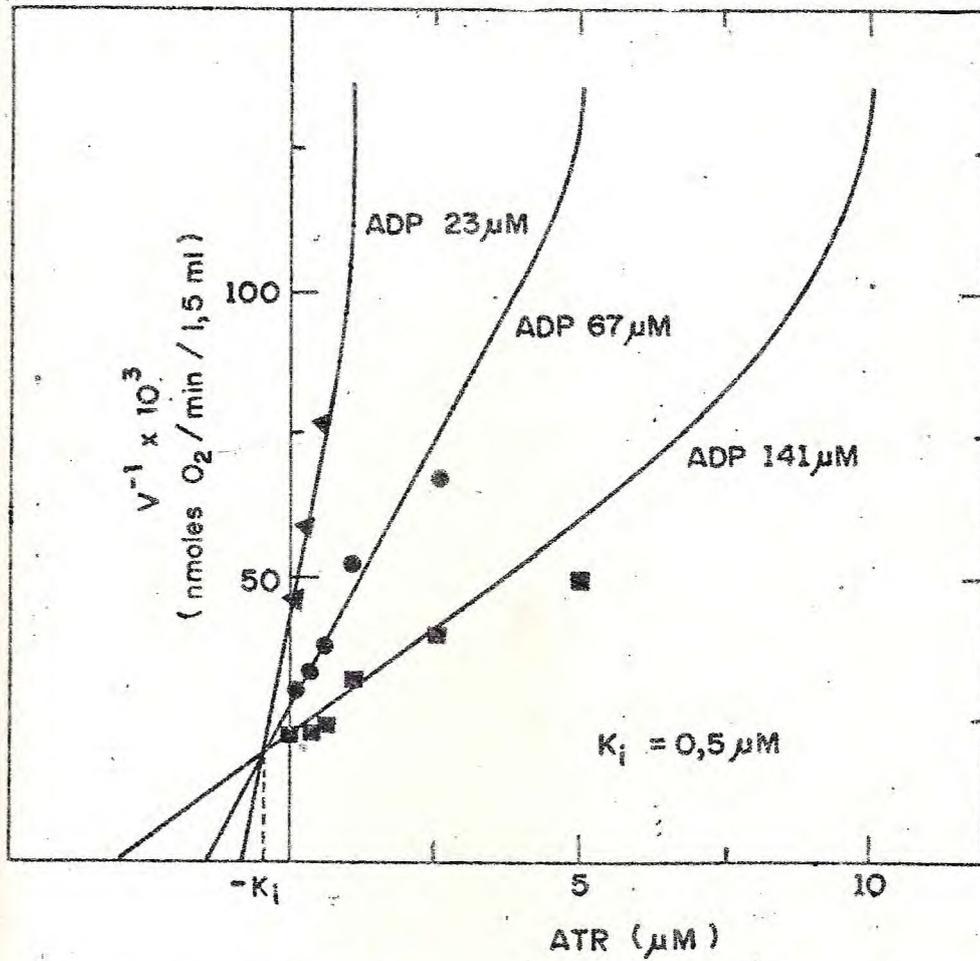


Fig. 16 - Gráfico de Dixon para determinação da constante de inibição ( $K_i$ ) do ATR. A concentração de proteína mitocondrial foi de  $1,5 \text{ mg}/1,5 \text{ ml}$ . As condições de ensaio estão descritas na fig. 15.

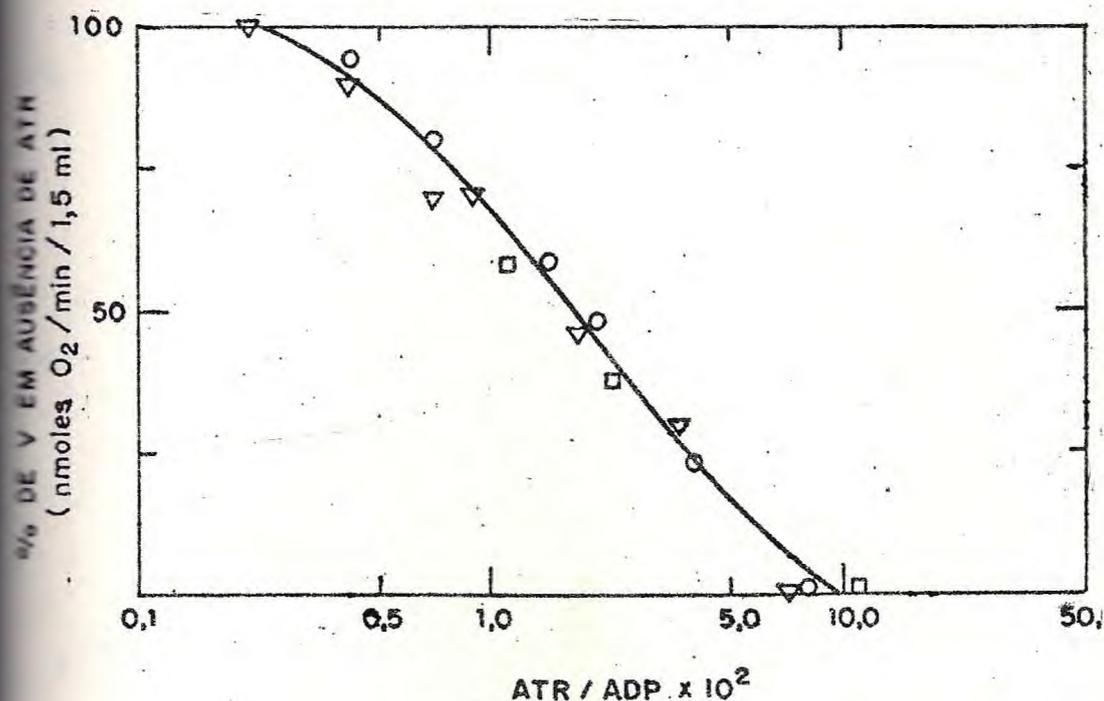


Fig. 17 - Efeito do ATR na velocidade de consumo de oxigênio. Os valores da velocidade de consumo de oxigênio foram calculados como está indicado na fig. 7 e são expressos como porcentagem da reação em ausência de inibidor. A relação ATR/ADP refere-se às concentrações de ATR 0,25 μM, 0,5 μM, 1,0 μM, 2,5 μM, 5,0 μM e 10,0 μM e concentrações de ADP 23 μM (□), 67 μM (○) e 141 μM (▽). A concentração de proteína mitocondrial foi de 1,5 mg/1,5 ml. As condições experimentais estão descritas na fig. 14.

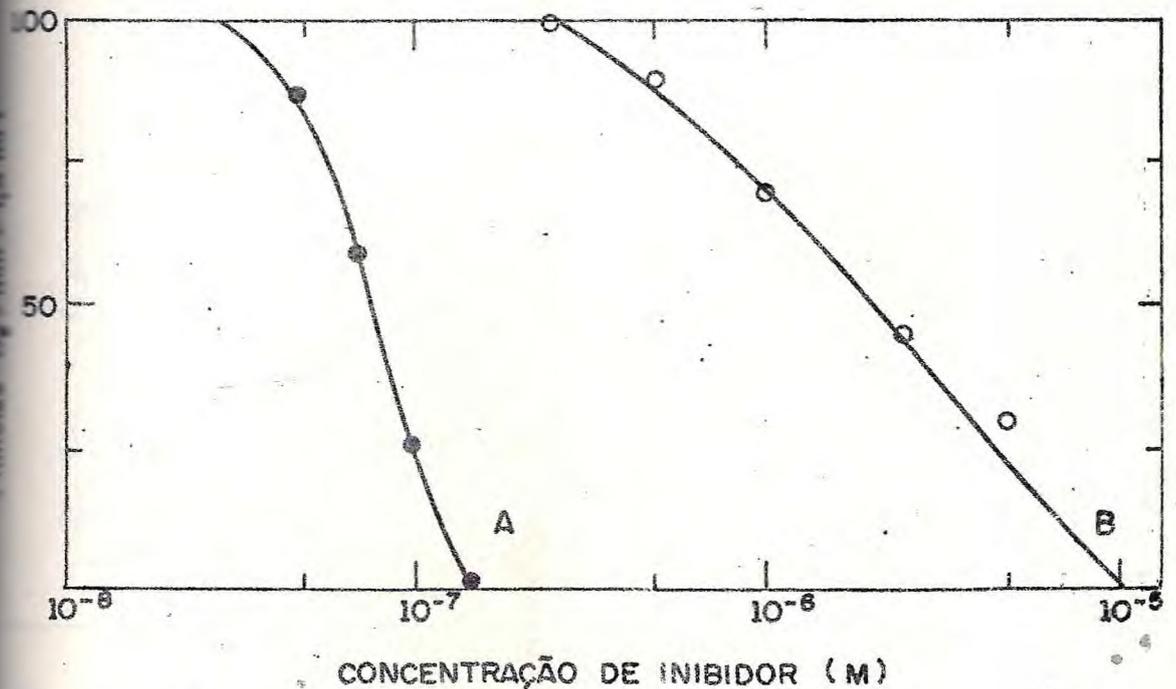


Fig. 18 - Gráfico semilogarítmico mostrando a diferença na susceptibilidade à ação dos inibidores (ATR e CAT) da translocação de ADP. A velocidade de consumo de oxigênio foi calculada como na fig. 17. (A) Efeito do CAT na respiração estimulada por ADP  $134 \mu\text{M}$ . (B) Efeito do ATR na respiração estimulada por ADP  $141 \mu\text{M}$ . A concentração de proteína mitocondrial em (A) foi de  $0,8 \text{ mg}/1,5 \text{ ml}$  e em (B) foi de  $1,5 \text{ mg}/1,5 \text{ ml}$ . As condições experimentais da fig. 18 (A) foram as mesmas da fig. 19, e as da fig. 18 (B) as mesmas da fig. 14.

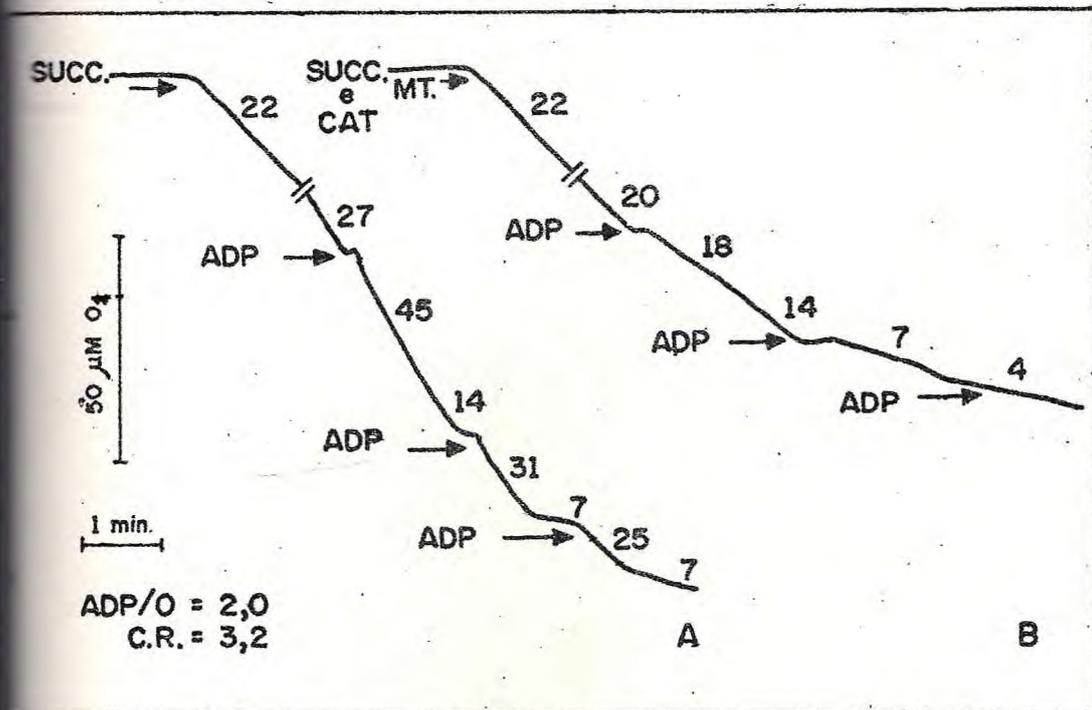


Fig. 19 - Traçado polarográfico da atividade mitocondrial, mostrando o efeito inibitório do CAT na respiração estimulada por ADP, em presença de succinato 16 mM como substrato. (A) Controle do consumo de oxigênio em presença de adições sucessivas de ADP nas concentrações de: 147  $\mu\text{M}$ , 77  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ . (B) Consumo de oxigênio em presença de CAT 0,17  $\mu\text{M}$  e com as mesmas concentrações de ADP do controle. A concentração de proteína mitocondrial foi de 0,8 mg/1,5 ml. As condições experimentais estão descritas na fig. 1.

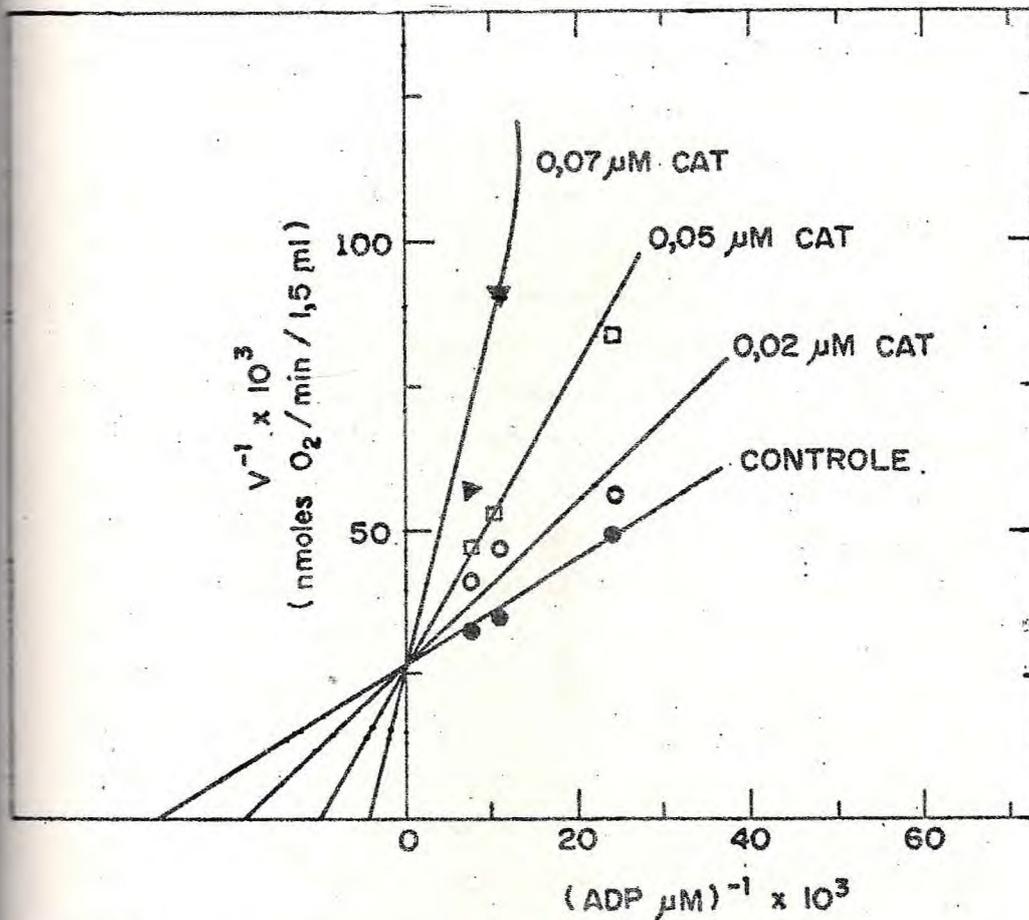


Fig. 20 - Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação do efeito inibitório do CAT. A concentração de proteína mitocondrial foi de 0,8 mg/1,5 ml. As condições de ensaio foram semelhantes às da fig. 19.

de ADP. As interseções no eixo dos x foram usadas para calcular os valores de  $K_i$ , os quais foram: 0,04  $\mu\text{M}$ , 0,02  $\mu\text{M}$  e 0,001  $\mu\text{M}$  para as concentrações de 0,02  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$  e 0,07  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O CAT parece competir pelo translocador, quando examinado com concentrações de ADP maiores que 41  $\mu\text{M}$  e concentrações de CAT até 0,05  $\mu\text{M}$ . A figura 18 (A) mostra um gráfico de % de velocidade em ausência de inibidor versus concentração de inibidor, sendo encontrado uma inibição de 50% com uma concentração de CAT igual a 0,08  $\mu\text{M}$  em presença de ADP 134  $\mu\text{M}$ . A variabilidade dos valores de  $K_i$  e a pequena concentração de CAT capaz de provocar 50% de inibição (Fig. 18 (A)), quando comparada a do ATR (Fig. 18 (B)), permite sugerir uma alta afinidade pelo translocador de ADP (67). Na figura 21, grafando-se as tangentes das curvas de inibição do gráfico de Lineweaver - Burk (Fig. 20) versus concentração de CAT, obtém-se uma curva côncava assintótica a uma linha vertical, característica de inibição competitiva de alta afinidade (68). A análise gráfica pelo método de Dixon (Fig. 22) confirma uma inibição do tipo aparentemente competitiva, sendo encontrado um  $K_i$  igual a 0,06  $\mu\text{M}$  para concentrações de CAT até 0,05  $\mu\text{M}$ . A figura 23 (A) e 23 (B) mostra gráficos de % de velocidade em ausência de inibidor versus a relação das concentrações de inibidor e do substrato. Observou-se que o grau de inibição variou com as diferentes concentrações de ADP, 87  $\mu\text{M}$  e 134  $\mu\text{M}$ , contrariamente do que ocorreu com o ATR (Fig. 17). A figura 24 apresenta um gráfico de  $(I/S)_{0,5}$  versus o inverso da concentração de ADP, resultando uma reta, cuja tangente foi calculada para encontrar-se o valor de  $K_i$ , o qual foi 0,06  $\mu\text{M}$ , idêntico ao valor encontrado pelo método de Dixon (Fig. 22).

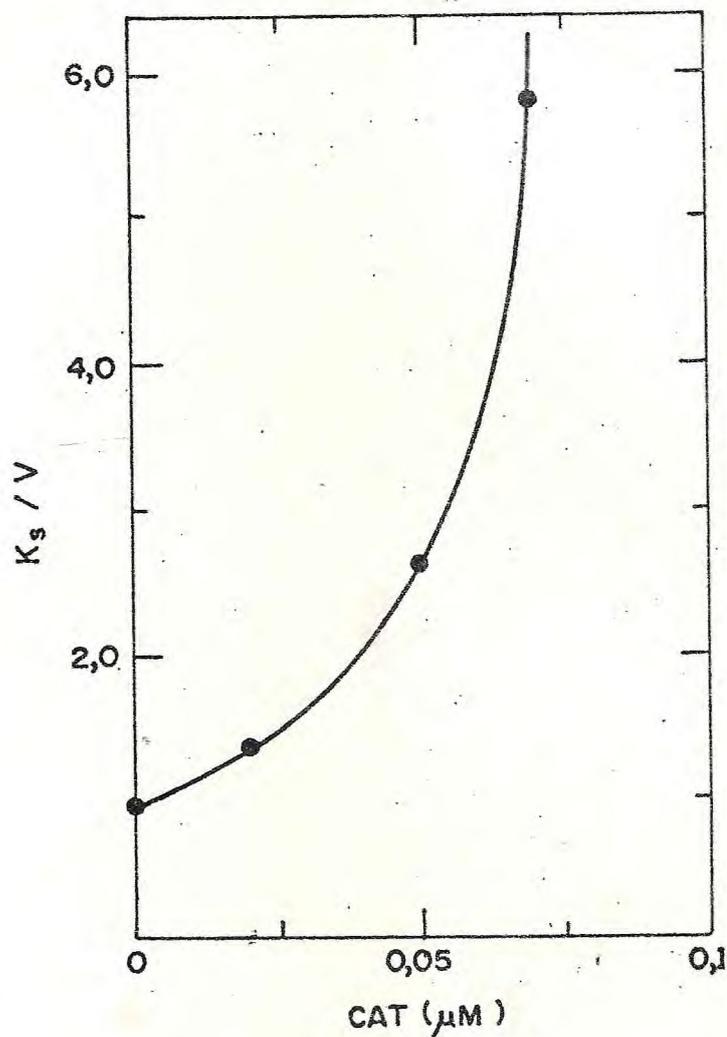


Fig. 21 - Análise da afinidade do CAT pelo translocador de ADP. Gráfico das inclinações obtidas do gráfico de Lineweaver-Burk (Fig. 20) versus a concentração total de CAT.

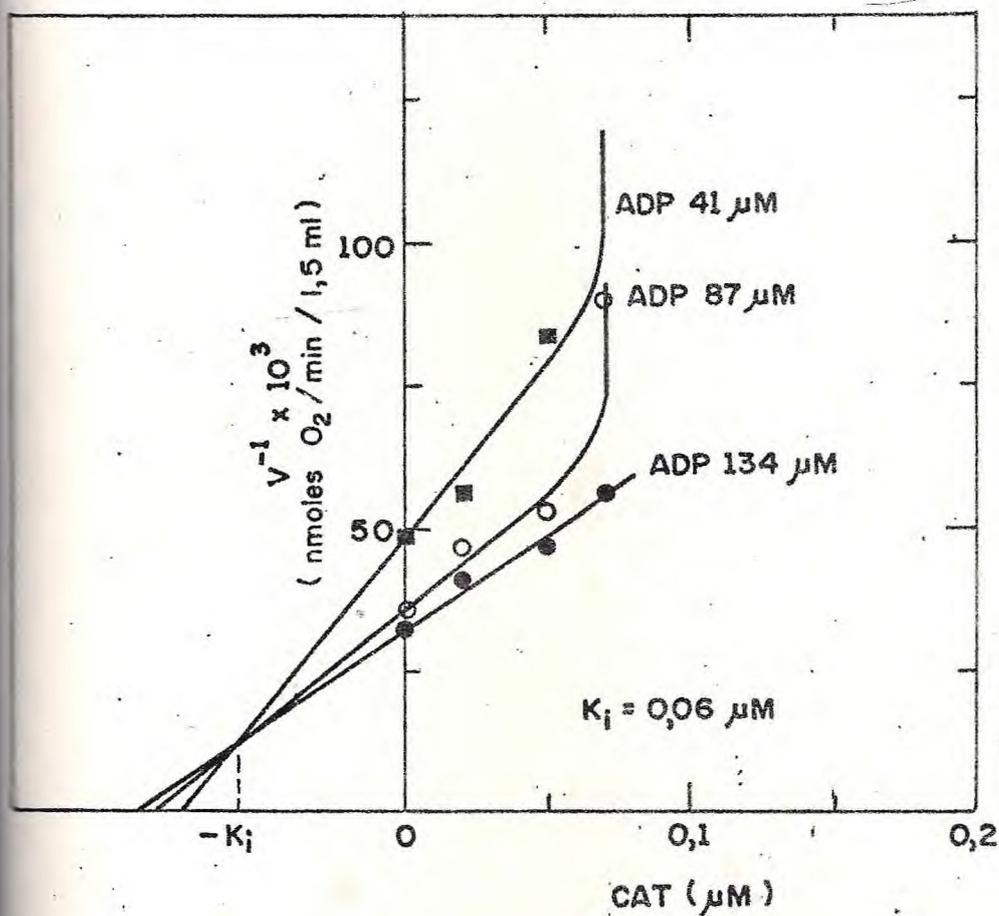


Fig. 22 - Gráfico de Dixon para determinação da constante de inibição ( $K_i$ ) do CAT. A concentração de proteína mitocondrial foi de 0,8 mg/1,5 ml. As condições de ensaio estão descritas na fig 20.

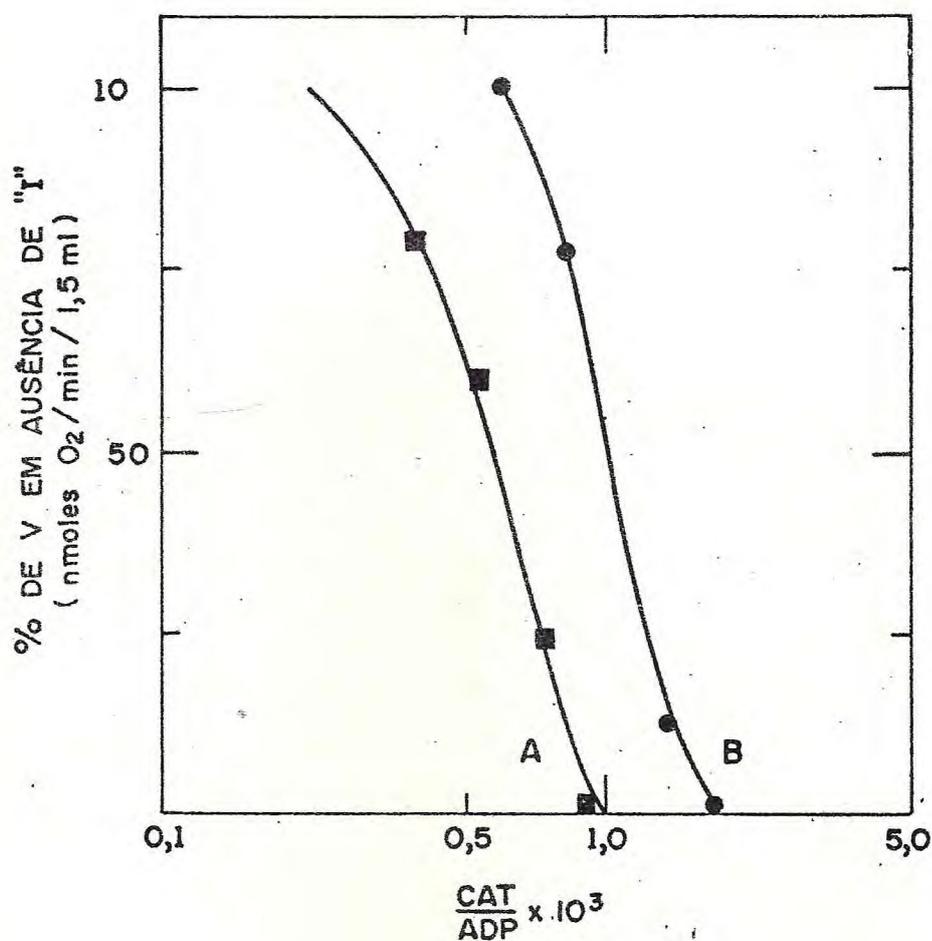


Fig. 23 - Efeito do CAT na velocidade de consumo de oxigênio. Os valores da velocidade de consumo de oxigênio foram calculados como está indicado na fig. 17. A relação CAT/ADP refere-se às concentrações de CAT: 0,05 μM, 0,07 μM, 0,1 μM, 0,12 μM e 0,15 μM e concentrações de ADP: 87 μM (●—●) e 134 μM (■—■). As condições experimentais são as mesmas da fig. 19.

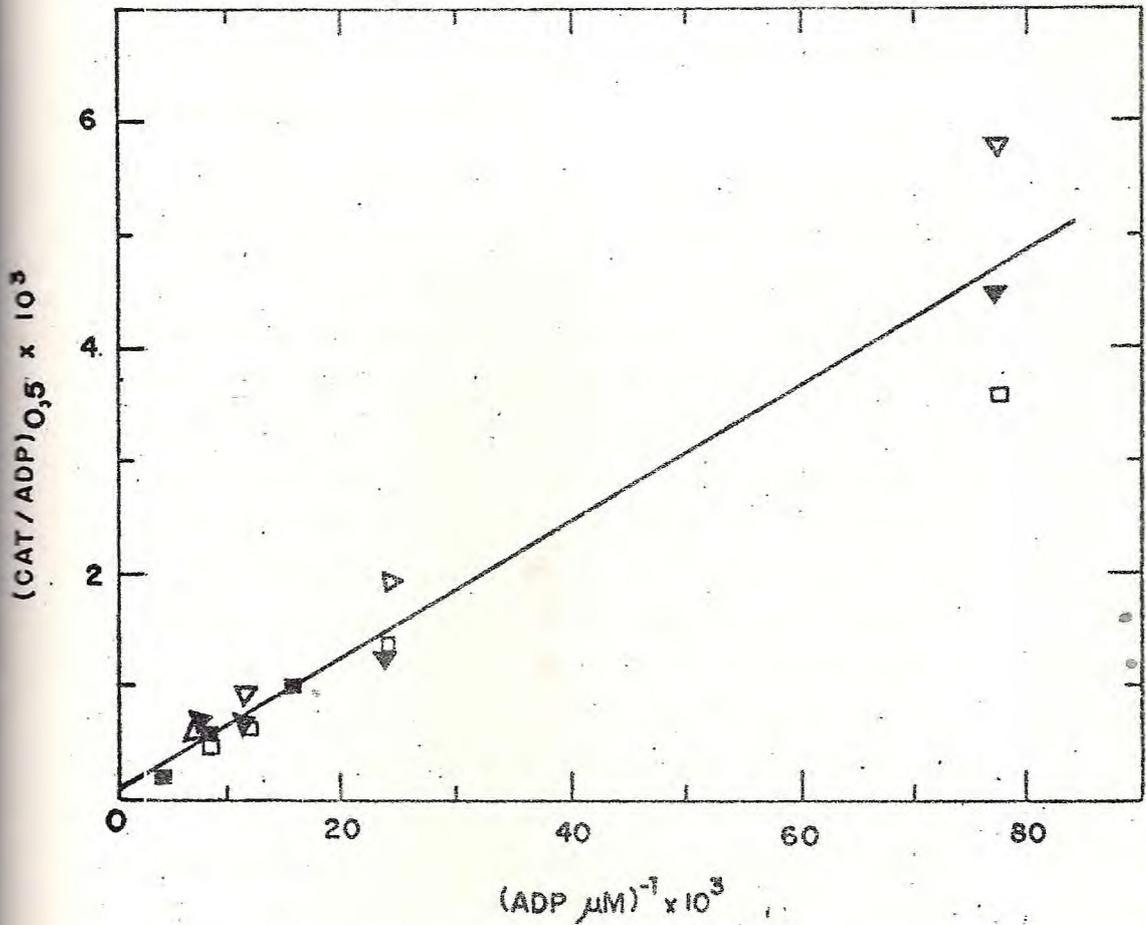


Fig. 24 - Variação do índice de 50% de inibição  $(CAT/ADP)_{0,5}$  em função dos inversos das concentrações de ADP.  $(CAT/ADP)_{0,5}$  foi calculado com as seguintes concentrações de CAT e ADP, respectivamente: 0,02  $\mu M$ , 0,05  $\mu M$ , 0,07  $\mu M$ , 0,10  $\mu M$ , 0,12  $\mu M$ , 0,15  $\mu M$ , 0,17  $\mu M$ , 0,20  $\mu M$  e 13  $\mu M$ , 41  $\mu M$ , 64  $\mu M$ , 87  $\mu M$ , 134  $\mu M$ , 274  $\mu M$ . Os símbolos representam a média de quatro diferentes experiências, com concentrações de proteína mitocondrial de 0,8 mg/1,5 ml. Condições experimentais descritas em material e métodos e na fig. 18 (A).

## DISCUSSÃO

### Técnica de isolamento da preparação mitocondrial de sorgo

A separação de mitocôndrias de tecidos vegetais tem-se apresentado, ao correr do tempo, mais difícil do que a separação da mesma fração em animais (20).

O método usado para isolar mitocôndrias, como está descrito no presente trabalho, mostrou-se válido na obtenção de uma preparação mitocondrial de sorgo funcionalmente íntegra e consequentemente bem acoplada. As condições de isolamento foram estabelecidas, tentativamente, de acordo com as técnicas usadas por Ikuma (46) em mitocôndrias de feijão e Sarkissian & Srivastava (44) em mitocôndrias de trigo. Sarkissian & Srivastava (44) concluíram que, para isolar mitocôndrias de trigo, sacarose no meio de homogeneização e manitol nos meios de lavagem e reação foram os melhores meios, apesar de comumente usar-se como meio osmótico, a sacarose (0,4 a 0,5 M) ou manitol (0,3 a 0,7 M) (39, 46). Tendo em conta a diversidade do material usado, no caso o sorgo, verificou-se que os meios de Sarkissian & Srivastava (44) eram os mais adequados, fazendo-se, contudo, modificações no que diz respeito a outras etapas envolvidas no processo de isolamento (vide material e métodos). Uma das peculiaridades deste material, é que o mesmo é bastante fibroso, dificultando a ruptura do tecido. Sendo esta uma etapa crítica para obtenção de uma preparação mitocondrial íntegra, observou-se que um contacto prévio das secções cortadas de epicótilos de sorgo com o meio de homogeneização facilitava a ruptura e a obtenção da fração mitocondrial melhor acoplada. Foi verificado, também, que a concentração do tampão no meio de homogeneização, tem um efeito marcante em relação à qualidade das mitocôndrias. Devido a presença de vacúolos nas células de plantas superio-

res, faz-se necessário ter um grande controle do pH, a partir do momento em que se provoca a ruptura das células, com conseqüente liberação do conteúdo ácido no interior do homogenato. Constatou-se que na preparação mitocondrial de sorgo, uma elevada concentração de tampão fosfato de potássio (0,067 M pH 7,2) no meio de homogeneização era necessária para preservar as atividades respiratórias e fosforilantes, a despeito do efeito prejudicial já conhecido em outras preparações, no que diz respeito à liberação de componentes respiratórios essenciais, como citocromo c e ruptura das membranas mitocondrias (53, 69). Uma concentração de tampão fosfato de potássio inferior (0,010 M pH 7,2) foi usada no meio de suspensão contendo manitol, concentração esta considerada não prejudicial ao isolamento das mitocôndrias (46). A escolha do uso deste tampão foi feita baseando-se não apenas nos meios utilizados por Sarkissian & Srivastava (44), mas também de acordo com os resultados apresentados por Stinson (69) e Ikuma (46). O meio de homogeneização continha, também, BSA, que tem sido usado, habitualmente, para estabilizar preparações mitocondriais de origem vegetal (44, 46, 74). Esta proteína funciona como agente protetor contra a ação deletéria de ácidos graxos e outros componentes liberados durante a disrupção celular ou durante a incubação das mitocôndrias (46). Stinson (69) sugere que a concentração de BSA de 0,1%, nos meios de homogeneização e lavagem, protege as mitocôndrias do efeito prejudicial, inclusive dos tampões. Diante destes dados, usou-se BSA em todos os meios envolvidos na preparação mitocondrial de sorgo, mesmo no meio de reação, de acordo com os meios usados por Sarkissian & Srivastava (44) (vide material e métodos). Com a finalidade de remover ions metálicos, capazes de promover injúrias à preparação mitocondrial durante o isolamento, EDTA foi adicionado no meio de homogeneização, sendo, porém, evitado no meio de suspensão (46). No que diz respeito ao esquema de centrifugação diferencial, as mitocôndrias de sorgo se apresentaram de maneira semelhante às de outros vegetais (44, 46).

### Influência da concentração de proteína mitocondrial na velocidade de consumo de oxigênio

Já foi observado que a influência da concentração de proteína mitocondrial no consumo de oxigênio em mitocôndrias de variadas origens é crítica. Abaixo de certas concentrações, diferente para as diversas origens, existe uma aparente perda de controle respiratório, não guardando uma relação de proporcionalidade. Experimentos feitos com mitocôndrias de couve-flor, cenoura e batata, mostraram que acima de uma determinada concentração mitocondrial, atinge-se um estado estacionário, onde o aumento desta concentração pouco interfere no consumo de oxigênio, na vigência dos estados 4 e 3 (70). A concentração de 0,8 mg/1,5 ml de proteína mitocondrial de sorgo foi escolhida como concentração crítica, vez que observamos que o consumo de oxigênio permanecia aproximadamente igual nos limites de 0,5 a 1,5 mg, na presença de succinato como substrato.

### Integridade funcional

Em face das dificuldades apresentadas pela metodologia de isolamento da fração mitocondrial de vegetais, no que tange a ruptura celular, controle de pH e acúmulo de compostos danosos (20, 27), é justificável encontrar-se valores dos parâmetros responsáveis pela avaliação de sua integridade (C.R. e relação ADP/O) inferiores aos das preparações mitocondriais animais, não sendo os mesmos indicativos de uma má qualidade da preparação (71). Em relação à utilização de diferentes substratos, sabe-se que pode variar entre mitocôndrias de diferentes fontes, dependendo não apenas do tipo da preparação, mas também da diversidade das técnicas de isolamento (39, 46, 72). De acordo com os resultados apresentados, verificamos que a preparação mitocondrial de sorgo oxidou, a diferentes velocidades, os substratos succinato (Fig. 1), NADH (Fig. 2 (A)) e L-malato (Fig. 2 (B)). Destes, o

succinato (Fig. 1) foi o único substrato capaz de apresentar até cinco ciclos de fosforilação (Fig. 7), verificando-se um aumento nos controles respiratórios, devido as diminuições de velocidade de consumo de oxigênio nos estados 4 subsequentes a segunda adição de ADP. Pode-se sugerir que esta diminuição seria devido a inibição da desidrogenase succínica pelo oxalacetato (55, 73) oriundo, em etapa posterior à oxidação do succinato, ou o fator limitante seria a diminuição da concentração de oxigênio na parte final da determinação polarográfica. A oxidação do succinato pela preparação mitocondrial de sorgo não apresentou uma resposta retardada após a primeira adição de ADP, fato constatado em mitocôndrias provenientes de diferentes plantas e tecidos (28, 55, 73). Wiskich & Bonner (73) atribuíram este período de latência, que precede o estímulo do consumo de oxigênio em presença de ADP, a quantidades inibitórias de oxalacetato, enquanto Verleur (74) atribuiu à qualidade das mitocôndrias. NADH (Fig. 2 (A)) e L-malato (Fig. 2 (B)), diferentemente do que ocorre com outras preparações mitocondrias vegetais, apresentaram um único ciclo de fosforilação (44, 54). Succinato (Fig. 1) e NADH (Fig. 2 (A)) mostraram as maiores velocidades no consumo de oxigênio, na vigência do estado 3, resultados concordantes com os obtidos com mitocôndrias de feijão (59). Os valores dos primeiros controles respiratórios, para os três referidos substratos, são comparáveis, apesar de mitocôndrias de outros vegetais apresentarem valores superiores, quando o substrato oxidável é o L-malato (54, 72). Verificamos que na oxidação do L-malato (Fig. 2 (B)) há uma diminuição da velocidade do consumo de oxigênio do segundo estado 4, quando comparada com as respectivas velocidades durante a oxidação de succinato (Fig. 1) e NADH (Fig. 2 (A)). Esta pode ser uma evidência da atuação, ainda mais forte, da inibição provocada pelo oxalacetato, o qual tem sido relatado acumular-se durante o estado 3 e inibido a atividade da malato desidrogenase (59). O oxalacetato resultante da oxidação do malato, também, possivelmente atuaria como

inibidor da malato desidrogenase, uma vez que a reação no sentido oxalacetato  $\rightarrow$  malato é termodinamicamente desfavorável ( $\Delta G' = +7,1$  Kcal/mol). Os valores das relações ADP/O para os três substratos foram compatíveis com os valores teóricos esperados. A figura 2 (A) mostra que o NADH adicionado a uma preparação mitocondrial de sorgo é oxidado, apresentando uma relação ADP/O de 2. Isto sugere que o sistema de desidrogenase do NADH exógeno está, provavelmente, localizado na face externa da membrana mitocondrial interna, associado a uma flavoproteína, ocorrendo um desvio na cadeia respiratória clássica ao nível do primeiro sítio de fosforilação de ATP (20, 56, 57, 58).

Os resultados da análise de avaliação da integridade bioquímica da preparação mitocondrial de sorgo, comparados aos de outras preparações vegetais, estão condizentes com os parâmetros considerados, a despeito das críticas imputadas ao isolamento das referidas frações (20, 26, 27).

#### Permeabilidade da membrana mitocondrial interna

##### Translocação de substratos

A acessibilidade dos substratos às enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, situadas na matriz mitocondrial, é dependente da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, através de seus transportadores, que funcionam como reguladores metabólicos. Os transportadores mitocondriais são proteínas especializadas ou grupos de proteínas, específicos da espécie e geneticamente determinados (4). Eles são mediadores da interação mitocôndria-citossol, sendo dependentes dos níveis energéticos e das concentrações efetivas de outros substratos, vez que a translocação envolve trocas intra e extramitocondriais simultâneas (75). Com a finalidade de obter informações a respeito destes transportadores nas mitocôndrias de sorgo, diferentes substratos foram usados como: succinato (Fig. 1), NADH (Fig. 2 (A)),

L-malato (Fig. 2 (B)), L-glutamato (Fig. 4 (A)),  $\alpha$ -cetogluturato (Fig. 4 (B)), fumarato (Fig. 5 (A)), oxalacetato (Fig. 5 (B)), piruvato (Fig. 6 (A)) e DL- $\beta$ -hidroxibutirato (Fig. 6 (B)). Dentre estes, succinato (Fig. 1), NADH (Fig. 2 (A)) e L-malato (Fig. 2 (B)) foram efetivamente oxidados. De acordo com os resultados apresentados, verificou-se que a afinidade do translocador de succinato é, pelo menos dez vezes maior, quando comparada à do L-malato. As constantes de afinidade para succinato, 0,5 mM (Fig. 10) e L-malato, 5 mM (Fig. 11), exibidas pela fração mitocondrial de sorgo, são comparáveis às de feijão 0,4 e 5 mM, respectivamente (54, 76). Apesar das mitocôndrias de diferentes vegetais oxidarem NADH e L-malato, tais substratos não são oxidados por mitocôndrias animais, o que constitui uma característica das mitocôndrias vegetais (20, 27, 28). Os demais substratos, L-glutamato (Fig. 4 (A)),  $\alpha$ -cetogluturato (Fig. 4 (B)), fumarato (Fig. 5 (A)), oxalacetato (Fig. 5 (B)), piruvato (Fig. 6 (A)) e DL- $\beta$ -hidroxibutirato (Fig. 6 (B)) não foram oxidados pelas mitocôndrias de sorgo. Dentre estes, com exceção do fumarato, os demais são utilizados com diferentes intensidades por mitocôndrias de animais (77, 78) e vegetais (40, 41, 59). L-glutamato e  $\alpha$ -cetogluturato, embora tenham sido oxidados pelas mitocôndrias de *Phaseolus aureus* (59), pela preparação mitocondrial de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. pitiúba, o  $\alpha$ -cetogluturato foi oxidado pobremente e o L-glutamato não o foi (41). Oxalacetato e piruvato, foram substratos oxidados por outras preparações mitocondriais vegetais, quando estavam presentes, no meio de reação, pequenas quantidades de outros substratos e cofatores (59, 76). Possivelmente, as diferenças, em relação a diversidade e intensidade de oxidação dos substratos por mitocôndrias animais e vegetais, e mais especificamente, nas mitocôndrias vegetais, pode ser atribuídas a diferenças na organização molecular destes translocadores situados ao nível da membrana mitocondrial interna. Contudo, o mecanismo básico que controla o transporte de substratos, nestas mitocôndrias, parece ser semelhante (26). Tendo em consideração que estes translocadores podem influen

ciar o metabolismo celular pela modulação da atividade de transporte dos mesmos, investigações nesta área de pesquisa, fundamentadas principalmente no uso de inibidores específicos destes transportadores, têm se desenvolvido nestes últimos anos (61, 77).

#### Translocação de nucleotídeos de adenina

Dos sistemas transportadores localizados na membrana mitocondrial interna, um de elevada importância, é o responsável pela translocação de nucleotídeos de adenina. Este carreador de ADP-ATP catalisa a troca assimétrica de uma molécula de ADP extramitocondrial por outra de ATP intramitocondrial, evidenciando a sua importância na economia celular (29, 31). As propriedades cinéticas do sistema transportador de ADP, em mitocôndrias de animal, têm sido estudadas intensamente e alguns aspectos do mecanismo de transporte têm sido revelados, através do uso de inibidores específicos, ATR, CAT e BKA (30, 31). Como o "pool" endógeno de nucleotídeos de adenina de mitocôndrias de plantas é muito pequeno, este material biológico constitui uma ótima escolha para estudar-se as propriedades ligantes e características cinéticas deste translocador (29, 30). Ao contrário do que ocorre com sistemas mitocondriais animais, é controverso o efeito dos inibidores da translocação, ATR e CAT, nos sistemas mitocondriais vegetais. Verificou-se respostas inibitórias com diferentes intensidades em preparações mitocondriais oriundas de diferentes plantas. Passam *et al.* (79) e Passam & Coleman (33), relataram que mitocôndrias de alcachofra de Jerusalem (*Helianthus tuberosus*) eram sensíveis ao BKA, sendo insensíveis ao ATR e CAT, em concentrações que normalmente inibiam a translocação em mitocôndrias de animais. Eles sugeriram que os translocadores de nucleotídeos de adenina, nas mitocôndrias de plantas, deveriam ter uma estrutura molecular diferente ou um fator antagônico ao ATR, como uma glicosidase associada a mitocôndria, a qual catalisaria uma hidrólise, separando a glicose da aglicona, atracteligenina,

que funcionaria como um inibidor menos potente que o ATR. Usando altas concentrações de ATR (50-100  $\mu\text{M}$ ), Jung & Hanson (34) mostraram inibição da translocação em mitocôndrias de couve-flor e milho, desde que estas mitocôndrias tivessem contacto prévio ("priming") com substratos oxidáveis. Mais recentemente, Earnshaw (37) verificou que a translocação de ADP em mitocôndrias de milho era também inibida por altas concentrações de ATR. Janovitz et al. (35) relataram que embora o translocador de ADP, em mitocôndrias de couve-flor, fosse insensível ao ATR, deveria ser controlado por uma unidade sensível a este glicósido. Vignais et al. (36) mostraram que baixas concentrações de ATR e CAT, 30  $\mu\text{M}$  e 0,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, eram suficientes para inibir, por completo, a translocação de 160  $\mu\text{M}$  de ADP em mitocôndrias de batata. Embora o ATR tenha se comportado como inibidor competitivo, apresentando um alto nível de sensibilidade, comparado ao encontrado em outras plantas, a concentração capaz de inibir a translocação de nucleotídeos de adenina foi ainda 30 vezes maior do que a encontrada para mitocôndrias animais (79). Em relação ao CAT, inibidor muito mais potente que o ATR, conhecido como inibidor não competitivo em sistemas animais (29), foi observado, inversamente, que ele agiu de maneira competitiva sobre a translocação de ADP em mitocôndrias de batata (36). Recentemente, Silva Lima et al. (38) mostraram que o ATR é um inibidor aparentemente competitivo da translocação de ADP em mitocôndrias isoladas de *Vigna sinensis*. Estas mitocôndrias não foram tão sensíveis ao ATR como as mitocôndrias de animal (33, 80). Entretanto, foram completamente inibidas por ATR 10,0  $\mu\text{M}$  em presença de ADP 220  $\mu\text{M}$ , sendo então as mais susceptíveis a ação do inibidor, mesmo quando comparadas as mitocôndrias de batata (36). Silva Lima & Denslow (resultados aceitos para publicação em Archives of Biochemistry and Biophysics) verificaram que o CAT comportou-se como inibidor aparentemente competitivo, sendo a respiração estimulada por ADP 200  $\mu\text{M}$  completamente inibida por CAT 0,3  $\mu\text{M}$ . No presente trabalho, verificamos que ATR 10,0  $\mu\text{M}$  era capaz de inibir totalmente o estímulo provocado por ADP 141  $\mu\text{M}$ ,

sendo a sensibilidade exibida pela fração mitocondrial de sorgo, relativa ao ATR, semelhante àquela pelas mitocôndrias de *Vigna sinensis* (38). Os gráficos de Lineweaver-Burk (Fig. 15) e Dixon (Fig. 16) demonstraram que o ATR pode competir com o ADP, o que é condizente com os resultados obtidos em sistemas mitocondriais animais (80, 81, 82). A quebra de linearidade da cinética, expressa nestes gráficos (Figs. 15 e 16), a altas concentrações de ATR e baixas de ADP, podem ser explicadas pelo mecanismo de reorientação do carreador de nucleotídeos de adenina, proposto por Klingenberg (31, 32). De acordo com esta teoria, os carreadores estão assimetricamente distribuídos na membrana mitocondrial interna, estando o maior número de sítios voltados para o citossol, quando em ausência de ADP. Ao ser adicionado ATR, sendo o mesmo um inibidor não penetrante, ele se fixa nos sítios carreadores situados na face externa da membrana, dando origem a um tipo de distribuição do translocador, variável com a concentração de inibidor presente no meio. Quando o ADP é adicionado, ele ativa estes sítios carreadores, individualizando, então, um tipo de distribuição dos translocadores que poderá ser simétrica, dependendo da concentração de ADP, por exposição de sítios que se encontravam voltados para a matriz mitocondrial. Portanto, pode-se considerar dois diferentes estados da membrana mitocondrial: um estado simétrico, com concentrações moderadas de ATR e ADP, mostrando uma cinética de saturação clássica, e um estado assimétrico, com altas concentrações de ATR e baixas concentrações de ADP. Nestas condições, verificou-se o aparecimento de efeitos cinéticos fora dos padrões clássicos e que foram denominados "odd effects". Uma evidência adicional, em relação ao tipo de inibição provocada pelo ATR, foi realizada segundo um outro método de análise (Fig. 17). Somente nas inibições competitivas, a porcentagem de inibição torna-se uma função da relação das concentrações de inibidor e substrato e não uma função da concentração absoluta do inibidor (4). Verificou-se o efeito inibitório do CAT na preparação mitocondrial de sorgo, constatando-se que 0,17  $\mu\text{M}$  inibia por completo a velocidade do

consumo de oxigênio estimulado por ADP 134  $\mu\text{M}$ . Por conseguinte, este é um inibidor muito mais potente que o ATR, sendo a preparação mitocondrial de sorgo, pelo menos, 30 vezes mais sensível em relação ao CAT, quando se compara às concentrações do CAT e ATR requeridas para inibir 50% da translocação. Como em mitocôndrias de batata (36) e *Vigna sinensis* (38), o CAT comportou-se como um inibidor competitivo, quando se usou concentrações de ADP maiores que 41  $\mu\text{M}$  e concentrações de CAT inferiores a 0,05  $\mu\text{M}$ , diferentemente do que ocorre com sistemas mitocondriais de animais (29, 31). Além das análises feitas com os gráficos de Lineweaver-Burk (Fig. 20) e Dixon (Fig. 22), usou-se, ainda, o índice de inibição (CAT/ADP), que variou com a concentração de ADP, diferentemente do que ocorreu com o ATR, cujo índice se manteve constante com concentrações variáveis de ADP (Fig. 23) (67). A expressão:  $(I/S)_{0,5} = K_i (1/S) + K_i/K_s$ , é válida para inibição competitiva, onde  $(I/S)_{0,5}$  depende não apenas de  $K_i/K_s$ , como também do inverso da concentração do substrato, o que não é verdade para o ATR. Apesar da semelhança da preparação mitocondrial de sorgo com os sistemas mitocondriais de feijão (*Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô) (38) e batata (36), verificamos que as mitocôndrias de sorgo apresentaram uma maior afinidade em relação ao CAT. A análise dos parâmetros cinéticos revelaram que o CAT é um inibidor que apresenta alta afinidade pelo translocador de ADP. Portanto, a análise cinética da inibição, baseada nas equações de Michaelis-Menten, é insuficiente, por não ser verdadeira a suposição de que a concentração de inibidor livre em solução seja igual à concentração de inibidor total (67, 68). Assim, deveria ser considerada uma cinética de mútua depleção. Entretanto, isto se tornou impossível devido à distribuição assimétrica do translocador na membrana, o que cria uma cinética do tipo cooperativo (67), com concentrações de CAT superiores a 0,05  $\mu\text{M}$ . A forma sigmoide da curva, mostrando o efeito da concentração do CAT, na porcentagem da velocidade de inibição do controle (Fig. 18 (A)), pode ser interpretada pela distribuição assimétrica dos translocadores de nucleotídeos

de adenina na membrana mitocondrial interna (32). A adição de um inibidor que se fixa nos sítios dos carreadores, localizados na face externa da membrana mitocondrial interna, aumenta mais ainda esta assimetria, um efeito possivelmente reforçado por se tratar de um inibidor de elevada afinidade. A forma mais aguda da curva sigmoide do CAT (Fig. 18 (A)), comparada com a do ATR (Fig. 18 (B)) em relação a porcentagem da velocidade de inibição em ausência de inibidor, é condizente com estas explicações.

Com base na diversidade dos dados obtidos do efeito dos inibidores da translocação de nucleotídeos de adenina, ATR e CAT, em sistemas mitocondriais vegetais, e a despeito das críticas motivadas pela variação das técnicas de isolamento (39, 46, 72), pesquisas devem ser desenvolvidas no sentido de esclarecer esta heterogeneidade entre frações mitocondriais vegetais de diferentes origens.

## CONCLUSÕES

(1) Uma técnica para isolamento da fração mitocondrial de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) foi padronizada, com base nos princípios gerais utilizados por Sarkissian & Srivastava (44), no isolamento de mitocôndrias de trigo, com as modificações cabíveis em face das peculiaridades deste material.

(2) A organização molecular da membrana mitocondrial interna apresentou aspectos particulares, no que tange a translocação de substratos oxidáveis. Assim, houve oxidação nítida de succinato, NADH, L-malato, e incapacidade de oxidação de  $\alpha$ -cetoglutarato, oxalacetato, piruvato, L-glutamato e DL- $\beta$ -hidroxibutirato, nas mesmas condições.

(3) A integridade bioquímica da preparação mitocondrial de sorgo foi avaliada através dos valores dos parâmetros de controle respiratório e relação ADP/O, que se mostraram comparáveis aos de outras preparações vegetais.

(4) A translocação de nucleotídeos de adenina, especificamente a translocação de ADP, foi estudada através do uso de inibidores específicos, atractilosídeo (ATR) e carboxiatractilosídeo (CAT). A susceptibilidade da translocação de ADP ao ATR ( $I_{50\%}$  ADP  $141 \mu\text{M} = 2 \mu\text{M}$ ) e ao CAT ( $I_{50\%}$  ADP  $134 \mu\text{M} = 0,08 \mu\text{M}$ ) mostrou-se elevada, com resultados comparáveis aos de feijão (38). A cinética de inibição do tipo competitiva em presença de ATR era esperada, sendo este um efeito já observado em mitocôndrias animais e, mais recentemente, em preparações de origem vegetal (36, 38). A cinética aparentemente competitiva em presença de CAT não é referida em mitocôndrias animais, já tendo sido, contudo, encontrada em algumas preparações, de origem vegetal (36, 38), agora confirmada com mitocôndrias de sorgo. A cinética da translocação de ADP é discutida, em face da ação dos dois referidos inibidores.

## BIBLIOGRAFIA

- ( 1 ) VIGNAIS, P.V., COLOMB, M.G., DUÉE, E.D. ET VIGNAIS, P.M. 1968. Rôle énergétique des mitochondries dans la cellule. - Bulletin d'Informations Scientifiques et Techniques du Commissariat à l'Energie Atomique, 123 : 31-46.
- ( 2 ) LEHNINGER, A.L. 1964. - In The Mitochondrion. Benjamin, New York. Citado em 3.
- ( 3 ) WHITTAKER, V.P. 1966. The ultrastructure of mitochondria. - In Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Vol.7 (TAGER, J.M., PAPA, S., QUAGLIARIELLO, E. AND SLATER, E.C. eds.), pp. 1-27, B.B.A. Library, Elsevier Publ., Amsterdam.
- ( 4 ) LEHNINGER, A.L. 1975. - Bioquímica - segunda edição, pp. 296, 304, 334, 351, 352, 360, 364, 369, Editora Edgar Blucher.
- ( 5 ) HALL, D.O. AND PALMER, J.M. 1969. Mitochondrial reaserch today. - Nature, 221 : 717-723.
- ( 6 ) PALADE, G.E. 1953. J. Histochem. Cytochem. 1,254. Citado em 7.
- ( 7 ) BONNER, W.D. Jr. 1965. Mitochondria and electron transport. - In Plant Biochemistry (BONNER, J. AND VARNER, J.E. eds.), pp. 89-123. Academic Press, New York.
- ( 8 ) MORAN, F.H. 1962. Circulation. 26,1939. Citado em 1.
- ( 9 ) GREEN, E.D. 1966. The mitochondrial electron - transfer system . - In Comprehensive Biochemistry, Vol. 14 (FLORKIN, M. AND STOTZ, E.H. eds.), pp. 309-326, Elsevier Publ., Amsterdam.
- (10) RACKER, E. 1967. Resolution and constitution of the inner mitochondrial membrane. - In Fed. Proc., Vol. 26, nº 5, pp. 1335-1340.

- (11) WIELAND, H. 1912. Ber. 45,484. Citado em 7.
- (12) WIELAND, H. 1913. Ber. 46,3327. Citado em 7.
- (13) THUNBERG, T. 1917. Skand. Arch. Physiol. 35,163. Citado em 7.
- (14) THUNBERG, T. 1917. Zentr. Physiol. 31,91. Citado em 7.
- (15) WARBURG, O. 1930. Bull. Johns. Hopkins Hosp. 46,341. Citado em 7.
- (16) WARBURG, O. AND CHRISTIAN, W. 1932. Biochem. Z. 254,438. Citado em 7.
- (17) KEILLIN, D. 1925. Proc. Roy. Soc. B98,312. Citado em 7.
- (18) CHANCE, B. AND WILLIAMS, G.R. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. - In Adv. Enzymol., Vol. 17 (NORD, F.F. ed.), pp. 65-130, Interscience Publ., New York.
- (19) HENRY, M.F. AND NYNS, E.J. 1975. Cianide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. Sub-Cell. Biochem., 4 : 1-65.
- (20) PALMER, J.M. 1976. The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. - Ann. Rev. Plant Physiol, 27 : 133-157.
- (21) LEHNINGER, A.L. 1971. Respiration and ATP formation in the mitochondria. - In Bioenergetics - The Molecular Basis of Biological Energy Transformations, second edition, pp. 73-98, Benjamin, W.A. Publ., Califórnia.
- (22) RACKER, E. 1976. - In A New Look at Mechanisms in Bioenergetics (RACKER, E. ed.), pp. 1-25, Academic Press, New York.

- (23) SLATER, E.C. 1966. Oxidative Phosphorylation. - In *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 14 (FLORKIN, M. AND STOTZ, E.H. eds.), pp. 327-387, Elsevier Publ., Amsterdam.
- (24) BOYER, P.D., CROSS, R.L. AND MOMSEN, W. 1973. A New Concept for Energy Coupling in Oxidative Phosphorylation Based on a Molecular Explanation of the Oxygen Exchange Reactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)*, 70 : 2837-3839. Citado em 4.
- (25) MITCHELL, P. 1977. A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane systems catalysing oxidative and photosynthetic phosphorylation. - *FEBS Lett.* 78 : 1-19.
- (26) PACKER, L., MURAKAMI, S. AND MEHARD, C. W. 1970. Ion transport in chloroplasts and plant mitochondria. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21 : 271-304.
- (27) IKUMA, H. 1972. Electron transport in plant respiration. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23 : 419-436.
- (28) BONNER, D.W.Jr. AND VOSS, D.O. 1961. Some characteristics of mitochondria extracted from higher plants. - *Nature*, 191 : 682-684.
- (29) VIGNAIS, P.V. 1976. Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. - *Biochim. Biophys. Acta* 456 : 1-38.
- (30) VIGNAIS, P.V., LAUQUIN, G.J.M. AND VIGNAIS, P.M. 1976. Kinetic and binding properties of the ADP/ATP carrier as a function of the environment. - In *Mitochondria: Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure* (PACKER, L. AND GOMEZ-PUYOU, A., eds.), pp. 109-125, Academic Press, New York.

- (31) KLINGENBERG, M. 1976. The adenine nucleotide transport of mitochondria. - *Ibid.* 127-149.
- (32) KLINGENBERG, M., RICCIO, P., AQUILA, H., BUCHANAN, B.B. AND GREBE, K. 1976. Mechanism of carrier transport and the ADP, ATP carrier. - In *The Structural Basis of Membrane Function* (HATEFI, Y. & DJAVADI-OHANIANCE, L., eds.), pp. 293-311, Academic Press, New York.
- (33) PASSAM, A.C. AND COLEMAN, J.O.D. 1975. The effects of atractyloside and bongkreikic acid on Jerusalem artichoke mitochondria in relation to adenine nucleotide translocation. - *J. Exp. Bot.* 26 : 536-543.
- (34) JUNG, D.W. AND HANSON, J.B. 1973. Atractyloside inhibition of adenine nucleotide transport in mitochondria from plants. - *Biochim. Biophys. Acta* 325 : 189-192.
- (35) JANOVIK, A., CHAVEZ, E. AND KLAPP, M. 1976. Adenine nucleotide translocation in cauliflower mitochondria. - *Arch. Biochem. Biophys.* 173 : 264-268.
- (36) VIGNAIS, P.V., DOUCE, R., LAUQUIN, G.J.M. AND VIGNAIS, P.M. 1976. Binding of radioactively labeled carboxyatractyloside, atractyloside and bongkreikic acid to the ADP translocator of potato mitochondria. - *Biochim. Biophys. Acta* 440 : 688-696.
- (37) EARNSHAW, M.J. 1977. Adenine nucleotide translocation in plant mitochondria. - *Phytochemistry*, 16 : 181-184.
- (38) SILVA LIMA, M., DENSLOW, N.D. AND FERNANDES de MELO, D. 1977. - Atractyloside inhibition of adenine nucleotide translocation in mitochondria from hypocotyls of *Vigna sinensis* cv. seridó. *Physiol. Plant.* 41 : 193-196.

- (39) KU, H.S., PRATT, H.K., SPURR, A.R. AND HARRIS, W. M. 1968. Isolation of active mitochondria from tomato fruit. *Plant. Physiol.* 43 : 883-887.
- (40) DAS, H.K. BANERJEE, A.K. AND ROY, S.C. 1962. Tricarboxylic acid-cycle activity in mitochondria from *Vigna sinensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 65 : 434-442.
- (41) ALMEIDA RAMOS, P.A. 1977. Atividade oxidativa e fosforilante de mitocôndrias de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L.) Savi). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brasil.
- (42) BOWMAN, E.J., IKUMA, H. AND STEIN, H.J. 1976. Citric acid cycle activity in mitochondria isolated from mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* 58 : 426-432.
- (43) BALTSCHIEFFSKY, H. AND BALTSCHIEFFSKY, M. 1974. Electron transport phosphorylation. *Ann. Rev. Biochim.* 43 : 871-897.
- (44) SARKISSIAN, I.V. AND SRIVASTAVA, H.K. 1968. On methods of isolation of active, tightly coupled mitochondria of wheat seedlings. *Plant Physiol.* 43 : 1406-1410.
- (45) SILVA LIMA, M., PINHEIRO, A.P. AND FERNANDES de MELO, D. 1974. Comparison between mitochondria isolated from seridó bean (*Vigna sinensis* cv. seridó) and rat-liver: substrate utilization and influence of rotenone and 2,4 dinitrophenol. *Rev. Brasil. Biol.*, 34 (3) : 303-308.
- (46) IKUMA, H. 1970. Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 45 : 773-781.
- (47) GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. AND DAVID, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. *J. Biol. Chem.* 177 : 651-766.

- (48) ESTABROOK, R.W. 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. - In *Methods in Enzymology*, Vol. X (ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E., eds.), pp. 41-47, Academic Press, New York.
- (49) HAGIARA, B. 1961. Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. - *Biochim. Biophys. Acta* 46 : 134-142.
- (50) KLINGENBERG, M. AND PFAFF, E. 1966. Structural and functional compartmentation in mitochondria. - In *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (TAGER, J.M., PAPA, S., QUAGLIARIELLO, G. & SLATER, E.C., eds.), Vol. 7, pp. 180-201, B.B.A. Library, Elsevier Publ., Amsterdam.
- (51) SILVA LIMA, M. ET VIGNAIS, P.V. 1968. Localisation et fonction de la GTP-AMP phosphotransférase dans les mitochondries de foie de rat. - *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50 : 1833-1848.
- (52) UMBRETT, W.W., BUNIS, R.H. AND STANFFER, J.F. 1959. Manometric techniques, pp. 5-6, Burgess. Publ., Co, Minn.
- (53) BONNER, W.D.Jr. 1967. A general method for the preparation of plant mitochondria. - In *Methods in Enzymology*, Vol. X (ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E., eds.), pp. 126-133, Academic Press, New York.
- (54) IKUMA, H. AND BONNER, W.D.Jr. 1967. Properties of higher plant mitochondria. I. Isolation and some characteristics of tightly-coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotyls. - *Plant Physiol.* 42 : 67-75.
- (55) DRURY, R.E., McCOLLUM, J.P. AND GARRISON, S.A. 1968. Properties of succinate oxidation in tomato fruit mitochondria. - *Ibid.* 43 : 248-254.

- (56) DAY, D.A. AND WISKICH, J.T. 1974. The oxidation of malate and exogenous reduced nicotinamide adenine dinucleotide by isolated plant mitochondria. - *Ibid.* 53 : 104-109.
- (57) DOUCE, R., MANNELA, C.A. AND BONNER, W.D.Jr. 1973. The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. - *Biochim. Biophys. Acta* 292 : 105-116.
- (58) KOEPPE, D.E. AND MILLER, R.J. 1972. Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by isolated corn mitochondria. - *Plant Physiol.* 49 : 353-357.
- (59) BOWMAN, E.J., IKUMA, H. AND STEIN, H.J. 1976. Citric acid cycle activity in mitochondria isolated from mung bean hypocotyls. - *Plant Physiol.* 58 : 426-432.
- (60) DAY, D.A. AND WISKICH, J.T. 1977. Glutamate transport by plant mitochondria. - *Plant Sci. Lett.*, 9 : 33-36.
- (61) WISKICH, J.T. 1977. Mitochondrial metabolite transport. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28 : 45-69.
- (62) DAY, D.A. AND HANSON, J.B. 1977. Pyruvate and malate transport and oxidation in corn mitochondria. - *Plant Physiol.* 59 : 630-635.
- (63) CHANCE, B. AND WILLIAMS, G.R. 1955. Simple and rapide assay of oxidative phosphorylation. - *Nature*, 175 : 1120-1121.
- (64) CHAPPEL, J.B. AND HAARHOFF, K.N. 1967. The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations.- In *Biochemistry of Mitochondria* (SLATER, E.C., KANIUGA, A. & WOJTCZAK, L., eds.), pp. 75-91, Academic Press, New York.

- (65) CHANCE, B. AND HAGIARA, B. 1963. Direct spectroscopic measurements of interaction of components of the respiratory chain with ATP, ADP, phosphate and uncoupling agents. - In Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry (SLATER, E.C., ed.), 1 : 1-32, Pergamon Press, New York.
- (66) DIXON, M. AND WEBB, E.C. 1964. Enzyme inhibitors. - In Enzymes, pp. 315-359. Longmans, Green and Co. Ltd.
- (67) WEBB, J.L. 1963. - In Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol. 1, pp. 62, 77, 105, 106, 185, Academic Press, New York.
- (68) HENDERSON, P.J.F. 1972. A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem. J.* 127 : 321-333.
- (69) STINSON, R.A. AND SPENCER, M. 1968. An evaluation of the effects of five buffers on respiratory parameters of isolated mitochondria. - *Can. J. Biochem.* 46 : 43-50.
- (70) RAISON, J.K. AND LYONS, J.M. 1970. The influence of mitochondrial concentration and storage on the respiratory control of isolated plant mitochondria. - *Plant Physiol.* 45 : 382-385.
- (71) BAKER, J.E., ELFVIN, L.G., BIALE, J.B. AND HONDA, S.I. 1968. - Studies on ultrastructure and purification of isolated plant mitochondria. - *Ibid.* 43 : 2001-2022.
- (72) POMEROY, M.K. 1974. Studies on the respiratory properties of mitochondria isolated from developing winter wheat seedlings. - *Ibid.* 53 : 653-657.
- (73) WISKICH, J.T. AND BONNER, W.D.Jr. 1963. Preparation and properties of sweet potato mitochondria. - *Ibid.* 38 : 594-604.

- (74) VERLEUR, J.D. 1965. Studies on the isolation of mitochondria from potato tuber tissue. - *Ibid.* 40 : 1003-1007.
- (75) WILLIAMSON, J.R. 1976. Mitochondrial metabolism and cell regulation. - In *Mitochondria: Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure* (PACKER, L. & GOMEZ-PUYOU, A., eds.), pp. 79-107, Academic Press, New York.
- (76) BOWMAN, E.J. AND IKUMA, H. 1976. Regulation of malate oxidation in isolated mung bean mitochondria. I- Effects of oxaloacetate, pyruvate, and thiamine pyrophosphate. - *Plant Physiol.* 58 : 433-437.
- (77) MEIJER, A.J. AND DAM, K.U. 1974. The metabolic significance of anion transport in mitochondria. - *Biochim. Biophys. Acta* 346 : 213-244.
- (78) TISCHLER, M.E., PACHENCE, J., WILLIAMSON, J.R. AND La NOVE, K.F. 1976. Mechanism of glutamate-aspartate translocation across the mitochondrial inner membrane. - *Arch. Biochem. Biophys.* 173 : 448-462.
- (79) PASSAM, A.C., SOUVERIJN, J.H.M. AND KEMP, A.Jr. 1973. Adenine nucleotide translocation in Jerusalem artichoke mitochondria. - *Biochim. Biophys. Acta* 305 : 88-94.
- (80) VIGNAIS, P.V., DUÉE, E.D., VIGNAIS, P.M. AND HUET, J. 1966. - Effects of atractyligenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and on the translocation of adenine nucleotides in mitochondria. - *Biochim. Biophys. Acta* 118 : 465-483.

- (81) VIGNAIS, P.M. AND DEFAYE. 1973. Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carboxyatractyloside (Gummiferin). - Biochemistry 12 : 1508-1519.
- (82) LUCIANI, S. AND VAROTTO, R. 1975. Difference between atractyloside and carboxyatractyloside on the binding to the mitochondrial membrane. - FEBS Lett. 56 : 194-197.

## PUBLICAÇÕES

### Comunicações

73-H 9

Influência do meio de extração sobre a capacidade funcional de mitocôndrias da *Vigna sinensis* cv. seridó.

LIMA, M. S.,  
PINHEIRO, P. A. e  
MELO, D. F. de

Mitocôndrias isoladas de hipocótilos estiolados de *Vigna sinensis* cv seridó apresentaram variação de sua capacidade funcional, i. é, alterações nos níveis da relação ADP/O e na capacidade de estímulo do estado de oxidação, pelo 2,4 dinitrofenol, na dependência do meio de extração das referidas mitocôndrias. Para a obtenção da fração mitocondrial, as sementes de *Vigna sinensis* cv. seridó eram colocadas a germinar no escuro, em vermiculite úmida, durante 6 ou 7 dias. Os hipocótilos eram homogeneizados em geral, na proporção de 1:1 com o meio de extração. As velocidades de centrifugação obedeceram ao esquema de Ikuma e Bonner (Ikuma, H. e Bonner, W. D. Jr.: *Plant Physiol.*, 42: 67, 1967). O isolamento era feito em câmara fria a uma temperatura de  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ .

Utilizando-se como meio de extração, sacarose, 0,27M, EDTA 1mM a pH 7.4 com Tris-HCl 20 mM, os valores da relação ADP/O evidenciaram-se mais baixos do que os esperados, bem como, o estímulo do estado 4 de oxidação pelo 2,4 dinitrofenol 117mM foi fraco e por vezes inexistente. Usando-se porém, um meio de extração composto de manitol 0.3M, cisteína 1%, BSA 0.1% EDTA 1mM a pH 7,4 com Tris-HCl 20mM, os valores da relação ADP/O aproximaram-se dos valores teóricos, bem como o estímulo do estado 4 de oxidação pelo 2,4 dinitrofenol, se fez evidenciar.

Os resultados apresentados, permitem sugerir a existência de uma correlação entre o meio de extração e a conservação da estrutura mitocondrial. Igualmente, uma correlação é sugerida entre o teor de íons  $\text{K}^+$  e a capacidade funcional da mitocôndria.

*Dep. Bioquím. e Biol. Molecular, Centro de Ciênc., UFCE*

*UFCE, CNPq*

Ci. cult. 26, 400 73-H9. (1974)

73-4:1.9 • Inibição por atractilosídeo da translocação de nucleotídios da adenina em mitocôndrias de plantas

M. S. LIMA e D. F. DE MELO

A presença de um translocador específico para o transporte de nucleotídios da adenina através da membrana mitocondrial de mamíferos tem sido largamente confirmada pelo uso de um glicosídeo, o atractilosídeo, isolado da *Atractilis gummifera*. Em mitocôndrias de plantas, a inibição da translocação tem se revelado somente em concentrações mais elevadas do que as habitualmente usadas em mitocôndrias de rato ( $1 \mu\text{M}$ ), como é o caso da alcachofra ( $30 \mu\text{M}$ ), milho e couve-flor ( $50 \mu\text{M}$ ). O presente trabalho, mostra o efeito inibidor do atractilosídeo em diferentes concentrações, adicionado antes e depois de ADP  $250 \mu\text{M}$ , através da determinação do consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de *Vigna sinensis* cv. seridó e de *Sorghum bicolor* L. Moench. As mitocôndrias de feijão foram isoladas segundo Ikuma, H. *Plant Physiol.* 43: 773-781, 1970, e as de sorgo, segundo técnica usada por Sarkissian, I. V. and Srivastava, H. K. *Plant Physiol.* 43: 1406-1410, 1969, para isolar mitocôndrias de trigo. O consumo de oxigênio foi determinado em oxígrafo GME com eletrodo de Clark. Os resultados mostraram que o atractilosídeo na concentração de  $1 \mu\text{M}$ , em mitocôndrias de sorgo e feijão inibiu o estímulo provocado por ADP  $250 \mu\text{M}$  (estado 3) ao ser adicionado ainda na vigência do referido estímulo. Inversamente, inibiu o estímulo do consumo de oxigênio por ADP  $250 \mu\text{M}$  (estado 3) ao ser adicionado previamente, isto é, na vigência do estado 4. Em concentrações de atractilosídeo da ordem de  $0.25 \mu\text{M}$ , a taxa de inibição do consumo de oxigênio foi porém inferior, quando o atractilosídeo foi adicionado sem a presença prévia de ADP, isto é, na vigência do estado 4. Em conclusão, os resultados apresentados não permitem a aceitação isolada da hipótese de diferente estrutura molecular do translocador ou da exigência exclusiva de um "priming" de ADP, porém abrem caminho para aproximar o translocador de nucleotídios da adenina de sorgo e feijão do de mamíferos. Resta explorar a existência de 2 sítios de afinidade para o atractilosídeo, como é proposto para mitocôndrias de fígado de rato, por Vignais, P. V., Vignais, P. M. and Colomb, M. *FEBS Letters*, 8: 328-332, 1970.

UFCA

CAPEL, OEA, CNPQ

Ci. cult. 28(7), 467 (1976)

INIBIÇÃO POR ATRACTILOSÍDEO DA TRANSLOCAÇÃO DE ADP EM MITOCÔNDRIAS DE Vigna sinensis cv. seridó

M. SILVA LIMA, N.D. DENSLOW e D. FERNANDES de MELO  
 Depto de Bioquímica e Biologia Molecular - Univ. Fed. do Ceará

O atractilosídeo (ATR) é um inibidor competitivo e não permeante da translocação de nucleotídeos da adenina ao nível da membrana mitocondrial interna. Embora sua ação seja bem conhecida em mitocôndrias de mamíferos, em mitocôndrias de plantas tem se mostrado controversa. Assim, o transporte de ADP em mitocôndrias de alcachofra é insensível ao ATR e em mitocôndrias de batata, o mesmo transporte só é inibido em concentrações 30 vezes maiores do que as usadas em preparações mitocondriais de mamíferos.

As mitocôndrias de feijão (Vigna sinensis cv. seridó) foram isoladas de hipocótilos de sementes germinadas (Ikuma, H. (1970) Plant Physiol. 45, 773-781) e o transporte de ADP bem como sua inibição foram estudados através da respiração estimulada por ADP, medida polarograficamente com eletrodo de Clark.

O transporte de ADP em mitocôndrias de feijão foi estudado através da determinação do Km para ADP cujo valor foi de 25 $\mu$ M, descontada a concentração de ADP, retirada do meio por ação da adenilato quinase.

ATR em concentrações de 10 $\mu$ M inibiu completamente a respiração estimulada por ADP (estado 3 menos estado 4).

A análise gráfica (Lineweaver-Burke e Dixon) dos parâmetros cinéticos da inibição da translocação de ADP por ATR revelou ser esta do tipo competitivo, sendo determinado um valor para Ki de ATR igual a 0.4 $\mu$ M.

As mitocôndrias de feijão mostraram ter um transporte de ADP semelhante ao de mamíferos, pelo valor do Km de ADP (25 $\mu$ M) semelhante nas duas preparações, mesmo sabendo que o "pool" de ADP endógeno de mitocôndrias vegetais é inferior ao de mitocôndrias de mamíferos. As mitocôndrias de feijão ainda, mostraram ter o mesmo tipo de inibição competitiva que as de mamíferos, embora em presença de concentrações mais elevadas de ATR. Isto justifica um maior estudo do mecanismo da translocação de nucleotídeos da adenina em mitocôndrias isoladas de diferentes vegetais, por ser a translocação etapa crítica do processo de fosforilação oxidativa.

U.F.Ce., CNPq e CAPES

Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBq) - VI Reunião Anual.

72-D.26 • Atividade adenilatoquinásica  
(S'-ATP: S'-AMP fosforotransferase,  
em mitocôndrias vegetais

MARIA DA GUIA S. LIMA, DIRCE FERNANDES DE  
MELO e NANCY DERRICK DENSILOW

A atividade adenilatoquinásica em sistemas animais vem sendo relacionada com a fosforilação oxidativa, com os efeitos Pasteur e Crabtree, sugerindo sua participação na regulação do metabolismo energético. O presente trabalho evidencia a existência da atividade adenilatoquinásica em mitocôndrias isoladas de feijão de corda (*Vigna sinensis* cv. seridó) e de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e tenta estabelecer, de modo preliminar, uma relação entre translocação de ADP e atividade adenilatoquinásica. As mitocôndrias de feijão foram isoladas segundo Ikuma, H. *Plant Physiol.* 45: 773-781 (1970) e as de sorgo segundo Sarkisian, I.V. et al. *Plant Physiol.* 43: 1406-1410 (1968). O consumo de oxigênio, controle respiratório e relação ADP: O foram determinados em oxígrafo dotado de eletrodo de Clark. A atividade adenilatoquinásica foi determinada medindo-se a formação de ATP através do sistema hexoquinase/glicose 6 fosfatodesidrogenase. A atividade específica da adenilatoquinase em mitocôndrias de sorgo e de feijão mostrou valores idênticos, isto é, de 500 nanomoles de ADP transformados em ATP/mg de prot./min. Quanto ao Km da adenilatoquinase para ADP, em ambas as preparações mitocondriais, o valor foi de 600  $\mu$ M. Já em mitocôndrias de feijão, o Km de ADP para o translocador mitocondrial específico foi de 25  $\mu$ M e de 33  $\mu$ M para o sorgo. Tais resultados indicam uma afinidade da adenilatoquinase por ADP, pelo menos 20 vezes menor do que a do translocador nos dois sistemas mitocondriais vegetais. Assim, a contribuição da atividade adenilatoquinásica na regulação do metabolismo energético, através do controle dos níveis de nucleotídeos de adenina parece ser subsidiária da ação do translocador. Resta esclarecer o grau efetivo de participação de cada sistema e como ambos se relacionam no exercício do controle energético.

Dep. de Bioquímica - Univ. Federal do Ceará  
CAPES, CNPq

Sociedade Brasileira para o Progresso  
da Ciência (SBPC) - XXIX Reunião Anual

COMPARISON BETWEEN MITOCHONDRIA ISOLATED  
FROM SERIDÓ BEAN (*Vigna sinensis* cv. seridó) AND RAT-LIVER:  
SUBSTRATE UTILIZATION AND INFLUENCE OF ROTENONE  
AND 2,4 DINITROPHENOL

SILVA LIMA, M., PINHEIRO, P.A., &amp; FERNANDES DE MELO, D. \*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal do Ceará,  
Fortaleza, Ceará, Brazil.

Comparison between properties of plant and animal mitochondria have been the subject of many studies<sup>1,2,3</sup>. Although questions have been raised about similarities which have been found, studies on respiratory activities in plant mitochondria indicate that they are different from animal mitochondria<sup>4</sup>. The purpose of this study was to examine the oxidative properties of mitochondria isolated from seridó bean hypocotyls (*Vigna sinensis* cv. seridó), with different substrates, by comparison with mitochondria isolated from rat-liver in similar conditions.

The influence of rotenone and 2,4 DNP<sup>2</sup> was also studied in order to emphasize the differences between animal and plant mitochondria.

*Acknowledgments* — The authors wish to thank colleagues of the Department of Biochemistry and Molecular Biology for valuable suggestions and Dr. Ralph L. Price (University of Arizona) for helpful revision of the manuscript.

Received for publication April 15, 1974.

\* A holder of a scholarship from the National Research Council (CNPq) of Brazil.

<sup>2</sup> Abbreviations: 2,4 DNP: 2,4 dinitrophenol; R. C.: respiratory control and TCA: trichloroacetic acid.

## MATERIAL AND METHODS

**SEED MATERIAL:** Seridó bean (*Vigna sinensis* cv. seridó) seeds were obtained from the Seed Bank of the Escola de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Ceará-Brazil (1971 and 1972 crops). The dry seeds were stored in sealed bottles at 10.° until they were used.

**GERMINATING CONDITIONS:** Seeds were soaked in 0.5% NaOCl for 5 minutes and then in distilled water for 10 minutes more. The soaked seeds were germinated and grown in moist vermiculite in the dark.

**PREPARATION OF MITOCHONDRIA:** Hypocotyls of 6 and 7 days old seedlings were separated from roots and cotyledons by means of scissors. They were washed twice with cold distilled water and once with grinding medium which consisted of 0.25 M sucrose, 1mM EDTA and 0.2mM Tris-HCl to adjust pH to about 7.5. Hypocotyls were cut into sections of about 1 cm and placed with grinding medium (volume 1:1) in a cold porcelain mortar. No more than 50g were homogenized by hand for 45 sec. each time, and the brei was squeezed through a nylon cloth. During these steps the pH of

the homogenate was maintained at about 7.5 by dropwise addition of 6N KOH. All operations were carried out between  $+ 2.0$  and  $+ 4.0$ . After filtration, the homogenate was centrifuged according to the centrifuging speed pattern of Ikuma and Bonner<sup>1</sup>. The mitochondrial pellet was resuspended in a medium consisting of 0.25M sucrose and 0.2mM Tris-HCl at a pH of 7.5. Rat-liver mitochondria were prepared according the Hogeboom and Schneider method<sup>5</sup>.

**PROTEIN DETERMINATION:** Oxygen uptake was measured polarographically in a GME oxygraph with a Clark oxygen electrode<sup>7</sup>.

Respiratory rates were calculated from a recorder trace on the basis of 356  $\eta$ moles  $O_2$  in aerated medium. All measurements were carried out at  $26.0 \pm 1.0$ . Oxygen consumption was expressed as  $\eta$ moles  $O_2/1.4$ ml of reaction medium. The reaction medium consisted of 110mM KCl, 16mM potassium phosphate buffer in a pH of 7.4 and 6mM  $MgCl_2$ . The substrate was added to the reaction medium before the addition of the mitochondrial preparation after which the measurement of oxygen uptake was initiated immediately. Unless otherwise stated, this sequence was always followed.

**RESPIRATORY CONTROL (R. C.) AND ADP/O RATIOS:** R. C. values were calculated in accordance with the definition of Chance and Williams<sup>8</sup>, i. e. the ratio of respiration rates in state 3 (phosphate, oxygen, substrate and ADP in excess) to state 4 (ADP limiting). ADP/O ratios were determined from the amount of oxygen utilized during state 3, responding to a known amount of ADP.

**ATPASE ACTIVITY:** The reaction medium consisted of 75mM KCl, 2mM ATP and 20mM Tris-HCl at a pH 7.5 in a final volume of 2.0 ml. The reaction was started by addition of mitochondria in a temperature of  $30^\circ$  and for 15 min. It was stopped with 0.2 ml 30% TCA. Protein was removed

by centrifugation, and Pi was calculated from the difference between the Pi content of a sample and its zero time control.

**CHEMICALS:** Rotenone, ATP, ADP and NADH were purchased from Sigma Chemical Company. Concentrations of ATP and ADP were determined optically at 260 m $\mu$  with an extinction coefficient of 6.22. All other chemicals were of analytical grade.

## RESULTS

**OXIDATIVE SEQUENCES:** Polarographic traces showing oxygen utilization by seridó bean mitochondria, with succinate, malate and NADH are illustrated in Fig. 1. With a limited amount of ADP, a transition between a state 4 to 3 was obtained. This sequence was repeated with succinate and

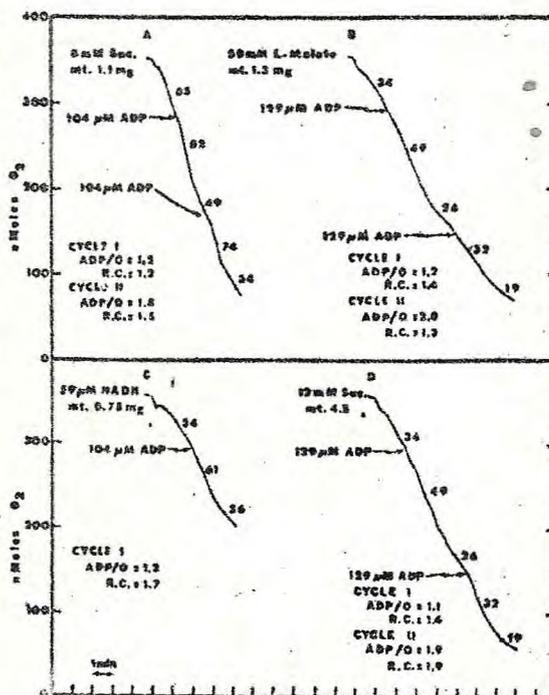


Fig. 1: Substrate utilization by seridó bean and rat-liver mitochondria: (A) 6mM succinate, (B) 59mM L-malate and (C) 59 $\mu$ M NADH oxidation by seridó bean mitochondria. (D) 12mM succinate oxidation by rat-liver mitochondria. Numbers along the traces indicate the rates of oxygen uptake calculated in  $\eta$ moles  $O_2/\text{min}/1.4$ ml,

malate as substrates. With both substrates the first states 4 and 3 were faster than subsequent states 4 and 3 (Fig. 1, B and C). When malate was used oxidative rates of states 4 and 3 were slower than that with succinate (Fig. 1, B). A similar oxidative pattern of states 4 and 3 was shown with rat-liver mitochondria submitted to an identical assay procedure (Fig. 1, D).

**RESPIRATORY CONTROL AND ADP/O RATIOS:** Respiratory control was examined in Fig. 1 with malate, NADH and succinate as substrates. Respiratory control was maintained with all of these substrates with slight variation from the first to the second oxidative cycle. The ADP/O ratios were nearer the theoretical expected values in the 2nd. oxidative cycles, even with rat-liver mitochondria (Fig. 1, D).

**ROTENONE INHIBITORY EFFECT:** Addition of rotenone showed a weaker inhibition of oxidation in the case of bean mitochondria than that exhibited by rat-liver mitochondria (Fig. 2).

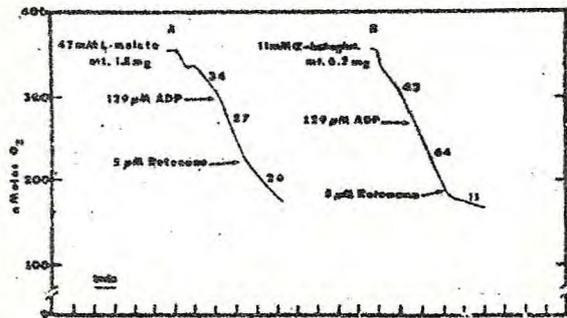


Fig. 2: Effect of rotenone upon oxygen uptake on (A) serido bean mitochondria and (B) rat-liver mitochondria. Numbers along the traces indicate the rates of O<sub>2</sub> uptake in nmoles O<sub>2</sub>/min/1.4ml. Rotenone inhibits 55% oxidation in serido bean mitochondria and 83% in rat-liver mitochondria.

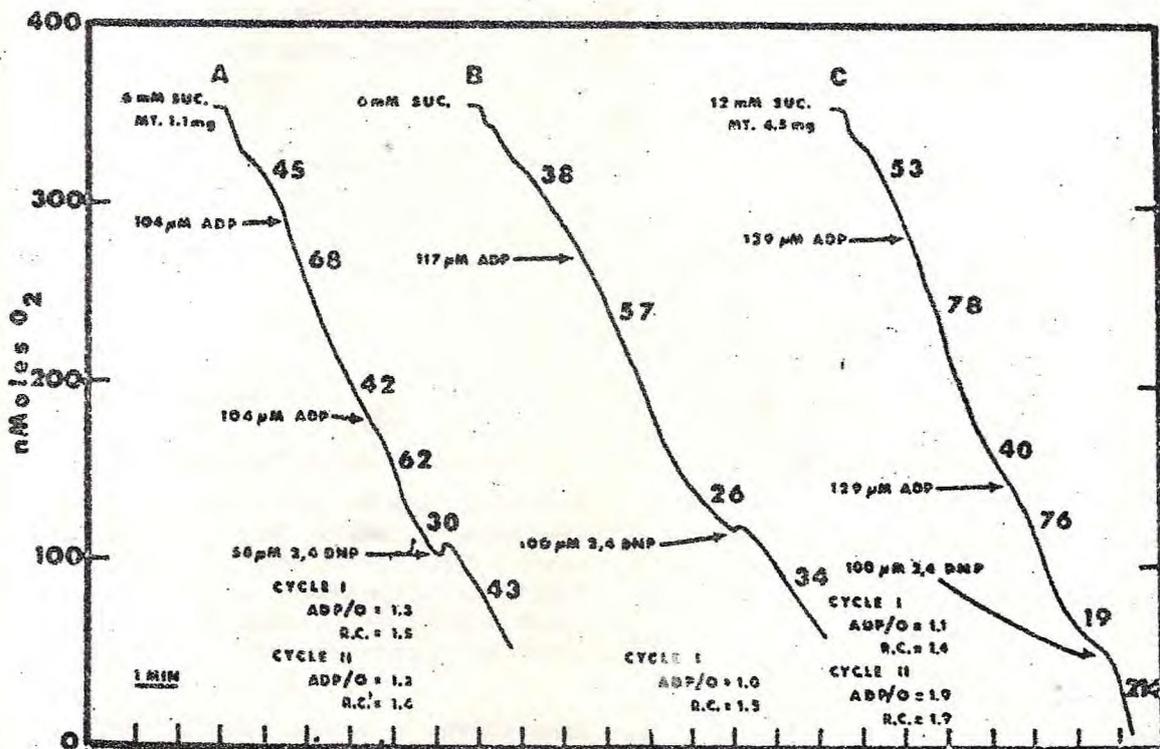


Fig. 3: Effect of 2,4 DNP on state 4 oxidation of serido bean and rat-liver mitochondria. Trace (A) shows a state 4 oxidation stimulation of 43% by 58 μM 2,4 DNP and trace (B) shows a 30% stimulation by 100 μM 2,4 DNP both in serido bean mitochondria. Trace (C) shows an uncoupling effect of electron transport by 100 μM 2,4 DNP in rat-liver mitochondria. Rates of oxygen utilization is measured in μmoles O<sub>2</sub>/min/1.4ml.

Although mitochondrial concentration was greater than with seridó bean mitochondria, the inhibitory effect was stronger in the former preparation: 83% (Fig. 2, B) than in the latter: 55% (Fig. 2, A)

**INFLUENCE OF 2,4 DNP:** Fig. 3 shows the effect of 2,4 DNP on state 4 of mitochondrial respiration. During state 4, 58 $\mu$ M 2,4 DNP weakly increased the electron transport (Fig. 3, A). With 100 $\mu$ M 2,4 DNP, the respiratory stimulation in relation to the previous state 4, was still weaker (Fig. 3, B) than with 58 $\mu$ M 2,4 DNP. A different pattern is shown with rat-liver mitochondria submitted to an comparable isolation procedure (Fig. 3, C).

Preservation of ADP requirement in presence of 100 $\mu$ M 2,4 DNP is shown on Fig. 4. Seridó bean mitochondria maintained the same ADP/O and R. C. ratios before (Fig. 4, A) and after 100 $\mu$ M 2,4 DNP addition (Fig. 4, B).

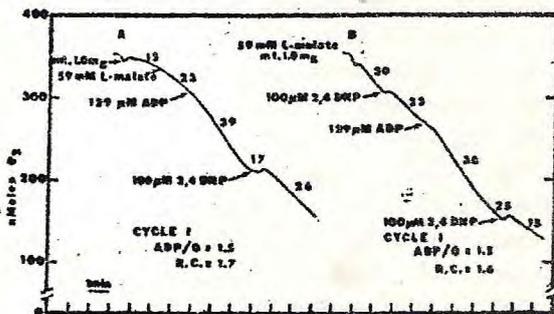


Fig. 4: Preservation of ADP requirement after 100 $\mu$ M 2,4 DNP addition on seridó bean mitochondria. The same ADP/O and R.C. ratios are maintained: (A) without addition of 2,4 DNP and (B) after addition of 2,4 DNP. Rates of oxygen utilization are measured in  $\eta$ moles  $O_2$ /min/1.4ml.

The ATPase activity of seridó bean mitochondria is presented in Table 1. Only mitochondrial preparations that maintained ADP/O and R. C. ratios within the rates presented in Fig. 1 had the ATPase activity verified.

TABLE 1

Effect of 2,4 DNP and  $MgCl_2$  on the ATPase activity of seridó bean mitochondria

| Addition                           | Activity<br>$\eta$ moles<br>Pi/mg/min |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| None                               | 19                                    |
| 100 $\mu$ M 2,4 DNP                | 21                                    |
| 6mM $MgCl_2$                       | 109                                   |
| 100 $\mu$ M 2,4 DNP + 6mM $MgCl_2$ | 99                                    |

NOTE: Reaction medium consisted of 2mM ATP, 75mM KCl and Tris-HCl at a pH of 7.5, in a final volume of 2.6ml. Reaction was started with mitochondrial sample and stopped with 0.3ml of 30% TCA after 15 min incubation at 30°. ATPase activity represents the difference between Pi release by a sample and its zero time.

The endogenous activity was slow and was not induced by 100 $\mu$ M 2,4 DNP. ATPase activity was induced by  $MgCl_2$  but the addition of 100 $\mu$ M 2,4 DNP did not cause an increased activity as expected, but actually caused a slight inhibition of ATPase activity.

## DISCUSSION

Seridó bean mitochondria have been shown to oxidize the same substrates as mung bean<sup>1</sup>. Unlike animal mitochondria, they oxidized malate and exogenous NADH. With succinate and malate as substrate the first state 4 and 3 were faster than the rates of subsequent states 4 and 3. The oxidative sequences obtained with succinate as substrate are not in agreement with that obtained by Ikuma and Bonner<sup>1</sup>. It may be due to the different isolation procedure<sup>10</sup> however the comparison between seridó bean and rat-liver mitochondria showed a similar oxidizing sequence, with succinate as substrate. Oxidative activity of other substrates was also verified, but significant results were not obtained. It is already known that the efficiency of the oxidative phosphorylation systems varies with substrates<sup>11</sup> Furthermore, work with mito-

chondria isolated from two day old seedlings of *Vigna sinensis* (Linn) Savi<sup>12</sup> showed that by increasing glutamate concentrations the endogenous mitochondrial respiration was inhibited. As the age of the hypocotyls used in this work varied from 6 to 7 days old and the range of glutamate was small, experiments are still underway in order to clarify the utilization of substrates such as  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamate.

The inhibitory effect of rotenone was stronger (83%) with rat-liver mitochondria than with seridó bean mitochondria (55%). This effect of rotenone on plant mitochondria has already been established<sup>13</sup> and was studied with seridó bean mitochondria in order to show possible differences between the electron transport of mammalian and plant mitochondria.

The influence of 2,4 DNP upon electron transport and ATPase activity on higher plants has been reported to vary<sup>14</sup>. These differences were presumably accounted for by an absence of mitochondrial structural integrity<sup>14</sup>. In the present paper seridó bean mitochondria maintained a functional integrity suggested by ADP/O and R. C. ratios. The properties of coupling and respiratory control lasted for three hours after the mitochondria were isolated and rat-liver mitochondria were comparable (Fig. 1, A and D), (Fig. 3, A and 3) among them. In spite of this, 2,4 DNP weakly stimulated state 4 oxidation (Fig. 3, A and B) of mitochondrial respiration, unlike rat-liver mitochondria (Fig. 3, C). Furthermore, seridó bean mitochondria did not lose its capacity to phosphorylate ADP after addition of 2,4 DNP (Fig. 4). The effect of 2,4 DNP on ATPase activity of seridó bean mitochondria could not be detected (Table 1). Also, in presence of 6mM  $MgCl_2$ , 100 $\mu$ M 2,4 DNP did not induce any ATPase activity on mitochondrial preparation, to the contrary a slight inhibition of the  $Mg^{++}$ -induced ATPase was exhibited (Table 1). This failure in showing 2,4 DNP accelerated ATPase may be due to a peculiar effect of

salt concentrations in the extraction medium or reaction medium on ATPase activity of some plant mitochondria<sup>15</sup> unlike rat-liver mitochondria. Then, these results seem to indicate that in spite of the difficulty in the isolation of higher plant mitochondria, there exists differences in the oxidative and ATPase activity of plant and mammalian mitochondria.

## ABSTRACT

SILVA LIMA, M., PINHEIRO, P. A. & FERNANDES DE MELO, D. Comparison between mitochondria isolated from seridó bean (*Vigna sinensis* cv. seridó) and rat-liver: substrate utilization and influence of rotenone and 2,4 dinitrophenol.

Preparations of mitochondria isolated from etiolated seridó bean hypocotyls were able to oxidize substrates such as succinate, and unlike rat-liver mitochondria, they were also able to oxidize exogenous L-malate and NADH. When succinate was used as substrate, sequences of oxidative states 4 and 3 were similar to those of rat-liver mitochondria submitted to a comparable isolation procedure. Rotenone was shown to be a more potent inhibitor of mitochondrial respiration in rat-liver mitochondria than in seridó bean preparation. A weak stimulating effect on state 4 oxidation was exhibited by 2,4 dinitrophenol and the ADP/O ratio was maintained even after addition of 2,4 dinitrophenol. Although the seridó bean mitochondria maintained Respiratory Control (R. C.) and ADP/O ratios, activity of a 2,4 DNP-induced ATPase (E.C.3.6.1.4.) could not be detected.

## RESUMO

SILVA LIMA, M., PINHEIRO, P. A. & FERNANDES DE MELO, D.\* Comparação entre mitocôndrias isoladas de feijão seridó (*Vigna sinensis* cv. seridó) e de fígado de rato: utilização de substratos e influência da rotenona e do 2,4 dinitrofenol.

As mitocôndrias isoladas de hipocótilos estiolados de feijão (*Vigna sinensis* cv. seridó) oxidam substratos com o succinato e

\* Bolsista do CNPq.

diferentemente do que é observado em mitocôndrias de fígado de rato, elas oxidam igualmente o L-malato e o NADH de origem exógena. As seqüências dos estados de oxidação 4 e 3 em presença de succinato, em mitocôndrias de feijão, assemelham-se às das mitocôndrias de fígado de rato, isoladas por um método comparável. A rotenona induz a uma inibição da respiração mitocondrial, mais forte nas mitocôndrias de fígado de rato. O 2,4 dinitrofenol estimula de maneira fraca o estado 4 de oxidação e a relação ADP/O é sempre conservada, mesmo após a adição de 2,4 dinitrofenol. Nenhum estímulo da atividade ATPásica (E.C.3.6.1.4) foi evidenciado pelo 2,4 dinitrofenol, embora a preparação conservasse o controle respiratório e a relação ADP/O.

## REFERENCES

1. IKUMA, H. AND BONNER, W. D. Jr., 1967, Properties of higher plant mitochondria. I. Isolation and some characteristics of tightly-coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* 42: 67-75.
2. LANCE, C. AND BONNER, W. D. Jr., 1968, The respiratory chain components of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 43: 756-766.
3. IKUMA, H., 1972, Electron transport in plant respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 419-436.
4. PACKER, L., MURAKAMI, S. AND MEHARD, C. W., 1970, Ion transport in chloroplasts and plant mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21: 271-304.
5. HOGEBOOM, G. H., SCHNEIDER, W. C. AND PALADE, G. E., 1948, Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* 172: 619-636.
6. GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J. AND DAVID, M. M., 1949, Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
7. ESTABROOK, R. W., 1967, Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. In: R. W. Estabrook and M. E. Pullman eds., *Methods in Enzymology*, Vol. X. Academic Press, New York, pp. 41-47.
8. CHANGE, B. AND WILLIAMS, R. G., 1956, The respiratory chain and oxidative phosphorylation. In: *Advanc. Enzymol.*, Vol. 17 pp. 65-134.
9. FISKE, C. H. AND SUBBAROW, Y., 1925, The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
10. IKUMA, H., 1970, Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 45: 773-781.
11. HOWELL, R. W., 1961, Changes in metabolic character istic of mitochondria from soybean cotyledons during germination. *Plant Physiol.* 14: 89-97.
12. DAS H. K. AND ROY, S. C., 1962, Metabolism of L-glutamic acid in plant mitochondria. II. Some characteristics of L-glutamic acid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 445-454.
13. IKUMA, H. AND BONNER, W. D. Jr., 1967, Properties of higher plant mitochondria. III. Effects of respiratory inhibitors. *Plant Physiol.* 42: 1535-1544.
14. BLACKMON, W. D. AND MORELAND, D. E., 1971, Adenosine triphosphatase activity associated with mung bean mitochondria. *Plant Physiol.*, 47: 532-536.
15. JUNG, D. W. AND HANSON, J. B., 1973, Respiratory activation of 2,4 dinitrophenol-stimulated ATPase activity in plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 158: 139-148.

## Atractyloside Inhibition of Adenine Nucleotide Translocation in Mitochondria from Hypocotyls of *Vigna sinensis* cv. Seridó

By

M. SILVA LIMA, N. D. DENSLOW and D. FERNANDES de MELO

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Ceará  
Caixa Postal, 1065 — 60.000 Fortaleza, Ceará, Brazil

(Received 20 April, 1977; revised 29 June, 1977)

### Abstract

The translocation of adenine nucleotides into mitochondria isolated from hypocotyls of *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. Seridó was examined as a function of oxidative phosphorylation. Mitochondrial membrane integrity was assessed by respiratory control and ADP:O ratios.

A kinetic analysis of the translocation of adenosine diphosphate into the mitochondria revealed that the mechanism of translocation obeys classical Michaelis-Menten kinetics with a  $K_m$  of  $25 \mu M$  for adenosine diphosphate. At moderate ratios of atractyloside to adenosine diphosphate (lower than 0.03), atractyloside appears to be a competitive inhibitor of the translocation process, with a  $K_i$  of  $0.4 \mu M$ . However, non-linear kinetic parameters are observed with ratios higher than 0.06. A concentration of  $2.5 \mu M$  atractyloside is sufficient to reduce the translocation of  $100 \mu M$  ADP by 50%. This represents a higher level of sensitivity to atractyloside than reported for other plants.

### Introduction

Atractyloside (ATR) is a membrane impermeant and a competitive inhibitor of the translocation of adenine nucleotides across the inner membranes of the mitochondria of mammalian cells (Kemp and Slater 1964, Pfaff *et al.* 1965, Duée and Vignais 1965, Vignais 1976). The inhibitory effect of ATR on mitochondria isolated from plants, however, is controversial. Passam *et al.* (1973) and Passam and Coleman (1975) reported that in mitochondria isolated from Jerusalem artichokes, adenine nucleotide reactions were undiminished by concentrations of ATR comparable to those required to inhibit the same reactions in rat liver mitochondria. They suggested that plant mitochondria have a different molecular structure of the adenine nucleotide translocator or, alternatively, a factor which is antagonistic to the effect of ATR. Using unusually high concentrations of ATR ( $50$ – $100 \mu M$ ) Jung and Hanson (1973, 1975) showed inhibitory effects on cauliflower mitochondria "primed" with an oxidizable substrate and on corn mitochondria (Jung and

Hanson 1975, Hanson *et al.* 1972). More recently, Janovitz *et al.* (1976) reported that the ADP translocator of cauliflower mitochondria is ATR insensitive but is controlled by an ATR-sensitive regulatory unit. Using potato mitochondria, Vignais *et al.* (1976) showed that  $30 \mu M$  ATR was sufficient to completely inhibit the translocation of  $110 \mu M$  ADP. Although this represents a higher level of sensitivity to ATR than found in other plants, this level is still at least 30 times lower than that reported for animals (Passam *et al.* 1973).

We present evidence that the adenine nucleotide translocator of seridó bean mitochondria is sensitive to low concentrations ( $10 \mu M$ ) of ATR. In this respect, seridó bean mitochondria resemble potato mitochondria more than other plants. The transport of ADP across the inner mitochondrial membrane and its inhibition by ATR are explored by kinetic parameters.

*Abbreviations:* ATR, atractyloside; ADP, adenosine-5'-diphosphate.

### Materials and Methods

Seridó bean (*Vigna sinensis* (L.) Savi cv. Seridó) seeds (1976 crop) were obtained from the seed bank of the Escola de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Brazil. These seeds were surface-sterilized with 0.5% NaOCl and germinated at  $28^\circ C$  in vermiculite moistened with distilled water. Mitochondria were isolated from 6 and 7 day-old dark-grown seridó bean hypocotyls by the method of Ikuma (1970) as modified by Silva Lima *et al.* (1975).

Protein was determined by a biuret procedure (Gornall *et al.* 1949) after solubilization of mitochondria with cholate. Oxygen uptake was measured polarographically with a Clark oxygen electrode at  $26^\circ C$ . The reaction medium consisted of  $0.3 M$  mannitol,  $10 mM$  potassium phosphate buffer (pH 7.2),  $10 mM$  KCl and  $6 mM$  MgCl<sub>2</sub> in a final

volume of 1.5 ml. Respiratory rates were calculated from a recorder trace on the basis of  $219 \mu\text{M O}_2$  in aerated medium (unpublished experimental determination by P. V. Vignais). The respiratory rates, respiratory control ratios, and ADP:O ratios were calculated according to Chance and Williams (1956).

ADP concentrations were corrected for adenylate kinase (5'ATP:5'AMP phosphotransferase) activity which was determined by spectrophotometric assay at 340 nm as described previously (Silva Lima and Vignais 1968).

### Results and Discussion

Transport of adenine nucleotides across the inner mitochondrial membrane is an exchange-diffusion process whose kinetic parameters depend on the energy state of the mitochondria (Passam *et al.* 1973, Luciani and Varotto 1975, Souverijn *et al.* 1973). We have used a system which studies the translocation as a function of oxidative phosphorylation. The biochemical integrity of the mitochondria can be inferred from the respiratory control of 6.1 and ADP:O ratio of 1.6 with succinate as substrate (Figure 1A). ATR at a concentration of  $10 \mu\text{M}$  added after ADP (Figure 1B) or before ADP (Figure 1C) inhibits the respiration stimulated by  $220 \mu\text{M}$  ADP.

The translocation of ADP through the inner mitochondrial membrane exhibited saturation kinetics of the Michaelis-Menten type (Figure 2A). The  $K_m$  for the externally added ADP was found to be  $25 \mu\text{M}$  with succinate as substrate.

This is comparable to results reported for mung bean mitochondria (Ikuma 1970, Ikuma and Bonner 1967) and for animal mitochondria (Chance and Williams 1955, Chance and Hagihara 1963, Duée and Vignais 1969, Pfaff *et al.* 1969). The double reciprocal plot and the Dixon plot (Dixon and Webb 1964) demonstrate that ATR can compete

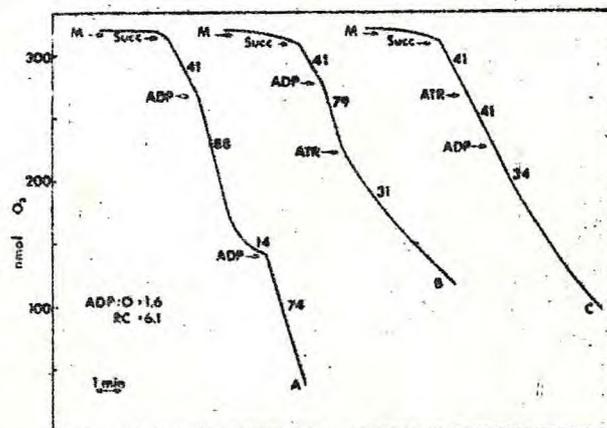


Figure 1. Polarographic traces showing the inhibitory effect of ATR on the ADP-stimulated respiration of mitochondria. The reaction medium is as described under Materials and Methods. At the indicated points the following additions were made: 7 mM succinate, 0.7 mg mitochondrial protein,  $220 \mu\text{M}$  ADP and  $10 \mu\text{M}$  ATR. Numbers along the traces are the rates of  $\text{O}_2$  uptake in  $\text{nmol min}^{-1}$  per 1.5 ml reaction volume.

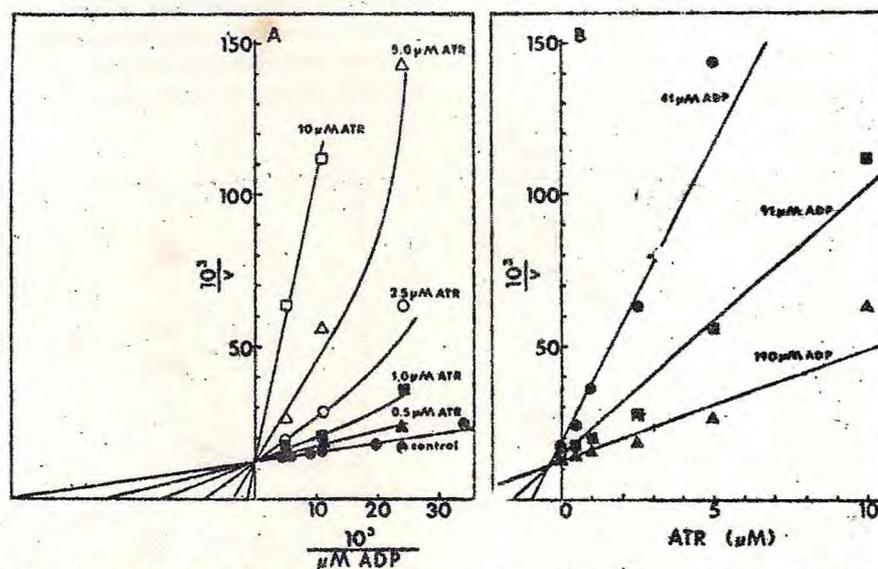


Figure 2. Kinetic analysis of the inhibition of adenine nucleotide translocation. Assay conditions are described under Materials and Methods. Mitochondria (0.7 mg of protein) were added to the reaction mixture. Various concentrations of ADP were sequentially added after 16 mM succinate. The rate of oxygen consumption,  $v$  ( $\text{nmol oxygen per min}$ ) equal the state 3 rate minus the corresponding state 4 rate. When ATR was used it was added to the reaction vessel before ADP. A. Double reciprocal plot of the effect of ATR on the ADP-stimulated respiration of bean mitochondria. B. Dixon plot illustrating the effect of various concentrations of ADP on the respiratory inhibition by ATR.

with ADP for the bean mitochondrial translocator (Figure 2), which is in agreement with the findings that ATR is an apparent competitive inhibitor of ADP in animal mitochondria (Luciani and Varotto 1975, Vignais *et al.* 1966, 1973). The  $K_i$  value obtained by the two methods of analysis was  $0.4 \mu\text{M}$  ATR.

The departure from linearity observed in Figure 2A at high ATR concentrations and low ADP concentrations may be explained by the reorienting carrier mechanism proposed by Klingenberg *et al.* (1976) for the transport of adenine nucleotides through mitochondrial membranes. According to this theory the carrier is asymmetrically distributed in the membrane with more carrier sites facing the cytosol side in the absence of externally added ADP. Because ATR cannot penetrate the membrane, it binds carrier sites found on the cytosol side and fixes them in this position, whereas ADP activates these carrier sites and switches some of them to the inside of the membrane causing them to be more equally distributed. Thus one can imagine two different states of mitochondrial membrane: a symmetrical state at moderate ATR and ADP concentrations exhibiting classical saturation kinetics and an asymmetrical state appearing at high ATR and low ADP concentrations giving "odd" kinetic effects (Klingenberg *et al.* 1976).

As further evidence of the argument presented above, Figure 3 shows by another method of analysis that ATR is a competitive inhibitor of ADP translocation in the range of concentrations studied. Only in competitive inhibition does the percentage of inhibition become a function of the ratio of the concentrations of inhibitor and substrate rather than a function of the absolute concentration of the inhibitor alone. In this figure, varying the ADP concentration between  $41 \mu\text{M}$  and  $190 \mu\text{M}$  gives the same inhibitory profile. The con-

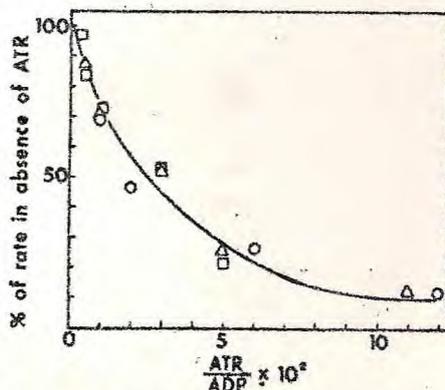


Figure 3. The effect of ATR on the rate of oxygen uptake by bean mitochondria. The reaction conditions are the same as in Figure 2. The ATR/ADP ratio refers to ATR concentrations of  $0.5 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $2.5 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$  and  $10 \mu\text{M}$  and ADP concentrations of  $41 \mu\text{M}$  (O),  $91 \mu\text{M}$  ( $\Delta$ ) and  $190 \mu\text{M}$  ( $\square$ ). The rates of oxygen consumption (state 3 minus state 4) are expressed as a percentage of the rates in the absence of inhibitor which are equal to  $59 \text{ nmol O}_2/\text{min}$ ,  $68 \text{ nmol O}_2/\text{min}$  and  $74 \text{ nmol O}_2/\text{min}$  for the respective concentrations.

centration of ATR that inhibits ADP translocation by 50% is  $2.5 \mu\text{M}$  when  $100 \mu\text{M}$  ADP is used. Bean mitochondria appear to be more sensitive to ATR than mitochondria of other plants. Those of potato require  $12 \mu\text{M}$  ATR to inhibit the transport of  $10 \mu\text{M}$  ADP by 50% (Vignais *et al.* 1976) whereas mitochondria of cauliflower and corn are inhibited by  $50\text{--}100 \mu\text{M}$  ATR (Jung and Hanson 1973, 1975, Hanson *et al.* 1972, Janovitz *et al.* 1976) and, Jerusalem artichoke mitochondria appear to be insensitive to ATR (Passam *et al.* 1973, Passam and Coleman 1975).

In spite of the technical difficulties in obtaining undamaged plant mitochondria, many real differences have been described between them and mammalian mitochondria (Ikuma 1972, Palmer 1976, Packer *et al.* 1970). Recent research has begun to explore differences existing between mitochondria of various higher plants and the group appears to be more heterogeneous than once assumed. Clearly this is an area where greater research is necessary in order to place the specificity of mitochondrial function into proper perspective.

We thank Dr. R. A. Moreira for his helpful discussion during the latter phases of this work. This study was supported in part by grants from the National Council of Research (CNPq) and Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

#### References

- Chance, B. & Williams, G. R. 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. — *J. Biol. Chem.* 217: 383–393.
- 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. — *In Advances in Enzymology* (F. F. Nord, ed.) 17: 65–134. Interscience Publishers.
- & Hagihara, B. 1963. Direct spectroscopic measurements of interaction of components of the respiratory chain with ATP, ADP, phosphate and uncoupling agents. — *In Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry* (E. C. Slater, ed.) 1: 1–32. Pergamon Press, N.Y.
- Dixon, M. & Webb, E. 1964. *Enzymes*. — pp. 329–330. Longmans, Green and Co. Ltd.
- Duce, E. D. & Vignais, P. V. 1965. Echange entre adénine nucléotides extra et intramitochondriaux. — *Biochim. Biophys. Acta* 107: 184–188.
- 1969. Kinetics and specificity of the adenine nucleotide translocation in rat liver mitochondria. — *J. Biol. Chem.* 244: 3920–3931.
- Gall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. — *Ibid.* 177: 751–766.
- Hanson, J. B., Bertagnolli, B. L. & Shepherd, W. D. 1972. Phosphate induced stimulation of acceptorless respiration in corn mitochondria. — *Plant Physiol.* 50: 347–354.
- Ikuma, H. 1970. Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. — *Ibid.* 45: 773–781.
- 1972. Electron transport in plant respiration. — *Annu. Rev. Plant Physiol.* 23: 419–436.
- & Bonner, W. D. 1967. Properties of higher plant mitochondria. I. Isolation and some characteristics of tightly coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotyls. — *Plant Physiol.* 42: 67–75.

- Janovitz, A., Chavez, E. & Klapp, M. 1976. Adenine nucleotide translocation in cauliflower mitochondria. — *Arch. Biochem. Biophys.* 173: 264-268.
- Jung, D. W. & Hanson, J. B. 1973. Atractyloside inhibition of adenine nucleotide transport in mitochondria from plants. — *Biochim. Biophys. Acta* 325: 189-192.
- 1975. Activation of 2,4-dinitrophenol-stimulated ATPase activity in cauliflower and corn mitochondria. — *Arch. Biochem. Biophys.* 168: 358-368.
- Kemp, A., Jr. & Slater, E. C. 1964. The site of action of atractyloside. — *Biochim. Biophys. Acta* 92: 178-180.
- Klingenberg, M., Riccio, P. & Aquila, H. 1976. Mechanism of carrier transport and the ADP, ATP carrier. — *In* *The Structural Basis of Membrane Function* (Hatefi, H. & Djavadi-Ohanian, L. eds.), pp. 293-311. Academic Press, N.Y.
- Luciani, S. & Varotto, R. 1975. Difference between atractyloside and carboxyatractyloside on the binding to the mitochondrial membrane. — *FEBS Lett.* 56: 194-197.
- Packer, L., Murakami, S. & Mehard, C. W. 1970. Ion transport in chloroplasts and plant mitochondria. — *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21: 271-304.
- Palmer, J. M. 1976. The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. — *Ibid.* 27: 133-157.
- Passam, A. C. & Coleman, J. O. D. 1975. The effects of atractyloside and Bongkreikic acid on Jerusalem artichoke mitochondria in relation to adenine nucleotide translocation. — *J. Exp. Bot.* 26: 536-543.
- , Souverijn, J. H. M. & Kemp, A., Jr. 1973. Adenine nucleotide translocation in Jerusalem artichoke mitochondria. — *Biochim. Biophys. Acta* 305: 88-94.
- Pfaff, E., Heldt, H. W. & Klingenberg, M. 1969. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Kinetics of the adenine nucleotide exchange. — *Eur. J. Biochem.* 10: 484-493.
- , Klingenberg, M. & Heldt, H. W. 1965. Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria. — *Biochim. Biophys. Acta* 104: 312-315.
- Silva Lima, M. G. & Pinheiro, P. A. 1975. Effect of 2,4-dinitrophenol on mitochondria of *Vigna sinensis* cv. seridó. — *Biochimie (Paris)* 57: 1401-1403.
- & Vignais, P. V. 1968. Localisation et fonction de la GTP-AMP phosphotransférase dans les mitochondries de foie de rat. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50: 1833-1844.
- Souverijn, J. H. M., Huisman, L., Rosing, J. & Kemp, A., Jr. 1973. Comparison of ADP and ATP as substrates for the adenine nucleotide translocator in rat liver mitochondria. — *Biochim. Biophys. Acta* 305: 185-198.
- Vignais, P. V. 1976. Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. — *Ibid.* 456: 1-38.
- , Douce, R., Lauquin, G. J. M. & Vignais, P. M. 1976. Binding of radioactively labeled carboxyatractyloside, atractyloside and bongkreikic acid to the ADP translocator of potato mitochondria. — *Biochim. Biophys. Acta* 440: 688-696.
- , Duče, E. D., Vignais, P. M. & Huet, J. 1966. Effects of atractyligenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and on the translocation of adenine nucleotides in mitochondria. — *Ibid.* 118: 465-483.
- , Vignais, P. M. & Defaye, G. 1973. Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carbonyatractyloside (Gummiferin). — *Biochemistry* 12: 1508-1519.