

REGIS BORGES

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA ISOCITRATO DESIDROGENASE
DE MITOCÔNDRIAS DE BATATA E DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
DEZEMBRO - 1999

REGIS BORGES

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA ISOCITRATO DESIDROGENASE
DE MITOCÔNDRIAS DE BATATA E DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

Aprovada: 28 de julho de 1999.

Prof.^a Maria Goreti de A. Oliveira
(Conselheira)

Prof. Paulo Roberto Mosquim
(Conselheiro)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Prof. Juraci Alves de Oliveira

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais, Acinézio e Jemimi.

Aos meus irmãos, Sara Jane, Débora, Sinézio e Janete.

AGRADECIMENTO

Ao professor Marco Aurélio Pedron e Silva, pela orientação, pelas críticas e pela amizade, o que tornou possível a execução deste trabalho.

À minha família, aos meus pais e irmãos, por me apoiarem, incentivarem e me sustentarem de pé em todos os momentos difíceis desta longa jornada, à maneira de cada um.

Aos meus verdadeiros e inseparáveis amigos de Viçosa, que se tornaram minha segunda família, digna de todo carinho, admiração e respeito, pelo apoio incondicional que me deram em todos esses anos de convívio.

Ao professor Paulo Roberto Mosquim, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, pela co-orientação tanto na iniciação científica quanto no Mestrado e pelas críticas aos experimentos e à redação deste trabalho.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, do Departamento de Bioquímica da UFV, pela co-orientação e pelas sugestões concernentes à caracterização enzimática realizada neste trabalho e à sua redação.

Ao professor Efraim Lázaro Reis, do Departamento de Química da UFV, pelo desenvolvimento e fornecimento de programas interativos e de um gráfico, que possibilitaram a execução da maior parte dos experimentos realizados neste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, pelo apoio técnico.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitotecnia da UFV, pelo fornecimento das sementes de milho e de soja.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, pelo uso de equipamentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, pelo incentivo e pela ajuda no trabalho diário.

Aos professores e colegas do BIOAGRO da UFV, pela disponibilização de laboratórios e aparelhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA

REGIS BORGES, filho de Acinézio Borges e Jemimi da Silva Borges, nasceu em 29 de novembro de 1973, em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

Em abril de 1992, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o diploma de curso superior como engenheiro-agrônomo em fevereiro de 1997.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em julho de 1999.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	viii
EXTRATO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1. Obtenção do material vegetal	6
2.2. Isolamento de mitocôndrias	7
2.2.1. Mitocôndrias de hipocótilos e raízes de soja	7
2.2.2. Mitocôndrias de tubérculos de batata	7
2.3. Obtenção dos extratos enzimáticos	8
2.4. Determinação da atividade da isocitrato desidrogenase	8
2.4.1. Efeito da temperatura	9
2.4.2. Efeito do pH	9
2.4.3. Efeito de cátions divalentes	10
2.4.4. Efeito de ADP e ATP	10
2.4.5. Estabilidade do extrato enzimático	10
2.4.6. Determinação dos parâmetros cinéticos	11

	Página
2.5. Determinação de proteína	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1. Estabilidade do extrato enzimático	12
3.2. Efeito da temperatura	14
3.3. Efeito do pH	15
3.4. Efeito de cátions divalentes	17
3.5. Efeito de ADP e ATP	22
3.6. Parâmetros cinéticos	24
4. RESUMO E CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A_{340}	- Absorbância a 340 nm.
ADP	- Adenosina-5'-difosfato.
ATP	- Adenosina-5'-trifostato.
BSA	- Albumina de soro bovino.
EGTA	- Ácido etileno glicol-bis-(β -aminoetil éter)-NN'-tetra acético.
GS	- Glutamina sintetase.
GOGAT	- Glutamina-oxoglutarato aminotransferase.
HEPES	- Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico.
$K_{M \text{ app}}$	- Constante de Michaelis-Menten aparente.
MES	- Ácido morfolino-etano-sulfônico.
NAD^+	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada.
NAD^+ -IDH	- Isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ .
$NADP^+$	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada.
$NAD(P)H$	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato), forma reduzida.
pmoles	- 10^{-12} moles.
TRICINA	- N-tris (hidroximetil) metil glicina.
$V_{\text{máx app}}$	- Velocidade máxima aparente.

EXTRATO

BORGES, Regis, M.S. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 1999.
Caracterização cinética da isocitrato desidrogenase de mitocôndrias de batata e de soja. Orientador: Marco Aurélio Pedron e Silva. Conselheiros: Maria Goreti de Almeida Oliveira, Maurílio Alves Moreira e Paulo Roberto Mosquim.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a regulação da atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ (NAD^+ -IDH), por cátions divalentes e nucleotídeos de adenina, em mitocôndrias vegetais. Para isto, utilizaram-se extratos enzimáticos de mitocôndrias isoladas de hipocótilos e raízes de soja e de tubérculos de batata, tendo a atividade da enzima sido determinada, espectrofotometricamente, pela redução do NAD^+ a 340 nm. A NAD^+ -IDH, independente da fonte da enzima, apresentou atividade ótima em pH 7,5 e temperatura de 35 °C. O armazenamento em banho de gelo ocasionou perda progressiva de atividade enzimática, semelhante para os materiais utilizados. A -20 °C, a enzima extraída de soja mostrou maior estabilidade, em função do tempo, que a de tubérculos de batata. Os cátions Mn^{2+} e Mg^{2+} estimularam a atividade da enzima, além de reverterem os efeitos do EGTA, porém, o Ca^{2+} não teve as mesmas influências. Houve pequena diminuição da atividade enzimática em presença do ADP e uma diminuição da atividade

enzimática mais drástica em resposta ao ATP, independente da fonte da enzima. O cálcio não interferiu no efeito dos nucleotídeos de adenina. Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x\ app}$ aparentes não foram alterados pelo cálcio. Em média, os valores de K_M foram em torno de 0,10 mM. Para as mitocôndrias de batata $V_{m\acute{a}x\ app}$ foi de 28 nm min^{-1} e para soja, em torno de 13 nm min^{-1} . Os dados não permitem associar a capacidade de mitocôndrias em acumular Ca^{2+} com um possível controle diferencial deste cátion sobre a atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ .

ABSTRACT

BORGES, Regis, M.S. Universidade Federal de Viçosa, December 1999. **Kinetic characterization of NAD⁺-isocitrate dehydrogenase from potato and soybean mitochondria**. Adviser: Marco Aurélio Pedron e Silva. Committee Members: Maria Goreti de Almeida Oliveira, Maurílio Alves Moreira and Paulo Roberto Mosquim.

This work focused on the regulation of NAD⁺-isocitrate dehydrogenase, by cations and adenine nucleotides, in plant mitochondria, using enzymatic extracts from soybean roots and hypocotils and potato tuber. NAD⁺-IDH was assayed by following the reduction of NAD⁺ at 340 nm. Maximum enzyme activity, regardless of the source of the enzyme (potato or soybean), was achieved at pH 7.5 in 25 mM HEPES and 35 °C. Both enzymatic extracts exhibited a progressive and similar loss of activity when stored in an ice bath. The enzymatic extract from soybean mitochondria showed the largest stability under storage at -20 °C. The cations Mn²⁺ and Mg²⁺ stimulated the enzymatic activity, in addition to reverting the effects of EGTA, even though Ca²⁺ was not equally effective. There was a short inhibition of the enzymatic activity in presence of ADP, and a drastic inhibition in response to ATP. Calcium did not change the adenine nucleotides effect. K_{M app} values were not altered by calcium and, on the average, they were in the range of 0.10 mM, regardless the source of

the enzyme. The values of $V_{\max \text{ app}}$ were 28 nm min^{-1} , for potato, and 13 nm min^{-1} , for soybean. As a whole, the present results do not support the view that mitochondrial capacity in accumulating calcium is associated to the differential control of the calcium on the NAD^+ -isocitrate dehydrogenase activity.

1. INTRODUÇÃO

O fluxo de metabólitos por meio do ciclo de Krebs está sob complexa regulação. Dentre os fatores que governam esse fluxo estão a disponibilidade de substratos, o acúmulo de produtos e os intermediários (HANSFORD, 1980). Além desses fatores, existem outros tidos como extrínsecos, como as alterações na concentração citosólica de cálcio.

Em células animais, os aumentos na concentração citosólica de cálcio, ocasionados pela ação de hormônios ou pelos estímulos extracelulares, geram mudanças nos processos celulares, que, comumente, conduzem ao aumento da demanda energética celular. Esta demanda, geralmente, é suprida pelo aumento na produção de ATP pelas mitocôndrias (NICHOLS et al., 1994). Um dos mecanismos que participam do aumento da síntese de ATP mitocondrial envolve a ativação, pelo cálcio, de três enzimas do ciclo de Krebs, que são: a piruvato desidrogenase, a isocitrato desidrogenase e a oxoglutarato desidrogenase (RUTTER et al., 1987; RUTTER e DENTON, 1988). O cálcio atua sobre a isocitrato e a oxoglutarato desidrogenase, diminuindo os valores de K_M para os seus respectivos substratos (RUTTER e DENTON, 1989). A piruvato desidrogenase, por outro lado, é indiretamente regulada pela fosforilação reversível, pois o cálcio estimula esta enzima, por ativar uma fosfatase e inibir uma cinase, o que favorece a forma mais ativa da enzima (HANSFORD, 1991).

Segundo McCORMACK et al. (1992), além da ativação das desidrogenases intramitocondriais, citadas anteriormente, os aumentos da concentração de cálcio na matriz mitocondrial influenciam outras duas enzimas-chave envolvidas no metabolismo energético. A primeira destas enzimas é uma pirofosfatase, que pode ser inibida por íons cálcio, na mesma faixa de concentração de Ca^{2+} das desidrogenases, e a segunda, ativada pelo cálcio ao longo da rota de produção de energia, é a própria ATP sintase. A sensibilidade dessas enzimas ao cálcio tem sido mostrada em extratos mitocondriais de diversos tecidos animais, especialmente de coração e fígado. Por outro lado, MYERNYK e RANDALL (1987), estudando as propriedades regulatórias do complexo piruvato desidrogenase de suspensões mitocondriais de ervilha, observaram que a dependência da enzima a cátions é mais bem suprida por Mg^{2+} ou Mn^{2+} e que o Ca^{2+} atua como um antagonista na ativação da enzima por outros cátions.

De acordo com McCORMACK e DENTON (1981) e McCORMACK et al. (1992), a capacidade de o cálcio regular essas desidrogenases parece estar restrita às mitocôndrias dos tecidos de vertebrados, pois somente estes possuem sistemas transportadores de cálcio.

HANSFORD e ZOROV (1998) relacionaram o aumento na produção de ATP a variações na concentração citosólica de cálcio. Essa resposta ocorreria em função da fidelidade com a qual as variações citosólicas são traduzidas em mudanças na concentração intramitocondrial de cálcio. McCORMACK e DENTON (1981) sugeriram que a regulação dessas desidrogenases em plantas e insetos é feita pelas razões ADP/ATP e NAD^+/NADH .

Entretanto, outras abordagens que envolvem mitocôndrias de plantas mostram que, dependendo da espécie, do tecido e da idade da planta, os sistemas transportadores de cálcio podem ser encontrados nesses organismos, porém diferenciando-se daqueles encontrados em vertebrados, por apresentarem uma atividade mais baixa e pela exigência absoluta de transporte simultâneo de fosfato (CARNIERI et al., 1987; VERCESI et al., 1989). Foi constatada a presença de sistemas de transporte de cálcio em mitocôndrias de coleótilos de milho, e hipocótilos de soja, feijão e café (CARNIERI, 1986; MARTINS et al., 1986).

Entretanto, as mitocôndrias de folhas brancas de repolho, tubérculos de batata e raízes de beterraba não possuem transportadores que lhes permitam acumular cálcio (MARTINS e VERCESI, 1985; SILVA, 1991).

Em células de determinados tecidos animais, a concentração intracelular de cálcio é controlada, principalmente, pela sua extrusão através da plasmalema e pelo seu acúmulo em outras organelas, como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias, por meio de transportadores, bombas e canais iônicos (MARMÉ, 1985; BUSH e SZE, 1986; GILROY et al., 1987; CHANSON, 1993; TREWAVAS, 1999).

As células vegetais também podem controlar os níveis de cálcio intracelular, mas dependem de sistemas adicionais, como a imobilização desses íons na parede celular e o seu acúmulo nos cloroplastos e no vacúolo, sendo este último o maior local de depósito intracelular de cálcio (CHIANG e DILLEY, 1987; KAUSS, 1987; VERCESI et al., 1989; TREWAVAS, 1999).

A participação das mitocôndrias no controle da homeostase celular do Ca^{2+} é controversa. Alguns pesquisadores defendem a idéia de que os transportadores mitocondriais de Ca^{2+} seriam os mais importantes para a regulação da concentração do íon em sua matriz (DENTON e McCORMACK, 1985; HANSFORD, 1985; VERCESI, 1993; NICHOLS e DENTON, 1995). Para esses pesquisadores, o cálcio atuaria no metabolismo celular, aumentando a capacidade fosforilativa intramitocondrial.

Dentre as desidrogenases que participam do controle do fluxo de metabólitos através do ciclo de Krebs, PALOMO et al. (1998) destacam a isocitrato desidrogenase, por fornecer o substrato (2-oxoglutarato) de uma rota metabólica muito importante em plantas superiores, que é a rota de assimilação do nitrogênio orgânico via sistema GS/GOGAT.

Em plantas superiores, a formação do 2-oxoglutarato, que representa um dos pontos de conexão entre o metabolismo do carbono e o do nitrogênio, é catalisada por duas enzimas: a isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ (NAD^+ -IDH, EC 1.1.1.41) e a isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ (NADP^+ -IDH, EC 1.1.1.42). Essas enzimas catalisam a descarboxilação oxidativa

do isocitrato, produzindo o 2-oxoglutarato numa reação acoplada à redução de NAD(P)^+ (CORNU et al., 1996). Essas enzimas extraídas de ervilha apresentam cinética de Michaelis-Mentem para NAD^+ , tendo NADH como inibidor competitivo e NADPH como inibidor não-competitivo. A cinética é sigmoideal em relação ao isocitrato, sendo influenciada pelo pH (COX e DAVIES, 1969), pelo citrato e pelos íons metálicos (DUGGLEBY e DENNIS, 1970) e pelo estado oligomérico da enzima (McINTOSH e OLIVER, 1992).

Na verdade, outros estudos com células vegetais indicam a existência de outras isoformas dessa enzima. Segundo McINTOSH e OLIVER (1992), as células vegetais possuem pelo menos quatro formas de isocitrato desidrogenases. Além da NAD^+ -IDH, isoforma específica de mitocôndrias associada ao ciclo de Krebs, existem outras isoformas dependentes de NADP^+ específicas do citosol, dos cloroplastos e das mitocôndrias. Além disto, TEZUKA e LATIES (1983) e McINTOSH (1997), trabalhando com mitocôndrias de ervilha e batata, respectivamente, constataram a existência de isoformas da enzima associadas à membrana interna mitocondrial (face matricial) com características cinéticas distintas.

Trabalhos que envolvem mitocôndrias de vertebrados (RUTTER e DENTON, 1988) mostram, de fato, que a NAD^+ -IDH é um importante ponto de controle do ciclo de Krebs, pois a atividade da enzima é absolutamente dependente da presença de íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , ou Co^{2+} , e é sensível à regulação por uma série de metabólitos, incluindo ADP como ativador alostérico e ATP e NADH como inibidores (GABRIEL et al., 1985).

Quanto à regulação por cálcio, RUTTER e DENTON (1989) e NICHOLS e DENTON (1995) relataram que a sensibilidade da enzima ao íon é muito influenciada pela razão ADP/ATP. Além disto, os autores inferiram, também, que a sensibilidade ao cálcio pela NAD^+ -IDH pode ser substancialmente menor que a de desidrogenases mitocondriais, quando as enzimas são avaliadas sob condições idênticas de experimentação em mitocôndrias permeabilizadas e em extratos mitocondriais.

Dentre as várias dificuldades de trabalhar com mitocôndrias vegetais, como a liberação de proteases, como consequência do rompimento dos tecidos, e a necessidade da adição de agentes protetores, existe ainda a dificuldade específica de trabalhar com a NAD^+ -IDH, que é relativamente instável. Algumas tentativas para estabilizar a enzima incluem o uso de glicerol (COX e DAVIES, 1967; GIORGIO et al., 1970), de citrato (BARNES et al., 1971) e de polietileno glicol (WADANO et al., 1989). Em virtude dessas dificuldades, a NAD^+ -IDH de tecidos vegetais não foi ainda purificada até a homogeneidade, embora alguns trabalhos já tenham sido feitos com enzimas de ervilhas (McINTOSH e OLIVER, 1992) e de batata (RASMUSSEN e MOLLER, 1990).

Sumarizando, McCORMACK e DENTON (1981) justificaram a falta de regulação, pelo cálcio, da NAD^+ -IDH de mitocôndrias de plantas pela ausência do transportador deste íon, nestas organelas. No entanto, outros pesquisadores mostraram que muitas mitocôndrias de vegetais possuem sistemas que as permitem acumular cálcio (MARTINS et al., 1986).

Existem algumas referências a NAD^+ -IDH de tubérculos de batata (LATIES, 1983), cujas mitocôndrias não captam cálcio (SILVA, 1991), mas nenhuma informação sobre as desidrogenases de mitocôndrias de soja, que são capazes de acumular cálcio, de modo semelhante às de vertebrados (CARNIERI, 1986). Por isto, julga-se importante caracterizar a NAD^+ -IDH de mitocôndrias de soja e verificar os efeitos de cátions divalentes e de nucleotídeos de adenina (ATP e ADP) sobre a atividade dessa enzima. Além disto, é necessário comparar os efeitos do íon Ca^{2+} sobre a atividade da enzima extraída de mitocôndrias que captam cálcio (soja) e outras que não o captam (batata).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal

Sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), variedade UFV 16, fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da UFV, foram lavadas em água corrente, esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,5%, por 60 minutos, e, posteriormente, lavadas em água destilada (cinco vezes). As sementes foram colocadas para germinar, umedecidas e mantidas no escuro à temperatura ambiente, dentro de caixas plásticas com areia, previamente esterilizada com hipoclorito de sódio 0,5 %. Cinco dias após o plantio, as raízes e os hipocótilos foram destacados e utilizados conjuntamente, para a extração das mitocôndrias.

Tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.), cultivar Binje, foram obtidos em mercado local e mantidos em câmara refrigerada (de 5 a 10 °C), no escuro, até o momento da utilização.

2.2. Isolamento de mitocôndrias

2.2.1. Mitocôndrias de hipocótilos e de raízes de soja

Cerca de 100 g de hipocótilos e raízes destacados das plântulas de soja foram cortados finamente com tesoura e suspensos em 500 mL de meio de extração básico (manitol 400 mM, BSA 0,1 %, EGTA 2 mM, cisteína 3 mM e HEPES 10 mM, pH 7,6), de acordo com o procedimento descrito por DIOLEZ e MOREAU (1983).

A homogeneização dos tecidos foi feita com o auxílio de homogeneizador polytron, durante um período de 5 segundos, no nível cinco de intensidade. Após filtragem através de oito camadas de gaze e uma camada de náilon, o pH da suspensão foi ajustado para 7,2, com KOH. A suspensão foi centrifugada a 1.200 g, por 10 minutos, descartando-se o precipitado e centrifugando o sobrenadante a 9.000 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 a 6.800 g, durante 10 minutos. O sedimento resultante (rico em mitocôndrias) foi suspenso, com o auxílio de um pincel, no volume mínimo possível (~ 500 µL) de meio de suspensão (manitol 300 mM, BSA 0,1 % e HEPES 10 mM, pH 7,2), obtendo-se a suspensão mitocondrial.

2.2.2. Mitocôndrias de tubérculos de batata

Aproximadamente 500 g de batatas lavadas e descascadas foram cortados em pedaços alongados, que foram submetidos à ruptura de seus tecidos com a utilização de uma centrífuga doméstica (Walita), para extração de sucos. Durante essa etapa, foi feita a adição concomitante de meio de extração gelado (manitol 400 mM, BSA 0,1%, EGTA 2 mM, cisteína 3 mM e HEPES 10 mM, pH 7,6). Após a homogeneização do material, a filtragem em oito camadas de gaze e uma camada de náilon e o ajuste de pH 7,2, o material foi submetido à centrifugação

diferenciada, para fracionamento celular. Uma primeira centrifugação a 700 g, durante 5 minutos, serviu para eliminar as células mal rompidas, as organelas de maior densidade e outras contaminações como o excesso de amido do material. O sobrenadante foi, então, submetido a uma centrifugação de 1.200 g, por 10 minutos. O novo sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado a 9.000 g, durante 10 minutos. O sedimento foi suspenso, com o auxílio de um pincel, 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 a suspensão foi submetida a uma última centrifugação de 6.800 g, por 10 minutos. O precipitado obtido (rico em mitocôndrias) foi suspenso da mesma forma descrita para os outros materiais.

Todos os procedimentos descritos neste item foram conduzidos a 4 °C, tendo as amostras de interesse sido mantidas em banho de gelo.

2.3. Obtenção dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos utilizados correspondem às suspensões mitocondriais obtidas conforme o item 2.2., acrescidas de Triton X-100 0,05 %, para a ruptura das membranas mitocondriais, e glicerol 5 M, a fim de estabilizar a atividade da isocitrato desidrogenase, que *in vitro* é bastante instável (COX e DAVIES, 1969). Os extratos enzimáticos foram divididos em alíquotas de 300 µL e mantidos a -20 °C, por um período máximo de sete dias. No momento do uso, as alíquotas foram descongeladas e mantidas em banho de gelo.

2.4. Determinação da atividade da isocitrato desidrogenase

A atividade da NAD⁺-IDH foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por COX e DAVIES (1967), com modificações. A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente, acompanhando a formação de NADH a 340 nm, com volume final de 1 mL de meio de reação contendo: NAD⁺ 0,5 mM, isocitrato 0,3 mM e HEPES 25 mM, em pH 7,5. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático (70 µg de proteína para mitocôndrias de tubérculos de batata

e 95 µg de proteína para mitocôndrias de soja) e acompanhada durante 2 minutos (período de linearidade), à temperatura de 35 °C e pH 7,5. Outras condições e inclusões ao meio de reação estão indicadas na legenda de cada figura.

Para todos os experimentos, foram feitas três repetições. Os valores de absorvância das soluções foram transformados em concentração e a atividade enzimática foi expressa em pmoles de NADH formado por minuto, por miligrama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

$$V = \left[\frac{A_{340}}{\text{e.c.t.}} \times 10^6 \right] / \text{mg.proteína} \quad (1)$$

em que

V = velocidade da reação enzimática;

A_{340} = absorvância a 340 nm;

ϵ = coeficiente de extinção molar do NAD(P)⁺ ($\epsilon = 6,22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

c = caminho óptico (1,0 cm); e

t = tempo de reação (120 segundos).

2.4.1. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a taxa de oxidação do isocitrato, catalisada pela NAD⁺-IDH, foi determinado a intervalos de 5 °C, entre 10 e 50 °C, utilizando um banho-maria acoplado ao espectrofotômetro. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em velocidade da reação enzimática, segundo a equação (1).

2.4.2. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a taxa de oxidação do isocitrato pela isocitrato desidrogenase foi determinado numa faixa de pH variando entre 4,0 e 9,5, mediante o uso dos seguintes sistemas-tampão, na concentração de 25 mM:

Tampão	pH
Ácido acético/acetato de sódio	4,0 a 5,5
MES	6,0 a 6,5
HEPES	7,0 a 8,5
Tricina	9,0
Ácido bórico/borato de sódio	9,5

2.4.3. Efeito de cátions divalentes

Ao meio de reação descrito no item 2.4., foram acrescentados EGTA e, ou, os cátions Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} . Para avaliação da concentração livre de cada cátion, foram feitos cálculos, utilizando um programa de computador fornecido pela professora Eva Gunila S. Carnieri, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. A concentração de EGTA foi mantida em 100 μM e a concentração livre dos três cátions variou de zero a 5 mM.

2.4.4. Efeito de ADP e ATP

Ao meio de reação que continha Mn^{2+} na concentração de 1 mM, foram adicionados ADP ou ATP (0; 1; 3 e 5 mM), na presença ou ausência de Ca^{2+} (100 μM). As demais condições foram as mesmas descritas no item 2.4.

2.4.5. Estabilidade do extrato enzimático

O efeito do armazenamento sobre a estabilidade da enzima foi testado mediante o uso dos dois procedimentos:

a) Determinação da atividade enzimática de 24 em 24 horas, ao longo de uma semana. Neste caso, o extrato enzimático foi armazenado em banho de gelo, durante todo o período de análise.

b) Determinação da atividade enzimática a intervalos de 24 horas, por um período de dez dias. Neste experimento, os extratos enzimáticos foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em pequenas frações (300 μL) acondicionadas em tubos Eppendorf, que foram descongeladas no momento do uso.

2.4.6. Determinação dos parâmetros cinéticos

A atividade da $\text{NAD}^+\text{-IDH}$ foi determinada, conforme anteriormente descrito, em presença de Mn^{2+} 1 mM, tendo sido utilizado o isocitrato como substrato enzimático, nas seguintes concentrações: 0,04, 0,08, 0,2, 0,3, 0,6, 1,0, 1,2 e 2,4 mM. Posteriormente, foi avaliado o efeito do cálcio, adicionando-se Ca^{2+} na concentração de 100 μM , em tampão HEPES 25 mM, em pH 7,5 e a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os parâmetros cinéticos, nas condições citadas, foram obtidos por meio de regressão não-linear, utilizando o programa de computação Enziffiter.

2.5. Determinação de proteína

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), tendo sido utilizada a curva-padrão de BSA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estabilidade do extrato enzimático

Os ensaios enzimáticos foram feitos, inicialmente, utilizando as suspensões mitocondriais intactas. Entretanto, a atividade da enzima NAD^+ -IDH caía a quase zero, em cerca de 3 horas, mesmo sob armazenamento a 4 °C (dados não-mostrados). Optou-se, então, pela adição de glicerol (5 M de concentração final) à suspensão mitocondrial, à semelhança dos procedimentos de COX e DAVIES (1967) e GIORGIO et al. (1970).

Nas suspensões mitocondriais acrescidas de glicerol e mantidas em banho de gelo, a atividade da NAD^+ -IDH de mitocôndrias de tubérculos de batata permaneceu inalterada no primeiro dia de armazenamento (Figura 1). Após este período, atividade decresceu linearmente ao longo do tempo, passando de 230 para 30 pmoles de $\text{NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

A enzima de raízes e hipocótilos de soja mostrou uma atividade específica sempre inferior à de batata (no início, cerca de 50% mais baixa) e semelhante perda progressiva de atividade (Figura 1).

A conservação do extrato enzimático a -20 °C resultou em aumento de 30% na atividade da NAD^+ -IDH extraída de tubérculos de batata, após um dia de armazenamento (Figura 2). Em seguida, houve queda progressiva da atividade,

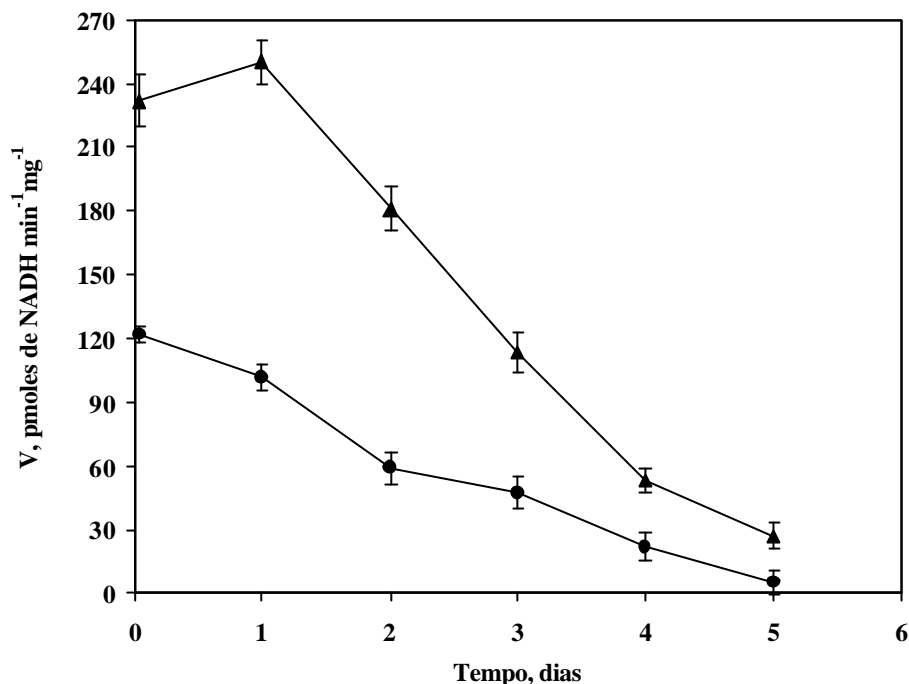


Figura 1 - Efeito do tempo de armazenamento do extrato enzimático em banho de gelo sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD^+ -IDH) de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (○) e de raízes e hipocótilos de soja (λ). As barras representam os desvios-padrão médios.

tendo, até o terceiro dia de armazenamento, a atividade da enzima de batata ainda sido comparável à atividade avaliada logo após a extração. Portanto, no caso da enzima de batata, os experimentos foram sempre executados com material mantido congelado por no máximo 72 horas. A enzima NAD^+ -IDH proveniente de raízes e hipocótilos de soja mostrou-se mais estável, devendo-se ressaltar que ao final de dez dias de congelamento sua atividade havia caído em apenas 25% (Figura 2).

Segundo McINTOSH (1997), a atividade da enzima, além de outros fatores, parece estar associada ao seu estado oligomérico. Assim, toda essa perda de atividade durante o tempo de armazenamento pode, de alguma forma, estar relacionada com a dissociação da enzima em agregados poliméricos menores. A forma nativa da enzima, em animais e em leveduras, é um homooctâmero. Em preparações de mitocôndrias de ervilha sem purificação (extrato cru), McINTOSH e OLIVER (1992) observaram a presença de duas diferentes formas com massas

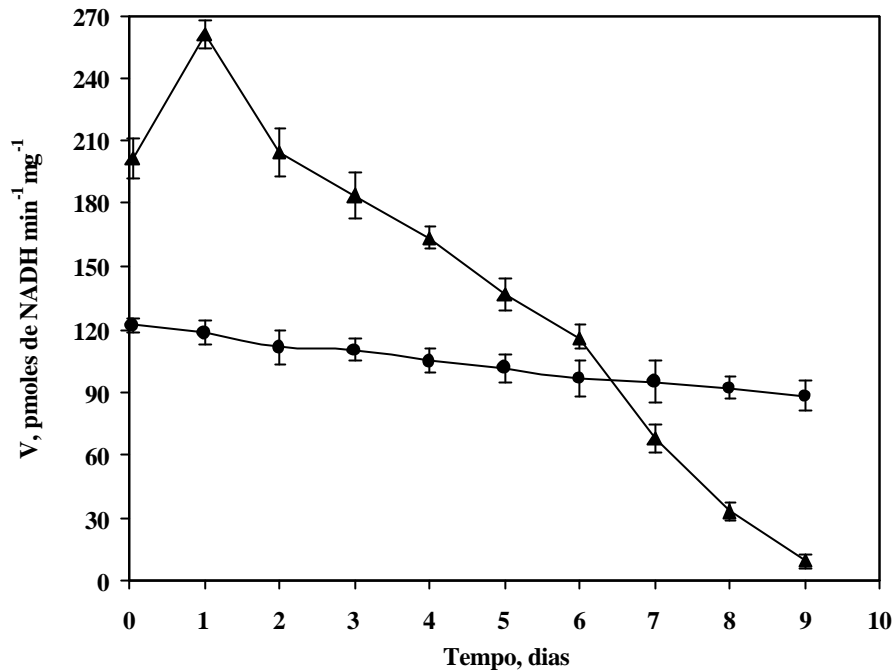


Figura 2 - Efeito do tempo de armazenamento do extrato enzimático a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD^{+} -IDH) de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (\circ) e de raízes e hipocótilos de soja (λ). As barras representam os desvios-padrão médios.

moleculares distintas (1400 e 690 kDa), com cerca da metade da atividade em cada porção.

3.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade da NAD^{+} -IDH está apresentado na Figura 3, para as mitocôndrias de batata e de soja. Houve aumento progressivo da velocidade de formação de NADH, em função do aumento da temperatura até $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, decréscimo dessa velocidade até $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, para os extratos enzimáticos dos dois tipos de mitocôndrias. Observa-se que a temperatura ótima para a atividade da NAD^{+} -IDH foi a mesma ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$), independente da fonte da enzima (batata ou soja). Nota-se que a atividade específica da isocitrato

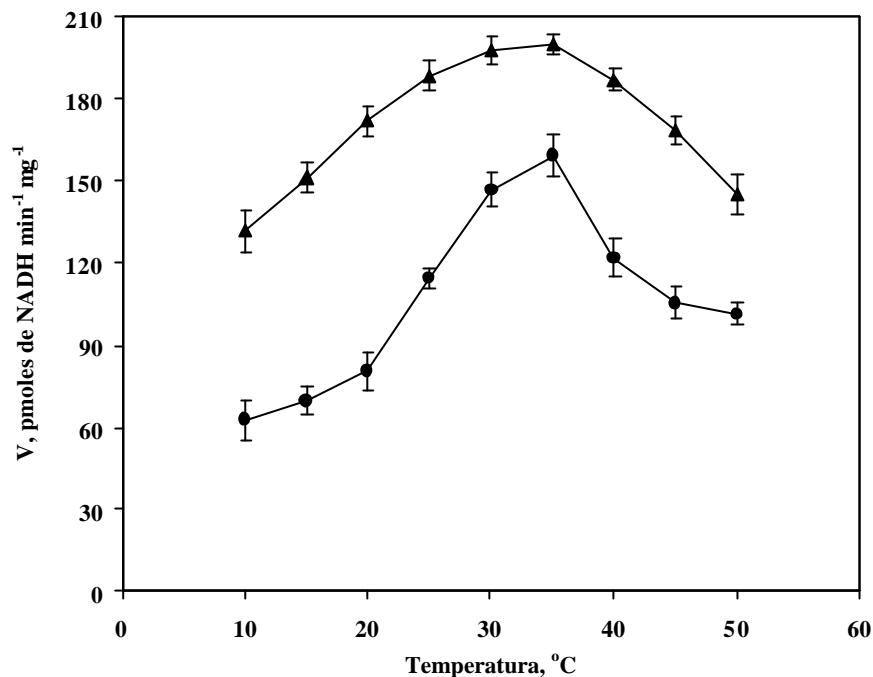


Figura 3 - Efeito da temperatura sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD^+ -IDH) de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (σ) e de raízes e hipocótilos de soja (λ). As barras representam os desvios-padrão médios.

desidrogenase de mitocôndrias de batata foi maior que a de mitocôndrias de soja, em todos os valores de temperatura analisados. Portanto, neste experimento, foi utilizado 35 °C.

Apesar de, praticamente, inexistirem trabalhos recentes sobre os efeitos da temperatura na atividade da NAD^+ -IDH, vários pesquisadores têm utilizado, como padrão, a temperatura de 30 °C, independente da fonte da enzima (WADANO et al., 1989; CHEN e GADAL, 1990; CUPP e McALISTER-HENN, 1993; NICHOLS et al., 1994).

3.3. Efeito do pH

A Figura 4 mostra o perfil da atividade da NAD^+ -IDH, em função do pH. Observa-se que o maior valor de atividade da NAD^+ -IDH de mitocôndrias de batata e de soja foi obtido mediante o uso do tampão HEPES 25 mM, em pH 7,5.

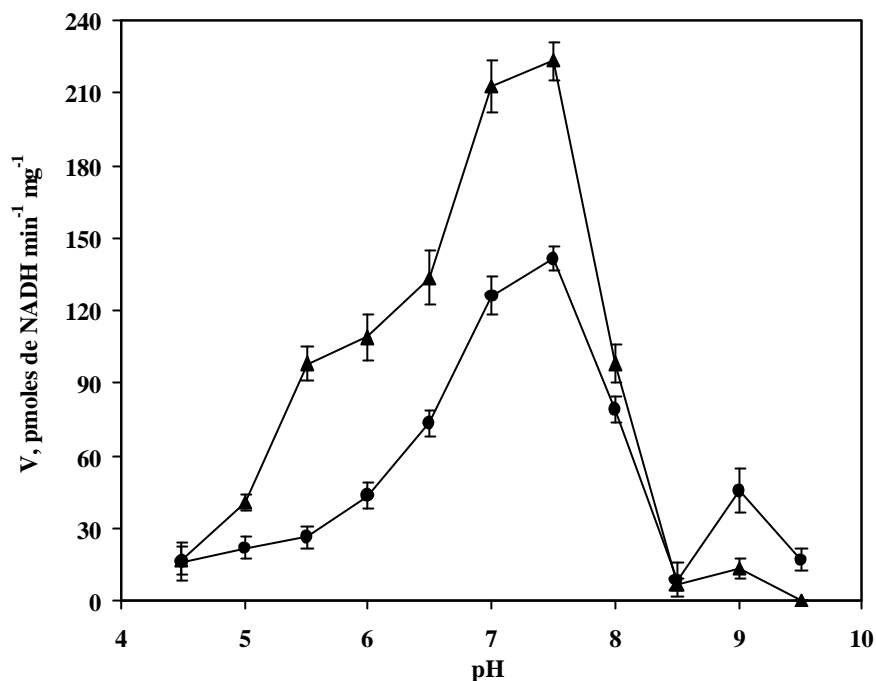


Figura 4 - Efeito do pH sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD^+ -IDH) de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (σ) e de raízes e hipocótilos de soja (λ). As barras representam os desvios-padrão médios.

COX (1969), trabalhando com enzimas extraídas de mitocôndrias de ervilha, observou que o pH ótimo para a reação foi de 7,6 em HEPES. Observações similares a esta foram feitas por TEZUKA e LATIES (1983), trabalhando com mitocôndrias de tubérculos de batata, que constataram que o pH ótimo da reação foi de 7,6. Analogamente, CORNU et al. (1996) observaram, em enzimas extraídas de mitocôndrias de *Picea abies*, que o pH ótimo para a NAD^+ -IDH foi de 7,4.

Foram testados, também, os valores de pH de 7,2, 7,3 e 7,4, sem que houvesse diferenças significativas entre eles (dados não-mostrados). Assim, nos experimentos utilizou-se pH 7,5 em tampão HEPES 25 mM.

COX e DAVIES (1969; 1970) observaram os efeitos do pH sobre o grau de cooperatividade e a afinidade da NAD^+ -IDH, extraída de ervilha, para o isocitrato. O grau de cooperatividade e a afinidade aparente da enzima foram estabelecidos em valores de pH na faixa de 6,4 – 8,7. Outra observação feita por

esses pesquisadores é que o pH ótimo da reação varia em função da relação NAD^+ : isocitrato. Nas mesmas condições utilizadas neste trabalho, para enzimas extraídas de mitocôndrias de ervilha, os pesquisadores obtiveram pH ótimo em 7,6.

Para ambos os materiais utilizados (batata e soja), com o aumento no pH de 7,5 para 8,5, houve perda de cerca de 90 % da atividade da enzima. Entretanto, uma redução no pH de 7,5 para 6,5, em ambos os materiais, resultou em diminuição da atividade enzimática em aproximadamente 40 %. Tal fato mostra que a atividade da enzima é muito mais sensível à alcalinidade do meio de reação.

3.4. Efeito de cátions divalentes

A atividade da NAD^+ -IDH, tanto para mitocôndrias de batata como para mitocôndrias de soja, mostrou-se bastante dependente de Mn^{2+} (Figura 5), devendo-se ressaltar que a maior atividade da enzima foi obtida na faixa de 100 a 1000 μM de concentração livre do íon. A utilização do EGTA, que atua quelando diferentes cátions, mostrou uma queda muito drástica da atividade enzimática, evidenciando a importância dos cátions na atividade da enzima.

Em batata, a utilização do EGTA fez com que a atividade da enzima caísse em cerca de 90% da velocidade de reação inicial. Entretanto, essa atividade, após a adição de Mn^{2+} , foi recuperada em níveis que superavam aos iniciais, evidenciando que o Mn^{2+} é capaz de satisfazer muito bem a exigência por cátions divalentes, da enzima extraída de tubérculos de batata. Em soja, o EGTA ocasionou perda de cerca de 40 % da atividade enzimática inicial. Tal fato mostra que a enzima extraída desse material deve ser menos dependente de cátions divalentes. Porém, a adição de Mn^{2+} permitiu incrementos na atividade da enzima semelhantes aos de batata, isto é, superiores aos níveis iniciais.

De maneira semelhante, os íons Mg^{2+} participaram da ativação da enzima (Figura 6), isto é, foram capazes de reverter os efeitos do EGTA. Porém, quando comparado ao Mn^{2+} , o Mg^{2+} teve participação menos relevante no aumento da atividade da enzima em relação ao controle. Na faixa de concentração de 500 a

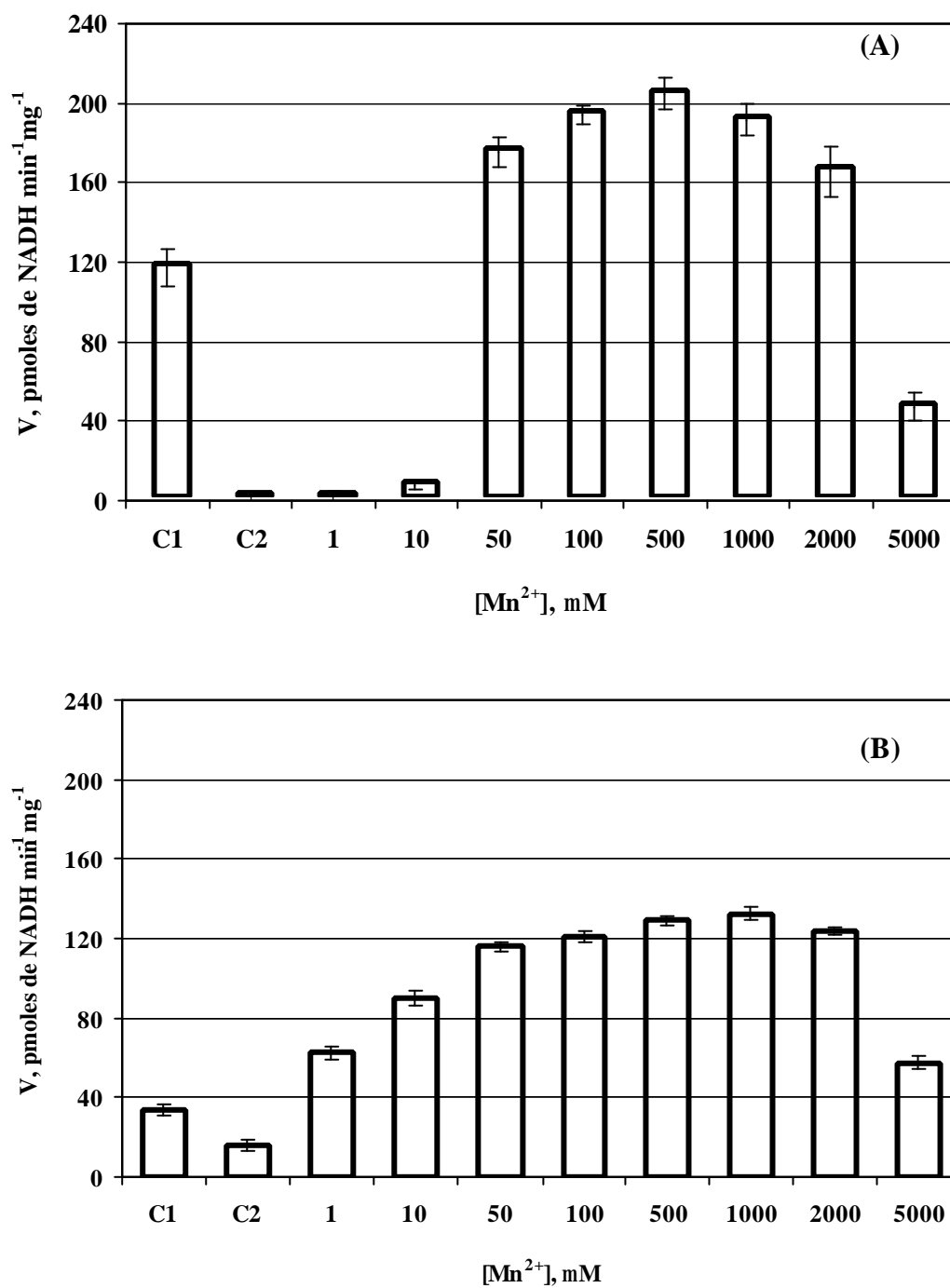


Figura 5 - Efeito da variação da concentração do Mn^{2+} sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD⁺-IDH) de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (A) e de raízes e hipocótilos de soja (B). C1: sem adição de Mn^{2+} ao meio de reação e C2: com adição de EGTA 100 μ M ao meio de reação. As barras representam os desvios-padrão médios.

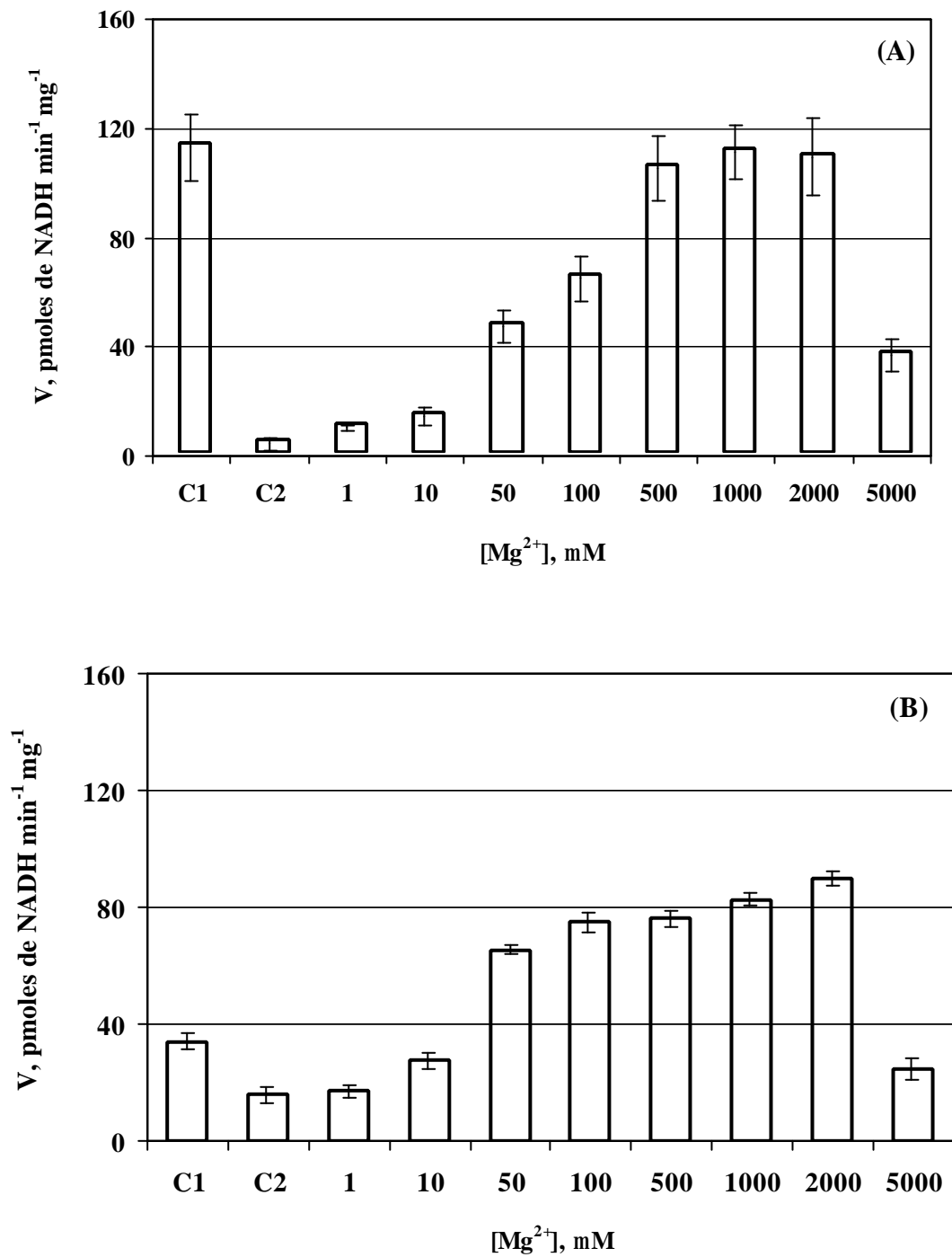


Figura 6 - Efeito da variação da concentração do Mg²⁺ sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD⁺-IDH) de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (A) e de raízes e hipocótilos de soja (B). C1: sem adição de Mg²⁺ ao meio de reação e C2: com adição de EGTA 100 μM ao meio de reação. As barras representam os desvios-padrão médios.

2.000 μM , foram obtidas as maiores atividades da $\text{NAD}^+\text{-IDH}$, sem atingir os mesmos níveis de atividade observados em presença de Mn^{2+} (Figura 5). Tanto os íons Mn^{2+} quanto os Mg^{2+} , em altas concentrações, diminuem a atividade da enzima.

De maneira semelhante, COX e DAVIES (1967) observaram que a $\text{NAD}^+\text{-IDH}$ de ervilha tem um absoluto requerimento pelos íons metálicos bivalentes Mn^{2+} e Mg^{2+} , porém, em altas concentrações, estes diminuem a atividade da enzima. Por outro lado, McINTOSH (1997) conseguiu bons resultados ao trabalhar com $\text{NAD}^+\text{-IDH}$ de mitocôndrias de ervilha, na presença de 5 mM de Mg^{2+} . Neste trabalho, esta concentração de Mg^{2+} resultou na diminuição da atividade da enzima extraída tanto de mitocôndrias de batata quanto de mitocôndrias de soja.

Ao contrário dos demais íons, o Ca^{2+} não foi capaz de recuperar a atividade da enzima após a adição de EGTA (Figura 7), diminuindo também a sua atividade, em concentrações mais elevadas (2 mM, para batata e 1 mM, para soja). Apesar disto, observou-se que a melhor resposta da enzima foi obtida na concentração de 100 μM de Ca^{2+} , porém, sem recuperação dos níveis anteriores à adição de EGTA.

RUTTER e DENTON (1989) e NICHOLS et al. (1994), trabalhando com $\text{NAD}^+\text{-IDH}$ extraída de coração de rato e porco, respectivamente, observaram que os íons cálcio permitem um grande estímulo da atividade enzimática. Entretanto, McCORMACK e DENTON (1981), trabalhando com várias fontes de $\text{NAD}^+\text{-IDH}$, observaram que o cálcio na concentração de 30 μM ativou a enzima extraída de todos os vertebrados analisados. Em contraste, constataram que em enzimas de insetos (gafanhoto, por exemplo) e batatas o cálcio não teve efeito significativo sobre a atividade da enzima. Os autores justificam a ausência de efeitos do cálcio sobre a atividade da enzima pela inexistência de sistemas transportadores de cálcio em mitocôndrias de plantas. Porém, as mitocôndrias de soja possuem tais sistemas (MARTINS e VERCESI, 1985; CARNIERI, 1986; SILVA, 1991), e ainda assim não sofreram estímulo, de sua enzima, pelo cálcio.

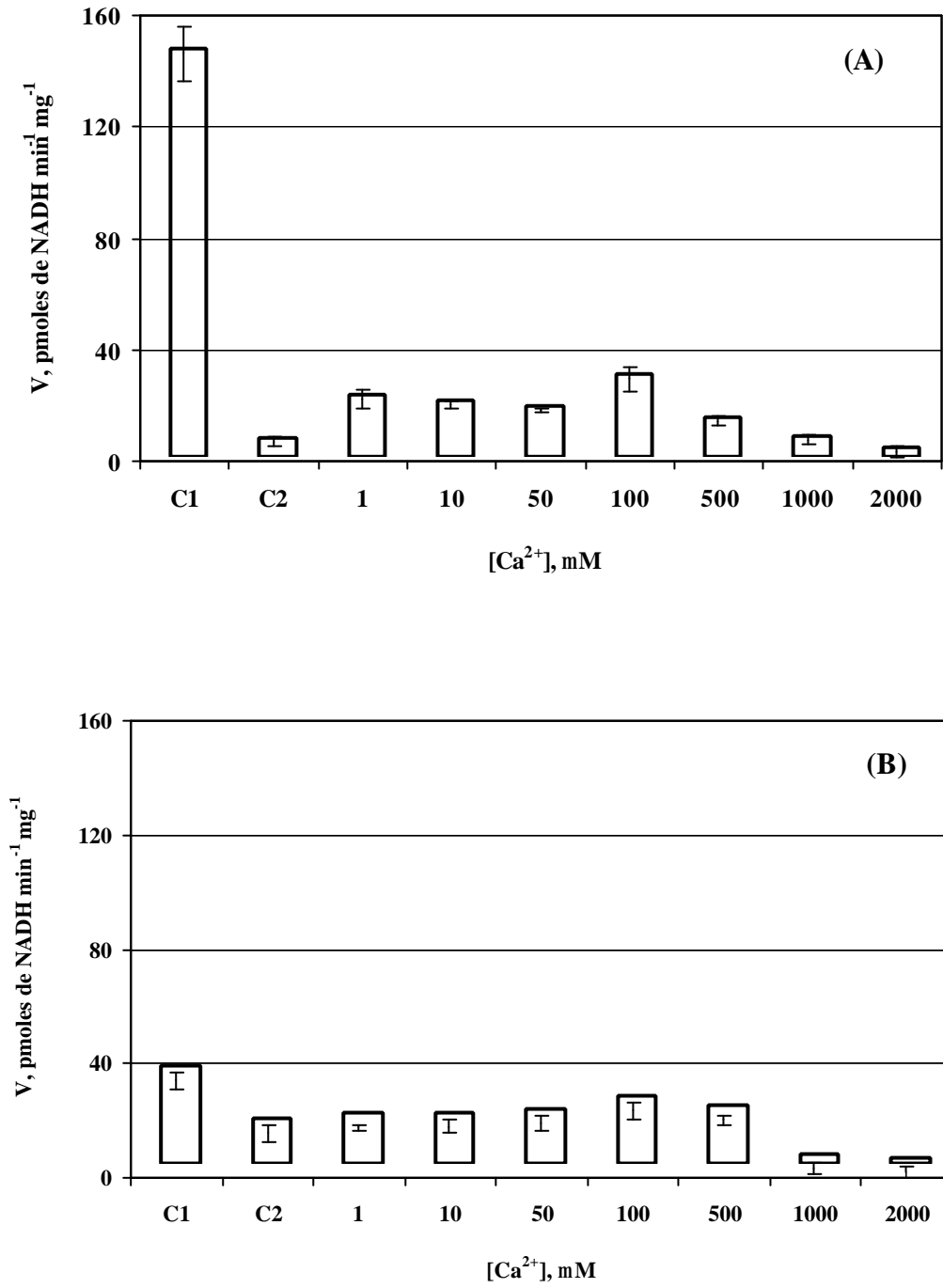


Figura 7 - Efeito da variação da concentração do Ca²⁺ sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD⁺-IDH) de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (A) e de raízes e hipocótilos de soja (B). C1: sem adição de Ca²⁺ ao meio de reação e C2: com adição de EGTA 100 μM ao meio de reação. As barras representam os desvios-padrão médios.

3.5. Efeito de ADP e ATP

Os efeitos do ADP e do ATP, na presença e ausência de Ca^{2+} , sobre a atividade da NAD^+ -IDH de mitocôndrias de batata e de soja estão apresentados nas Figuras 8 e 9. Observa-se que o ADP em concentrações mais elevadas, independente da presença de cálcio e da fonte da enzima, apresentou uma pequena diminuição da atividade da NAD^+ -IDH (Figuras 8 e 9). Contudo, entre o controle e as concentrações de 1 e 3 mM desse nucleotídeo, não houve diferenças quanto à diminuição da atividade enzimática.

O ATP, por outro lado, diminuiu, progressivamente, a atividade da enzima, extraída de mitocôndrias de tubérculos de batata, em função da sua concentração (Figura 8). Para as mitocôndrias de soja, observa-se que 1 mM de ATP foi suficiente para reduzir em cerca de 20 % a atividade da NAD^+ -IDH, sem efeitos adicionais nas concentrações mais elevadas (Figura 9).

Os dados apresentados são semelhantes aos de TEZUKA e LATIES (1983), que, trabalhando com a NAD^+ -IDH de mitocôndrias de batata, associadas à matriz e à membrana, observaram efeitos inibitórios do ADP e do ATP, na concentração de 5 mM, tendo o ATP o maior efeito. COX e DAVIES (1969) e McINTOSH e OLIVER (1992), por outro lado, trabalhando com esta enzima, extraída de ervilha, não constataram efeitos inibitórios, significativos, desses nucleotídeos. Tal fato contrasta com os dados obtidos para a enzima extraída de mitocôndrias de leveduras, gafanhotos e bovinos (McCORMACK e DENTON (1981), que é estimulada por ADP e AMP e inibida por ATP.

GIORGIO et al. (1970), trabalhando com a NAD^+ -IDH de coração bovino, relacionaram a razão do grau de dissociação com o de associação da enzima à sensibilidade da enzima aos nucleotídeos de adenina. Os autores observaram que a elevação da razão ADP/ATP estimulou a atividade da NAD^+ -IDH, por simular um aumento na demanda energética.

Um dos aspectos do efeito inibitório dos nucleotídeos, segundo TEZUKA e LATIES (1983), deve-se ao fato de que estes têm a capacidade de quelar os íons metálicos, principalmente o Mg^{2+} , que são essenciais à atividade da enzima. Além

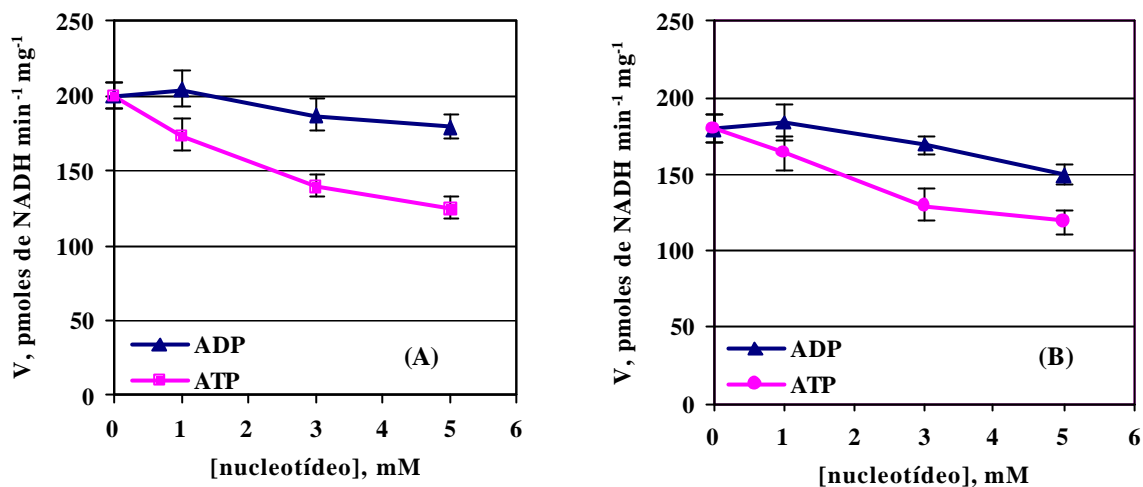


Figura 8 - Efeito dos nucleotídeos de adenina sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD⁺-IDH) de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata. (A) sem adição de Ca²⁺ ao meio de reação e (B) com adição de Ca²⁺ 100 μM ao meio de reação. As barras representam os desvios-padrão médios.

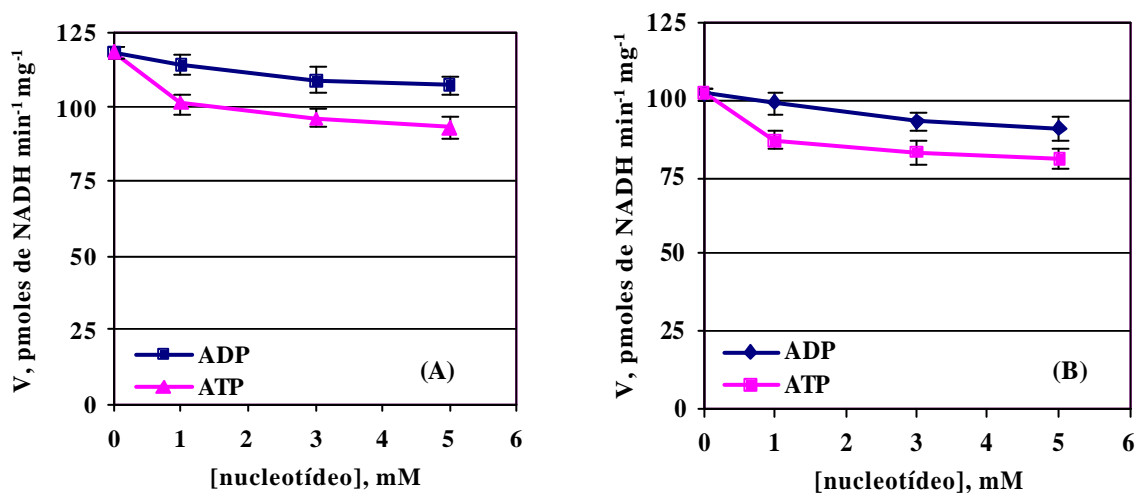


Figura 9 - Efeito dos nucleotídeos de adenina sobre a atividade específica da isocitrato desidrogenase (NAD⁺-IDH) de mitocôndrias isoladas de raízes e hipocótilos de soja. (A) sem adição de Ca²⁺ ao meio de reação e (B) com adição de Ca²⁺ 100 μM ao meio de reação. As barras representam os desvios-padrão médios.

disto, esses autores sugerem que a ligação dos nucleotídeos de adenina (ADP e ATP) na enzima ocasiona cooperatividade negativa desta.

3.6. Parâmetros cinéticos

As Figuras 10 e 11 apresentam os gráficos de MICHAELIS-MENTEN, para formação de NADH pela oxidação do isocitrato, catalisada pela NAD^+ -IDH de mitocôndrias de batata e de soja, respectivamente, em presença de citrato. Nessas figuras estão inseridos os gráficos de duplos recíprocos de LINEWEAVER-BURK.

Observa-se que não há diferenças entre as diferentes figuras, quanto aos valores de $K_{M \text{ app}}$. Em todas as situações analisadas, o $K_{M \text{ app}}$ esteve entre os valores de 0,099 e 0,120 mM. Porém, os valores de $V_{\text{máx app}}$ em NAD^+ -IDH de mitocôndrias de batata são cerca de duas vezes maiores que os de mitocôndrias de soja.

Trabalhos que envolvem NAD^+ -IDH e Ca^{2+} , em mitocôndrias animais, mostram que estes íons são muito importantes na ativação da enzima e que, geralmente, atuam diminuindo seu valor de K_M . Em coração de rato, por exemplo, esse valor variou de 0,470 para 0,075 mM após a adição de cálcio (RUTTER e DENTON, 1988; 1989; NICHOLS et al., 1994). Por outro lado, RUTTER et al. (1987), trabalhando com outras duas enzimas (piruvato desidrogenase e do oxoglutarato), além da NAD^+ -IDH, mostraram que o Ca^{2+} , em condições fisiológicas, tem menor influência sobre a NAD^+ -IDH do que sobre as outras enzimas.

MCCORMACK e DENTON (1981), utilizando uma variedade bastante grande de fontes de enzima, observaram que o Ca^{2+} causou significativo decréscimo no K_M da NAD^+ -IDH de pombos, rãs e coração de truta, mas não teve o mesmo efeito sobre a enzima extraída de insetos (ex. gafanhoto) e batatas. Em vez disto, o Ca^{2+} pareceu inibir a NAD^+ -IDH desses últimos organismos, em consequência da combinação de um modesto decréscimo em $V_{\text{máx}}$ (em batata, de 193 para 178 mU mg^{-1} , por exemplo) e um modesto incremento no K_M (em batata, de 0,135 para 0,140 mM, por exemplo), respectivamente.

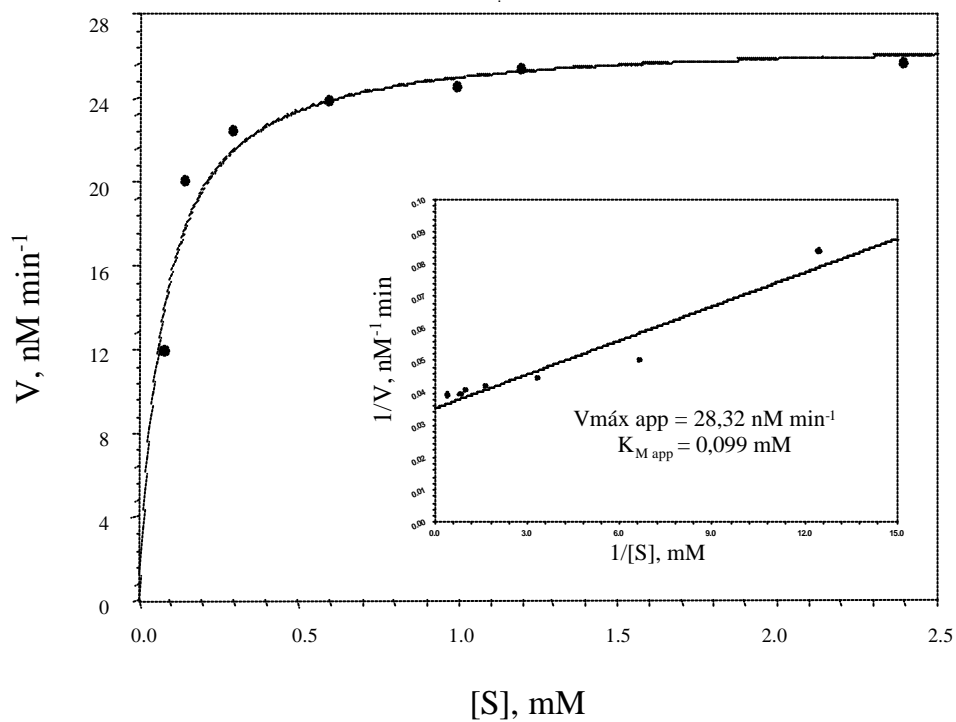
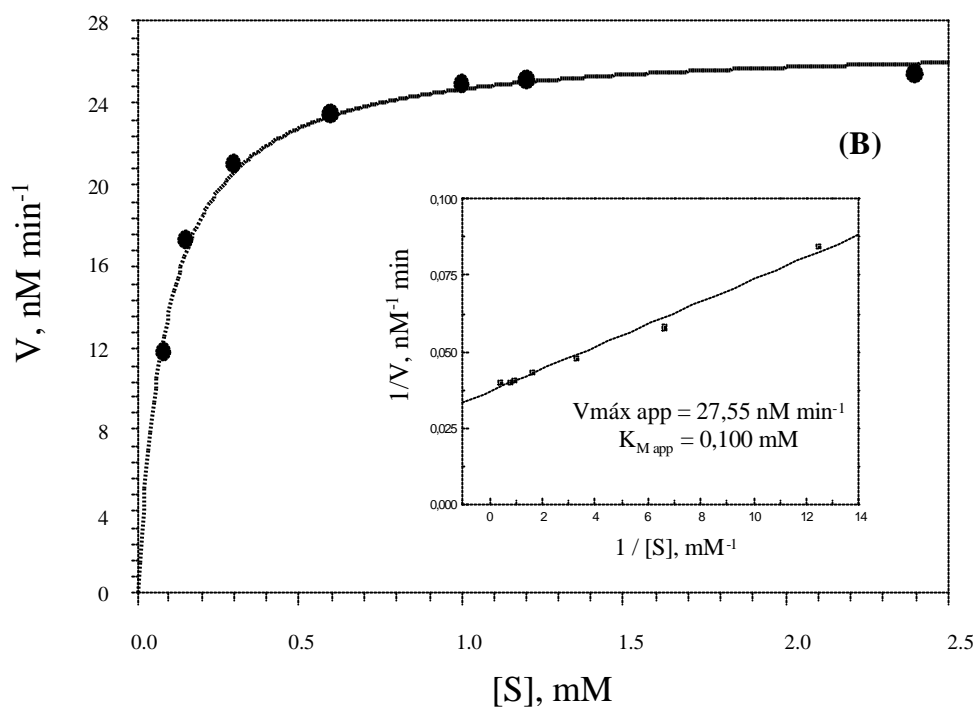


Figura 10 - Gráfico de MICHAELIS-MENTEN para oxidação do isocitrato catalisada pela NAD^+ -IDH extraída de mitocôndrias de tubérculos de batata ($70 \mu\text{g}$ de proteína), na presença de citrato 1 mM . (A) sem adição de Ca^{2+} e (B) com adição de $\text{Ca}^{2+} 100 \text{ mM}$.

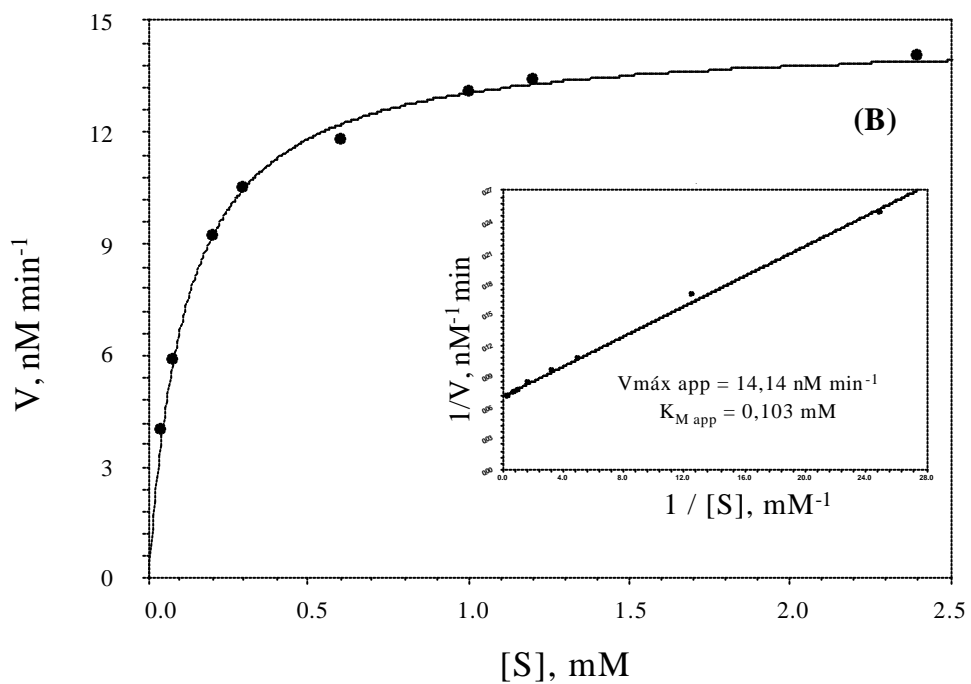
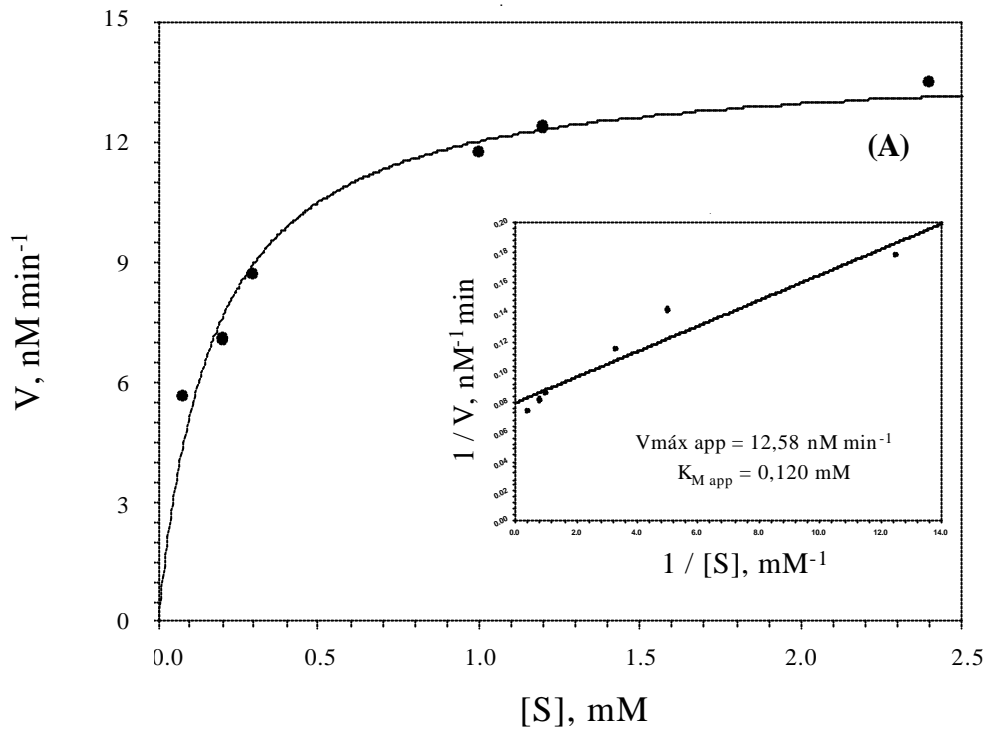


Figura 11 - Gráfico de MICHAELIS-MENTEN para oxidação do isocitrato catalisada pela NAD⁺-IDH extraída de mitocôndrias de raízes e hipocótilos de soja (95 µg de proteína), na presença de citrato 1 mM. (A) sem adição de Ca²⁺ e (B) com adição de Ca²⁺ 100 mM.

Neste trabalho, a presença do Ca^{2+} não exerceu efeito sobre os parâmetros cinéticos da enzima, independente da fonte desta.

Os valores obtidos estão de acordo com os de TEZUKA e LATIES (1983) e COX e DAVIES (1969), que obtiveram valores de K_M para NAD^+ -IDH de mitocôndrias de batata e de ervilha, respectivamente, na faixa de 0,1 a 0,2 mM.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve por principal objetivo verificar os efeitos de cátions divalentes e de nucleotídeos de adenina (ATP e ADP) sobre a atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ . Foram comparados, também, os efeitos do íon Ca^{2+} sobre a atividade da enzima extraída de mitocôndrias que captam cálcio (soja) e outras que não o captam (batata).

Para isso, foram utilizadas mitocôndrias extraídas de raízes e hipocótilos de soja e de tubérculos de batata, que após a adição de glicerol 5 M consistiram do extrato enzimático. A atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ foi, espectrofotometricamente, acompanhada pela formação de NADH, a 340 nm.

O armazenamento do extrato enzimático a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ permitiu sua utilização nos diferentes experimentos, durante três dias para batata e sete dias para soja.

Foi obtida atividade ótima em pH 7,5 e na temperatura de $35\text{ }^\circ\text{C}$.

Tanto o Mn^{2+} quanto o Mg^{2+} foram capazes de reverter a redução da atividade enzimática em presença de EGTA e permitiram aumentos consideráveis na atividade da isocitrato desidrogenase, independente do material utilizado. A atividade enzimática foi maior em presença de Mn^{2+} do que de Mg^{2+} . O Ca^{2+} , por outro lado, não permitiu a reversão dos efeitos do EGTA e tão pouco estimulou a atividade da enzima. Os três cátions, em concentrações elevadas, diminuíram a atividade enzimática, independente da fonte da mesma.

O ADP, independente da presença de cálcio, demonstrou pequena diminuição da atividade da enzima. Porém, não houve diferenças entre o controle e esse nucleotídeo nas concentrações de 1 e 3 mM. O ATP, em batata, nas diferentes concentrações, diminuiu a atividade da enzima, independente da presença do cálcio. Por outro lado, em soja, o ATP na concentração de 1 mM foi suficiente para diminuir a atividade da enzima, e concentrações mais elevadas do nucleotídeo não tiveram efeitos adicionais sobre a atividade enzimática.

Em média, os valores de K_M app, para ambas as enzimas e independente da presença de cálcio, foi de 0,10 mM. Analogamente, os valores de $V_{máx}$ app não variaram, na presença de cálcio, e foram aproximadamente de 28 nM min⁻¹ para batata e 13 nM min⁻¹ para soja.

Os dados não permitem afirmar que a capacidade das mitocôndrias em acumular cálcio esteja associada a um possível controle diferencial do cálcio sobre a atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NAD⁺.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNES, L.D., KUEHN, G.D., ATKINSON, D.E. Yeast diphosphopyridine nucleotide specific isocitrate dehydrogenase. Purification and some properties. **Biochemistry**, v.10, p.3939-3944, 1971.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
- BUSH, D.R., SZE, H. Calcium transport in tonoplast and endoplasmic reticulum vesicles isolated from cultured carrot cells. **Plant Physiol.**, v.80, p.549-555, 1986.
- 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 J. Med. Biol. Res.**, v.20, p.635-638, 1987.
- CHANSON, A. Active transport of proton and calcium in higher plant cells. **Plant Physiol. Biochem.**, v.31, n.6, p.943-955, 1993.
- CHEN, R.D., GADAL, P. Structure, functions and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenase in higher plants and in other organisms. **Plant Physiol. Biochem.**, v.28, p.411-427, 1990.

- CHIANG, G., DILLEY, R. Evidence for Ca^{2+} -gated proton fluxes in chloroplast thylakoid membranes: Ca^{2+} controls a localized to delocalized proton gradient switch. **Biochemistry**, v.26, p.4911-4916, 1987.
- CORNU, S., PIREAUX, J.C., GERARD, J., DIZENGREMEL, P. NAD(P)⁺-dependent isocitrate dehydrogenase in mitochondria purified from *Picea abies* seedlings. **Physiol. Plant.**, v.96, p.312-318, 1996.
- CUPP, J.R., McALISTER-HENN, L. Kinetic analysis of NAD⁺-isocitrate dehydrogenase with altered isocitrate binding sites: contribution of IDH1 and IDH2 subunits to regulation and catalysis. **Biochemistry**, v.32, p.9323-9328, 1993.
- COX, G.F. Isocitrate dehydrogenase (NAD-specific) from pea mitochondria. **Methods Enzymol.**, v.13, p.47-51, 1969.
- COX, G.F., DAVIES, D.D. Nicotinamide-adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from pea mitochondria. Purification and properties. **Biochem. J.**, v.105, p.729-734, 1967.
- COX, G.F., DAVIES, D.D. The effects of pH and citrate on the activity of nicotinamide Adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from pea mitochondria. **Biochem. J.**, v.113, p.813-820, 1969.
- COX, G.F., DAVIES, D.D. The effects of pH on the characteristics of the binding of nicotinamide-adenine dinucleotide by nicotinamide-adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from pea mitochondria. **Biochem. J.**, v.116, p.819-824, 1970.
- DENTON, R.M., McCORMACK, J.G. Ca^{2+} transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. **Am. J. Physiol.**, v.249, p.E543-E554, 1985.
- DIOLEZ, P., MOREAU, F. Effect of bovine serum albumin on membrane potential in plant mitochondria. **Physiol. Plant.**, v.59, p.177-182, 1983.
- DUGGLEBY, R.G., DENNIS, D.T. Regulation of the nicotinamide adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from a higher plant, the effect of reduced nicotinamide dinucleotide and mixtures of citrate and isocitrate. **J. Biol. Chem.**, v.245, p.3751-3754, 1970.
- GABRIEL, J.L., MILNER, R., PLAUT, G.W.E. Inhibition and activation of bovine heart NAD-specific isocitrate dehydrogenase by ATP. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.240, n.1, p.128-134, 1985.

- GILROY, S., BLOWERS, D.P., TREWAVAS, A.J. Calcium: a regulation system emerges in plant cells. **Development**, v.100, p.181-184, 1987.
- GIORGIO, N.A., YIP, A.T., FLEMING, J., PLAUT, G.W.E. Diphosphopyridine nucleotide-linked isocitrate dehydrogenase from bovine heart, polymeric forms and subunits. **J. Bio. Chem.**, v.245, p.5460-5477, 1970.
- HANSFORD, R.G. Control of mitochondrial substrate oxidation. **Curr. Top. Bioenerget.**, v.10, p.217-278, 1980.
- HANSFORD, R.G. Dehydrogenase activation by Ca^{2+} in cells and tissues. **J. Bioenerg. Biomemb.**, v.23, n.6, p.823-854, 1991.
- HANSFORD, R.G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. **Rev. Physiol. Biochem. Pharm.**, v.102, p.1-72, 1985.
- HANSFORD, R.G., ZOROV, D. Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. **Mol. Cell. Biochem.**, v.184, n.1-2, p.359-369, 1998.
- KAUSS, H. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. **Ann. Rev. Plant. Physiol.**, v.38, p.47-72, 1987.
- LATIES, G.G. Membrane-associated NAD-dependent isocitrate dehydrogenase in potato mitochondria. **Plant. Physiol.**, v.72, p.953-958, 1983.
- MARMÉ, D. The role of calcium in the cellular regulation of plant metabolism. **Physiol. Vég.**, v.23, n.6, p.945-953, 1985.
- MARTINS, I.S., CARNIERI, E.G., VERCESI, A.E. Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v.850, p.49-56, 1986.
- MARTINS, I.S., VERCESI, A.E. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.129, n.3, p.943-948, 1985.
- McCORMACK, J.G., DANIEL, R.L., OSBALDESTON, N.J., RUTTER, G.A., DENTON, R.M. Mitochondrial Ca^{2+} transport and the role of matrix Ca^{2+} in mammalian tissues. **Biochem. Soc. Trans.**, v.20, n.1, p.153-159, 1992.
- McCORMACK, 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. **Biochem. J.**, v.196, p.619-624, 1981.

- McINTOSH, C.A. Partial purification and characteristics of membrane-associated NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase activity from etiolated pea mitochondria. **Plant Sci.**, v.129, p.9-20, 1997.
- McINTOSH, C.A., OLIVER, D.J. NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase: isolation, purification, and characterization of the protein from pea mitochondria. **Plant Physiol.**, v.100, p.69-75, 1992.
- MYERNYK, J.A., RANDALL, D.D. Some kinetic properties of the pea mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. **Plant Physiol.**, v.83, p.306-310, 1987.
- NICHOLS, B.J., DENTON, R.M. Towards the molecular basis for the regulation of mitochondrial dehydrogenase by calcium ions. **Mol. Cel. Biochem.**, v.149/150, p.203-212, 1995.
- NICHOLS, B.J., RIGOLET, M., DENTON, M. Comparison of the effects of Ca²⁺, adenine nucleotides and pH on the kinetic properties of mitochondrial NAD⁺- isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rat heart. **Biochem. J.**, v.303, p.461-465, 1994.
- PALOMO, J., GALLARDO, F., SUÁREZ, M.F., CÁNOVAS, F.M. Purification and characterization of NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase from scots pine. evidence for different physiological roles of the enzyme in primary development. **Plant Physiol.**, v.118, p.617-626, 1998.
- RASMUSSEN, A., MOLLER, I.M. NADP-utilizing enzymes in the matrix plant mitochondria. **Plant Physiol.**, v.94, p.1012-1018, 1990.
- 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. **Biochem. J.**, v.263, p.445-452, 1989.
- 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. **Biochem. J.**, v.252, p.181-189, 1988.
- RUTTER, G.A., MIDGLEY, P.J.W., DENTON, R.M. Regulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase and NAD-linked isocitrate dehydrogenase within toluene-permeabilized mitochondria. **Biochem. Soc. Trans.**, v.15, p.5, p.834-835, 1987.
- 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.

- TEZUKA, T., LATIES, G.G. Isolation and characterization of inner membrane-associated and matrix NAD-specific isocitrate dehydrogenase in potato mitochondria. **Plant Physiol.**, v.72, p.959-963, 1983.
- TREWAVAS, A.J. Le calcium, c'est la vie: calcium makes waves. **Plant Physiol.**, v.120, p.1-6, 1999.
- VERCESI, A.E. Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.26, p.441-457, 1993.
- VERCESI, A.E., PEREIRA DA SILVA, L., MARTINS, I.S., CARNIERI, E.G.S., BERNARDES, C.F., FAGIAN, M.M. Ca^{2+} transport by liver and plant mitochondria. Aspects linked to the biological role. In: FISKUM, G. (Ed.), **Cell calcium metabolism**. New York: Plenum Press, 1989, p.103-111.
- WADANO, A., MIURA, K., IHARA, H., KONDO, N., TANIGUCHI, M. Purification and some properties of isocitrate dehydrogenase of a blowfly *Aldrichina grahamsi*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.94B, p.189-194, 1989.