

PATRICIA TEIXEIRA PADILHA DA SILVA

ESTUDOS SOBRE A ESTABILIDADE DE ENZIMAS MITOCONDRIAIS DURANTE
O ENVELHECIMENTO DE MITOCONDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.

TESE APRESENTADA AO DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

CURITIBA
1983.

Tese orientada pelo

Dr. Annibal Paiva Campello

e co-orientada pelo

Dr. Aguinaldo José Nascimento

*À minha Bã,
Joana Romão dos Santos.*

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Dr. Annibal Paiva Campello, pela orientação e confiança na execução deste trabalho.

Ao Dr. Aguinaldo José Nascimento, pela co-orientação, estímulo, confiança e amizade recebidos.

Ao Prof. Mário Stencel, pela dedicação e sugestões na elaboração do trabalho.

Aos Drs. Maria Lúcia Klüppel, Kazuko H. Nascimento e Shigehiro Funayama, pela revisão do conteúdo e correções.

As colegas Ilma Higuti e Lilia Murata, pelo fornecimento de dados e informações.

As Dras. Glaci Terezinha Zancan e Dêa do Amaral, pela coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná.

A Sra. Maria Helena B. Imayuki, pela revisão das referências bibliográficas.

A FINEP, CAPES, CNPq e OEA, pelo auxílio financeiro.

Aos professores, funcionários, colegas e amigos, pela colaboração, estímulo e amizade.

Aos meus pais e esposo, pela compreensão e estímulo recebidos para finalizar este trabalho.

I N D I C E

	AGRADECIMENTOS.....	iv
	ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	vi
	RESUMO.....	vii
1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
2.1	Produtos químicos.....	8
2.2	Isolamento de mitocôndrias.....	8
2.3	Armazenamento de mitocôndrias.....	8
2.4	Determinação do consumo de oxigênio....	9
2.5	Medida das atividades enzimáticas.....	10
2.5.1	ATPase.....	10
2.5.2	Citocromo <u>c</u> oxidase.....	11
2.5.3	NADH desidrogenase.....	12
2.5.4	NADH oxidase.....	12
2.5.5	Succinato oxidase.....	13
2.5.6	Succinato desidrogenase.....	13
2.5.7	Alfa-cetoglutarato desidrogenase.....	14
2.5.8	Aspartato aminotransferase.....	15
2.5.9	Malato desidrogenase.....	15
2.6	Determinação de proteína.....	16
2.7	Determinação de fósforo inorgânico.....	16
3.	RESULTADOS.....	17
4.	DISCUSSÕES.....	31
5.	CONCLUSÕES.....	37
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
7.	ERRATA.....	50

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADP	= adenosina-5'-difosfato
ATP	= adenosina-5'-trifosfato
BSA	= soro albumina bovina
EDTA	= ácido etilenodiamino tetracético
HEPES	= ácido N-2-hidroxietilpiperazina N'-2-etano sulfônico
meio R	= meio de reação para ensaio polarográfico
NAD	= nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	= nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
RC	= controle respiratório
TCA	= ácido tricloro acético
TMPD	= N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamino
Tris	= Tris(hidroximetil)aminometano
EDTA(K ⁺)	= sal potássico de EDTA

R E S U M O

Em mitocôndrias de fígado de rato preservadas em condições pré-estabelecidas por Montaño et al. (Arq.Biol.Tecnol., 24: 375-384, 1981) em presença de fontes de energia (ADP e α -cetoglutarato], de fatores (albumina, EDTA, Mg^{2+}) e em condições de envelhecimento (sacarose tamponada) foram determinadas as atividades de algumas enzimas mitocondriais, durante o período de armazenamento de 5 dias.

As enzimas ATPase, citocromo c oxidase e NADH desidrogenase apresentaram latência, aumentando a atividade em função do tempo de preservação ou de envelhecimento mitocondrial. As enzimas succinato desidrogenase, succinato oxidase, NADH oxidase, malato desidrogenase, aspartato aminotransferase e Alfa-cetoglutarato desidrogenase mostraram-se sensíveis aos dois sistemas de armazenamento mitocondrial.

As condições de preservação de mitocôndrias isoladas, apresentando acoplamento fosforilativo e ainda que com oscilações nas atividades enzimáticas, possibilitam estudos com a cadeia de transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e sistema enzimático da matriz mitocondrial, durante o período de armazenamento de 5 dias.

1. INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas que se encontram de maneira constante no citoplasma de células eucarióticas (28, 58). A sua forma e localização variam com o tipo celular e diferentes estágios funcionais (28).

Algumas lesões celulares podem provocar variações reversíveis nas mitocôndrias, outras provocam alterações irreversíveis que podem ser interpretadas como sinais de degeneração mitocondrial. Existem, genericamente, três tipos de alterações mitocondriais:

- 1) a fragmentação em grânulos seguida de lise e dispersão;
- 2) intenso inchamento com formação de grandes vacúolos;
- 3) grande acúmulo de materiais diversos com transformação das mitocôndrias em grânulos hialinos (58).

Em células normais pode-se observar mitocôndrias degeneradas, em focos de autólise constituindo um tipo de lisossoma, o citolisossoma (58). Outro tipo de degeneração consiste na fusão da mitocôndria formando as condriosferas (58).

Hã consideráveis evidências que sugerem que as mitocôndrias se alteram com o envelhecimento celular e em tumores

(10, 49, 66, 70, 73). Wilson e Franks (80), em estudos com mitocondrias de fígado de rato de 6 a 30 meses, observaram diferencias na forma mitocondrial, no arranjo e no número de cristas da matriz mitocondrial.

O envelhecimento mitocondrial (77) é considerado um desacoplamento estrutural o qual danifica a integridade da membrana interna mitocondrial aumentando a atividade ATPásica, diminuindo o controle respiratório, o controle de transporte e acúmulo de íons e, freqüentemente, a eficiência da fosforilação (77). Mitocôndrias envelhecidas (75, 77) e partículas submitocondriais, obtidas por sonicação, perdem o controle respiratório quase que completamente, mas retêm a capacidade de fosforilação acoplada à oxidação (34).

A perda ou decréscimo da fosforilação oxidativa que ocorre durante o envelhecimento mitocondrial "in vitro" deve-se à produção de várias lesões durante o processo de envelhecimento (70). Essas alterações decorrem de modificações na membrana mitocondrial interna cuja consequência é: A) "swelling" mitocondrial e concomitante alteração morfológica; B) perda para o meio de incubação de cofatores essenciais como adenina nucleotídeos (14, 23, 54), piridino nucleotídeos (45, 76) e outros fatores termoestáveis; C) acúmulo de lipídeos livres ou ligados a proteína, contendo ácidos graxos de cadeia longa não esterificados; D) ativação de fosfolipases (lecitinases) que hidrolisam os fosfolipídeos mitocondriais em ácidos graxos livres insaturados e lisofosfatídeos (9, 20).

Em estudos "in vivo" com mitocôndrias envelhecidas de fígado, de rim e de pulmão de rato, observam-se variações nos

níveis de algumas enzimas relacionadas com o sexo e com a idade do animal (6,18 e 30 meses) (78, 79). Em fígado, Knox et al. (42) observaram que não há variação nas atividades da succinato oxidase, malato desidrogenase e glutamato-oxalacetato transaminase, mas ocorre uma diminuição da atividade da citocromo oxidase.

Resultados de estudos citoquímicos "in vivo" sugerem haver pequena variação na distribuição mitocondrial da citocromo oxidase e da malato desidrogenase, acompanhadas por um leve decréscimo nos níveis enzimáticos com o envelhecimento (80).

Em fígado de rato macho, as atividades da glicogênio fosforilase (78) e citocromo oxidase (80) pouco variam, as atividades da fosfoglucomutase e fosfatase ácida aumentam e a da glucose-6-fosfatase diminui com a idade. As enzimas succinato desidrogenase, NAD diaforase (NAD(P)H desidrogenase), fosfatase alcalina e 5'-nucleotidase aumentam seus níveis de atividade até 180 meses (78). O inverso é obtido com a Beta-glucuronidase, glucose-6-P desidrogenase, lactato desidrogenase e ATPase. Em animais do sexo feminino o comportamento enzimático, em relação a idade, difere do sexo masculino, por exemplo, as atividades da lactato desidrogenase e 5'-nucleotidase mantem-se constantes enquanto a da ATPase aumenta (78).

Em mitocôndrias de fígado de rato (38) observa-se aumento contínuo na atividade das enzimas succinato-citocromo c redutase e NADH-citocromo c redutase sensível à antimicina no período fetal e pós-natal. A atividade da NADH-citocromo c redutase e succinato-citocromo c redutase, em fígado de rato de 6 a 24 meses, aumenta e a Beta-hidroxibutirato desidrogenase

apresenta-se levemente diminuída (29).

As propriedades cinéticas da glucose-6-fosfatase e da succinato-citocromo c redutase, de fígado de rato, variam com o envelhecimento (29). Isto é relacionado, a partir de estudos "in vitro" (84), com as variações conformacionais na membrana fosfolipídica que alteram a estabilidade bem como regulam a atividade da enzima ligada a membrana. Esse estudo (29) demonstra não haver correlação das perdas da atividade enzimática com a perda de lipídeos da membrana no envelhecimento "in vivo", mas sugere haver relação entre a conformação da membrana e a regulação da atividade enzimática (68).

Os fosfolipídeos tem significativo envolvimento na organização molecular da membrana mitocondrial (22) e na atividade de certos complexos mitocondriais como a citocromo oxidase, succinato-citocromo c redutase, succinato-coenzima Q redutase, Beta-hidroxibutirato desidrogenase (no transporte de elétrons) (20, 22). Participam no mecanismo de saída de água da mitocôndria (56) bem como no acúmulo de íons metálicos divalentes como Mn^{2+} e Ca^{2+} na mitocôndria (20).

A regulação da atividade mitocondrial, segundo Lehninger (44) deve ser realizada "in vivo" por desacopladores ativos produzidos pela célula, provocando alterações na permeabilidade e na estrutura da membrana. Provavelmente ocorre também um controle na permeabilidade por estes agentes desacopladores, regulando não apenas a concentração mitocondrial de pequenas moléculas iônicas ou coenzimas, como também a concentração citoplasmática de grandes moléculas catalíticas (44).

A ativação de enzimas mitocondriais, que ocorrem na forma latente, como a ATPase, glutamato desidrogenase, citocromo c redutase e citocromo oxidase é interpretada como conseqüência de um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial (3).

O envelhecimento da mitocôndria "in vitro" e sua degradação "in vivo" estão relacionadas à ação de fosfolipases A, proteinases endógenas e certas enzimas líticas do lisossoma. Assim, para diminuir o efeito do envelhecimento mitocondrial, tem sido realizados estudos que visam preservar as funções ligadas à energia e aumentar a resistência mitocondrial à proteólise e à ação de fosfolipases. O sistema de fosforilação oxidativa na mitocôndria intacta é estável contra a proteólise em meio contendo concentrações definidas de NADH, succinato, ADP e fosfato (47).

Em estudos de manutenção de mitocôndrias "in vitro", Racker e Horstman (55) mostram que mitocôndrias mantidas por um dia a 49°C apresentam controle respiratório o que não acontece com mitocôndrias mantidas a temperatura de congelamento.

Ridley e Leech (57), Giles e Sarafis (25) mostraram a sobrevivência de cloroplastos isolados durante vários dias. Estudos de Romani e Monadjem (61), Romani e Özelkök (59,60,62),

descreveram a necessidade da adição de substratos a mitocôndrias isoladas de pera e abacate para a manutenção do seu controle respiratório durante 72 a 96 horas a 25°C.

Montaño et al. (51) estudando preservação de mitocôndrias "in vitro" obtiveram, na presença de fatores protetores (EDTA, Mg^{2+} , BSA, ATP, substratos, etc. ...), um retardamento no envelhecimento demonstrado por um declínio gradual dos valores de RC e na integridade mitocondrial, até 7 dias após a extração. As mitocôndrias apresentavam-se inicialmente na forma condensada passando à forma ortodoxa no decorrer do tempo de incubação. Essas duas configurações básicas da ultra estrutura mitocondrial (condensada e ortodoxa) (33) correspondem, respectivamente, aos estados respiratórios III (ativo) e IV (repouso) (8).

Desde que as funções energéticas mitocondriais são dependentes da integridade da forma vesicular das mitocôndrias (50) e que a perda dessas funções energéticas durante o armazenamento é governada principalmente pela desorganização da unidade de membrana pela ação de fosfolipases (65), objetivamos analisar a atividade de algumas enzimas situadas na matriz e na membrana interna de mitocôndrias isoladas e mantidas a 0-4°C por longos períodos de tempo, nas condições estabelecidas por Montaño et al. (51).

As enzimas analisadas foram:

-Enzimas da membrana interna-

ATPase

Citocromo c oxidase

NADH desidrogenase

NADH oxidase

Succinato oxidase

Succinato desidrogenase

-Enzimas da matriz mitocondrial-

Alfa-cetoglutarato desidrogenase

Aspartato aminotransferase

Malato desidrogenase

Muitos estudos que relacionam o envelhecimento mitocondrial "in vivo" e o seu comportamento enzimático tem sido mencionados. Utilizando esta idéia, o presente trabalho foi realizado com a finalidade de obter informações sobre a integridade funcional da organela preservada "in vitro", por longos períodos de tempo, na presença de fontes de energia e de fatores protetores, bem como analisar o comportamento enzimático de mitocôndrias em envelhecimento "in vitro", isto é, mitocôndrias armazenadas em meio de sacarose tamponada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produtos químicos:

Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram "pro-analyse" ou do melhor grau disponível comercialmente.

2.2 Isolamento de mitocôndrias:

As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos adultos, Wistar, pelo método descrito por Montañó et al. (51). Os ratos foram sacrificados por decapitação, os fígados removidos e imediatamente lavados com meio de extração gelado, separados de tecido conjuntivo, gordura e sangue e fragmentados com tesoura. Os fígados fragmentados foram suspensos, a 10% p/v, em meio de extração gelado e saturado com nitrogênio gasoso e submetidos a homogeneização em homogeneizador de Van Potter-Elvehjem. O meio de extração era constituído de 200mM de manitol, 75mM de sacarose, 10mM de EDTA(K⁺), 0,05% de BSA e 5mM de Tris-HCl pH 7.4. A suspensão obtida foi saturada novamente com nitrogênio gasoso e centrifugada por 10min a 1000xg em centrífuga refrigerada SORVALL RC 2B para eliminar restos celulares. O sobrenadante foi centrifugado por 10min a 12000xg. O sedimento foi ressuspensão na metade do volume do meio de extração e centrifugado por 10min a 8000xg, repetindo-se tal procedimento duas vezes com o volume do meio de extração reduzido para 1/4 do volume original. O sedimento final foi ressus-

penso em sacarose 250mM gelada de modo a se obter suspensão mi
tocondrial com concentração protéica de 40 a 45mg/ml.

2.3 Armazenamento_de_mitocôndrias:

As mitocôndrias foram preservadas em meio de armazenamento de Goldblatt e Romani (26) modificado por Montañó et al. (51) (mitocôndria preservada). O meio era constituído de 250mM de sacarose, 10mM de Alfa-cetogluturato(K^+), 10mM de EDTA(K^+), 2,5mM de $MgCl_2$, 0,6mM de ADP, 0,05% de BSA, 10mM de tampão fosfato (K^+) pH 7,4. O sistema de armazenamento era constituído de 1,7mg de proteína mitocondrial por ml de meio em volume fi
nal de 25ml, mantido em refrigerador ($0-4^{\circ}C$), em Erlenmeyer de 50ml vedado com "Parafilm".

No meio de armazenamento utilizado para o controle da atividade ATPásica, o tampão fosfato foi substituído pelo tampão HEPES, na mesma concentração.

Em paralelo ao sistema mitocondrial preservado nas condições acima (51), as mitocôndrias foram mantidas em meio de armazenamento contendo 250mM de sacarose em 20mM de tampão TrisHCl pH 7,4 (mitocôndria envelhecida).

Alíquotas das suspensões mitocondriais foram, periodicamente, retiradas, centrifugadas a 8000xg por 10min e os sedimentos utilizados para os ensaios de atividade enzimática. ve
locidade respiratória, oxidação fosforilativa e determinação da concentração protéica.

2.4 Determinação_do_consumo_de_oxigênio:

O consumo de oxigênio foi determinado por polarografia a 28°C usando eletrodo de oxigênio (RANK BROTHERS) acoplado a registrador ECB-RB 102.

O controle respiratório (RC) foi obtido pela razão entre a taxa respiratória com ADP (estado III) e a taxa respiratória após o ADP ser consumido (estado IV) (18).

O sistema de incubação utilizado era constituído de 30 micromoles de Alfa-cetoglutarato (Na^+), 4,0mg de proteína mitocondrial, 0,5micromol de ADP em meio de reação (meio R) aerado e a 28°C, para um volume de 2,50ml. Nestas condições a quantidade de oxigênio inicial foi avaliada em 1,25 microátomosgrama segundo Hodgman et al. (36). A velocidade de consumo de oxigênio foi expressa em nanoátomosgrama de oxigênio por min por miligrama de proteína mitocondrial.

As mitocôndrias utilizadas no ensaio polarográfico foram retiradas do meio de armazenamento sedimentadas e ressuspensas em 3,0ml de meio de reação (meio R) aerado a 28°C.

O meio de reação (meio R) era constituído de 250mM de manitol, 10mM de KCl, 0,20mM de EDTA(K^+), 0,05% de BSA, 5mM de tampão fosfato (K^+) pH 7,4 e 10mM de Tris-HCl pH 7,4.

2.5 Medidas das atividades enzimáticas:

2.5.1 ATP fosfohidrolase (E.C.3.6.1.3).

Nome comum: ATPase, Adenosinatrifosfatase.

A reação enzimática da ATPase foi analisada pelo método

do de Perry e Grey (53). O sistema de reação era constituído de 40mM de sacarose, 2,25mM de $MgCl_2$, 2,46mM de ATP, 0,2mg de proteína mitocondrial (em 0,01ml de sacarose 250mM), 10mM de Tris-HCl pH 7,4. Após 4min de incubação a 30°C a reação foi interrompida com 0,2ml de TCA 10%. Volume final de 1,22ml: o fósforo inorgânico liberado foi determinado no sobrenadante pelo método de Sumner (72)

2.5.2 Ferrocitocromo c: oxigênio óxido-redutase (E.C.1.9.3.1) (16).

Nome comum: citocromo c oxidase.

A reação enzimática foi analisada de acordo com o método de Smith e Camarino (69), medindo-se a velocidade de consumo de oxigênio quando o citocromo c é reduzido continuamente pelo ascorbato + TMPD. O sistema de reação era constituído de 0,08mM de citocromo c, 0,8% de desoxicolato (Na^+) para solubilizar as mitocôndrias, 0,5mg de proteína mitocondrial, 20mM de ascorbato (Na^+) em 0,8mM de TMPD (52), 7,6mM de Tris-HCl pH 7,4 em 76mM de KCl aerado. Volume final de 2,50ml. Temperatura de reação de 28°C. O consumo de oxigênio foi acompanhado em eletródio de oxigênio após a adição de ascorbato e TMPD.

As mitocôndrias utilizadas foram obtidas de 0,5ml de meio de armazenamento, sedimentadas, ressuspensas em igual volume de solução 10mM de Tris-HCl pH 7,4 em KCl 100mM e mantidas em banho de gelo.

2.5.3 NADH: ferricianeto óxido-redutase (E.C.1.6.99.3).

Nome comum: NADH desidrogenase.

A reação enzimática da NADH desidrogenase foi analisada pelo método de Sottocasa (71). O sistema de reação era constituído de 1mM de KCN (67), concentrações entre 0,20mM e 0,60mM de $K_3Fe(CN)_6$ (67), 0,2mM de NADH, 0,05mg de proteína mitocondrial em 50mM de tampão fosfato (K^+) pH 7,5. Volume final de 1,0ml. Temperatura de reação 28°C. A redução do ferricianeto (K^+), que nestas condições atua como acceptor final de elétrons, foi acompanhada a 420nm em espectrofotômetro Beckman DB, após iniciar a reação por adição da enzima. Foram lançados em gráfico os inversos das variações da densidade ótica (D.O.) por min contra o inverso das concentrações de ferricianeto para se obter, por extrapolação, a atividade correspondente à concentração infinita de ferricianeto (67).

As mitocôndrias utilizadas no ensaio foram obtidas de 1,0ml de meio de armazenamento, centrifugadas, ressuspensas em 2,0ml de tampão fosfato (K^+) 100mM pH 7,3, congeladas durante 1 hora e descongeladas. O coeficiente de extinção utilizado foi de $1,03mM^{-1} \times cm^{-1}$ (13) para o ferricianeto (K^+).

2.5.4 NADH: oxigênio óxido-redutase (E.C.1.6.99.3).

Nome comum: NADH oxidase.

A reação enzimática foi analisada polarograficamente, de acordo com o método de Singer (67). Foram adicionados, à câmara de reação, 4mg de proteína mitocondrial, 0,20mM de NADH e 40mM de tampão fosfato (K^+) pH 7,4 aerado. Volume final de

2,50ml. Temperatura de reação de 28°C. O consumo de oxigênio foi acompanhado em eletródio de oxigênio após adição de NADH.

As mitocôndrias utilizadas foram obtidas de 3,0ml de meio de armazenamento, sedimentadas, ressuspensas em 0,5ml de tampão de fosfato (K^+) 50mM pH 7,4, congeladas durante 1 hora e rompidas por descongelamento à temperatura ambiente e mantidas em banho de gelo.

2.5.5 Succinato: oxigênio óxido-redutase (E.C.1.3.99.1).

Nome comum: succinato oxidase.

A reação enzimática foi medida polarograficamente segundo o método de Singer (67). Na câmara de reação foram adicionados 3mg de proteína mitocondrial, 12mM de succinato(Na^+), 40mM de tampão fosfato (K^+) pH 7,3 contendo 1,6mM de EDTA(K^+) aerado. Volume final de 2,50ml. Temperatura de 28°C. O consumo de oxigênio foi acompanhado em eletródio de oxigênio após a adição de succinato.

As mitocôndrias utilizadas no ensaio foram obtidas de 3,0ml de meio de armazenamento, sedimentadas, ressuspensas em 0,5ml de tampão fosfato (K^+) 50mM pH 7,3 com 2mM de EDTA(K^+). Em seguida, foram congeladas a -18°C por 1 hora, descongeladas à temperatura ambiente e mantidas em banho de gelo.

2.5.6 Succinato: citocromo c óxido-redutase (E.C.1.3.99.1).

Nome comum: succinato desidrogenase.

A reação enzimática foi determinada segundo o método

de Sottocasa (71). O sistema de reação utilizado era constituído de 0,05mM de citocromo c, 0,3mM de KCN (67), 0,05mg de proteína mitocondrial, 3mM de succinato(Na^+), 1,2nanomoles de rotenona, 25mM de tampão fosfato (K^+) pH 7,3. Volume final de 1,0ml. Temperatura de 26^oC. A medida da redução do citocromo c foi acompanhada a 550nm em espectrofotômetro Beckman DB, após iniciar a reação por adição de succinato.

As mitocôndrias utilizadas foram obtidas de 1,0ml de meio de armazenamento, centrifugadas e ressuspensas em 2,0ml de tampão fosfato (K^+) 100mM pH 7,3, congeladas durante 1 hora, descongeladas e pré-aquecidas a 30^oC por 10min a fim de favorecer a atividade máxima da enzima (67). Foi utilizado o coeficiente de extinção de $21,0\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para o citocromo c ($\text{cit. } \underline{c} \text{ red}_{550\text{nm}} - \text{cit. } \underline{c} \text{ oxid}_{550\text{nm}}$) (13).

2.5.7 2-oxoglutarato: lipoamida óxido-redutase (E.C.1.2.4.2).

Nome comum: Alfa-cetoglutarato desidrogenase.

A reação enzimática foi analisada de acordo com o método de Massey (48). O sistema de reação utilizado era constituído de 0,25mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5mM de Alfa-cetoglutarato(Na^+), 0,50mg de proteína mitocondrial em 75mM de tampão fosfato(K^+) pH 6,5. Volume final de 1,0ml. Temperatura de 25^oC. A redução de ferricianeto (K^+) foi acompanhada a 420nm em espectrofotômetro Beckman DB, após iniciar a reação por adição de proteína mitocondrial.

As mitocôndrias utilizadas foram obtidas de 1,0ml de meio de armazenamento, centrifugadas, ressuspensas em 0,5ml de

tampão fosfato (K^+) 100mM pH 6,5, congeladas durante 1 hora e descongeladas. O coeficiente de extinção utilizado foi de $1,03mM^{-1} \times cm^{-1}$ (13) para o ferricianeto (K^+).

2.5.8 L-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferase (E.C.2.6.1.1).

Nome comum: glutamato-oxalacetato transaminase,
aspartato aminotransferase.

A reação enzimática foi analisada segundo o método de Jenkins et al. (39). O sistema de reação possuía 0,8mg de proteína mitocondrial, 4,50mM de Alfa-cetoglutarato (Na^+), 200mM de tampão Tris-aspartato pH 8,0. Volume final de 1,10ml. Temperatura de 27°C. A formação de oxalacetato foi acompanhada a 280nm, em espectrofotômetro Beckman DB, após iniciar a reação por adição do Alfa-cetoglutarato (Na^+). Foi utilizada solução de tampão Tris-aspartato como referência.

As mitocôndrias utilizadas foram obtidas de 1,0ml de meio de armazenamento, centrifugadas, solubilizadas em 10 μ l de desoxicolato (Na^+) 20% e adicionadas de 0,5ml de tampão Tris-HCl 20mM pH 8,1 contendo EDTA (K^+) 0,1mM. Foi utilizado o coeficiente de extinção de $0,55 \text{ mM}^{-1} \times cm^{-1}$ (43) para o oxalacetato.

2.5.9 L-malato: NAD⁺ óxido-redutase (E.C.1.1.1.37).

Nome comum: malato desidrogenase.

A reação enzimática foi analisada de acordo com o método de England e Siegel (15). O sistema de reação era constituído de 85mM de L-malato (K^+) pH 7,5, 2,5mM de NAD⁺ pH 6,5 ,

0,02mg de proteína mitocondrial, tampão glicina-NaOH 100mM pH 10,0. Volume final de 1,0ml. Temperatura de 28°C. A redução do NAD⁺ foi acompanhada a 340nm em espectrofotômetro Beckman DB acoplado a um registrador, após iniciar a reação por adição da enzima. Foi utilizado tampão glicina-NaOH como referência.

As mitocôndrias foram obtidas de 0,5ml de meio de armazenamento, sedimentadas, ressuspensas em 1,0ml de tampão fosfato (K⁺) 100mM pH 7,4. A seguir foram congeladas durante 1 hora, descongeladas e recentrifugadas a 13000xg por 15min e separado o sobrenadante para o ensaio. O coeficiente de extinção do NADH utilizado foi de $6,22\text{mM}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$ (37).

2.6 Determinação de proteína:

A concentração protéica foi determinada pelo método de reação de Biureto (27) a 540nm, após solubilização das mitocôndrias com desoxicolato (Na⁺) ou pelo método de Lowry et al. (46), a 660nm. As medidas de absorvância foram feitas em espectrofotômetro Coleman Junior. Foi utilizada soro albumina bovina como padrão.

2.7 Determinação de fósforo inorgânico:

As concentrações de fósforo inorgânico foram determinadas pelo método de Sumner (72), após 5min de incubação. As medidas de absorvância foram efetuadas a 610nm, usando espectrofotômetro Coleman Junior.

3. RESULTADOS

As mitocôndrias armazenadas em sacarose tamponada não apresentam retenção de RC com o tempo de armazenamento, condição denominada de envelhecimento mitocondrial. Ao contrário, as mitocôndrias preservadas analisadas apresentam comportamento idêntico ao descrito por Montañó et al. (51), com retenção de RC por vários dias (figura 11).

Durante o período de armazenamento, a atividade da ATPase mitocondrial (figura 1), sob condições de preservação, aumenta lentamente até 66 horas, mantendo-se constante por mais 54 horas. Por outro lado, em meio de sacarose tamponada, a ATPase mostra atividade máxima, com liberação de 1,35 micromoles de Pi por min por mg de proteína, nas 24 primeiras horas, para diminuir gradativamente a seguir.

A atividade da citocromo c oxidase (figura 2) em mitocôndrias preservadas a 0-4°C e nas condições descritas por Montañó et al. (51) aumenta até 72 horas, permanecendo constante após este período (até 120 horas). Em sacarose tamponada, a atividade da citocromo c oxidase apresenta pequeno aumento nas primeiras 24 horas, seguida por decréscimo no período restante de armazenamento (115 horas).

A atividade da NADH desidrogenase mostrada na figura 3, em mitocôndrias preservada, aumenta nas primeiras 72 horas de armazenamento, seguida de valores quase constantes até o fi-

nal do período. Comportamento oposto é observado com mitocôndrias em sacarose tamponada, isto é, a atividade da NADH desidrogenase apresenta diminuição gradativa em função do tempo de armazenamento (5 dias).

Em condições de preservação, as atividades da ATPase, (figura 1) da citocromo c oxidase (figura 2) e da NADH desidrogenase (figura 3), mostram perfil similar; aumento inicial seguido por valores relativamente constantes até o final do período de armazenamento. Em sacarose tamponada as atividades da citocromo c oxidase e NADH desidrogenase apresentam diminuição durante o período, enquanto que a atividade de ATPase aumenta com o envelhecimento mitocondrial nas primeiras 24 horas seguida de decréscimo acentuado.

Em mitocôndria preservada, a atividade da NADH oxidase (figura 4) apresenta uma leve diminuição nas primeiras horas de armazenamento, seguida de valores constantes próximos de 28,0 $\mu\text{mol O}_2$ consumidos por min por mg de proteína mitocondrial. Em sacarose tamponada a atividade da NADH oxidase apresenta pequena diminuição durante o período de 5 dias.

A atividade da succinato oxidase mitocondrial (figura 5), sob condições de preservação, apresenta diminuição gradativa durante 120 horas. O mesmo comportamento enzimático é observado em sacarose tamponada.

A figura 6 mostra a atividade da succinato desidrogenase em mitocôndria preservada, aumenta até 72 horas de armazenamento, seguida de acentuado decréscimo nas horas subsequentes. O mesmo comportamento é observado em sacarose tamponada,

mas em níveis ligeiramente inferiores.

A atividade da NADH oxidase (figura 4) mostra ser menos sensível às condições de preservação que a da NADH desidrogenase (figura 3), enquanto que a atividade da succinato oxidase (figura 5), mostra ser mais estável que a da sua correspondente desidrogenase (figura 6).

Entre as atividades da NADH oxidase e da succinato oxidase (figuras 4 e 5), a segunda mostra ser mais sensível às condições de armazenamento. A atividade da succinato desidrogenase (figura 6), ainda que com comportamento similar a da NADH desidrogenase (figura 3), apresenta variações mais pronunciadas; ambas apresentam atividade máxima em 72 horas de armazenamento, nas condições de preservação.

A atividade da Alfa-cetoglutarato desidrogenase (figura 7), em condições de preservação mitocondrial, diminui lentamente no decorrer do tempo de armazenamento. Em sacarose tamponada, a atividade da Alfa-cetoglutarato desidrogenase apresenta, no início do período, um acentuado decréscimo, seguido por lenta diminuição com o tempo de armazenamento.

A atividade da aspartato aminotransferase mitocondrial (figura 8), em condições de preservação e de envelhecimento (sacarose tamponada), apresenta comportamento similar; um aumento nas primeiras 24 horas de armazenamento seguido de lenta diminuição até o final do período observado.

A malato desidrogenase mitocondrial (figura 9) quando preservada ou em sacarose tamponada, mostra uma perda lenta de

atividade durante o armazenamento.

As atividades das enzimas da matriz mitocondrial, Alfa-cetoglutarato desidrogenase (figura 7), aspartato aminotransferase (figura 8) e malato desidrogenase (figura 9) apresentam, ainda que com pequenas diferenças no início do período, diminuição durante o armazenamento.

A figura 10 mostra que a concentração protéica mitocondrial não apresenta variação considerável, estando ou não sob condições de preservação, durante o período de 5 dias.

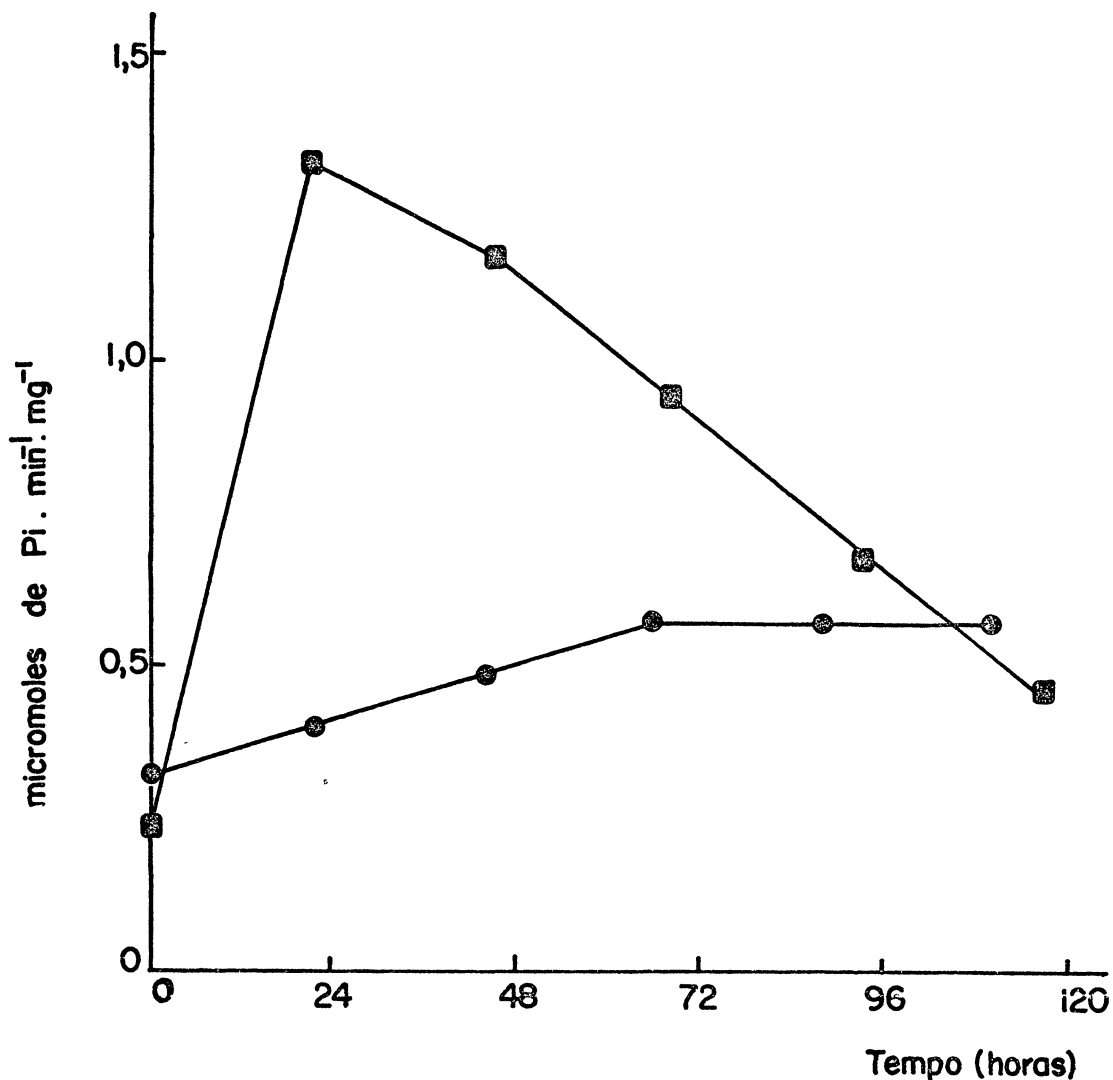


Figura 1 Medida da atividade ATPásica em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4^oC, em função do tempo de armazenamento.

O sistema de reação (53) utilizado foi de 40mM de sacarose, 2,25mM de MgCl₂, 2,46mM de ATP, 0,2mg de proteína mitocondrial, 10mM de Tris-HCl pH 7,4, num volume final de 1,22ml. Tempo de incubação de 4min. Temperatura de 30^oC. O fósforo inorgânico liberado (72) foi expresso em micromoles de Pi por min por mg de proteína mitocondrial. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montaño et al. (51).

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

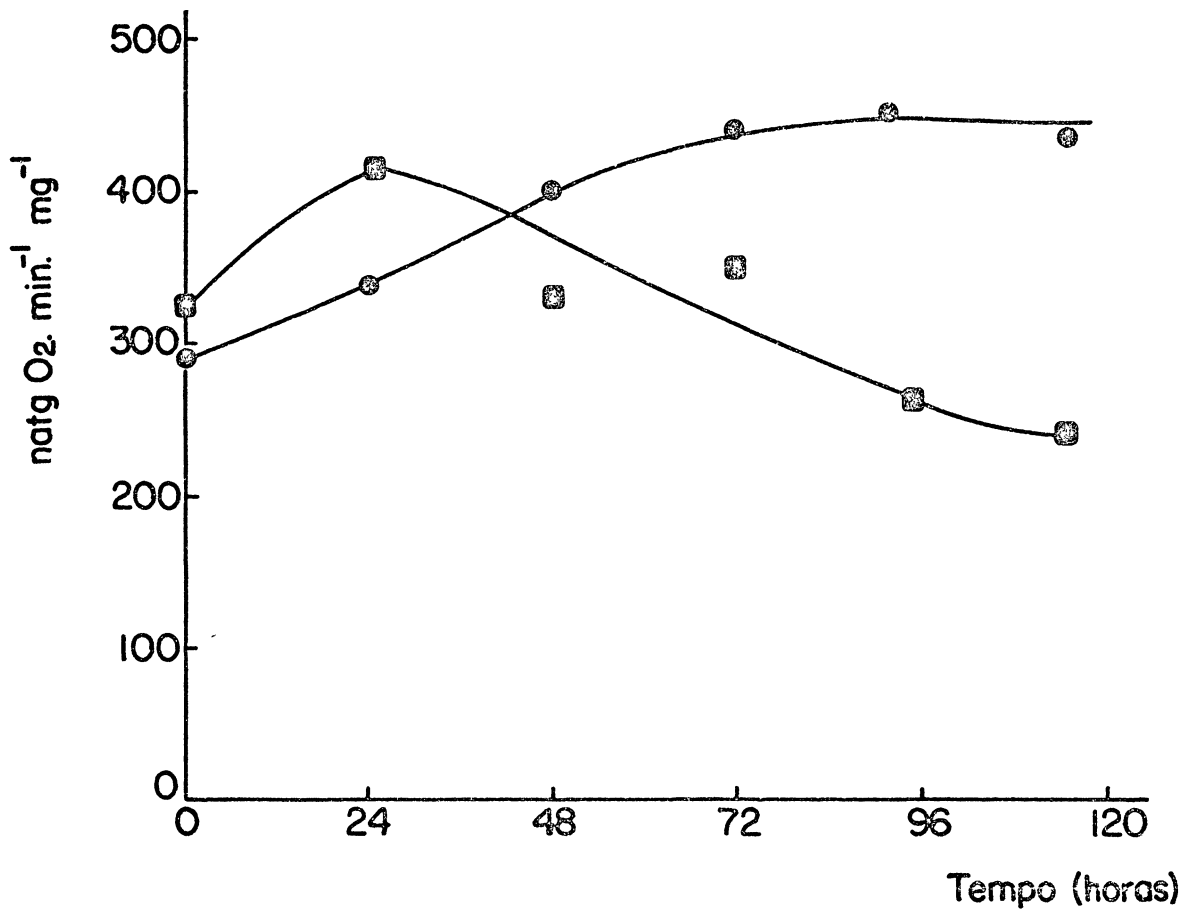


Figura 2 Medida da atividade da citocromo c oxidase em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema (69) utilizado na câmara de reação do eletrodo de oxigênio era constituído de 0,08mM de citocromo c, 0,8% de desoxicolato (Na⁺), 0,5mg de proteína mitocondrial, 20 mM de ascorbato (Na⁺) em 0,8mM de TMPD, 7,6mM de Tris-HCl pH 7,4 em 10mM de KCl, num volume final de 2,50ml. Temperatura de 28°C. A medida de consumo de oxigênio foi expressa em nat-g O₂ por min por mg de proteína. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montaño et al. (51).

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

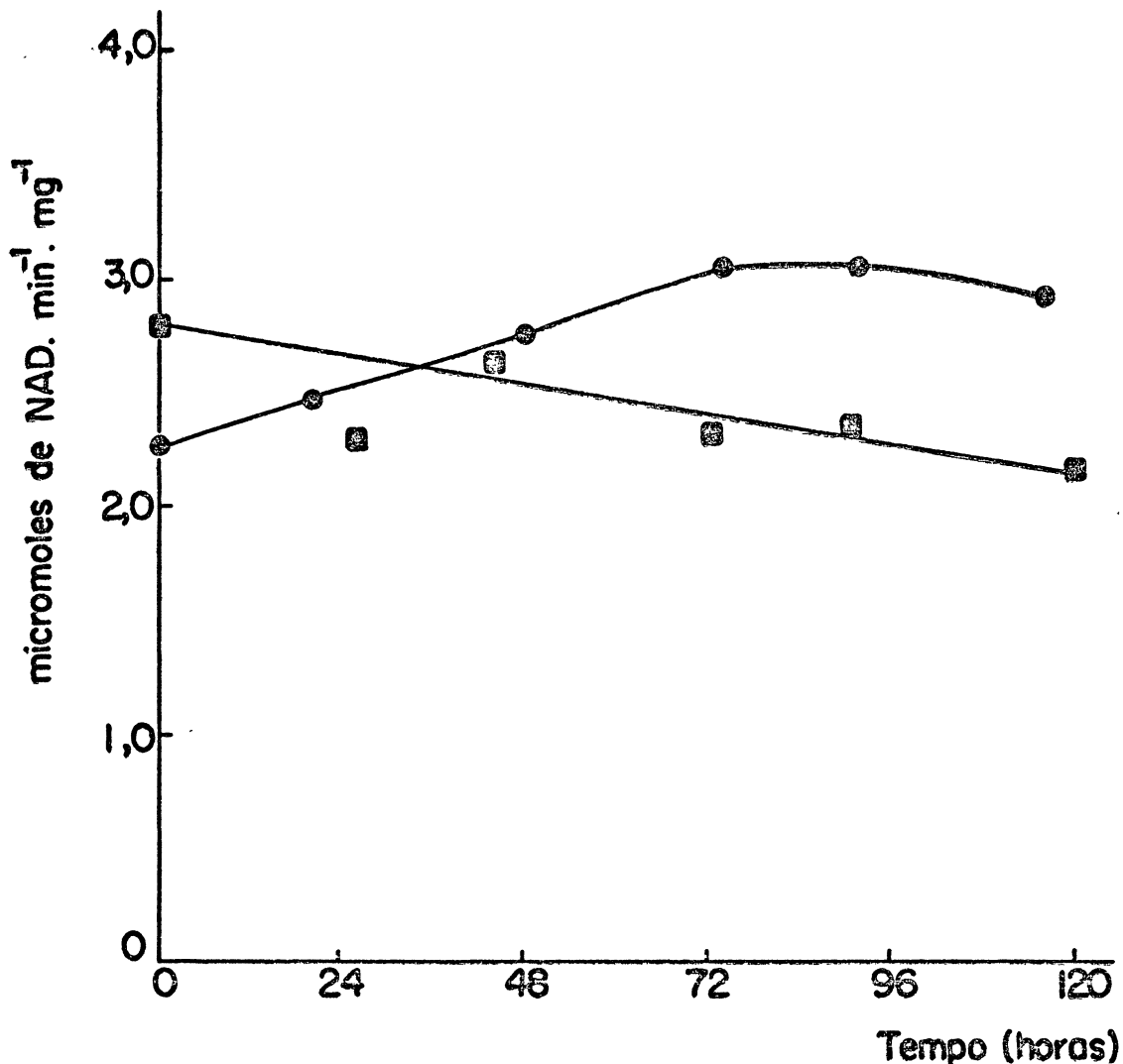


Figura 3 Medida da atividade da NADH desidrogenase em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema utilizado (71) para a medida espectrofotométrica era constituído de 1,0mM de KCN, 0,20mM a 0,60mM de $K_3Fe(CN)_6$, 0,2mM de NADH, 0,05mg de proteína mitocondrial, 50mM de tampão fosfato (K^+) pH 7,5, num volume final de 1,0ml. Temperatura de 28°C. Os resultados foram expressos em micromoles de NADH oxidados por min por mg de proteína. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montañó et al. (51),

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

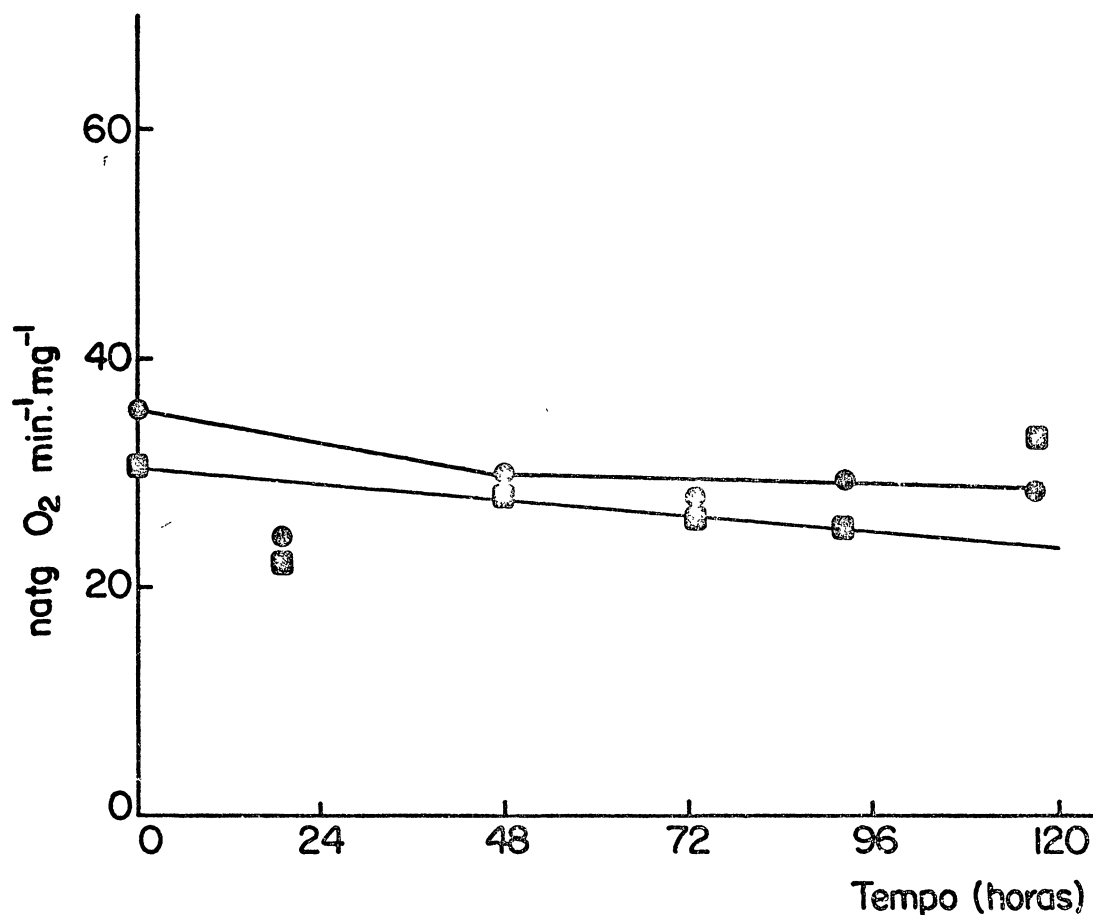


Figura 4 Medida da atividade da NADH oxidase em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema (67) utilizado na câmara de reação do eletrodo de oxigênio era: 4mg de proteína mitocondrial, 0,20mM de NADH, 40mM de tampão fosfato (K⁺) pH 7,4, num volume final de 2,50ml. Temperatura de 28°C. A medida do consumo de oxigênio foi expressa em nat-g O₂ por min por mg de proteína. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montañó et al. (51),

(◻) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

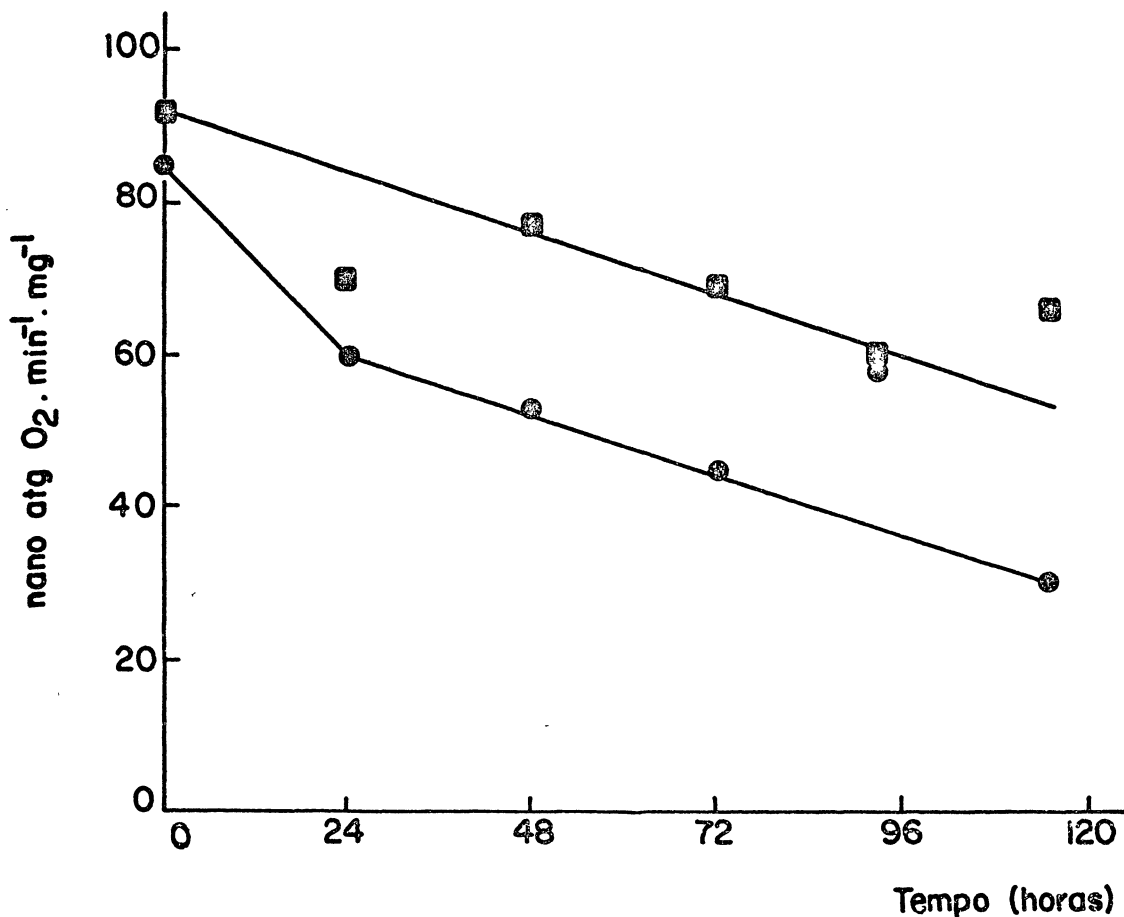


Figura 5 Medida da atividade da succinato oxidase em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema (67) utilizado na câmara do eletródio de oxigênio era constituído: 3mg de proteína mitocondrial, 12mM de succinato (Na⁺), 40mM de tampão fosfato (K⁺) pH 7,3 em 1,6mM de EDTA (K⁺), num volume final de 2,50ml. Temperatura de 28°C. A medida de consumo de oxigênio foi expressa em nat-g O₂ consumidos por min por mg de proteína. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montaño et al. (51),

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

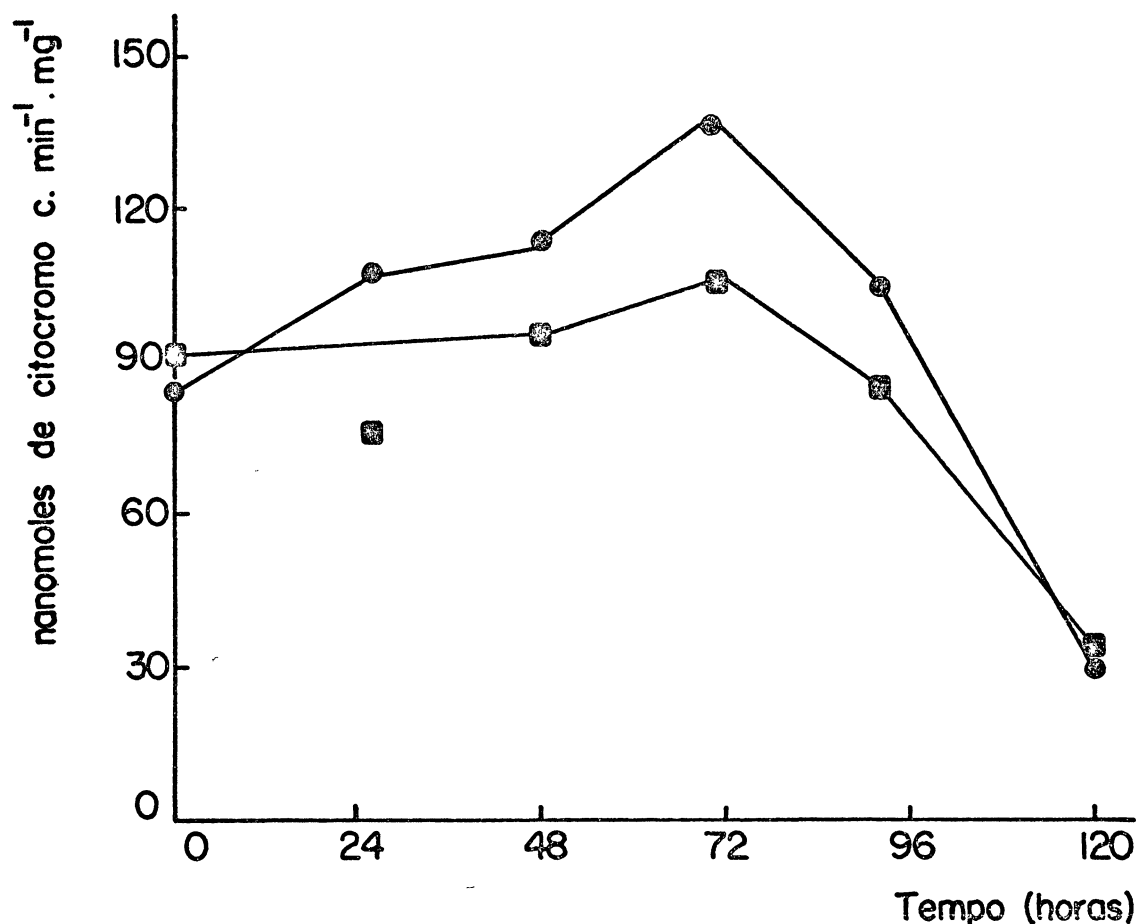


Figura 6 Medida da atividade da succinato desidrogenase em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema utilizado (71) para a medida espectrofotométrica era constituído de 0,05mM de citocromo c, 0,3mM de KCN, 0,05mg de proteína mitocondrial, 3mM de succinato (Na⁺), 1,2 nmoles de rotenona, 25mM de tampão fosfato (K⁺) pH 7,3, num volume final de 1,0ml. Temperatura de 26°C. Os resultados foram expressos em nmoles de citocromo c reduzidos por min por mg de proteína. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montañó et al. (51),

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

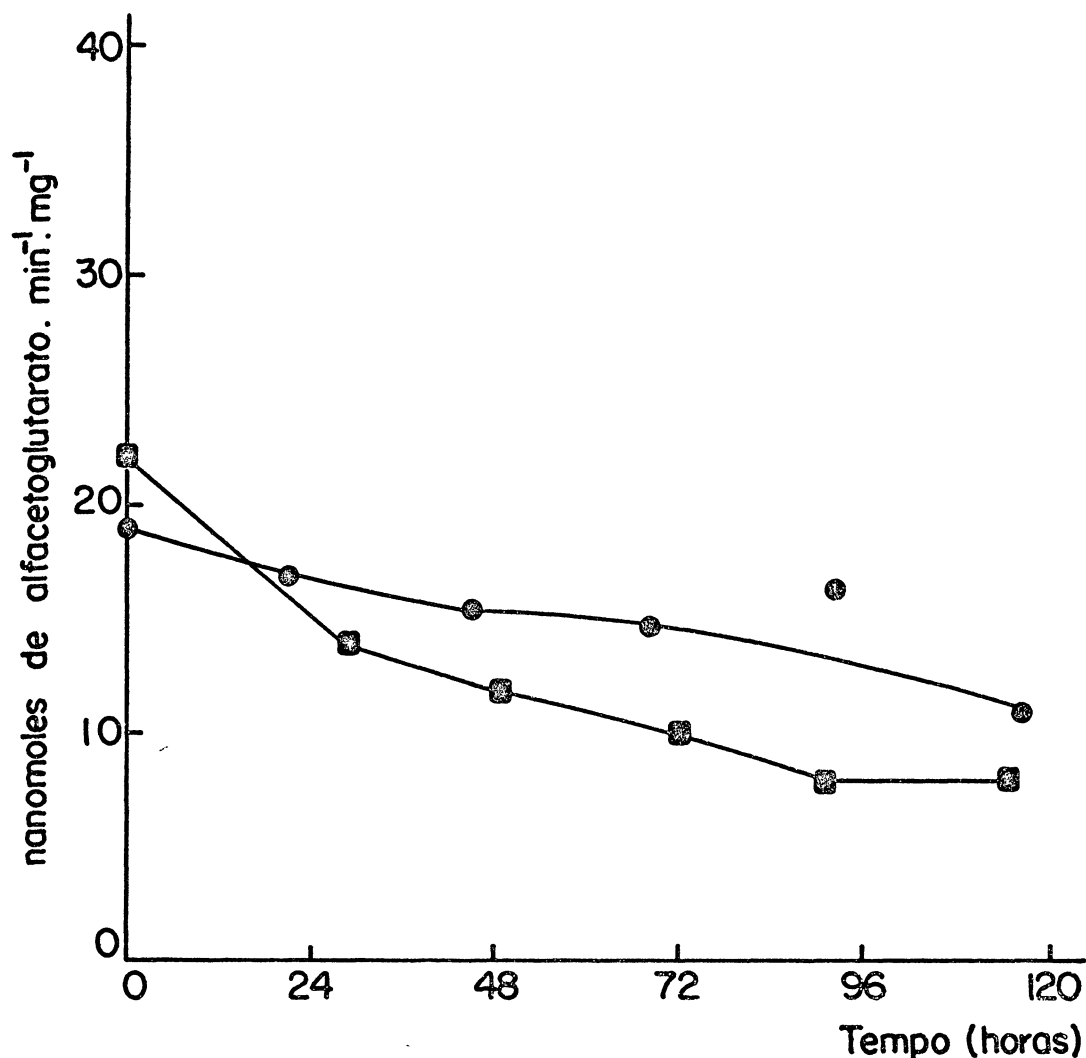


Figura 7 Medida da atividade Alfa-cetoglutarato desidrogenase em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema utilizado (48) para a medida espectrofotométrica era constituído de 0,25mM de $K_3Fe(CN)_6$, 5mM de Alfa-cetoglutarato (Na^+), 0,50mg de proteína mitocondrial, 75mM de tampão fosfato (K^+) pH 6,5, num volume final de 1,0ml. Temperatura de 25°C. Os resultados foram expressos em nmoles de Alfa-cetoglutarato consumidos por min por mg de proteína. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montañó et al. (51),

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

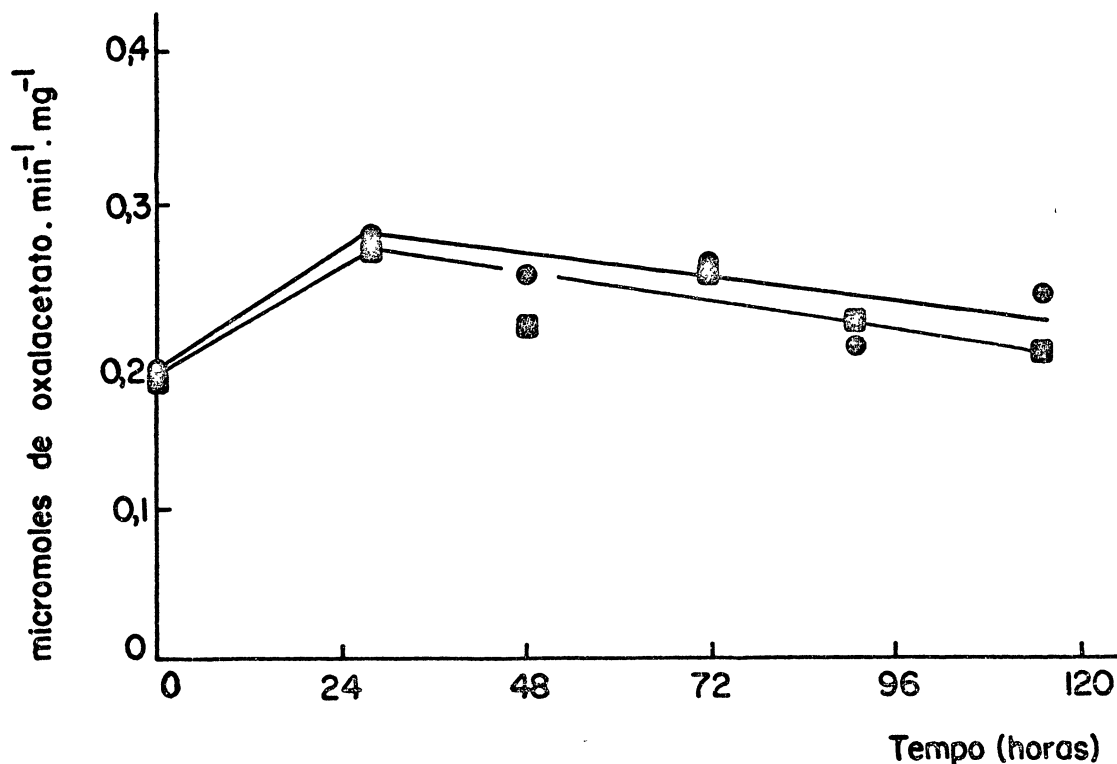


Figura 8 Medida da atividade aspartato aminotransferase em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema utilizado (39) para a medida espectrofotométrica era constituído de 0,8mg de proteína mitocondrial, 4,50mM de Alfa-cetoglutarato (Na^+), 200mM de tampão Tris-aspartato pH 8,0, num volume final de 1,10ml. Temperatura de 27°C. Os resultados foram expressos em micromoles de oxalacetato formados por min por mg de proteína. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montaño et al. (51),

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

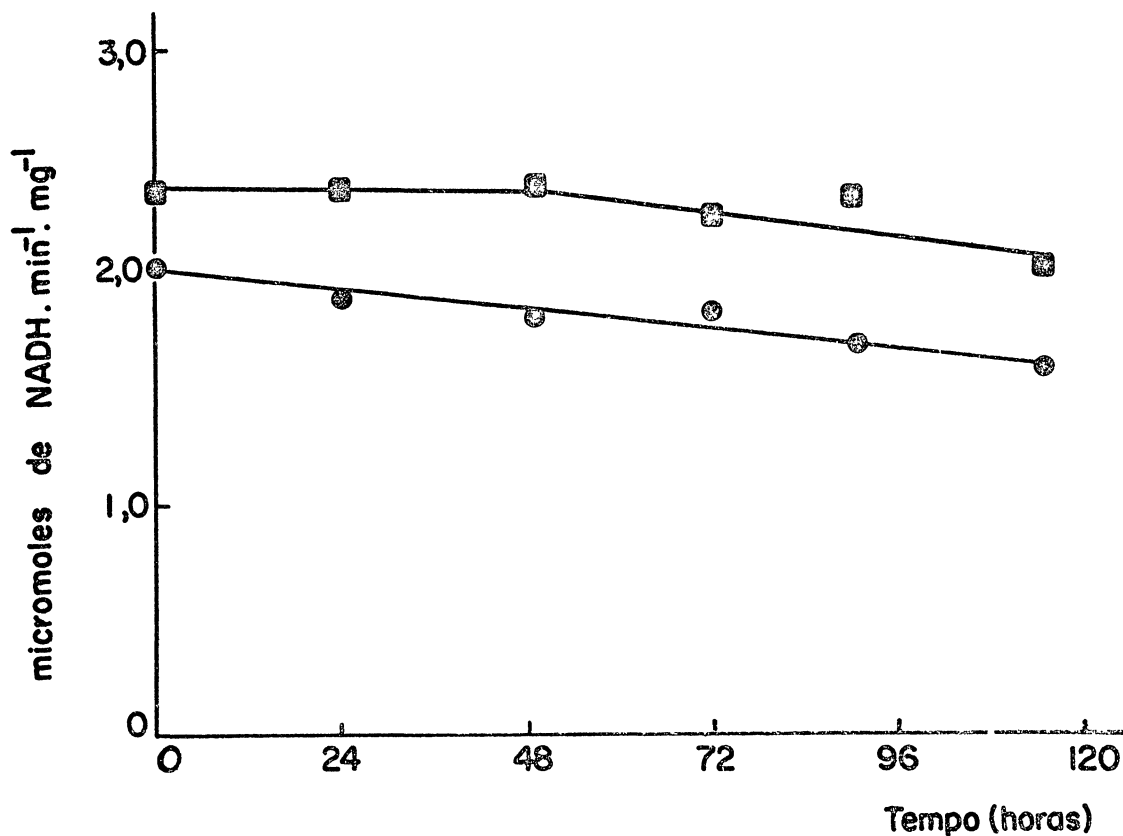


Figura 9 Medida da atividade da malato desidrogenase em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema utilizado (15) para o ensaio espectrofotométrico era constituído de 100mM de tampão glicina-NaOH pH 10,0, 85mM de L-malato (K^+) pH 7,5, 2,5mM de NAD^+ pH 6,5, 0,02mg de proteína mitocondrial, num volume final de 1,0ml. Temperatura de 28°C. Os resultados foram expressos em micromoles de NAD reduzidos por min por mg de proteína. Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montañó et al. (51),

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH 7,4.

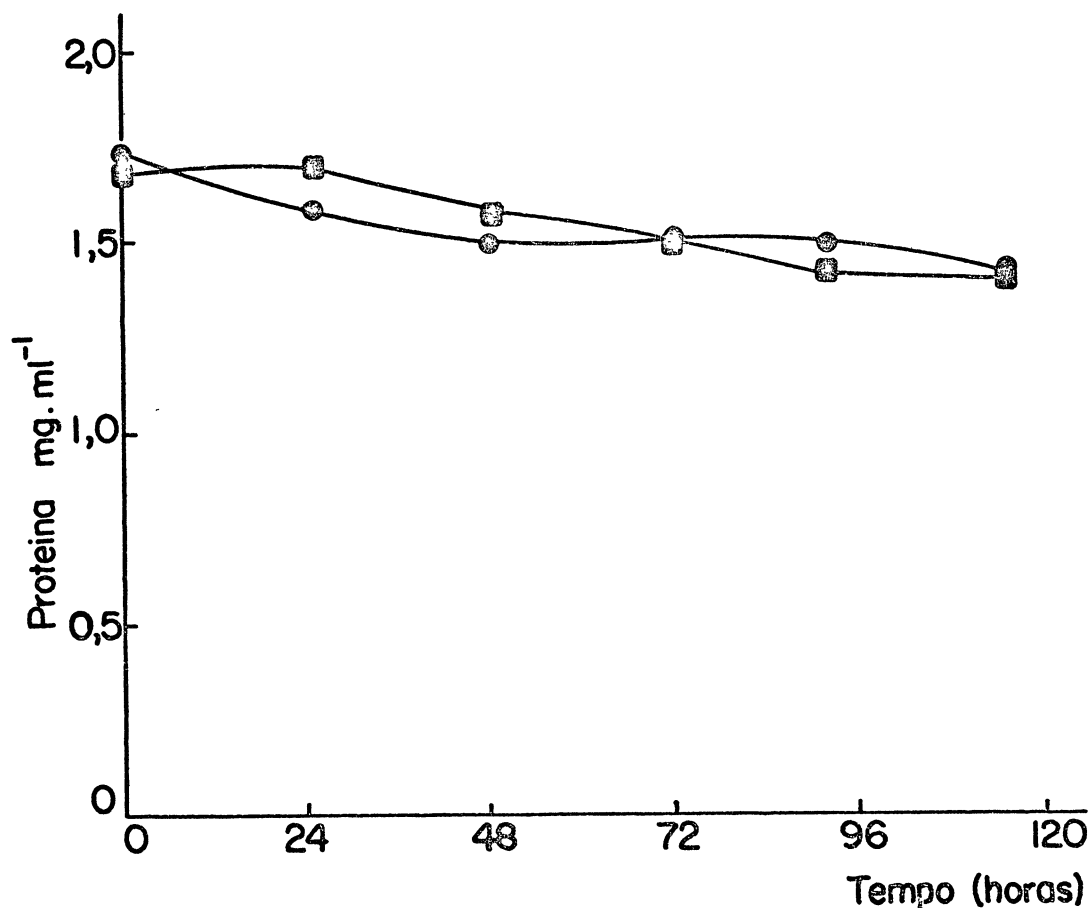


Figura 10 Medida da concentração protéica em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

A concentração protéica mitocondrial dos sistemas de armazenamento foi determinada pelo método da reação do Biuret (27). Cada resultado é a média de 3 experimentos independentes.

(●) nas condições descritas por Montaño et al. (51),

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris - HCl pH 7,4.

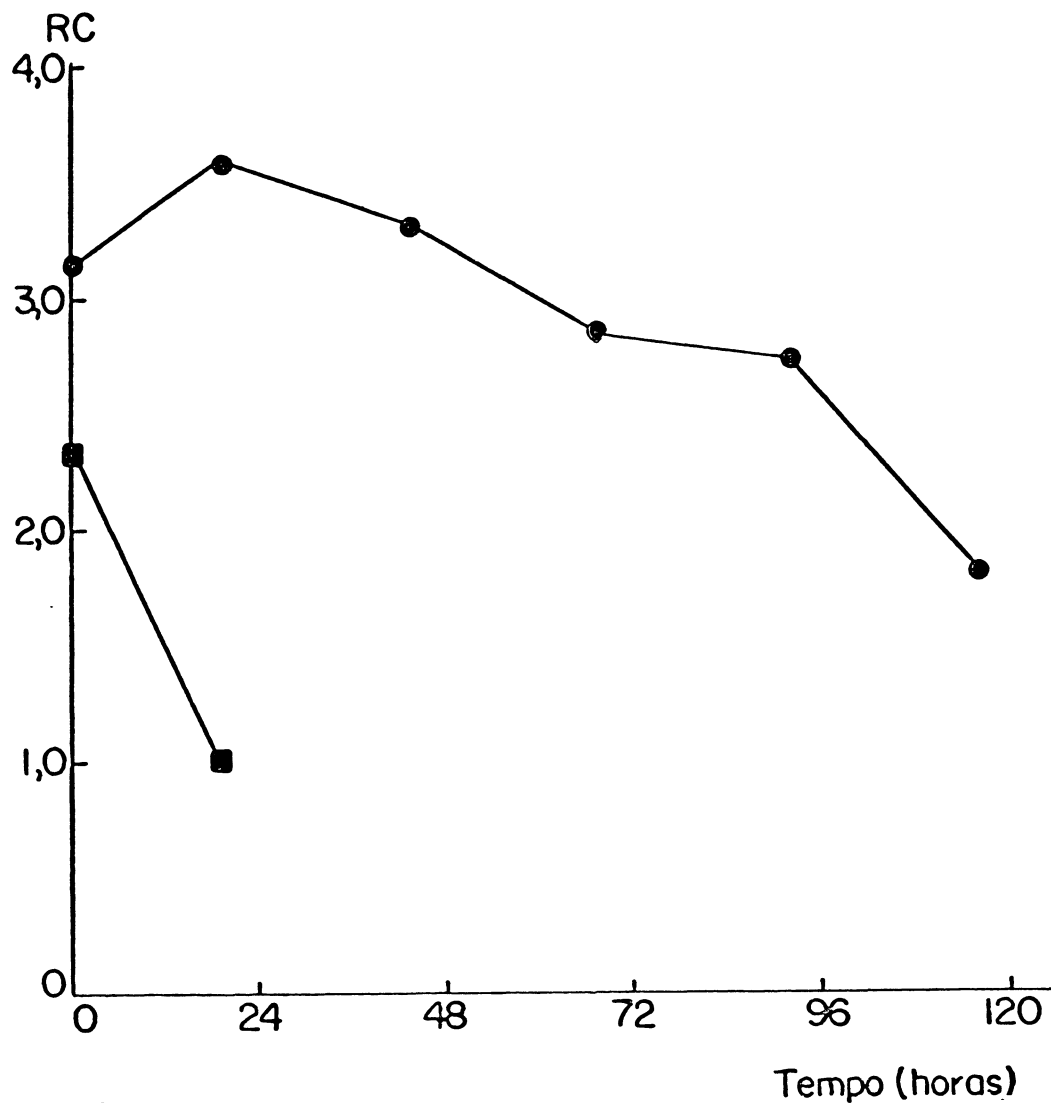


Figura 11 Medida do Coeficiente de Controle Respiratório (RC) em mitocôndrias de fígado de rato, mantidas a 0-4°C, em função do tempo de armazenamento.

O sistema utilizado para a medida polarográfica era constituído de: 30 micromoles de Alfa-cetoglutarato(Na^+), 4,0mg de proteína mitocondrial, 0,5micromol de ADP, meio de reação R aerado; num volume final de 2,50ml. Temperatura de 28°C.

(●) nas condições descritas por Montañó et al. (51),

(■) em 250mM de sacarose em 20mM de tampão Tris-HCl pH7,4.

Estudos de Chan e Higgins (7) com mitocôndrias de fígado de rato envelhecidas em tampão Tris-sacarose 0,25M a 0°C, mostram que o decréscimo do coeficiente de controle respiratório e taxa ADP : O estão relacionados ao aumento dos níveis de ácido graxo livre que corresponde ao aumento dos níveis da atividade da fosfolipase A. Esse estudo (7) mostra que há uma correlação direta entre o nível de ácido graxo endógeno e o desacoplamento da oxidação fosforilativa mitocondrial que pode ser restaurado pelo BSA e EDTA (65).

O BSA e o EDTA exercem efeito protetor por se ligarem, respectivamente, a ácidos graxos livres (4) e ao íon Cálcio, que são responsáveis pelo desacoplamento (12,31,82) bem como pela ativação da fosfolipase A₂ presente na membrana externa mitocondrial (65). O uso de BSA e de EDTA no meio de extração e de incubação mitocondrial resulta em mitocôndrias com valores de controle respiratório mais estáveis (26) e com maior período de sobrevivência (51). Segundo Slater e Cleland (68), o uso do EDTA evita as variações morfológicas e confere estabilidade aos sistemas enzimáticos da fosforilação oxidativa.

Nas condições de armazenamento, para se obter mitocôndria preservada, foi utilizado o íon Mg²⁺ para auxiliar na manutenção da estrutura organizada da mitocôndria (81,83) e no controle da permeabilidade da membrana (64).

Algumas enzimas localizadas na membrana interna e matriz mitocondrial, na mitocôndria intacta, apresentam latência (3,17). Em condições de preservação mitocondrial, algumas das enzimas analisadas: ATPase (figura 1), citocromo c oxidase (figura 2) e NADH desidrogenase (figura 3), apresentam latência durante o período de armazenamento.

A baixa atividade ATPásica observada (figura 1) no início do armazenamento também foi mencionada por Kielley e Kielley (41) em material recém-preparado. Segundo Cereijo-Santaló (6) a latência da ATPase em mitocôndrias frescas é devido ao acúmulo de prótons na membrana e à presença de ADP endógeno.

A perda da latência observada na atividade ATPásica (figura 1) em condições de armazenamento, é o resultado de ações degradativas que ocorrem na membrana mitocondrial durante o período. O estímulo lento e gradativo na atividade ATPásica, na mitocôndria preservada, pode estar relacionado à perda da eficiência no controle da atividade ATPásica pelos fatores presentes no meio, como o BSA (2), ADP (6) e EDTA (68). Esta perda de latência deve-se a remoção de prótons por aumento na permeabilidade (3, 11) ou por troca por cátions extramitocondriais (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , K^{+}) (6).

A ativação inicial da citocromo c oxidase (figura 2), na mitocôndria preservada, pode estar relacionada àqueles fatores mencionados para a ativação da ATPase (figura 1) bem como por modificações conformacionais da enzima relacionadas a fosfolipídeos (3,11).

O aumento da atividade da NADH desidrogenase, na mitocôndria preservada (figura 3), deve-se, provavelmente, a ação do BSA que complexa os ácidos graxos liberados de fosfolipídeos pela ação de fosfolipase A, são potentes inibidores do sistema NADH desidrogenase (1). Essa ação complexante do BSA foi observada em estudos de Fleischer e Fleischer (21) que demonstraram a reativação da NADH-citocromo c redutase em sistemas contendo fosfolipase A e BSA.

Na mitocôndria envelhecida, onde apenas a sacarose tampoadade age como fator de manutenção da estrutura mitocondrial(24), ocorre um maior efeito sobre a latência e atividades da ATPase (figura 1), da citocromo c oxidase (figura 2) e da NADH desidrogenase (figura 3) simultaneamente à perda da integridade da membrana mitocondrial.

As atividades enzimáticas envolvendo segmentos da cadeia de transporte de elétrons da membrana interna mitocondrial, tais como, NADH oxidase e succinato oxidase, apresentam comportamentos diferentes, face ao armazenamento. Enquanto que a NADH oxidase (figura 4) praticamente não se altera, a succinato oxidase (figura 5) apresenta um leve decréscimo na atividade, em função do tempo de armazenamento. O comportamento da succinato oxidase pode estar relacionado a presença do EDTA e ADP que em condições de armazenamento de Slater e Cleland (68) evitam sua ativação.

Em sacarose tamponada, as atividades da NADH oxidase (figura 4) e succinato oxidase (figura 5) mostram comportamento similar em relação a mitocôndria preservada. A atividade NADHoxi

dase (figura 4) parece pouco sofrer com a variação do ambiente lipídico(1).

A perda da atividade da succinato desidrogenase , mostrada na figura 6, após 72 horas de armazenamento, pode ser consequência da remoção de agentes que estabilizam a enzima na sua conformação ativa. Gutman et al. (32) observaram em mitôcondrias de fígado que a succinato desidrogenase era desativada na presença de desacopladores, acompanhada pela total oxidação da coenzima Q.

Resultados obtidos com a citocromo c oxidase (figura 2), a succinato oxidase (figura 5) e a succinato desidrogenase (figura 6), se correlacionados a ação de lipases, são concordantes com trabalhos de Ambe e Crane (85), Tookey e Balls (86) , que mostram ser a enzima succinato oxidase mais sensível à ação de lipases que a succinato desidrogenase e citocromo c oxidase.

As enzimas da matriz mitocondrial, Alfa- cetoglutatarato desidrogenase (figura 7) , aspartato aminotransferase (figura 8) e malato desidrogenase (figura 9), em condições de armazenamento, sofrem um leve decréscimo na atividade enzimática. Essas perdas de atividade parecem estar relacionadas com as perdas de proteínas solúveis para o meio de armazenamento (figura 10).

A atividade detergente dos lisofosfatídeos resulta em alterações estruturais a qual permite a liberação de certas enzimas da matriz mitocondrial. As alterações estruturais da mem

brana provocadas pelo lisofosfatídeo é inibida pelo BSA, provavelmente devido a formação de complexos com os ácidos graxos e lisofosfatídeos (20).

No processo de envelhecimento "in vitro", a contínua liberação de ácidos graxos pode resultar em quantidade suficiente para causar alterações da estrutura mitocondrial ou no potencial de membrana (31). Qualquer alteração conformacional induzida pelo lipídeo pode conferir as enzimas modificações características como estabilidade, sensibilidade a inibidores e ativadores e habilidade para interagir com outras proteínas da membrana. A perda ou modificação lipídica pode resultar em complexos não específicos com outras enzimas ou inativá-las (11). Esta poderia ser a causa da deterioração irreversível das mitocôndrias envelhecidas por longo período de tempo (40).

O trabalho não publicado de I.H.Higuti, em nosso laboratório, indica que a presença de cátions inibidores de fosfolipase A, no meio de preservação de Montaño et al.(51), fornece valores mais estáveis de coeficiente de controle respiratório, sem contudo prolongar a vida útil das mitocôndrias (coeficiente respiratório acima de 2) por mais de 7 dias. Além disso, a vida média dos fosfolipídeos mitocondriais, aumentou de 19 para 36 horas com a presença de Fe^{2+} no meio de preservação.

A análise da degradação protéica intra-mitocondrial, realizada por Grisolia et al. (30), permitiu avaliar o tempo de

meia vida de 4 a 7 dias para proteínas de mitocôndrias de fígado de rato. Posto que a renovação protéica, em mitocôndrias isoladas, não deve ocorrer, a estabilidade das preparações mitocondriais durante o armazenamento prolongado deve ser função da eficiência de inibição da atividade de proteínases e lipases endógenas mitocondriais.

5. CONCLUSÕES

1. As enzimas ATPase e citocromo c oxidase apresentam latência, aumentando a atividade em função do tempo de preservação ou de envelhecimento mitocondrial.

2. A atividade da NADH desidrogenase aumenta com o armazenamento mitocondrial em meio de preservação e diminui em condições de envelhecimento (sacarose tamponada).

3. As enzimas NADH oxidase, succinato oxidase e succinato desidrogenase são relativamente sensíveis ao armazenamento em condições de preservação ou de envelhecimento mitocondrial. Estas enzimas diminuem a atividade com o tempo de armazenamento.

4. As enzimas de matriz Alfa-cetoglutarato desidrogenase, aspartato aminotransferase e malato desidrogenase diminuem a atividade com o tempo de armazenamento em condições de preservação e de envelhecimento mitocondrial.

5. As condições de preservação de mitocôndrias isoladas, apresentando acoplamento fosforilativo, descrito por Montañó et al.(51), ainda que apresentando oscilações nas atividades enzimáticas, possibilitam estudos com a cadeia de transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e sistemas enzimáticos da matriz mitocondrial, durante o período de armazenamento de 5 dias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AWASTHI, Y.C.; RUZICKA, F.J.; CRANE, F.L. The relation between phospholipase action and release of NADH dehydrogenase from mitochondrial membrane. Biochim. Biophys. Acta, 203: 233-248, 1970.
02. AZZONE, G.F.; CARAFOLI, E.; MUSCATELLO, U. Biochemical properties of skeletal muscle mitochondria. II. The ATPase activity and the albumin effect. Exp. Cell Reserch., 21: 456-467, 1960.
03. BENDALL, D.S. & DE DUVE, C. Tissue-fractionation studies. 14. The activation of latent dehydrogenases in mitochondria from rat liver. Biochem. J., 74: 444-450, 1960.
04. BOIME, I.; SMITH, E.E.; HUNTER Jr, F.E. The role of fatty acids in mitochondrial changes during liver ischemia. Arch. Biochem. Biophys., 139: 425-443, 1970.
05. BRIERLEY, G.P.; MEROLA, A.J.; FLEISCHER, S. Studies of electron-transfer system. XLIX. Sites of phospholipid involvement in the electron-transfer chain. Biochim. Biophys. Acta, 64: 218-228, 1962.
06. CEREIJO-SANTALÓ, R. Mitochondrial permeability and ATPase activity. Can. J. Biochem., 45: 897-909, 1967.

07. CHAN, S.H.P. & HIGGINS Jr, E. Uncoupling activity of endogenous free fatty acids in rat liver mitochondria. Can.J.Biochem., 56: 111-116, 1978.
08. CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol., 17: 65-134, 1956.
09. CHEFURKA, W. Oxidative phosphorylation in "in vitro " aged mitochondria. I. Factors controlling the loss of the dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase activity and respiratory control in mouse liver mitochondria. Biochemistry, 5: 3887-3903 , 1966.
10. CHEN, J.C.; WARSHAW, J.B.; SANADI, D.R. Regulation of mitochondrial respiration in senescence. J. Cell. Physiol., 80: 141-148, 1972.
11. COLEMAN, R. Membrane-bound enzymes and membrane ultra structure. Biochim. Biophys. Acta, 300: 1-30, 1973.
12. DIANZANI, M.U. Restoration of oxidative phosphorylation by mitochondrial extracts. Biochim. Biophys. Acta, 22: 389-391, 1956.
13. DOUCE, R.; MANNELLA, C.A.; BONNER Jr, W.D. The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria . Biochim. Biophys. Acta, 292: 105-116, 1973.
14. DRESEL, E.I.B. Some observations on the instability of adenine nucleotides in bird-liver preparations. Biochem. J., 54: 654-659, 1953.

15. ENGLARD, S. & SIEGEL, L. Mitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. In: LOWENSTEIN, J.M. Citric acid cycle. New York, Academic, 1969, p. 99-106 . (Methods in Enzymology, 13).
16. ENZYME Nomenclature, 1978; recommendations of the nomenclature committee of the International Union of Biochemistry on the nomenclature and classification of Enzymes. New York, Academic, 1979, 606 p.
17. ERNSTER, L. & KUYLENSTIERNA, B. Outer membrane of mitochondria. In: RACKER, E. ed. Membranes of mitochondria and chloroplasts, New York, Van Nostrand Reinhold, 1970, p. 172-212.
18. ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. Oxidation and phosphorylation. New York, Academic, 1967, p. 41-47. (Methods in Enzymology, 10).
19. ESTRADA-O, S. The release of mitochondrial enzymes by uncoupling agents. Arch. Biochem. Biophys., 106 : 498-504, 1964.
20. ESTRADA-O, S.; CARABEZ, T.A.; CABEZA, G.A. Effect of phospholipids on induced enzyme release from mitochondria. Biochemistry, 5: 3432-3440, 1966.
21. FLEISCHER, S. & FLEISCHER, B. Removal and binding of polar lipids in mitochondria and outer membrane systems. In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. ed. Oxidation and phosphorylation. New York, Academic,

1967, p. 406-433. (Methods in Enzymology, 10).

22. FLEISCHER, S.; BRIERLEY, G.; KLOUWEN, H.; SLAUTTERBACK, D.B. Studies of the electron transfer system. XLVII. The role of phospholipids in electron transfer. J. Biol. Chem., 237: 3264-3272, 1962.
23. FONNESU, A. & DAVIES, R.E. The prevention of swelling of liver mitochondria in vitro. Biochem. J., 64: 769-777, 1956.
24. GAMBLE Jr., J.L. & GARLID, K.D. The permeability of the mitochondrial inner membrane to sucrose. Biochim. Biophys. Acta, 211: 223-232, 1970.
25. GILES, K.L. & SARAFIS, V. Chloroplast survival and division in vitro. Nat. New Biol., 236: 56-58, 1972.
26. GOLDBLATT, M.J. & ROMANI, R.J. Maintenance of respiratory control by beef heart mitochondria incubated at 25°C: response to protective agents and to prior stress. Arch. Biochem. Biophys., 183: 149-155, 1977.
27. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J. Biol. Chem., 177: 751-766, 1949.
28. GREEN, D.E. & HATEFI, Y. The mitochondrion and biochemical machines. Mitochondria or their equivalents are the principal energy transducers in all aerobic organisms. Science, 133: 13-19, 1961.
29. GRINNA, L.S. & BARBER, A.A. Age related changes in membrane lipid content and enzyme activities. Biochim.

Biophys. Acta, 288: 347-353, 1972.

30. GRISOLIA, S.; KNECHT, E.; HERNÁNDEZ-YAGO, J.; WALLACE, R. Turnover and degradation of mitochondria and their proteins. In: PROTEIN degradation in health and disease. Amsterdam, Excerpta Medica, 1980, p. 167-188. (Ciba Foundation Symposium 75(New Series)).
31. GUEDES, L.S.; STENCEL, M.; CAMPELLO, A.P.; NASCIMENTO, A.J. Effect of sodium oleate on oxidative metabolism of isolated mitochondria and submitochondrial particles. An. Acad. Bras. Ciênc., 54: 233-239, 1982.
32. GUTMAN, M.; KEARNEY, E.B.; SINGER, T.P. Control of succinate dehydrogenase in mitochondria. Biochemistry, 10: 4763-4770, 1971.
33. HACKENBROCK, C.R. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with changes in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. J.Cell.Biol., 30: 269-297, 1966.
34. HANSTEIN, W.G. Uncoupling of oxidative phosphorylation. Biochim.Biophys. Acta, 456: 129-148, 1976.
35. HELINSKI, D.R. & COOPER, C. Studies on the action of bovine serum albumin on aged rat liver mitochondria. J.Biol.Chem., 235: 3573-3579, 1960.
36. HODGMAN, C.D.; WEAST, R.C.; SHANKLAND, R.S.; SELBY, S.M. In: HANDBOOK of chemistry and physics. 42ed. Cleveland, Chemical Rubber, 1960, 3481 p.

37. HORECKER, B.L. & KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J.Biol.Chem., 175: 385-390, 1948.
38. JAKOVIC, S.; HADDOCK, J.; GETZ, G.S.; RABINOWITZ, M.; SWIFT, H. Mitochondrial development in liver of foetal and newborn rats. Biochem.J., 121: 341-347, 1971.
39. JENKINS, W.T.; YPHANTIS, D.A.; SIZER, I.W. Glutamic aspartic transaminase. I. Assay, purification, and general properties. J.Biol.Chem., 234: 51-57, 1959.
40. JURKOWITZ, M.; SCOTT, K.M.; ALTSCHULD, R.A.; MEROLA, A.J.; BRIERLEY, G.P. Ion transport by heart mitochondria. Retention and loss of energy coupling in aged heart mitochondria. Arch.Biochem.Biophys., 165: 98-113, 1974.
41. KIELLEY, W.W. & KIELLEY, R.K. Myokinase and adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. J. Biol.Chem., 191: 485-500, 1951.
42. KNOX, W.E.; AUERBACH, V.H.; LIN, E.C.C. Enzymatic and metabolic adaptations in animals. Physiol.Rev., 36: 164-254, 1956.
43. KUN, E.; FANSHIER, D.W.; GRASSETTI, D.R. Interaction between β -fluoro-oxaloacetate and glutamate-aspartate transaminase of heart mitochondria. J. Biol. Chem., 235: 416-419, 1960.
44. LEHNINGER, A.L. Thyroxine and the swelling and contrac

tion cycle in mitochondria. Ann.N.Y.Acad.Sci., 86: 484-493, 1960.

45. LESTER, R.L.; HATEFI, Y.; WELCH, E. Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. IV. Pyridine nucleotide binding and its relation to activity in heart mitochondria. Biochim.Biophys. Acta, 29:103-112, 1958.
46. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265-275, 1951.
47. LUZIKOV, V.N.; SAKS, V.A.; KUPRIYANOV, V.V. Studies on the stabilization of an oxidative phosphorylation system. I. Resistance of a phosphorylating system of submitochondrial particles to trypsin, due to phosphorylation of ADP. Biochim.Biophys. Acta, 253: 46-57, 1971.
48. MASSEY, V. The composition of the ketoglutarate dehydrogenase complex. Biochim.Biophys. Acta, 38: 446-460, 1960.
49. MINTZ, H.A.; YAWN, D.H.; SAFER, B.; BRESNICK, E.; LIEBELT, A.G.; BRAILOCK, Z.R.; RABIN, E.R.; SCHWARTZ, A. Morphological and biochemical studies of isolated mitochondria from fetal, neonatal, and adult liver and from neoplastic tissues. J.Cell.Biol., 34: 513-523, 1967.
50. MITCHELL, P. & MOYLE, J. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae mem-

brane of rat liver mitochondria. Eur.J.Biochem., 7: 471-484, 1969.

51. MONTAÑO, J.A.; STENCEL, M.; CAMPELLO, A.P.; NASCIMENTO, A.J. Studies on rat liver mitochondria. I. Survival at 0-4°C during a week period. Arq.Biol.Tecnol., 24: 375-384, 1981.
52. NASCIMENTO, A.J. & NASCIMENTO, K.H. Reaction of modified cytochrome c (nitrocytochrome c) with ascorbate. An.Acad.Bras.Ciênc., 48: 719-723, 1976.
53. PERRY, S.V. & GREY, T.C. A study of the effects of substrate concentration and certain relaxing factors on the magnesium-activated myofibrillar adenosine triphosphatase. Biochem.J., 64:184-192,1956,
54. PRICE, C.A.; FONNESU, A.; DAVIES, R.E. Movements of water and ions in mitochondria. Biochem.J., 64 : 754-768, 1956.
55. RACKER, E. & HORSTMANN, L.L. Mechanism and control of oxidative phosphorylation. In: MEHLMAN, M.A. & HANSON, R.W. ed. Energy metabolism and the regulation of metabolic processes in mitochondria. New York , Academic, 1972, p. 1-25.
56. RENDI, R. Water extrusion in isolated subcellular fractions. III. The importance of phospholipids in the Me^{2+} -EDTA dependent reaction. Biochim.Biophys.Acta, 84: 694-706, 1964.
57. RIDLEY, S.M. & LEECH, R.M. Division of chloroplast in an artificial environment. Nature, 227:463-465,1970.

58. ROBERTIS, E.D.P. De; SAEZ, F.A.; ROBERTIS, E.M.F. De. Biologia Celular. 9. ed. Buenos Aires, El Ateneo , 1978, p. 173-200.
59. ROMANI, R.J. & ÖZELKÖK, S. Survival of mitochondria in vitro. Physical and energy parameters. Plant Physiol., 47: 5-27, 1971.
60. ROMANI, R.J. & ÖZELKÖK, S. "Survival" of mitochondria in vitro. Physical and energy parameters. Plant Physiol., 51: 702-707, 1973.
61. ROMANI, R.J. & MONADJEM, A. Mitochondrial longevity in vitro: The retention of respiratory control. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 66: 869-873, 1970.
62. ROMANI, R.J.; TUSKES, S.E.; ÖZELKÖK, S. Survival of plant mitochondria in vitro. Form and function after 4 days at 25⁰C. Arch.Biochem.Biophys., 164: 743 - 751, 1974.
63. SEKUZU, I.; JURTSUK Jr.,P.; GREEN, D.E. Studies on the electron transfer system. LI. Isolation and characterization of the D-(-)- β -hydroxybutyric apodehydrogenase from beef heart mitochondria. J.Biol.Chem. 238: 975-982, 1963.
64. SETTLEMIRE, C.T.; HUNTER, G.R.; BRIERLEY, G.P. Ion transport in heart mitochondria. XIII. The effect of ethylenediaminetetra acetate on monovalent ion uptake. Biochim.Biophys.Acta, 162:487-499, 1968.
65. SCARPA, A. & LINDSAY, J.G. Maintenance of energy-linked functions rat-liver mitochondria aged in pre -

- sence of nupercaine. Eur.J.Biochem., 27: 401-407 , 1972.
66. SILIPRANDI, D.; SILIPRANDI, N.; SCUTARI, G.; ZOCCARATO, F. Restoration of some energy linked processes lost during the ageing of rat liver mitochondria . Biochem. Biophys.Res.Commum., 55: 563-567, 1973.
67. SINGER, T.P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and α -glycero phosphate dehydrogenases. In: Glick, D. ed. Methods Biochemical Analysis, New York, John Wiley & Sons, 1974, v.22, pp 123-175.
68. SLATER, E.C. & CLELAND, K.W. The effect of calcium on the respiratory and phosphorylative activities of heart-muscle sarcosomes. Biochem. J., 55: 566-580, 1953.
69. SMITH, L. and Camerino, P.W. Comparison of polarographic and spectrophotometric assays for cytochrome c oxidase activity. Biochemistry, 2: 1427-1433, 1963.
70. SORDAHL, L.A.; BLAILOCK, Z.R.; SCHWARTZ, A. Changes in mitochondrial ultrastructure: the problem of biochemical correlation. J.Cell.Biol., 39: 127a-128a, 1968.
71. SOTTOCASA, G.L.; KUYLENSTIERNA, B.; ERNSTER, L.; BERGSTRAND, A. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. J.Cell Biol., 32: 415-438, 1967.

72. SUMNER, J. B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. Science, 100: 413-414, 1944.
73. TRIBE, M.A. & ASHHURST, D.E. Biochemical and structural variations in the flight muscle mitochondria of ageing blowflies, Calliphora erythrocephala. J. Cell Sci., 10: 443-469, 1972.
74. TRUMP, B.F.; DUTTERA, S.M.; BYRNE, W.L.; ARSTILA, A.U. Membrane structure: lipid-protein interactions in microsomal membranes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. , 66: 433-440, 1970.
75. VAN SCHIJNDEL, B.C.; REITSEMA, A.; SCHERPHOF, G.L. In vitro stimulation of lecithin synthesis in rat liver mitochondria and microsomes after treatment with phospholipase C. Biochem.Biophys.Res.Commun., 55 : 568-573, 1973.
76. WAINIO, W.W. The mammalian mitochondrial respiratory chain. New York, Academic, 1970, 499 p.
77. WEINBACH, E.C. A procedure for isolating stable mitochondria from rat liver and kidney. Anal.Biochem., 2: 335-343, 1961.
78. WILSON, P.D. Enzyme patterns in young and old mouse livers and lungs. Gerontologia, 18: 36-54, 1972.
79. WILSON, P.D. & FRANKS, L.M. Enzyme patterns in young and old mouse kidneys. Gerontologia, 17: 16-32, 1971.
80. WILSON, P.D. & FRANKS, L.M. The effect of age on mito

chondrial ultrastructure and enzymes. Adv.Exp.Med. Biol., 53: 171-183, 1975.

81. WITTER, R.F. & COTTONE, M.A. A study of some factors involved in the swelling of isolated mitochondria. Biochim.Biophys. Acta, 22: 365-371, 1956.
82. WOJTCZAK, L. & LEHNINGER, A.L. Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 51: 442-456, 1961.
83. WOLKOWICZ, P.E. & McMILLIN-WOOD, J. Glutamate-supported calcium movements in rat liver mitochondria: effects of anions and pH. Arch.Biochem.Biophys., 209: 408-422, 1981.
84. ZAKIM, D. Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. I. The effect of phospholipases and phospholipids on glucose 6-phosphatase. J.Biol.Chem., 245: 4953-4961, 1970.

7. ERRATA

Introduzir: No item de Referências Bibliográficas as seguintes referências:

85. AMBE, K.S. & CRANE, F.L. Studies on the electron transport system. XXVI. Specificity of coenzyme Q and coenzyme Q derivatives. Biochim. Biophys. Acta, 43:30-40, 1960.
86. TOOKEY, H.L. & BALLS, A.K. Plant phospholipase D. II. Inhibition of succinic oxidase by cottonseed phospholipase D. J. Biol. Chem., 220:15-23, 1956.

Desconsiderar: No item de Referências Bibliográficas as referências correspondentes aos números:

5 - 19 - 35 - 63 - 74 - 75