

ROSANA CARDOSO BARRETO ALMASSY

**FISIOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DE MITOCÔNDRIAS CAPTADORAS E
NÃO-CAPTADORAS DE CÁLCIO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

ROSANA CARDOSO BARRETO ALMASSY

**FISIOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DE MITOCÔNDRIAS CAPTADORAS E
NÃO-CAPTADORAS DE CÁLCIO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de dezembro de 2001.

Prof. Eldo Antônio Monteiro da Silva

Prof. João Marcos de Araújo
(Conselheiro)

Prof^ª. Rosane M^a. de Aguiar Euclides

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de aprofundar minha formação acadêmica.

Ao meu marido Alexandre que me deu muito mais que apoio moral, deu-me esperança, muito amor e ajuda nos trâmites de computação e formatação.

Ao orientador Marco Aurélio Pedron e Silva, por ter aceito assumir a orientação desta pesquisa e ter realmente acompanhado de perto todo o desenvolvimento do trabalho, pelo imenso apoio, dedicação e palavras amigas, que me encorajaram a prosseguir trabalhando mesmo nas horas em que tudo parecia obscuro.

Aos professores João Marcos de Araújo e Rosane Aguiar Euclides por terem contribuído com suas experiências em microscopia eletrônica, enriquecendo significativamente este trabalho.

Ao professor Kioshi Matsuoka que, mesmo com imensas ocupações, acabou participando ativamente do desenvolvimento deste trabalho.

À professora Rita Maria de Carvalho-Okano, pela amizade, respeito e crença na minha capacidade de luta.

À minha mãe Sônia, ao meu pai Pedro e aos meus irmãos Rosa, Lia, Rivaldo e Reinaldo, por, mesmo distantes, terem sempre me apoiado na realização deste trabalho.

Aos meus amigos especiais Dimmy e Fanny, pelo companheirismo e alegria nas horas de angústia e sofrimento.

A todos os meus amigos, que, direta ou indiretamente, acreditaram no êxito deste trabalho, incentivando e dando o suporte necessário nos momentos em que tudo parecia complicado, em especial: Danilo, Elaine, Oscar, Telêmaco, Gemma, Alicinha, Silvana, Luciana, Patrícia, Pedro, Rosário, Amélia, João, Fran, Cassiano e Sabrina.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pela amizade e atenção, em especial à Dona Ângela e Dona Glória por nos tratarem com carinho e respeito.

À FAPEMIG e à CAPES, pela concessão das bolsas de estudo.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta pesquisa e contribuíram para que tudo transcorresse na mais perfeita harmonia.

BIOGRAFIA

ROSANA CARDOSO BARRETO ALMASSY, filha de Pedro Nunes Barreto e Sônia Maria Cardoso Barreto, nasceu em Salvador, Estado da Bahia, em 04 de março de 1970.

Em 1991, ingressou no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG. Durante todo o período de sua graduação, buscou formação eclética, tendo realizado estágios em instituições de diversos ramos da Biologia e, atuou durante 2,5 anos como monitora de disciplinas associadas à Botânica. Após diplomar-se em setembro de 1996 iniciou o exercício da docência de ensino fundamental e médio ministrando aulas de Ciências e Biologia.

Em 1999, iniciou o curso de Mestrado em Botânica no Programa de Pós-Graduação, do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da UFV.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1. Obtenção do Material Vegetal.....	6
3.2. Isolamento das Mitocôndrias	8
3.2.1. Mitocôndrias de Hipocótilos de Soja e Coleóptiles de Milho	8
3.2.2. Mitocôndrias de Raízes de Beterraba e Tubérculos de Batata...	8
3.3. Determinação de Proteína	9
3.4. Análise do Consumo de Oxigênio	9
3.5. Avaliação da Captação de Ca ²⁺	10
3.6. Análise Ultraestrutural	10
3.6.1. Coleta das Amostras	10
3.6.2. Preparo do Material para a Análise Ultraestrutural	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1. Consumo de O ₂	12
4.2. Captação de Cálcio.....	14
4.3. Análise Ultraestrutural	18
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

ALMASSY, Rosana Cardoso Barreto, MS. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2001. **Fisiologia e ultraestrutura de mitocôndrias captadoras e não-captadoras de cálcio**. Orientador: Marco Aurélio Pedron e Silva. Conselheiros: João Marcos de Araújo e Kioshi Matsuoka.

Foram analisadas mitocôndrias isoladas de hipocótilos de soja, coleóptiles de milho, raízes de beterraba e tubérculos de batata, no sentido de comparar ultraestruturalmente mitocôndrias que apresentam transportador de Ca^{2+} (soja e milho) com outras que são incapazes de acumular este cátion (beterraba e batata). As mitocôndrias foram analisadas quanto à sua atividade respiratória, grau de acoplamento, consumo de Ca^{2+} e aspectos de sua ultraestrutura. A análise ultraestrutural evidenciou o alto grau de purificação das mitocôndrias isoladas, com membranas íntegras, em sua maioria, variando do estado ortodoxo, para o estado condensado, em consequência da adição de ADP ao meio de reação e retorno ao estado ortodoxo inicial, após a fosforilação de todo o ADP adicionado. Na matriz, finamente granulosa, foram observados grânulos esféricos e uniformes, presentes em todos os tipos de mitocôndrias, independente de serem capazes de captar Ca^{2+} ou não. Não foram observadas alterações nesse tipo de granulação quando as mitocôndrias de soja e de milho encontravam-se em atividade de captação de Ca^{2+} . Entretanto, ao contrário das mitocôndrias isoladas de beterraba, as mitocôndrias de soja e de milho passaram para a conformação condensada, enquanto captavam Ca^{2+} do meio de reação.

ABSTRACT

ALMASSY, Rosana Cardoso Barreto, MS. Universidade Federal de Viçosa, December, 2001. **Physiology and ultrastructure of capturing and non-capturing calcium mitochondria**. Adviser: Marco Aurélio Pedron e Silva. Committee members: João Marcos de Araújo and Kiyoshi Matsuoka.

Mitochondria isolated from soybean hypocotyls, maize coleoptiles, sugarbeet roots and potato tubers were searched by considering a group able in capturing Ca^{2+} (soybean and maize) and another one unable in that activity (sugarbeet and potato). Mitochondria were evaluated in relation to respiratory activity, coupling degree, Ca^{2+} uptake and ultrastructural profile. The electron microscopy showed a high degree of purification, and little contamination with other organelles, such as peroxisomes and proplastids. Mostly, the isolated mitochondria showed complete membranes, varying from the orthodox to the condensed state, as a response to ADP additions. In all types of mitochondria, uniform and spherical granules were present in their matrix, independently on their ability to capture Ca^{2+} . Only mitochondria from soybean and maize changed from orthodox to condensed state while performing Ca^{2+} uptake, without exhibiting alterations in the granulation pattern.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina- 5'-difosfato.
ATP	-Adenosina- 5'-trifosfato.
BSA	-Albumina de soro bovino.
cADPR	- Adenosina monofosfato ribose cíclico.
CCCP	- Carbonil cianeto clorofenil-hidrazona
cAMP	- Adenosina monofosfato cíclico.
cGMP	-Guanosina monofosfato cíclico
EGTA	- Ácido etileno glicol-bis-(β-aminoetil éter)-NN'-tetra acético.
HEPES	- Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico.
IP ₃	- Inositol trifosfato.

1. INTRODUÇÃO

As mitocôndrias eram inicialmente descritas como cilindros rígidos e alongados, com diâmetros de 0,5 a 1,0 μm , assemelhando-se a bactérias. Porém, microfilmagens em intervalos definidos, utilizando células vivas, mostraram que as mitocôndrias são organelas notavelmente móveis e plásticas, mudando constantemente as suas formas, podendo inclusive fundir-se umas com as outras e separar-se novamente (ALBERTS *et al.*, 1994). As mitocôndrias possuem um plano tridimensional simples, variando sua forma em diferentes tipos de célula, podendo assumir a forma de bastão, esférica ou outras formas não definidas. Além disso, seu tamanho pode ser variável de espécie para espécie. A membrana mitocondrial interna, geralmente, apresenta-se paralela ao contorno da membrana mitocondrial externa invaginando-se em direção à matriz para formar as cristas mitocondriais, que são numerosas e se dispõem em vários planos dentro da mitocôndria. As cristas podem se dispor de forma lamelar, tubular, lamelar e tubular, ramificadas e anastomosadas ou podem ter outras formas geométricas. A matriz mitocondrial apresenta-se internamente às cristas, possui aspecto homogêneo e é finamente granulada, onde muitas vezes destacam-se corpos eletrodensos interpretados por BOZZOLA & RUSSELL (1992) como sendo sais de cálcio. HACKENBROCK & CAPLAN (1969) descrevem a configuração chamada de lamelar por BOZZOLA & RUSSELL (1992) como sendo uma configuração “ortodoxa”, e a configuração tubular como sendo “condensada”.

Durante a fosforilação oxidativa, induzida pela adição de ADP, as mitocôndrias passam de uma conformação ortodoxa para a conformação condensada, caracterizada por redução no volume interno da matriz. HACKENBROCK & CAPLAN (1969) observaram que mitocôndrias isoladas de fígado de rato no estado fosforilativo 3 (condensado) alteram sua conformação, para ortodoxa, à medida que a concentração de cálcio no meio de reação aumenta. Salienta-se ainda que, quanto mais cálcio for adicionado, menor será o volume interno da matriz mitocondrial.

A análise ultraestrutural pode revelar detalhes que evidenciam diferenças significativas entre espécies que se deseja comparar. Por exemplo, PEVERLY et al. (1974) observaram que mitocôndrias isoladas de milho, tratadas com fosfato e cálcio adicionados ao meio de reação apresentam poucos grânulos eletrondensos e uniformes, oriundos da precipitação do fosfato de cálcio. A intensidade de deposição desses grânulos depende do tempo de incubação, da concentração do substrato respiratório e das concentrações de cálcio e fosfato inorgânico. Esses depósitos de fosfato de cálcio inicialmente observados como amorfos tendendo a esféricos, passam a apresentar extremidades afiladas quando a concentração de cálcio é aumentada.

O cálcio mitocondrial desempenha papel primordial em diversos processos celulares, atuando como molécula sinalizadora intracelular e interferindo no controle da obtenção de energia, da atividade de canais iônicos e, possivelmente, na morte celular programada (POZZAN & RIZZUTO, 2000).

Além dos íons Ca^{2+} , são conhecidos outros mensageiros secundários, como o inositol trifosfato (IP_3), a adenosina monofosfato cíclico (cAMP), a guanosina monofosfato cíclico (cGMP) e adenosina monofosfato ribose cíclico (cADPR) (d'AUZAC, 1994). Este mesmo autor considera que, em plantas, o papel do cAMP não está claramente demonstrado, porém o cálcio parece ser um mensageiro secundário essencial para a transdução de estímulos externos. Para que esses mensageiros atuem como mediadores, a sua concentração intracelular deve diminuir ou aumentar rapidamente em resposta a sinais extracelulares. As alterações de concentração dos mensageiros secundários devem ser rápidas e podem ser obtidas por aumentos na síntese da molécula, pela sua degradação ou pela sua remoção para compartimentos celulares

diversos (ALBERTS *et al.*, 1994; d'AUZAC, 1994; CLAPHAM, 1995; McAINSH & HETERINGTON, 1998).

A capacidade citoplasmática de absorção de cálcio pelas células situa-se numa faixa de 0,1 a 0,5 μM (MALHÓ *et al.*, 1998; TREWAVAS, 1999). O excesso de cálcio que chega ao citoplasma pode ser bombeado e armazenado em certas organelas. O vacúolo é o maior reservatório de cálcio intracelular no organismo vegetal e pode contribuir para o processo de sinalização celular. Outros reservatórios importantes intracelulares de cálcio são o retículo endoplasmático, as mitocôndrias, os cloroplastos e, possivelmente, vesículas do complexo de Golgi (CHIANG & DILLEY, 1987; KAUSS, 1987; TREWAVAS, 1999). No vacúolo estão presentes depósitos mais densos de cálcio, enquanto no retículo endoplasmático, no citoplasma e nas mitocôndrias se encontram depósitos menos densos (LAZZARO & THOMSON, 1992).

Vários estudos têm demonstrado que as mitocôndrias de células animais acumulam Ca^{2+} quando elevadas concentrações de hormônios são lançadas no sistema circulatório (BOOTMAN & BERRIDGE, 1995). Essas organelas podem acumular cerca de 0,5 mM de Ca^{2+} em sua matriz, devido ao gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento mitocondrial de prótons, resultante do transporte de elétrons pela cadeia respiratória (CLAPHAM, 1995). Segundo análise apresentada por GUNTER *et al.* (1994), diversos autores têm sugerido que as mitocôndrias de tecidos animais: regulam a concentração de Ca^{2+} citosólico livre; proporcionam a diminuição temporária do excesso de Ca^{2+} livre, até que a concentração citosólica volte ao normal; estão aptas a liberar Ca^{2+} , se forem ativadas; protegem o citosol do dano que uma elevada concentração de Ca^{2+} pode causar; regulam o Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial para a ativação de desidrogenases sensíveis ao cálcio e outros processos metabólicos associados a esse íon. Entretanto, outros estudos indicam que dentro da célula, sob condições normais, as mitocôndrias não contêm muito Ca^{2+} e, nessas condições, não serviriam nem para controlar a concentração de Ca^{2+} citosólico e nem para liberá-lo, caso fosse necessário (GUNTER *et al.*, 1994; RUTTER & DENTON, 1989; POZZAN & RIZZUTO, 2000). Considerando-se os tecidos vegetais, as informações são também contraditórias. TREWAVAS & MALHÓ (1997) acreditam que mitocôndrias e

cloroplastos não somente controlam a concentração de Ca^{2+} , como também possuem seu próprio sistema interno de sinalização por Ca^{2+} , que regula a respiração celular e o ciclo de Calvin. Em células vegetais tem sido observado que o ácido abscísico (ABA) e auxina promovem aumentos na concentração de Ca^{2+} citosólico. O efeito do ABA está geralmente associado com um incremento no pH, enquanto a auxina acidifica o citosol. Porém, ainda não está claramente demonstrado que o efeito desses hormônios em canais iônicos seja mediado por pH ou pela concentração de Ca^{2+} citosólico (GRABOV & BLATT, 1998).

O transporte de cálcio em mitocôndrias de células animais é do tipo uniporte, originado através do potencial de membrana (negativo internamente), produzido pela operação da cadeia respiratória. Se as mitocôndrias acumulam grandes quantidades de cálcio na presença de fosfato, armazenam esse cálcio na matriz como sais de fosfato insolúveis cuja liberação ocorre muito vagarosamente. Se o acúmulo é limitado, a liberação é rápida e dependente de duas vias. A primeira, mais eficiente, possibilita a troca de Ca^{2+} por Na^+ e a segunda troca Ca^{2+} por H^+ (POZZAN & RIZZUTO, 2000).

Em mitocôndrias de plantas o sistema transportador de Ca^{2+} é semelhante ao de animais, possuindo uma atividade mais baixa e, exigindo um co-transporte de fosfato (MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS et al., 1986). PERVELY et al. (1974) afirmam que este co-transporte seria o responsável por depósitos grosseiros de fosfato de cálcio no interior das mitocôndrias e, também que alguns grânulos discretos intramitocondriais, interpretados como sendo fosfato de cálcio por outros autores, são na verdade artefatos de preparação do material para microscopia eletrônica.

Em células animais, aumentos na concentração de cálcio citossólico geram mudanças no metabolismo celular e geralmente conduzem ao aumento da demanda energética que é suprida pelo aumento na produção de ATP pelas mitocôndrias. Esse aumento na síntese de ATP possibilita a ativação, via cálcio, de três enzimas que participam do ciclo de Krebs: a piruvato desidrogenase, a isocitrato desidrogenase e a oxoglutarato desidrogenase (RUTTER & DENTON, 1989). MACCORMACK & DENTON (1981) trabalhando com vários tipos de vertebrados, verificaram que a isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ é ativada pelo cálcio numa concentração de $30 \mu\text{M}$. Estes

mesmos autores verificaram que em enzimas de insetos e batatas o cálcio pouco influencia a atividade dessas enzimas e uma possível explicação para este fato seria a ausência de transportadores de cálcio em mitocôndrias vegetais. Realmente, transportadores de cálcio não foram encontrados em mitocôndrias de folhas brancas de repolho, tubérculos de batata e raízes de beterraba (MARTINS & VERCESI, 1985; SILVA, 1991). Porém, sistemas específicos de transporte de cálcio foram constatados em mitocôndrias de coleóptiles de milho e hipocótilos de soja, feijão e café (CARNIERI, 1986; MARTINS *et al.*, 1986).

BORGES (1999) investigou o efeito do cálcio sobre a atividade da isocitrato desidrogenase de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata e de hipocótilos de soja. Observou que, em ambos os casos, o cálcio não alterou a atividade desta enzima, o que não permite correlacionar a capacidade das mitocôndrias em armazenar cálcio com um possível controle diferencial deste cátion sobre a atividade desta enzima do ciclo de Krebs.

2. OBJETIVOS

Diante da persistência de dúvidas quanto ao papel do acúmulo de cálcio em mitocôndrias vegetais, o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a atividade respiratória, o grau de acoplamento e a capacidade de captação de cálcio das mitocôndrias utilizadas nos experimentos;
- Verificar se existem diferenças ultraestruturais entre mitocôndrias de vegetais que captam cálcio (isoladas de hipocótilos de soja e coleóptiles de milho) e mitocôndrias que não captam cálcio (isoladas de tubérculos de batata e raízes de beterraba).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do Material Vegetal

Foram utilizados coleóptiles de milho (*Zea mays* L.), raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.), hipocótilos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L., cv. Binje).

Sementes de soja, variedade UFV 16, fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da UFV, foram lavadas em água corrente, tratadas com hipoclorito de sódio 0,5%, por 15 minutos e, posteriormente, lavadas em água destilada por cinco vezes. Após lavagem, as sementes foram colocadas para germinar, umedecidas e mantidas no escuro, à temperatura de 28°C, dentro de caixas plásticas com areia, previamente tratadas com hipoclorito de sódio a 0,5%. As sementes de milho, variedade AG 1051, também fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da UFV, foram lavadas em água corrente, tratadas com hipoclorito de sódio 0,5% por 60 minutos e, novamente lavadas em água destilada por cinco vezes. Finalmente foram deixadas por duas horas imersas em água para acelerar a embebição.

Após cinco dias de plantio, os hipocótilos de soja e os coleóptiles de milho foram coletados para a extração das mitocôndrias. As batatas e beterrabas frescas foram compradas no mercado local e mantidas dentro de sacos plásticos, em câmara refrigerada, até o momento da utilização.

3. 2. Isolamento de Mitocôndrias

3.2.1. Mitocôndrias de Hipocótilos de Soja e Coleótilos de Milho

Aproximadamente 100g de hipocótilos de soja e coleótilos de milho foram destacados de plântulas recém germinadas, cortados finamente com tesoura e suspensos em 500 mL de meio de extração básico [manitol 400 mM, albumina de soro bovino (BSA) 0,1%, ácido etileno glicol-bis-(β -aminoetil éter)-NN'-tetra acético (EGTA) 2 mM, cisteína 3 mM e ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico (HEPES) 10 mM, em pH 7,6], de acordo com DIOLEZ & MOREAU (1983).

Foi utilizado um homogeneizador do tipo POLYTRON para romper os tecidos, durante quatro segundos, no nível cinco de intensidade. O extrato foi filtrado através de oito camadas de gaze e uma camada de seda, o pH da suspensão ajustado para 7,2 com NaOH 10N. A suspensão obtida foi centrifugada a 1.200 x g, por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 9.000 x g, por 10 minutos. O precipitado obtido foi suspenso em aproximadamente 40 mL de meio de isolamento (manitol 300 mM, BSA 0,1%, EGTA 0,1 mM e HEPES 10 mM, pH 7,2) e submetido a uma nova centrifugação de 6.800 x g, durante 10 minutos. O sedimento resultante, rico em mitocôndrias foi suspenso com o auxílio de um pincel, no volume mínimo possível (~500 μ L) de meio de suspensão (manitol 300 mM, BSA 0,1% e HEPES 10 mM, pH 7,2), para a obtenção da suspensão mitocondrial.

3.2.2. Mitocôndrias de Raízes de Beterraba e Tubérculos de Batata

Aproximadamente 300g de tubérculos de batata foram cortados e colocados em uma centrífuga doméstica do tipo WALITA para a ruptura dos seus tecidos. Durante esta etapa foi adicionado meio de extração a 4°C. Após homogeneização, o material foi filtrado em 8 camadas de gaze e uma camada de seda e o pH ajustado para 7,2 com NaOH 10N . Primeiramente, o extrato foi centrifugado a 700x g por 5 minutos, para que o amido fosse retirado. Posteriormente, o material foi submetido a centrifugação diferenciada para

fracionamento celular, como descrito no ítem anterior. O isolamento de mitocôndrias a partir de raízes de beterraba seguiu o mesmo procedimento do isolamento de tubérculos de batata, usando-se 300 g de raízes de beterraba, porém não foi necessária a primeira centrifugação.

3.3. Determinação de Proteína

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se uma curva padrão de BSA. Três repetições das amostras foram preparadas, adicionando-se 10 µL da suspensão mitocondrial a 90 µL de água. Desta mistura foram retirados 10 µL e acrescentados a 990 µL de água. Em seguida, foram adicionados 5 mL da solução de Coomassie – Blue, da mesma forma que nos padrões. Após dois minutos (e antes de uma hora) as absorbâncias foram determinadas a 595 nm.

3.4. Análise do Consumo de Oxigênio

Foram testadas as atividades respiratórias mitocondriais utilizando-se um eletrodo específico de oxigênio (do tipo Clark) acoplado a um registrador. Os registros de consumo de O₂ foram feitos por meio da adição de 0,5 mg de proteína mitocondrial em 6,0 ml de meio de reação, a 25°C, contendo 300 mM de Manitol, 20 mM de KCl, 2 mM de HEPES, 0,1% de BSA, 6 mM de KH₂PO₄, 6 mM de MgCl₂, 5 mM de succinato e 100 µM de ATP. Foram feitas 2 adições de ADP a 100 µM, a fim de se poder avaliar as variações na velocidade de respiração nos estados 3 e 4, para cálculo do controle respiratório.

3.5. Avaliação de Captação de Ca²⁺

Os testes fisiológicos de captação de cálcio foram realizados acompanhando-se as variações na absorvância do corante Arsenazo III, de acordo com THOMAS (1982), em espectrofotômetro HITACHI U-2000 (acoplado a um registrador), a um comprimento de onda de 652 nm.

Foram adicionados 2 mg de proteína mitocondrial, em 6,0 ml meio de reação contendo 300 mM de Manitol, 20 mM de KCl, 2 mM de HEPES, 0,1% de BSA, 6 mM de KH₂PO₄ e 25 μM de Arsenazo III. As variações na absorvância do arsenazo foram acompanhadas ao longo de 10 minutos, a 28°C, sob agitação contínua.

No transcorrer dos experimentos foram realizadas 3 adições de Ca²⁺, totalizando 100 μM, além de 2 mM de succinato. Ao final de cada traçado de captação de cálcio, foi adicionado CCCP (0,7 μM) visando obter um desacoplamento artificial das mitocôndrias isoladas.

3.6. Análise Ultraestrutural

3.6.1. Coleta das Amostras

Durante os experimentos de avaliação da qualidade fisiológica das mitocôndrias foram retiradas amostras das mesmas para análise ultraestrutural.

Nos traçados do consumo de O₂ as amostras foram coletadas de mitocôndrias energizadas (em presença de succinato) antes da adição de ADP, durante a fosforilação (estado 3, caracterizado pelo aumento na taxa respiratória, conseqüente da adição de ADP) e após a fosforilação de todo o ADP adicionado (estado 4), conforme assinalado na figura que apresenta a atividade respiratória das mitocôndrias obtidas (página 13).

Nos experimentos de avaliação da absorção de Ca²⁺, as amostras foram coletadas antes da energização das mitocôndrias (pela adição de succinato), após a adição de succinato (durante a captação do Ca²⁺ adicionado) e após o desacoplamento resultante da adição de CCCP, conforme assinalado na figura

que representa a atividade de captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias analisadas (páginas 15 e 17).

Nos momentos assinalados anteriormente, foram retiradas alíquotas de 1,5 ml, colocadas em tubos Eppendorf, que foram centrifugadas a $12000 \times g$, por 2 minutos, para precipitação das mitocôndrias.

3.6.2. Preparo do Material para a Análise Ultraestrutural

As mitocôndrias foram fixadas em solução contendo 2% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído preparados em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2 e, acrescida de 3% de sacarose, 5mM de cloreto de cálcio à temperatura de 4°C durante 18 horas (KARNOVSKY, 1965 - modificado). Em seguida, os materiais foram lavados em solução de cacodilato de sódio 0,1M, acrescido de 3% de sacarose e 5mM de cloreto de cálcio, por 120 minutos, com trocas em intervalos de 15 minutos. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1%, utilizando-se da mesma solução descrita no ítem anterior, porém acrescida de 0,8% de ferricianeto de potássio, por um período de quatro horas, à temperatura de 4°C. As mitocôndrias foram lavadas com tampão cacodilato em seguida em água destilada e, posteriormente, foram desidratadas, por meio de uma série etanólica de 30% a 100%.

Após a desidratação, as mitocôndrias foram embebidas em uma mistura de resina SPURR ERL-4206, com etanol e, finalmente, emblocadas em resina pura (SPURR, 1969). Os blocos foram levados para polimerização em estufa, à temperatura de 70°C por 8 horas.

Os cortes ultrafinos, com espessura de 80 a 100 nm foram obtidos em um ultramicrótomo SORVAL MT2 - B, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da UFV, com auxílio de navalhas de vidro. Os cortes foram dispostos sobre telas de cobre de 100 mesh, cobertas com filme de FORMVAR. A contrastação foi realizada, tratando-se os cortes com uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% (25 a 30 minutos) e citrato de chumbo em solução de hidróxido de sódio 1N (10 a 15 minutos).

As telas foram levadas para observação em microscópio eletrônico de transmissão, marca ZEISS modelo 109, do Departamento de Fitopatologia da UFV, com voltagem de aceleração de 80 kV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Consumo de O₂

A Figura 1 representa o traçado de consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas a partir de raízes de beterraba. As mitocôndrias de hipocótilos de soja, coleóptiles de milho e tubérculos de batata comportaram-se de forma semelhante e, por essa razão, os seus traçados foram omitidos. Observa-se que a adição de ADP ao meio de reação resultou em um incremento na velocidade de consumo de O₂ (estado respiratório 3), o qual retornou a valores inferiores logo após a fosforilação de todo o ADP adicionado (estado respiratório 4). Os controles respiratórios avaliados após a segunda adição de ADP foram de 2,5 e 2,7, enquanto que a razão ADP/O ficou igual a 1,7. Estes valores são indicativos da boa qualidade dos preparados mitocondriais.

Segundo HALL et al. (1982), o controle respiratório varia de 2 a 10; enquanto que a razão ADP/O de 0,8 a 2,7, dependendo diretamente do substrato respiratório utilizado e do grau de acoplamento das mitocôndrias isoladas. Na verdade, raros são os registros de controles respiratórios superiores a 3,0, quando se utiliza mitocôndrias isoladas de tecidos vegetais (MARTINS & VERCESI, 1985; CARNIERI, 1986; SILVA, 1991). Valores de controle respiratório superiores a 2,0 indicam que o ADP adicionado está sendo efetivo em promover a aceleração da atividade respiratória, uma vez que o

potencial de membrana está sendo utilizado para promover a fosforilação do ADP (CHANCE & WILLIAMS, 1956; DAY et al., 1987; BRYCE et al., 1990).

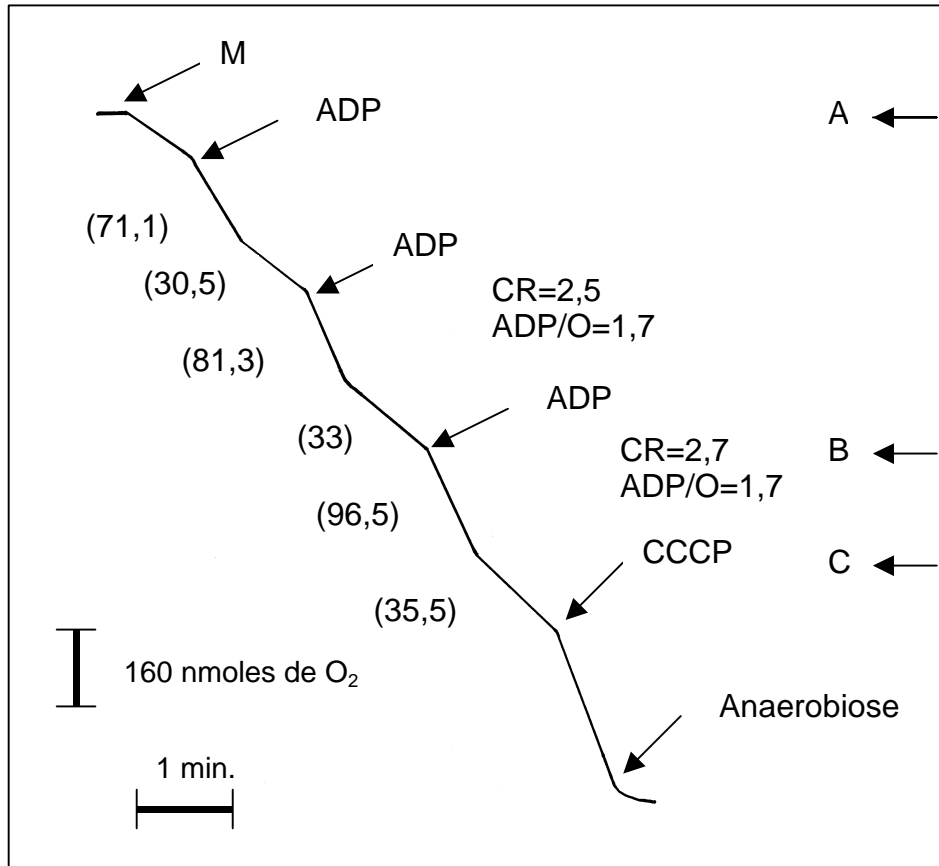


Figura 1 – Atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.) durante o tempo de um minuto. As setas indicam: M - adição de mitocôndrias (0,5 mg de proteína); ADP - adição de ADP (100 μM) e CCCP (0,7 μM). Os números entre parênteses referem-se às velocidades de consumo de O_2 , expressos em $\text{nmoles de } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. CR - Controle Respiratório. A, B e C indicam os momentos nos quais foram retiradas amostras para análise ultraestrutural. Este traçado é representativo de uma série de 5 (cinco) repetições.

De modo semelhante, as razões ADP/O de 1,7 indicam que o aproveitamento da energia armazenada pelo potencial de membrana está próximo do máximo teórico possível. Quando se utiliza succinato como substrato respiratório, a passagem dos elétrons pela cadeia respiratória apenas envolve dois sítios de conservação de energia, o que pode render até 2,0 ATP (MITCHELL, 1961; MITCHELL, 1980; TAIZ & ZEIGER, 1998). O valor de 1,7 indica que cerca de 85% da energia armazenada no potencial de membrana está sendo aproveitada na síntese de ATP, o que só é possível quando se tem pelo menos 85% de mitocôndrias com membranas íntegras.

4.2. Captação de Cálcio

A Figura 2 mostra a captação de cálcio por mitocôndrias isoladas de hipocótilos de soja, indicada pela queda na absorbância do arsenazo, após a adição de succinato. As mitocôndrias de coleóptiles de milho comportaram-se de forma semelhante e, por isso, os seus traçados não foram apresentados.

Considerando as mitocôndrias de vegetais, a entrada de Ca^{2+} é simultânea à entrada de fosfato, efetuada por um simporte Ca^{2+}/Pi , e ocorre por um processo eletroforético, em resposta ao potencial elétrico de membrana, gerado pelo bombeamento de prótons durante o transporte de elétrons pela cadeia respiratória (CARNIERI et al., 1987; SILVA et al., 1992).

Vários são os registros de captação de Ca^{2+} envolvendo mitocôndrias isoladas de soja e de milho (MARTINS & VERCESI, 1985; CARNIERI, 1986; SILVA, 1991), sendo que o traçado apresentado foi executado no sentido de confirmar que as variedades utilizadas (Soja “UFV-16” e Milho “AG 1051”) se comportam de modo semelhante aos dados da literatura, uma vez que há grandes diferenças entre as espécies utilizadas ou mesmo entre as variedades de uma mesma espécie (CARNIERI et al., 1987; CHEN & LEHNINGER; DIETER & MARMÉ, 1980).

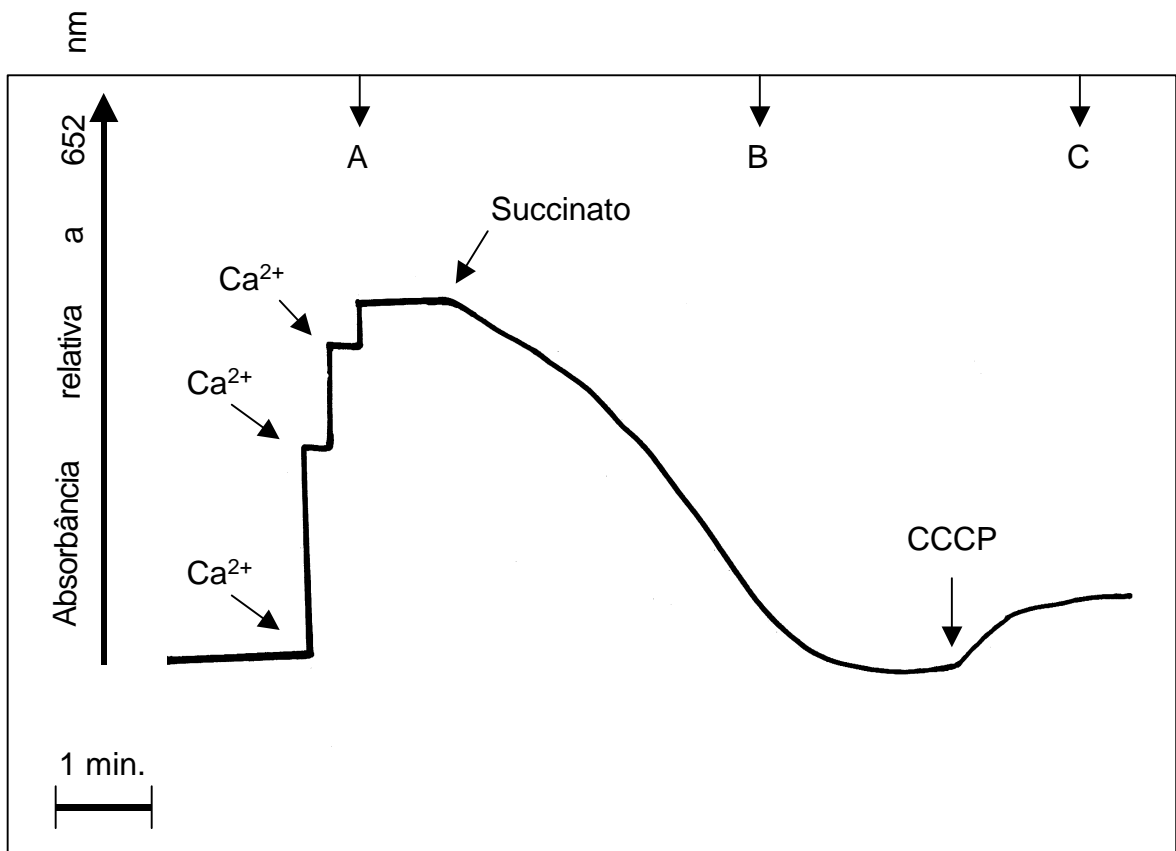


Figura 2 – Captação de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de coleótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill.). O traçado foi iniciado com meio de reação já contendo mitocôndrias (2,0 mg de proteína) e arsenazo III (25 μM), em 3 ml de meio de reação. Onde indicado, foram feitas três adições de Ca^{2+} , totalizando 100 μM , succinato (2,0 mM) e CCCP (0,7 μM). As letras A, B e C indicam os momentos em que foram retiradas amostras para análise ultraestrutural. Este traçado é representativo de uma série de cinco repetições.

Na Figura 3, o traçado efetuado com mitocôndrias isoladas de raízes de beterraba em presença de Arsenazo III indicaram que as mesmas não são capazes de captar o Ca^{2+} adicionado ao meio de reação. Observou-se que não houve variação da absorbância do Arsenazo após a adição do substrato respiratório (succinato). Isto indica que, mesmo após a sua energização e o estabelecimento de um potencial de membrana suficiente para o transporte de Ca^{2+} , este cátion não foi captado pelas mitocôndrias de beterraba. Realmente, o transportador mitocondrial de Ca^{2+} não é de ocorrência universal entre os vegetais, existindo registros de sua ausência em mitocôndrias de folhas brancas de repolho, tubérculos de batata e raízes de beterraba (MARTINS & VERCESI, 1985; CARNIERI et al., 1987; SILVA et al., 1992). Também neste caso, o traçado foi efetuado no sentido de confirmar que as variedades disponíveis se comportavam do mesmo modo que os registros da literatura, além de permitir a coleta de amostras para a análise ultraestrutural.

Entre os animais, os numerosos registros da literatura indicam a universalidade da presença de transportador mitocondrial de Ca^{2+} (CARAFOLI, 1979; McCORMACK et al, 1990; SILVA, 1991; POZZAN & RIZZUTO, 2000). Entretanto, o mesmo não pode ser dito em relação às mitocôndrias de plantas, permanecendo aberta a discussão acerca da existência, para os vegetais, de espécies cujas mitocôndrias captam Ca^{2+} , enquanto outras não o fazem (RUGOLO et al., 1990; SILVA et al., 1992; BUSH, 1993).

De modo semelhante, qualquer que seja a fonte das mitocôndrias consideradas, continua incerto se a captação mitocondrial de cálcio é importante para regular a atividade metabólica da própria organela ou para ajudar na manutenção do equilíbrio na concentração citosólica dos íons Ca^{2+} (DENTON & McCORMACK, 1985; HANSFORD, 1985; POZZAN & RIZZUTO, 2000).

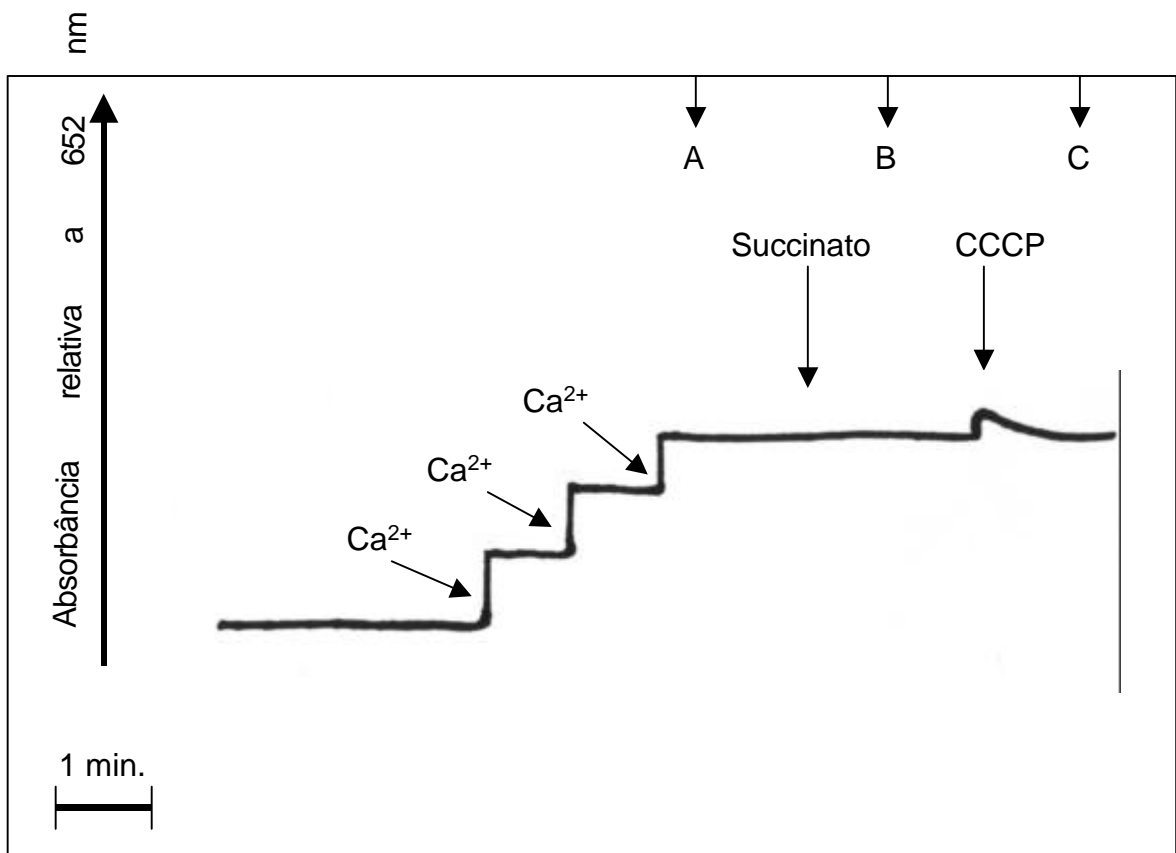


Figura 3 – Variações na absorvância do arsenazo III ao se utilizar mitocôndrias isoladas de raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.). O traçado foi iniciado com meio de reação já contendo mitocôndrias (2,0 mg de proteína) e arsenazo III (25 μ M), em 3 ml de meio de reação. Onde indicado, foram feitas três adições de Ca^{2+} , totalizando 100 μ M, succinato (2,0 mM) e CCCP (0,7 μ M). As letras A, B e C indicam os momentos em que foram retiradas amostras para análise ultraestrutural. Este traçado é representativo de uma série de cinco repetições.

4.3. Análise Ultraestrutural

A Figura 4 apresenta micrografias de mitocôndrias isoladas a partir das três espécies estudadas, em meio de reação contendo Mg^{2+} , succinato, fosfato, porém sem adição de ADP.

Mitocôndrias isoladas tendem a ter uma forma esférica, em função dos processos de rompimento celular ocasionados pela centrifugação e, portanto, não foi possível avaliar comparativamente o formato das mesmas nos diferentes materiais estudados, baseando-se na sua forma intacta nos tecidos vegetais.

As mitocôndrias de beterraba apresentaram, em geral, cristas mais estreitas (lamelares ou de conformação ortodoxa) e uniformes quando comparadas às mitocôndrias de hipocótilos de soja e coleóptiles de milho. Apresentaram uma matriz com aparência mais uniforme e com volume interno proporcionalmente superior ao observado nas organelas isoladas de hipocótilos de soja e coleóptiles de milho. As mitocôndrias isoladas de raízes de beterraba, na ausência de ADP, apresentaram um aspecto semelhante à conformação denominada de ortodoxa, por HACKENBROCK & CAPLAN (1969) e HUNTER et al. (1976), ou denominada de lamelar, por BOZZOLA & RUSSELL (1992). É importante ressaltar que nas preparações de mitocôndrias isoladas das espécies analisadas (Figura 4) foi obtido um excelente grau de purificação, com baixa ocorrência de outras organelas contaminantes no meio. Organelas, como peroxissomas e proplastídeos, foram raramente observadas. Além disso, constatou-se que as mitocôndrias isoladas encontravam-se, estruturalmente, íntegras em sua maioria, podendo ser visualizadas as duplas membranas da organela, as invaginações na membrana interna (cristas) e as granulações da matriz, principalmente aquelas correspondentes aos ribossomos e outros grânulos eletrondensos.

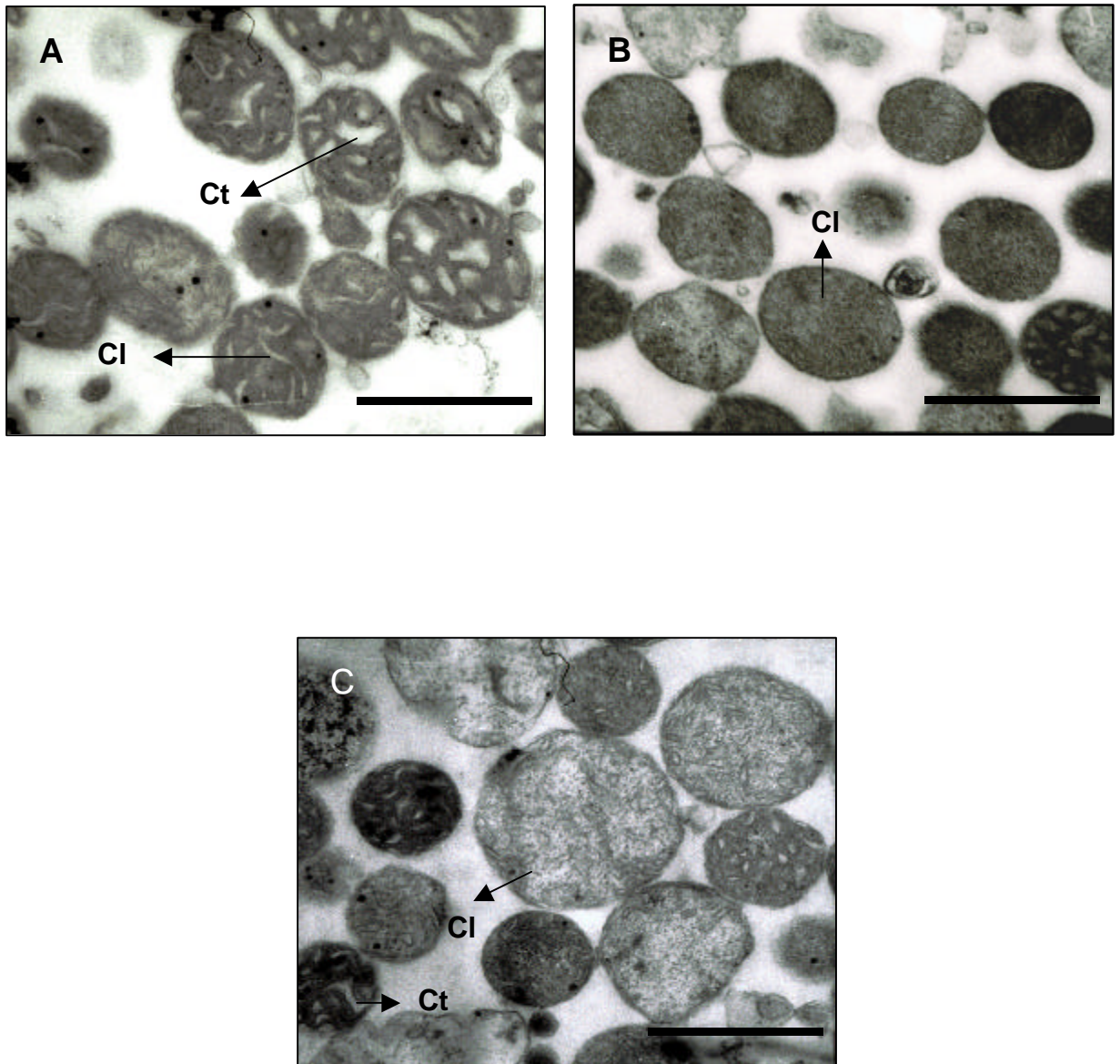


Figura 4 - Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando mitocôndrias isoladas de (A) hipocótilos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill.); (B) coleóptiles de milho (*Zea mays* L.); e (C) raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.), em meio de reação contendo Mg^{2+} e succinato, sem adição de ADP. Cl – Cristas lamelares; Ct – Cristas tubulares. Aumento de 38.000 X. Escala 0,5 μm .

Em mitocôndrias isoladas de hipocótilos de soja, em meio de reação contendo Mg^{2+} (Figura 5 A), observou-se o predomínio de cristas do tipo tubular, com largos espaços entre as mesmas, mesmo antes da ocorrência da fosforilação oxidativa. Durante a fosforilação oxidativa (estado 3) (Figura 5 B), promovida pela adição de ADP ao meio de reação, observou-se o aumento do espaço entre as cristas e, conseqüentemente, redução no volume da matriz, que se tornou mais densa em relação à situação inicial. Após a fosforilação oxidativa (estado 4) (Figura 5 C) houve uma diminuição do espaço entre as cristas, além de uma redução na densidade da matriz. Resultados semelhantes foram obtidos para mitocôndrias isoladas de raízes de beterraba (Figura 7), embora essas transformações tenham sido mais discretas. Ao contrário, mitocôndrias de coleóptiles de milho não apresentaram diferenças significativas em sua ultraestrutura (Figura 6), considerando-se os diferentes estados analisados.

Não foram encontrados dados na literatura de trabalhos com mitocôndrias de plantas que pudessem ser utilizados como parâmetro de comparação com os dados obtidos neste trabalho.

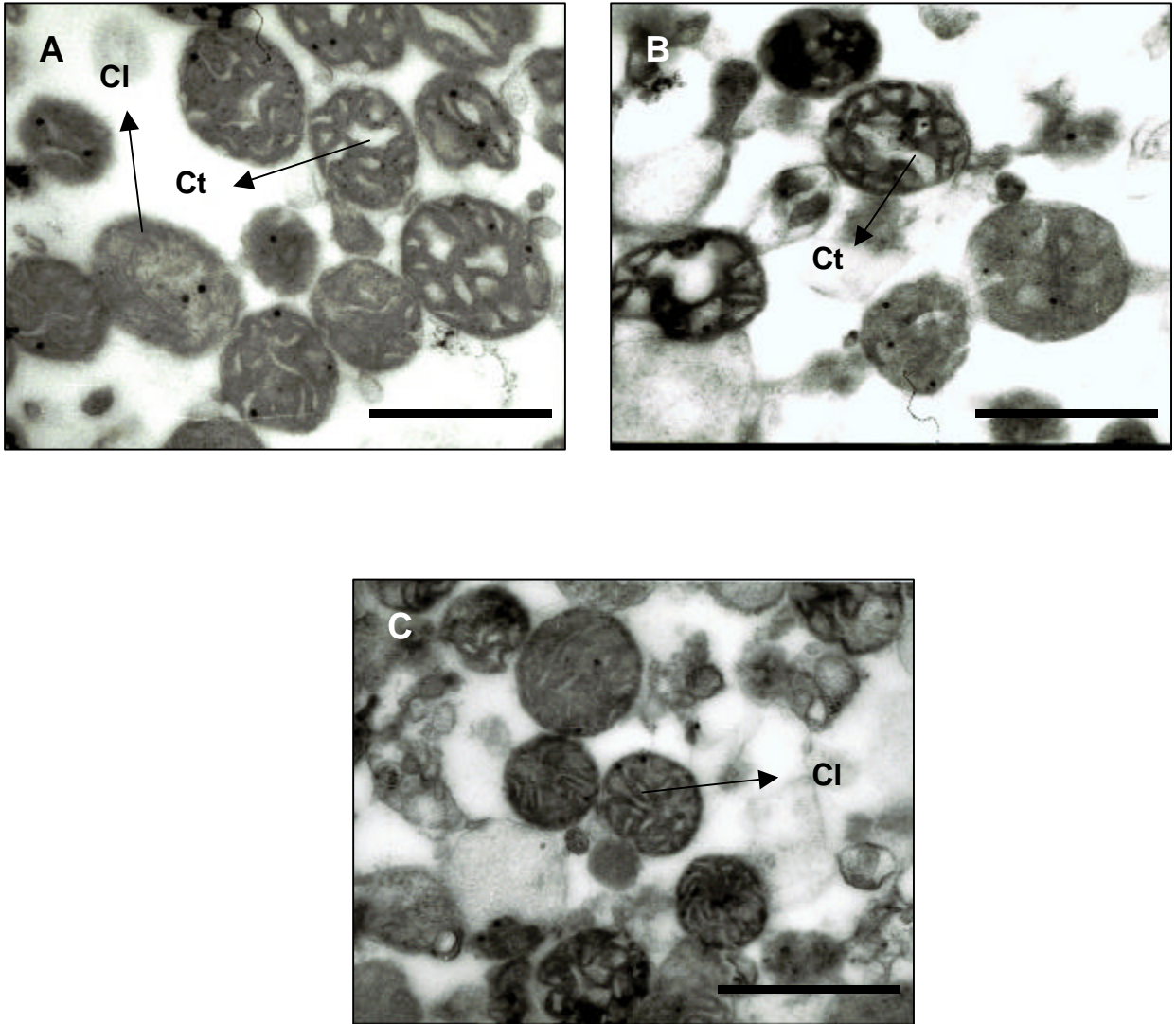


Figura 5 - Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando mitocôndrias isoladas de hipocótilos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), em meio de reação com Mg^{2+} . (A) Após a energização, pela adição de succinato (2 mM) e antes da fosforilação oxidativa; (B) Após energização com adição de ADP e durante a fosforilação oxidativa (estado 3); (C) Mitocôndrias energizadas após a fosforilação oxidativa (estado 4). Cl - Cristas lamelares; Ct - Cristas tubulares. Aumento de 38.000 X. Escala 0,5 μ m.

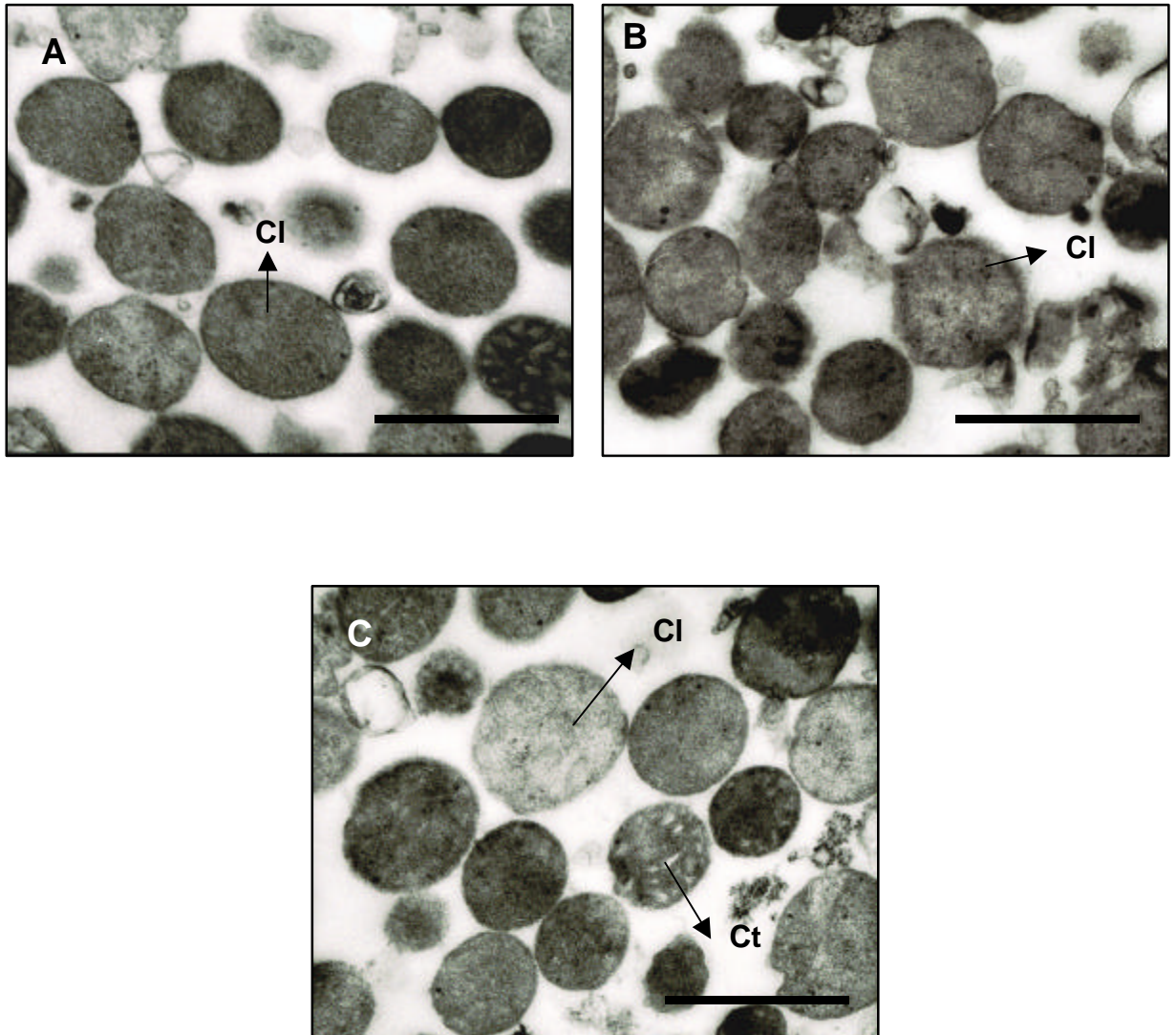


Figura 6 - Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando mitocôndrias isoladas de coleóptiles de milho (*Zea mays* L.) em meio de reação com Mg^{2+} . (A) Após a energização, pela adição de succinato (2 mM) e antes da fosforilação oxidativa; (B) Após energização com adição de ADP e durante a fosforilação oxidativa (estado 3); (C) Mitocôndrias energizadas após a fosforilação oxidativa (estado 4). CI - Cristas lamelares; Ct – Cristas tubulares. Aumento de 38.000 X. Escala 0,5 μm .

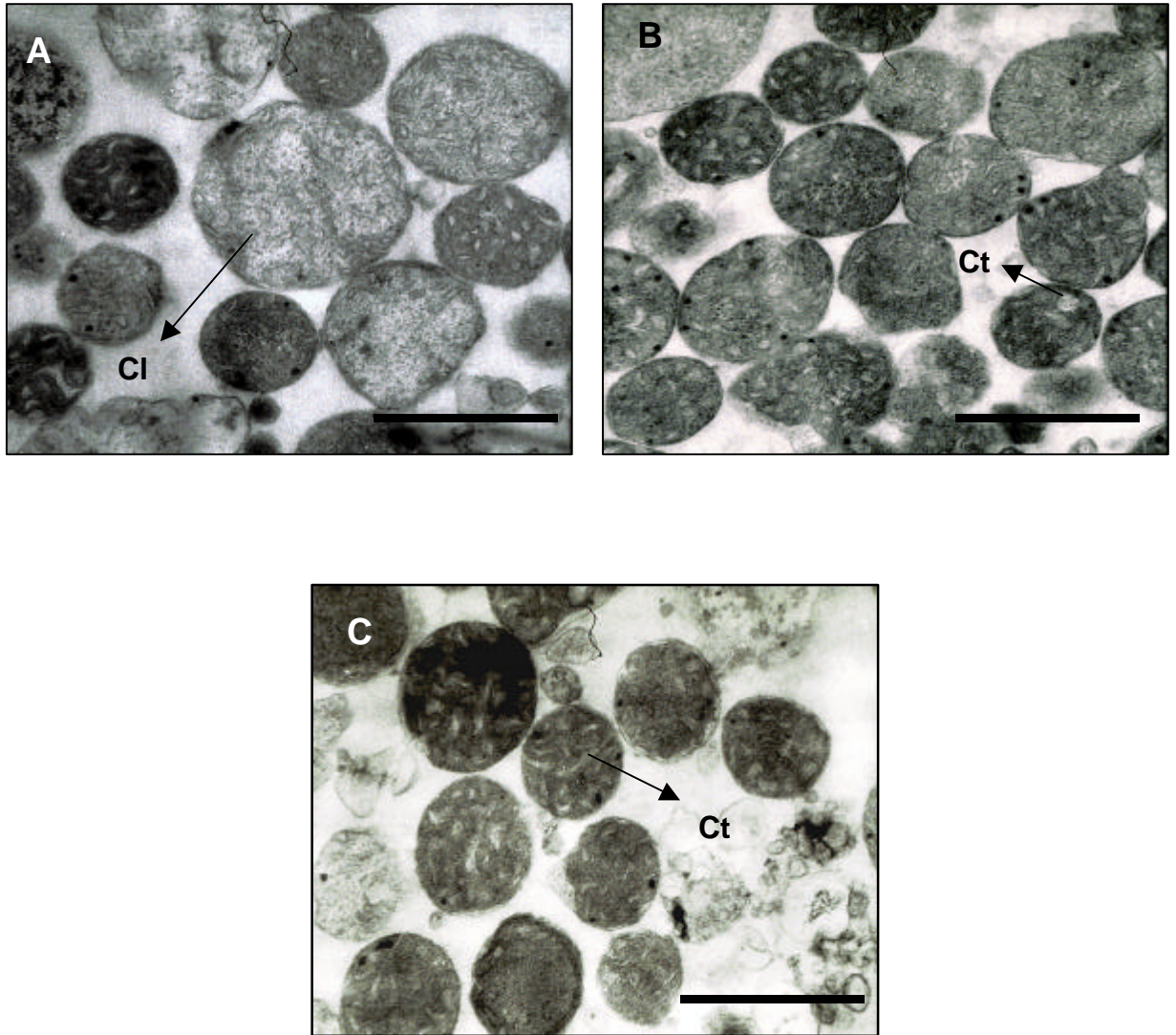


Figura 7 - Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando mitocôndrias isoladas de raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.) em meio de reação com Mg^{2+} . (A) Após a energização, pela adição de succinato (2 mM) e antes da fosforilação oxidativa; (B) Após energização com adição de ADP e durante a fosforilação oxidativa (estado 3); (C) Mitocôndrias energizadas após a fosforilação oxidativa (estado 4). Cl - Cristas lamelares; Ct – Cristas tubulares. Aumento de 38.000 X. Escala 0,5 μ m.

Em meio de reação contendo Ca^{2+} (na ausência de Mg^{2+}), as mitocôndrias isoladas de hipocótilos de soja passaram de uma conformação predominantemente ortodoxa (antes da adição de succinato) (Figura 8 A) para uma conformação condensada ao se adicionar succinato para energizar as organelas (Figura 8 B). Observou-se o aumento do espaço das cristas em relação ao controle experimental, possibilitando, assim, que a maioria das cristas adquirissem a forma tubular (conformação condensada). Ao acrescentar CCCP às mitocôndrias no estado energizado (Figura 8 C), diminuíram o espaço interno das cristas em relação à condição não desacoplada anterior, voltando à conformação ortodoxa inicial. Comportamento semelhante foi apresentado pelas mitocôndrias isoladas de milho (Figuras 9 A, B e C).

Em mitocôndrias isoladas de beterraba, na presença de Ca^{2+} e succinato (estado energizado) observou-se que o espaço interno das cristas não foi alterado, havendo predomínio de cristas do tipo lamelar e abundante espaço de matriz, característicos da configuração ortodoxa (Figuras 10 A e B). Com a adição de CCCP (Figura 10 C) também não houve alterações na forma das cristas e no espaço interno da matriz.

As micrografias obtidas de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não foram apresentadas neste trabalho, uma vez que não foi possível obter preparados com nível confiável de segurança quanto ao seu estado de preservação e ausência de artefatos.

Nas mitocôndrias de todas as espécies estudadas foram observadas discretas granulações eletrodensas, de forma muito regular e esférica, com cerca de $0,04 \mu\text{m}$ de diâmetro. Não houve diferenças marcantes no padrão de distribuição desse tipo de granulação, ou seja, mitocôndrias não captadoras de cálcio (como as de beterraba) apresentaram granulações semelhantes às mitocôndrias captadoras (soja e milho) (Figuras 5 a 10). Também não ocorreram diferenças nas granulações quando as mitocôndrias acumularam cálcio ou quando elas foram desacopladas pela adição de CCCP (Figuras 8, 9 e 10). O desacoplamento promove a saída de cálcio do seu interior (SCARPA & AZZONE, 1970; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Essas observações não permitiram afirmar que o tipo de granulação observado corresponde a depósitos de cálcio como foi sugerido por GREENAWALT et al., 1964 e por

HANSON & HODGES (1967). Além disso, em nenhum dos materiais utilizados foram observados granulações grosseiras, com bordos afilados como aquelas descritas por PEVERLY et al. (1974), como sendo acúmulo de fosfato de cálcio. Estes autores obtiveram apenas este tipo de granulação quando as mitocôndrias foram tratadas com elevadas concentrações de cálcio externo (acima de 80 nmoles de Ca^{2+} por mg de proteína).

De acordo com a revisão apresentada por BENCHIMOL (1998), a adição de 5 mM de CaCl_2 , nas soluções fixadoras e pós-fixadoras, permite identificar sítios com alta afinidade por cálcio. Acrescentando-se o ferrocianeto de potássio a essas soluções observou-se a formação de precipitados eletrodensos em grandes extensões da célula. Segundo este mesmo autor, a técnica do ferrocianeto de potássio é útil, não somente na localização de cálcio, bem como para melhor evidenciar os sistemas trilaminares de membrana, pois ocorre a formação de complexos de ósmio-ferro ligados ao cianeto por pontes, que são quelados por proteínas de membrana eficazes no seqüestro de íons. Embora esta técnica tenha sido utilizada no desenvolvimento dos experimentos, não podemos afirmar que as granulações finas evidenciadas nas fotomicrografias sejam depósitos de cálcio, em função das argumentações utilizadas nos parágrafos anteriores.

Desta forma, constatou-se que mitocôndrias isoladas de milho assemelham-se às as mitocôndrias de soja, no que se refere ao padrão de comportamento fisiológico de captação de cálcio, assim como em relação ao tamanho e disposição das cristas, diferindo ambas, em relação às mitocôndrias de beterraba. Também não foram observadas alterações conformacionais em mitocôndrias isoladas de raízes de beterraba por ocasião de sua energização com succinato, em presença de Ca^{2+} , ao contrário do que ocorreu com as mitocôndrias captadoras de cálcio (soja e milho), que assumiram a conformação condensada enquanto acumulavam cálcio.

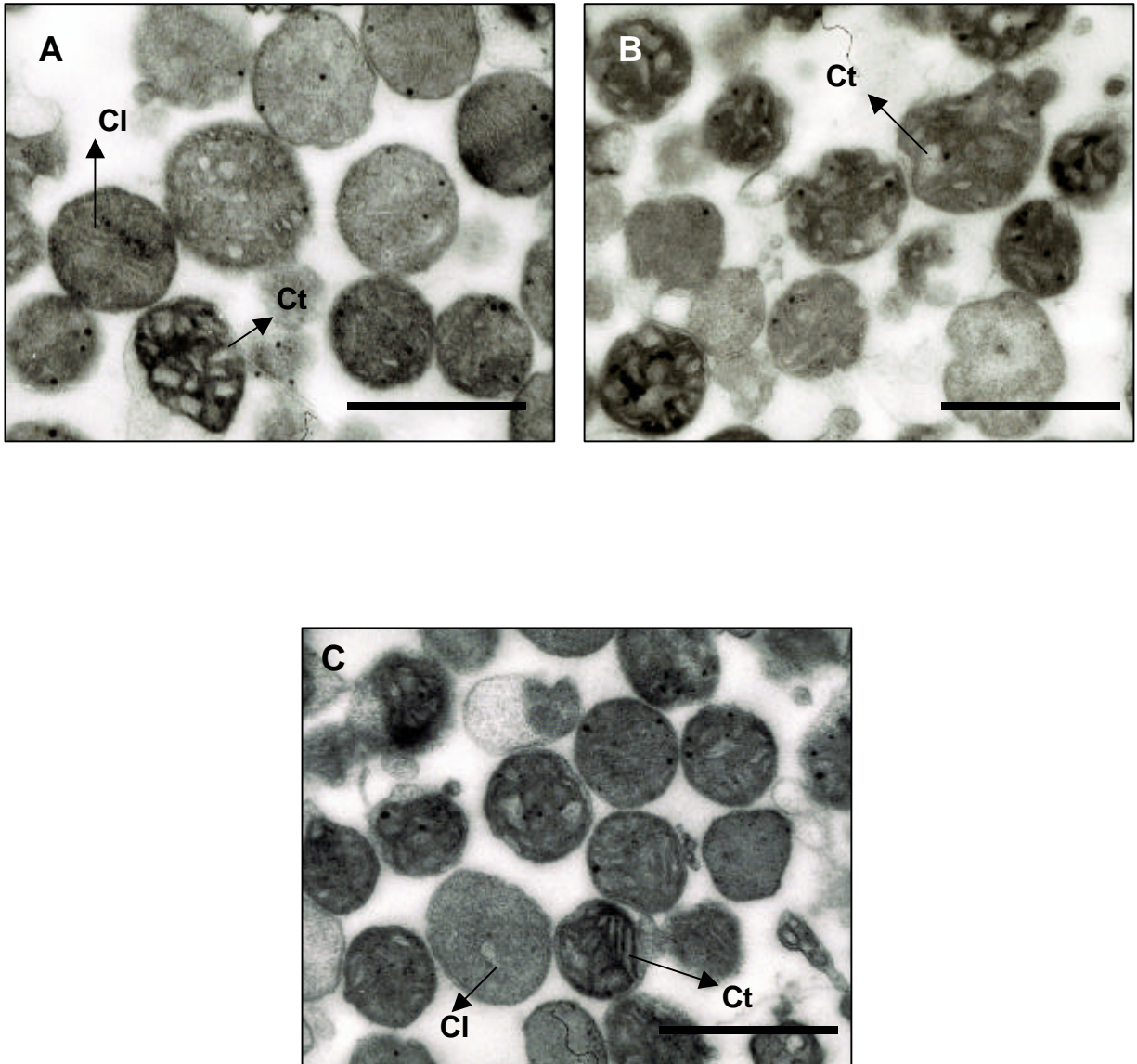


Figura 8: Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando mitocôndrias isoladas de hipocótilos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em presença de Arsenazo III e cálcio. (A) Estado não energizado (ausência de substrato respiratório). (B) Estado energizado (presença de substrato respiratório). (C) Estado energizado com desacoplamento artificial pela adição de CCCP (0,7 μ M). Cl - Cristas lamelares. Ct - Cristas tubulares. Aumento de 38.000 X. Escala 0,5 μ m.

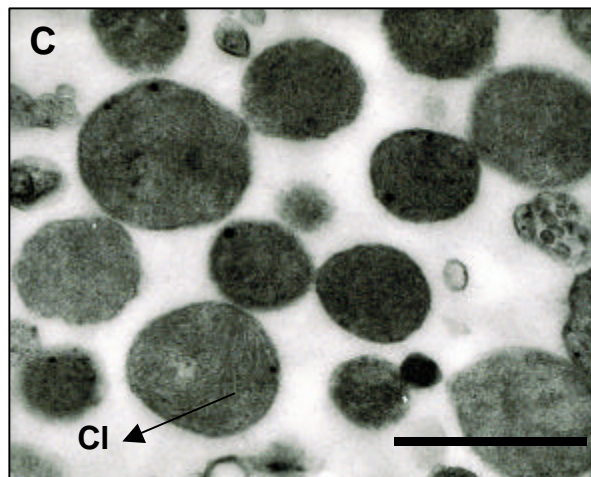
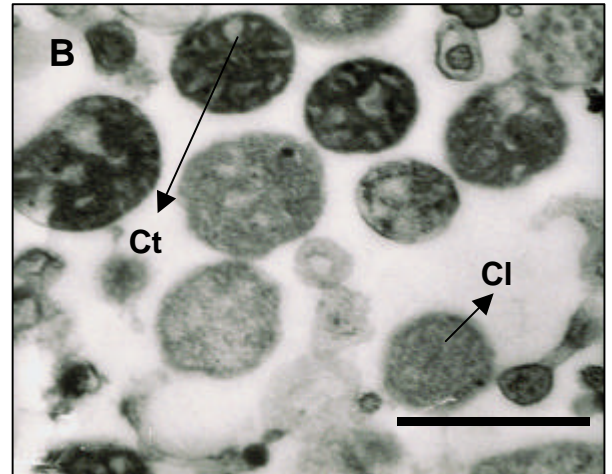
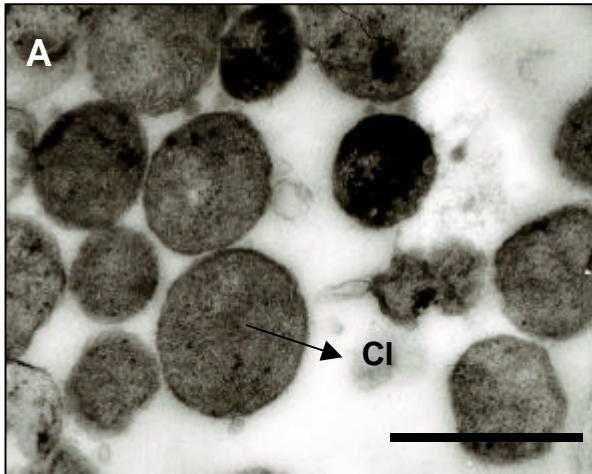


Figura 9: Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando mitocôndrias isoladas de coleóptiles de milho (*Zea mays* L.) em presença de Arsenazo III e cálcio. (A) Estado não energizado (ausência de substrato respiratório). (B) Estado energizado (presença de substrato respiratório). (C) Estado energizado com desacoplamento artificial pela adição de CCCP (0,7 μ M). CI - Cristas lamelares. Ct - Cristas tubulares. Aumento de 38.000 X. Escala 0,5 μ m.

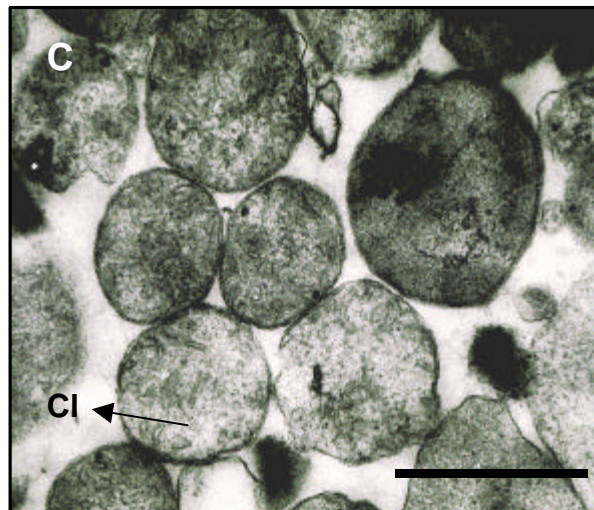
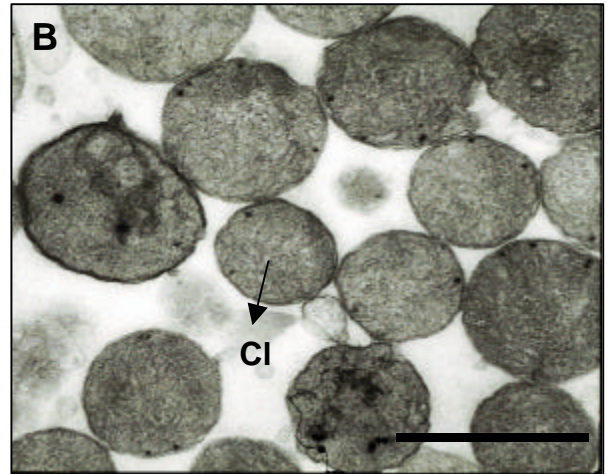
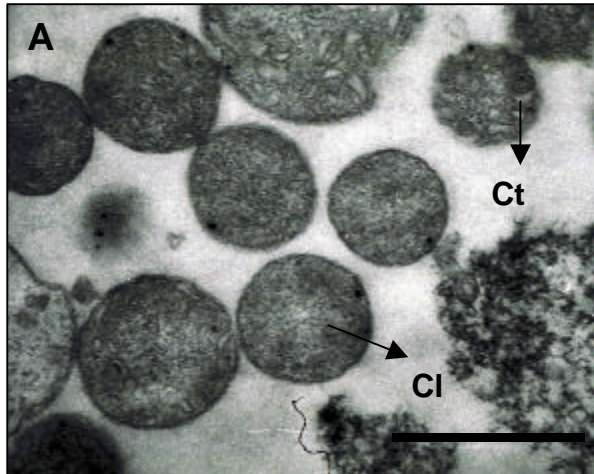


Figura 10: Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando mitocôndrias isoladas de raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.) em presença de Arsenazo III e cálcio. (A) Estado não energizado (ausência de substrato respiratório). (B) Estado energizado (presença de substrato respiratório). (C) Estado energizado com desacoplamento artificial pela adição de CCCP (0,7 μ M). Cl - Cristas lamelares. Ct - Cristas tubulares. Aumento de 38.000 X. Escala 0,5 μ m.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram estudadas mitocôndrias isoladas de hipocótilos de soja, coleóptiles de milho, raízes de beterraba e tubérculos de batata, no sentido de comparar ultraestruturalmente mitocôndrias que apresentam transportador de Ca^{2+} (soja e milho) com outras que são incapazes de acumular este cátion (beterraba e batata). As mitocôndrias foram analisadas quanto à sua atividade respiratória, grau de acoplamento, consumo de Ca^{2+} e aspectos de sua ultraestrutura. As análises de atividade respiratória foram acompanhadas por meio de um eletrodo seletivo de oxigênio (do tipo Clark) e a captação de cálcio foi avaliada seguindo-se a variação da absorbância do corante Arsenazo III, a 652 nm. Amostras das mitocôndrias isoladas, coletadas em diversos momentos das avaliações fisiológicas, foram precipitadas a 12.000 *g*. As mitocôndrias precipitadas foram fixadas em glutaraldeído e paraformaldeído, pós-fixadas em tetróxido de ósmio e incluídas em resina tipo Spurr. Os cortes obtidos foram contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila e analisados em microscópio eletrônico.

Os dois tipos de mitocôndrias (captadoras e não captadoras de cálcio) mostraram-se acoplados, com controle respiratório superior a 2,5 e razão ADP/0 superior a 1,7, quando energizadas pela adição de succinato ao meio de reação. As mitocôndrias isoladas de hipocótilos de soja e de coleóptiles de

milho acumularam cálcio em seu interior, retirando-o do meio de reação, enquanto as mitocôndrias de raízes de beterraba e de tubérculos de batata não foram capazes de retirar cálcio do meio. A análise ultraestrutural evidenciou o alto grau de purificação das mitocôndrias isoladas, sendo que as mesmas apresentaram-se, na maioria das vezes, com membranas íntegras, variando do estado ortodoxo, para o estado condensado, em consequência da adição de ADP ao meio de reação, retornando ao estado ortodoxo inicial, após a fosforilação de todo o ADP adicionado. Na matriz, finamente granulosa, além dos ribossomos, foram observados grânulos esféricos e uniformes, presentes em todos os tipos de mitocôndrias, independente de serem capazes de captar Ca^{2+} ou não. Não foram observadas alterações nesse tipo de granulação quando as mitocôndrias de soja e de milho encontravam-se em atividade de captação de Ca^{2+} . Entretanto, ao contrário das mitocôndrias isoladas de beterraba, as mitocôndrias de soja e de milho passaram para a conformação condensada, enquanto captavam Ca^{2+} do meio de reação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, K. R. & WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. In: Garland Publishing. New York & London, 3rd ed, p. 721-782. 1994.
- BENCHIMOL, M. Localização de cálcio. In: DE SOUZA, W. (ed). **Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicada às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Microscopia: 80-83,1998.
- BOOTMAN, M. D. & BERRIDGE, M. J. The elemental principles of calcium signaling. **Cell**, v.83, p. 675-678, 1995.
- BORGES, R. **Caracterização cinética da isocitrato desidrogenase de mitocôndrias de batata e de soja**. Viçosa: UFV, 1999. 34p. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- BOZZOLA, S. S., & RUSSELL, L. D. **Electron Microscopy- Principles and Techniques for Biologists**. Boston: Jones and Bartlett, 1992. 542p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRYCE, J. H., AZCON-BIETO, J., WISKICH, J. T. & DAY, D. A. Adenylate control of respiration in plants: the contribution of rotenone in sensitive electron transport to ADP-limited oxygen consumption by soybean mitochondria. **Physiology Plantarum**, 78, p. 105-111, 1990.
- BUSH, D. S. Regulation of cytosolic calcium in plants. **Plant Physiology**, v. 103, p. 7-13, 1993.
- CARAFOLI, E. The calcium cycle of mitochondria. **FEBS Letters**. 104, p. 1-5, 1979.

- CARNIERI, E. G. S. **Transporte de Ca²⁺ por mitocôndrias vegetais**. Curitiba: UFPR, 1986. 74p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, 1986.
- CARNIERI, E. G. S., MARTINS, I. S., & VERCESI, A. E. The mechanism and biological role of calcium transport by plant mitochondria. **Brazilian Journal and Medicine and Biological Research**, v. 20, p. 635-638. 1987.
- CHANCE, B., & WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advanced Enzymology**, v. 17, p. 65-134, 1956.
- CHEN, C. & LEHNINGER, A. L. Ca²⁺ transport activity in mitochondria from some plant tissues. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 157, p. 183:196, 1973.
- CHIANG, G., & DILEY, R. A. Evidence for Ca²⁺ - gated proton fluxes in chloroplast thylakoid membranes: Ca²⁺ controls a localized to delocalized proton gradient switch. **Biochemistry**, v. 26, p. 4911-4916, 1987.
- CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, p. 259-268, 1995.
- d'AUZAC J. Le calcium un messenger dans la réponse des plantes aux stimuli. **Plantation Recherche et Développement**, v.1, n.1, p.22-27, 1994.
- DAY, D. A., WISKICH, J. T., BRYCE, J. H. & DRY, I. B. Regulation of ADP-limited respiration in isolated plant mitochondria. *In*: MOOR, A. L. & BEECHE, R. B. (eds.), **Plant Mitochondria: Structural Functional and Physiological Aspects**. Plenum, New York, p.59-66, 1987
- DENTON, R. M. & McCORMACK, J. G. Ca²⁺ transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. **American Journal of Physiology**, v. 249, p. E 543- E 554, 1985.
- DIETER, P. & MARMÉ, D. Ca²⁺ transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher plants. *Planta*, v. 150,p.1-8, 1980.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F. Effect of bovine serum albumine on membrane potential in plant mitochondria. **Physiologia Plantarum** , v. 59, p. 177-182, 1983.
- GRABOV, A. & BLATT, M. R. Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 351-360, 1998.
- GREENAWALT, J. W.; ROSSI, C. S. & LEHNINGER, A. L. Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat-liver mitochondria. **Journal of Cell Biology**, 23: 21-38, 1964.
- GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K.; SHEU, S. S. & GAVIN, C. E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **American Journal of Physiology**, v. 267, n.36, p. C313-C339, 1994.

- HACKENBROCK, J. C. & CAPLAN, A. I. Ion-induced ultrastructural transformations in isolated mitochondria. **Journal of Cell Biology**, 42: 221-234, 1969.
- HALL, J. L.; FLOWERS, T. J. & ROBERTS, R. M. **Plant cell structure and metabolism**. Longman, New York, 2nd edition, 1982, 534 p.
- HANSFORD, R. G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. **Rev. Physiol. Biochem. Pharm.**, v. 102, p. 1-72, 1985.
- HANSON, J. B. & HODGES, T. K. Energy-linked reaction of plant mitochondria. **Current Topics in Bioenergetics**, v. 2, p. 65-98, 1967.
- HUNTER, D. R., HAWORTH, R. A. & SOUTHARD, J. H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium- treated mitochondria. **J. Biological Chemistry**, v. 251 (16), p. 5069-5077, 1976.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde- glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27: 137A, 1965.
- KAUSS, H. Some aspects of calcium dependent regulation in plant metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 47-72, 1987.
- LAZZARO, M. D. & THOMSON, W. W. Ultrastructural localization of calcium in the organic acid secreting trichomes of chickpea (*Cicer arietinum*). **Canada Journal Botany**, vol. 70, 1992.
- MACCORMACK, J. G. & DENTON, R. M. A comparative study of the regulation by Ca^{2+} of the activities of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and NAD^+ - isocitrate dehydrogenase from a variety of sources. **Biochemical Journal**, v. 196, p. 619-624, 1981.
- MALHÓ, R., MOUTINHO, A., VANDERLUIT, A. & TREWAVAS, A. J. Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. **Phill Trans. R. Soc. Lond. B.** v.3, p. 1463-1473, 1998.
- MARTINS, I. S., CARNIERI, E. G. & VERCESI, A. E. Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 850, p. 49-56, 1986.
- MARTINS, I. S. & VERCESI, A. E. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. **Biochemistry and Biophysical Research Communication**, v.129, n.3, p. 943- 948, 1985.
- McAINSH, M. R. & HETHERINGTON, A. M. Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. **Trends in Plant Science**, v. 3, n.1, p. 32-36, 1998.

- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, 191, p. 144-148, 1961.
- MITCHELL, P. Proton motive cytochrome system of mitochondria. **Annual Review of Academic Science**, 341, p. 564, 1980.
- NICHOLLS, D. G. & AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 683, p. 57-88, 1982.
- PEVERLY, J. H.; MILLER, R. J.; MALONE, C. & KOEPPE, D. E. Ultrastructural evidence for calcium phosphate deposition by isolated corn shoot mitochondria. **Plant Physiology**, v. 54, p. 408-411, 1974.
- POZZAN, T. & RIZZUTO, R. The renaissance of mitochondrial calcium transport. **European Journal of Biochemistry**, 267, 5269-5273, 2000.
- RUGOLO, M., PISTOCCHI, R. & IZANNONI, D. Calcium ion transport in higher plant mitochondria (*Elianthus tuberosus*). **Physiologia Plantarum** v.79, p. 297-302, 1990.
- RUTTER, G. A. & DENTON, R. M. Regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca²⁺ ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/ NAD⁺ ratios. **Biochemical Journal**, v. 252, p. 181-189. 1988.
- RUTTER, G. A. & DENTON, R. M. Rapid purification of pig heart NAD⁺ - isocitrate dehydrogenase. Studies on the regulation of activity by Ca²⁺, adenine nucleotides, Mg²⁺ and other metal ions. **Biochemical Journal**, v. 263, p. 445-452. 1989.
- SCARPA, A. & AZZONE, G. F. The mechanism of ion translocation in mitochondria – coupling of K⁺ efflux with Ca²⁺ uptake. **European Journal of Biochemistry**, v. 12, p. 328-335, 1970.
- SILVA, M. A. P. **Características do transporte de cálcio, fosfato e prótons em mitocôndrias de plantas**. Campinas: UNICAMP, 1991. 185p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, 1991.
- SILVA, M. A. P.; CARNIERI, E. G. S. & VERCESI, A. E. Calcium transport by corn mitochondria. Evaluation of the role of phosphate. **Plant Physiology**, 98 (2): 452-457, 1992.
- SPURR, A. R. A. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructural Research**, 26: 31, 1969.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2^a ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 1998.

THOMAS, M. V. Techniques in calcium research, In: **Biological Techniques Series**, pp. 90-108, Treherne, J.E. & Rubery, P.H. eds. Academic Press, London. 1982.

TREWAVAS, A. J. Le calcium, C'est la vie: calcium makes waves. **Plant Physiology**, v. 120, p.1-6, 1999.

TREWAVAS, A. J. & MALHÓ, R. Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1181-1195, 1997.