

Marco Aurélio Pedron e Silva

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pelo candidato Marco Aurélio Pedron e Silva e aprovada pela comissão julgadora

*Marco Aurélio Pedron e Silva*  
6/8/92

CARACTERÍSTICAS DO TRANSPORTE DE  
CÁLCIO, FOSFATO E PRÓTONS EM  
MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

ORIENTADOR  
Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi *LC*

Campinas, 1991

Si38c

14484/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*219109429*

A minha esposa, Sandra,  
e aos meus filhos,  
Denise, Ronaldo e Flávia.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, pela orientação que tornou possível a execução deste trabalho.

A minha família, em especial à minha esposa, pelo apoio e pelas restrições a que se submeteram.

Ao Prof. Dr. Antônio C. Bianco, do Departamento de Fisiologia (ICB-USP-SP), pela colaboração e utilização de seu Laboratório nos primeiros isolamentos de proteína.

Ao Prof. Dr. Wamberto A. Varanda, do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela orientação nos experimentos desenvolvidos em seu laboratório e pelas sugestões ao manuscrito deste trabalho.

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo uso de equipamentos.

Ao Prof. Dr. W. C. Sgarbieri, do Instituto de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP, pelo uso da ultracentrífuga.

Ao Prof. Dr. William José da Silva, do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo fornecimento das sementes de milho.

Aos Profs. Drs. Ladslav Sodek, Lúcia Pereira da Silva e Hiroshi Ayoama pelas críticas e sugestões feitas à redação deste trabalho.

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

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioenergética do Instituto de Biologia da UNICAMP pela amizade, incentivo, e ajuda no trabalho diário, em especial à Márcia M. Fagian Pansani.

Aos colegas e amigos do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, pela licença concedida e pela ajuda e apoio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de Bolsa de Estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

## ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina-5'-difosfato
Ap5A	- Diadenosina penta-fosfato
ATP	- Adenosina-5'-trifosfato
BSA	- Albumina de soro bovino
CAT	- Carboxiatractilato
cAMP	- Adenosina monofosfato, forma cíclica
cGMP	- Guanosina monofosfato, forma cíclica
CR	- Controle respiratório
DNA	- Acido desoxi-ribonucléico
DNP	- 2,4-dinitrofenol
EDTA	- Acido etileno diamino tetra acético
EGTA	- Acido etileno glicol-bis-( $\beta$ -aminoetil eter)-NN'- tetra acético
FCCP	- p-trifluoro-metoxicarbonil cianeto fenil hidrazina
F <sub>0</sub>	- Porção da ATP-sintetase sensível à oligomicina
F <sub>1</sub>	- Porção catalítica da ATP-sintetase
GDP	- Guanosina-5'-difosfato
GTP	- Guanosina-5'-trifosfato
HEPES	- Acido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico
kDa	- Quilo-dalton
MBa	- Mitocôndrias de tubérculos de batata
MBe	- Mitocôndrias de raízes de beterraba
MF	- Mitocôndrias de fígado de rato
MM	- Mitocôndrias de coleóptiles de milho
MER	- Mersalil
MES	- Acido morfolino-etano-sulfônico
MOPS	- Acido morfolino-propano-sulfônico

NAD <sup>+</sup>	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NAD(P)H	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato), forma reduzida
OLIGO	- Oligomicina
Pi	- Fosfato inorgânico
POPOP	- 1,4-bis-(5-fenil oxazol-2)-benzeno
PPO	- 2,5-difenil oxazol
SDS	- Dodecil-sulfato de sódio
SHAM	- Ácido salicil-hidroxiâmico
SUC	- Succinato
TPB <sup>-</sup>	- Tetrafenilborato
TPP <sup>+</sup>	- Tetrafenilfosfônio
TRIS	- Tris (hidroximetil) aminometano
UCP	- Proteína desacopladora
VALINO	- Valinomicina
VR	- Vermelho de rutênio
$\Delta A_{520}$	- Variação de absorbância a 520 nm
$\Delta E$	- Diferença de força eletromotriz
$\Delta E_h$	- Diferença de potencial de oxi-redução
$\Delta G_p$	- Potencial de fosforilação
$\Delta p$	- Força protomotiva
$\Delta p_H$	- Gradiente químico de prótons
$\Delta \mu_{H^+}$	- Gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta \mu_{Ca^{2+}}$	- Gradiente eletroquímico de cálcio
$\Delta \psi$	- Potencial elétrico de membrana

## ÍNDICE

1.0. INTRODUÇÃO .....	01
2.0. REVISÃO DE LITERATURA .....	05
2.1. Organização da cadeia respiratória.....	05
2.2. NADH desidrogenases em mitocôndrias de plantas ..	07
2.2.1. Oxidação de NAD(P)H exógeno .....	07
2.2.2. Oxidação de NADH endógeno .....	09
2.3. Oxidase terminal insensível a cianeto .....	10
2.4. Acoplamento entre o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa .....	15
2.5. O controle respiratório .....	19
2.6. Atuação de BSA e ácidos graxos livres sobre o acoplamento mitocondrial .....	20
2.7. Mitocôndrias de tecido adiposo marrom .....	22
2.8. Os íons $Ca^{2+}$ e a transdução de sinais .....	26
2.8.1. O transporte de $Ca^{2+}$ por mitocôndrias animais	29
2.8.2. O efluxo de $Ca^{2+}$ mitocondrial .....	31
2.8.3. O transporte de $Ca^{2+}$ em mitocôndrias vegetais	35
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
3.1. Isolamento de mitocôndrias .....	39
3.1.1. Material vegetal .....	39
3.1.2. Meios utilizados durante o isolamento .....	39
3.1.3. Isolamento de mitocôndrias de batata .....	40
3.1.4. Isolamento de mitocôndrias de beterraba .....	41
3.1.5. Isolamento de mitocôndrias de milho .....	42
3.1.6. Isolamento de mitocôndrias de fígado .....	43

3.2. Dosagem de proteína mitocondrial .....	44
3.3. Meios de reação .....	44
3.4. Determinação do consumo de oxigênio .....	45
3.5. Avaliação do potencial elétrico de membrana .....	46
3.6. Determinação de $Ca^{2+}$ no meio de reação .....	48
3.7. Determinação de $Ca^{2+}$ e fosfato intramitocondriais	49
3.8. Determinação da variação do volume mitocondrial .	51
3.9. Determinação da ligação de nucleotídeos a mito- côndrias isoladas .....	52
3.10. Isolamento de uma proteína de mitocôndrias de tubérculos de batata, com possível função desa- copladora.....	54
3.11. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida .....	55
3.12. Incorporação da proteína em bicamada lipídica ...	56
3.12.1. Obtenção das bicamadas lipídicas planas.....	56
3.12.2. Circuito eletrônico associado .....	57
3.12.3. Incorporação da proteína com possível fun- ção desacopladora à bicamada lipídica .....	58
4.0. RESULTADOS .....	60
4.1. Captação de $Ca^{2+}$ por mitocôndrias isoladas de diferentes órgãos vegetais ou de um mesmo órgão com diferentes idades .....	60
4.2. Dependência de fosfato para a captação de $Ca^{2+}$ por mitocôndrias de coleóptiles de milho .....	67
4.3. Efluxo de $Ca^{2+}$ em mitocôndrias de coleóptiles de milho .....	70
4.4. Independência de fosfato para o efluxo de $Ca^{2+}$ em mitocôndrias de coleóptiles de milho .....	76
4.5. Nucleotídeos de purina e acoplamento em mito-	



côndrias de tubérculos de batata .....	81
4.6. Ligação de nucleotídeos de purina a mitocôndrias de fígado e de batata .....	89
4.7. Alterações na permeabilidade a $K^+$ e/ou $Cl^-$ pro- movidas por BSA e nucleotídeos de purina em mi- tocôndrias de batata .....	91
4.8. Isolamento de uma proteína de tubérculos de ba- tata, com possível função desacopladora.....	96
4.9. Incorporação da proteína isolada em bicamadas lipídicas .....	101
5.0. DISCUSSÃO .....	114
5.1. Aspectos relacionados ao transporte de $Ca^{2+}$ .....	114
5.2. Aspectos relacionados ao acoplamento em mito- côndrias de batata .....	123
6.0. RESUMO .....	136
7.0. SUMMARY .....	139
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	141

## 1.0. INTRODUÇÃO

Uma das funções fundamentais das mitocôndrias de qualquer ser vivo é fornecer ATP como fonte principal de energia para a célula, além de produzir e liberar numerosos compostos intermediários que podem ser utilizados como substratos em compartimentos celulares diversos. Para a execução dessas funções básicas, a organização estrutural e funcional de mitocôndrias de animais e de plantas manteve-se basicamente a mesma, apesar de bilhões de anos de divergência evolutiva (HALL et alii, 1982; DOUCE & NEUBURGER, 1989).

Dentre as semelhanças encontradas, destacam-se: a) a morfologia de mitocôndrias de animais e de plantas é extremamente similar (GUNNING, & STEER, 1975; HALL et alii, 1982); b) a organização dos fosfolípidios nas membranas de ambos os tipos de mitocôndrias é essencialmente idêntica (HARWOOD, 1985); c) a seqüência dos transportadores que mediam o fluxo de elétrons do NADH e do succinato até o  $O_2$  via citocromo oxidase (isto é, a via sensível a cianeto), assim como a estrutura fundamental do sistema de fosforilação (complexo ATPase) são semelhantes em plantas, fungos e animais (PALMER, 1976; DOUCE et alii, 1987; NORLING et alii, 1987); d) os mecanismos de ejeção de prótons e os sistemas de conservação de energia são similares (MOORE & RICH, 1985); e) as mitocôndrias de plantas possuem diversos carreadores de ânions ( $H_2PO_4^-$ , ADP/ATP, piruvato, etc...) similares aos encontrados nas mitocôndrias de outros organismos (DAY &

WISKICH, 1984); e f) o funcionamento do ciclo dos ácidos tricarboxílicos é também análogo em qualquer tipo de mitocôndria considerado (WISKICH & DRY, 1985).

Entretanto, existem várias características específicas de mitocôndrias vegetais, que se assume serem um reflexo de sua evolução, no sentido de permitir o seu funcionamento nos sistemas autotróficos. Estas características especiais incluem: a) uma oxidase terminal alternativa, que permite uma atividade respiratória insensível a cianeto (SIEDOW & BERTHOLD, 1986); b) capacidade de oxidação de NADH externo e uma via adicional de oxidação de NADH interno insensível à rotenona (MOLLER, 1986); c) ocorrência de uma enzima málica na matriz mitocondrial (RUSTIN et alii, 1980; LANCE & RUSTIN, 1984); d) ocorrência, em tecidos clorofilados de plantas C3, de uma enzima capaz de descarboxilar oxidativamente a glicina, como parte do metabolismo foto-respiratório do glicolato (TOLBERT, 1980; DAY et alii, 1985a; PETIT & CANTREL, 1986); e) presença de um carreador para o transporte de oxaloacetato (DOUCE & BONNER, 1972; DeSANTIS et alii, 1976; ZOGLOWEK et alii, 1988); f) carreadores para a captação de NAD, coenzima A e tiamina pirofosfato (DOUCE et alii, 1985); e g) um DNA de maior tamanho e complexidade que o encontrado em mitocôndrias animais (DOUCE et alii, 1985; DOUCE & NEUBURGER, 1989).

Muitas destas diferenças destacadas foram atribuídas, durante muitos anos, a artefatos gerados por danificação ou contaminações, ocorridos durante o processo de isolamento das mitocôndrias de plantas. Isto porque, em função da presença de parede celulósica rígida, são necessários métodos mais drásticos para a ruptura da maioria dos tecidos

vegetais. Adicionalmente, há extravazamento do conteúdo dos vacúolos ácidos, geralmente portadores de hidrolases e fenol-oxidases, capazes de alterar as características estruturais e funcionais das mitocôndrias isoladas (DOUCE et alii, 1985).

Entretanto, o uso de gradientes de densidade de Percoll permitiu o isolamento de mitocôndrias vegetais extremamente purificadas, sem a interferência de membranas plastídicas ou de qualquer enzima extramitocondrial (NEUBURGER et alii, 1982; DAY et alii, 1985b; GOMEZ-SILVA et alii, 1985). Deste modo é possível obter preparações vegetais com 97% de mitocôndrias intactas e virtualmente livres de interferentes. Após vários anos de testes intensivos, hoje é possível reconhecer que muitas das diferenças encontradas são representativas das verdadeiras propriedades de mitocôndrias vegetais (DAY et alii, 1985b; DOUCE et alii, 1985; DOUCE & NEUBURGUER, 1989).

Persistem discussões a respeito do mecanismo de transporte de  $Ca^{2+}$ , por mitocôndrias de plantas. As abordagens mais recentes encontram-se nos trabalhos de MARTINS & VERCESI (1985), MARTINS et alii (1986), CARNIERI et alii (1987) e VERCESI et alii (1989). Eles conseguiram demonstrar que, quando presente, o sistema mitocondrial transportador de  $Ca^{2+}$  de mitocôndrias de plantas é mais semelhante ao de animais do que se supunha anteriormente, diferenciando-se, apenas, por uma atividade mais baixa e pela exigência absoluta de transporte simultâneo de fosfato. Os resultados obtidos por estes autores foram atribuídos aos métodos utilizados, que permitiram a obtenção de mitocôndrias com maior grau de acoplamento.

Embora a exigência por fosfato seja evidente e tenha amplo apoio da literatura, não há registros acompanhando o transporte deste ânion, simultaneamente ao de  $\text{Ca}^{2+}$ . Também não existem dados relativos ao possível papel do fosfato sobre as vias de efluxo deste cátion, em mitocôndrias de plantas. Por isto, numa parte do presente trabalho, procurou-se investigar mais detalhadamente tanto os processos de captação quanto os de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfato, em mitocôndrias de coleóptiles de milho, no sentido de esclarecer os mecanismos envolvidos, assim como o papel da ocorrência de movimento cíclico de  $\text{Ca}^{2+}$ , em mitocôndrias de plantas.

Dentre outras dificuldades envolvidas no trabalho com mitocôndrias isoladas de plantas, destaca-se a necessidade do uso de quantidades relativamente elevadas de BSA, desde os meios de extração até mesmo nos de reação. Isto é feito no sentido de evitar as deficiências de acoplamento normalmente observadas e capazes de interferir na maioria das atividades mitocondriais. Como este tipo de problema (assim como outros descritos mais adiante) é comum a mitocôndrias de tecido adiposo marrom de vertebrados (NICHOLLS, 1979), numa segunda parte do presente trabalho procurou-se estabelecer um paralelo entre algumas das características destas mitocôndrias e as de plantas. Para esta finalidade foram utilizadas mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, investigando-se aspectos diversos relacionados ao seu acoplamento, incluindo a possível participação de uma proteína desacopladora, semelhante à de mitocôndrias de tecido adiposo marrom.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Algumas das características especiais de mitocôndrias de plantas encontram-se destacadas, a seguir, devido à sua importância para a compreensão do funcionamento destas organelas no metabolismo vegetal.

### 2.1. ORGANIZAÇÃO DA CADEIA RESPIRATÓRIA

A cadeia respiratória de mitocôndrias de plantas, como também acontece em animais e leveduras, consiste fundamentalmente de quatro complexos protéicos: o Complexo I (responsável pela transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona); o Complexo II (que efetua a transferência de elétrons do succinato para a ubiquinona); o Complexo III (também chamado de Complexo citocromo b-c<sub>1</sub>, responsável pela transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c); e o Complexo IV ou citocromo c oxidase (que efetua a transferência de elétrons do citocromo c para o O<sub>2</sub>). Com exceção do citocromo c, todos estes complexos são extremamente hidrofóbicos e, por consequência, encontram-se imersos na bicamada lipídica fluida da membrana interna mitocondrial. As próprias quinonas livres, dispersas no cerne da bicamada lipídica, são os agentes móveis que efetuem a conexão entre os complexos protéicos doadores

(complexo I ou II) e o receptor (complexo III) (WISKICH et alii, 1960; HANSON & DAY, 1980; STOREY, 1980; NICHOLLS, 1982; HATEFI, 1985; DURAND, 1986; KOEPPE & SIEDOW, 1987; DOUCE et alii, 1987).

A transferência de elétrons do substrato para o  $O_2$ , através dos vários complexos, é acoplada a uma translocação eletrogênica de prótons através da membrana interna mitocondrial, resultando em acúmulo líquido de prótons no lado externo. De acordo com a Hipótese Quimiosmótica (MITCHELL, 1961; MITCHELL, 1980), as bombas de prótons (ao nível dos complexos I, III e IV) fornecem a ligação entre a oxi-redução e a síntese de ATP. Existem hoje, consideráveis evidências de que a síntese de ATP, nas mitocôndrias, é acompanhada pela reentrada de prótons, via uma ATPase vetorial reversível, localizada na membrana interna (HANSON & DAY, 1980; HATEFI, 1985; DURAND, 1986; DOUCE et alii, 1987; FUTAI et alii, 1989). O Complexo ATPase (ou Complexo V) apresenta dois componentes: um hidrofóbico ( $MF_0$ ), constituído por um complexo protéico integral da membrana e envolvido no movimento transmembranar de prótons, bloqueável pela oligomicina (CRIDDLE et alii, 1977; NICHOLLS, 1982), e outro hidrofílico ( $MF_1$ ), podendo ser destacado da membrana como um complexo solúvel, onde se encontra o sítio ativo de síntese de ATP (NICHOLLS, 1982; HATEFI, 1985; NORLING et alii, 1987; FUTAI et alii, 1989).

Ainda, de modo análogo ao que acontece em animais, o transporte de elétrons através destes transportadores, em mitocôndrias de plantas, pode ser bloqueado pela ação de alguns inibidores. Por exemplo, o Complexo I é inibido por rotenona, a antimicina A é capaz de inibir o Complexo III, e

o cianeto (assim como o monóxido de carbono e a azida sódica) bloqueia a cadeia respiratória ao nível do Complexo IV (NICHOLLS, 1982; DOUCE et alii, 1985; DURAND, 1986).

Entretanto, mesmo em presença de um ou mais dos inibidores citados anteriormente, é possível se detectar o funcionamento da cadeia respiratória, e o conseqüente consumo de  $O_2$ , em mitocôndrias isoladas de um grande número de tecidos vegetais (DOUCE et alii, 1985; DOUCE & NEUBURGER, 1989). Isto se deve ao fato de que, em mitocôndrias de plantas, além da cadeia respiratória anteriormente descrita, e universalmente presente, podem ocorrer algumas desidrogenases adicionais, assim como uma oxidase terminal alternativa, descritas a seguir.

## 2.2. NADH DESIDROGENASES EM MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS

### 2.2.1. OXIDAÇÃO DE NAD(P)H EXÓGENO

As mitocôndrias de plantas superiores são capazes de catalisar uma rápida oxidação de NADH exógeno, sem a adição de citocromo c (DOUCE, 1985). O NADH exógeno é oxidado por uma NADH desidrogenase localizada na superfície externa da membrana interna, que injeta elétrons diretamente no reservatório de ubiquinona, desviando do complexo I e do primeiro sítio de translocação de prótons (MOLLER, 1986). Esta via, que é insensível à rotenona, mas capaz de ser



inibida por antimicina A, parece não estar conectada com a oxidase alternativa. Consequentemente, a oxidação de NADH externo através desta desidrogenase, que não requer NADH translocase, conduz a uma razão ADP/O similar à da oxidação do succinato (DOUCE & NEUBURGER, 1987). A atividade desta NADH desidrogenase é regulada por concentrações micromolares de  $Ca^{2+}$ , que é freqüentemente encontrado ligado às membranas mitocondriais em quantidades suficientes para assegurar atividade máxima, parecendo não envolver a participação de calmodulina (MOLLER & LIN, 1986).

Similarmente, as mitocôndrias de plantas também oxidam NADPH exógeno, com razão ADP/O abaixo de 2, insensibilidade à rotenona, e sensibilidade à antimicina A (PALMER & MOLLER, 1982; PALMER & WARD, 1985). Como as oxidações de NADH e de NADPH exógenos comportam-se diferentemente em relação ao pH, a agentes quelantes e à inibição pelo mersalil, prevalece a idéia de que existem duas desidrogenases distintas, na superfície externa da membrana interna, uma específica para NADH e outra para NADPH (MOLLER & PALMER, 1981; DOUCE & NEUBURGER, 1989).

O significado metabólico da presença destas desidrogenases adicionais, capazes de oxidar NAD(P)H citosólico, presentes em todos os tipos de mitocôndrias isoladas até o momento, permanece desconhecido. Como elas exibem um  $K_m$  baixo, é provável que elas sirvam como lançadeiras entre as fontes citoplasmáticas de NAD(P)H (via glicolítica, via das pentoses-fosfato,  $\beta$ -oxidação em peroxissomos) e a cadeia respiratória, o que favoreceria a continuidade de operação destas vias (DOUCE & NEUBURGER, 1989).

### 2.2.2. OXIDAÇÃO DE NADH ENDÓGENO

A oxidação de NADH endógeno em mitocôndrias de plantas parece ser mais complexa do que nas organelas correspondentes de animais. Isto porque inibidores como piericidina A ou rotenona, que inibem a oxidação de NADH em mitocôndrias de animais (interagindo com os centros Fe/S do complexo I), causam apenas uma inibição parcial (às vezes imperceptível) em mitocôndrias de plantas. A determinação do ATP formado indica que a via resistente à rotenona não está acoplada ao primeiro sítio de síntese do mesmo, ao contrário da via sensível à rotenona (PALMER, 1976).

Parece, portanto, que as mitocôndrias de plantas, em contraste com as de animais, possuem duas NADH desidrogenases localizadas na superfície interna da membrana interna. Uma destas desidrogenases oxida NADH endógeno de uma maneira sensível à rotenona, estando, portanto, acoplada à síntese de 3 moléculas de ATP, sendo similar ao complexo I caracterizado em mitocôndrias animais (DOUCE & NEUBURGER, 1989). Esta NADH desidrogenase tem um  $K_m$  aparente para o NADH de 8  $\mu\text{M}$  (MOLLER & LIN, 1986), e opera em estreita relação com todas as desidrogenases dependentes de NAD, do ciclo de Krebs, que utilizam o reservatório comum de  $\text{NAD}^+$  presente no espaço da matriz (NEUBURGER & DOUCE, 1983).

A segunda NADH desidrogenase está conectada à cadeia respiratória através do reservatório de ubiquinona, é insensível à inibição pela rotenona e está acoplada à

síntese de somente 2 moles de ATP (PALMER, 1976). Em contraste com o complexo I, esta desidrogenase exibe baixa afinidade pelo NADH interno e difere da NADH desidrogenase associada com a face externa da membrana interna (também resistente à rotenona) por não ser sensível a EGTA ou ao  $\text{Ca}^{2+}$  (MOLLER & PALMER, 1982; MOLLER & LIN, 1986).

O papel fisiológico desta NADH desidrogenase interna adicional não está bem esclarecido. DOUCE & NEUBURGER (1987) sugerem que o complexo I deve estar associado com a oxidase sensível ao cianeto, enquanto que a desidrogenase insensível à rotenona estaria associada com a oxidase alternativa (resistente ao cianeto), formando uma via totalmente não fosforilativa, para a oxidação de NADH endógeno, quando a carga energética estiver elevada.

### 2.3. OXIDASE TERMINAL INSENSÍVEL A CIANETO

Quase todas as mitocôndrias isoladas de plantas mostram uma respiração residual na presença de  $\text{CO}$ ,  $\text{N}_2$  ou  $\text{CN}^-$  (LATIES, 1982; SIEDOW & BERTHOLD, 1986), como também acontece numa ampla variedade de fungos (incluindo leveduras e Neurospora) e vários microorganismos (DOUCE & NEUBURGER, 1989).

Em 1971, BENDALL e BONNER demonstraram que a respiração insensível ao cianeto e à antimicina A era mediada por uma via adicional de transporte de elétrons, envolvendo o mesmo conjunto de desidrogenases da cadeia respiratória, mas desviando-se dos citocromos, provavelmente atra-

vés de uma segunda oxidase (a oxidase terminal alternativa). Esta via alternativa é inibida por ácidos benzohidroxâmicos substituídos, como o ácido salicil-hidroxâmico (SHAM), o antioxidante n-propilgalato e o dissulfiram (HENRIKA-WAGNER et alii, 1986; DOUCE & NEUBURGER, 1989).

Como os elétrons se ramificam a partir da ubiquinona para a oxidase alternativa, eles não passam por dois sítios de conservação de energia (translocação de prótons), ao nível dos complexos III e IV. Assim, a maior parte da energia liberada, durante a transferência de elétrons, é perdida como calor, ao invés de ser inicialmente estocada como gradiente de prótons para posterior síntese de ATP (SIEDOW & BERTHOLD, 1986). Entretanto, a transferência de elétrons para o  $O_2$  através da via alternativa não pode ser considerada totalmente não fosforilativa, porque os elétrons derivados do ciclo de Krebs, via NADH interno, passam através do complexo I, podendo gerar 1/3 do ATP normalmente produzido (MOORE & RICH, 1985). Este é, na verdade, um valor máximo e teórico, por causa da existência da NADH desidrogenase interna insensível à rotenona, que também não está associada à fosforilação oxidativa (PALMER & WARD, 1985).

Embora a respiração alternativa, resistente ao cianeto, tenha sido registrada há mais de 60 anos, o seu papel fisiológico permanece obscuro. Em tecidos com atividade elevada da via alternativa (flores masculinas de Cycas e inflorescências de algumas espécies das famílias Annonaceae, Araceae, Aristolochiaceae, Cyclanthaceae e Nymphaeaceae) o significado fisiológico desta via é melhor conhecido, estando claro o seu papel termogênico (LATIES,

1982; DOUCE & NEUBURGER, 1989).

Nas Araceae, por exemplo, a produção de calor, por intermédio do fluxo de elétrons através da via alternativa, é usada para volatilizar substâncias odoríferas que atraem insetos, facilitando a polinização (MEEUSE, 1975). No dia do florescimento, a via alternativa torna-se operante, e o amido que tinha sido acumulado até este estágio é queimado em poucas horas, como consequência de uma taxa extremamente elevada de glicólise e respiração (apREES et alii, 1977; LATIES, 1982; LANCE et alii, 1985). No climax, este fenômeno pode conduzir a temperaturas localizadas superiores em 15 °C em relação à temperatura ambiente, em Arum maculatum, ou ainda maiores em Alocasia pubera (MEEUSE, 1975; DOUCE et alii, 1985).

Entretanto, apesar da via resistente ao cianeto ser de larga ocorrência entre as plantas, a sua capacidade freqüentemente representa somente cerca de 20 a 30% da taxa obtida na ausência de cianeto (HENRY & NYNS, 1975). Além disso, a maioria das plantas não é termogênica, e as taxas respiratórias associadas com os tecidos vegetais são muito baixas para se esperar produção significativa de calor, esteja ativa ou não a via alternativa (SIEDOW & BERTHOLD, 1986).

De início surgiram teorias de que a via alternativa seria um vestígio evolucionário de uma cadeia de transporte de elétrons mais antiga e menos eficiente, ou ainda, que ela tivesse aparecido entre as plantas cianogênicas, como meio de sobreviver a incrementos periódicos de cianeto (LYR & SCHEWE, 1975; LAMBERS, 1980). No entanto, não há apoio experimental para estas duas hipóteses, não tendo sido

encontrada correlação entre plantas que são cianogênicas e a presença de via alternativa (SIEDOW & BERTHOLD, 1986; MUSGRAVE & SIEDOW, 1987).

Um papel fisiológico mais geral para a via alternativa foi proposto por PALMER (1976) e por LAMBERS (1980), sugerindo que esta via só receberia elétrons que não pudessem ser acomodados na via dos citocromos. Assim, em condições de "excedente energético", as plantas poderiam fazer uso deste curto circuito, como meio de continuar transformando esqueletos carbônicos, mesmo em presença de níveis elevados de ATP. Reforçando esta idéia, LAMBERS (1980) relata que a via alternativa está ativa somente quando há um excesso de suprimento de carboidratos para as raízes, em relação às suas necessidades de utilização (para crescimento estrutural, produção de energia, reserva e osmo-regulação). Em tecidos foliares de trigo e espinafre, AZCON-BIETO et alii (1983) observaram que a via alternativa não estava ativa (embora presente) pela manhã, quando os níveis de carboidratos eram baixos, mas, após várias horas de fotossíntese, a taxa de respiração aumentava e a via alternativa tornava-se ativa.

Embora a hipótese do "excedente energético" seja extremamente atrativa e consistente com algumas evidências experimentais, ela foi criticada severamente por BRYCE & apREES (1985), ao observarem que sacarose em excesso não aumenta significativamente a taxa respiratória de raízes de ervilha. No entanto, a proposição de PALMER (1976) vai além de uma simples regulação por excesso de substrato, sugerindo que a atuação da via não fosforilativa poderia permitir o

funcionamento contínuo do ciclo de Krebs, mesmo quando o tráfego de elétrons através da via dos citocromos fosse inibido pela carga energética (DOUCE & NEUBURGER, 1989). Deste modo, a via alternativa poderia funcionar como um mecanismo fornecedor de numerosos substratos (como citrato) para utilização em vias sintéticas citoplasmáticas ou de outras organelas.

Embora muita pesquisa tenha sido feita, abordando a via alternativa a nível fisiológico, relativamente pouca informação existe a nível bioquímico da(s) proteína(s) envolvida(s). Acredita-se que a via alternativa consista de um único complexo, chamado "oxidase alternativa", que funciona como uma ubiquinol: oxigênio oxiredutase (BONNER & RICH, 1978). Usando esta premissa, HUQ & PALMER (1978) e RICH (1978) descreveram simultaneamente a solubilização de uma quinol oxidase, sensível a SHAM, de mitocôndrias de espádi-dices de Arum maculatum, altamente resistentes a cianeto. Ambos obtiveram, na verdade, extratos relativamente crus, contendo quantidades significativas de cobre, citocromo b, carotenóides e várias proteínas.

Pouco se progrediu nesta área, até que BONNER et alii (1986) registraram a caracterização da oxidase de Arum maculatum, como uma proteína contendo Fe, com um peso molecular aparente em torno de 34 kDa, mostrando uma extrema sensibilidade ao calor. ELTHON & McINTOSH (1986 e 1987) registraram o isolamento da oxidase alternativa de Sauromatum gutatum, obtendo um grupo de proteínas na faixa de 35 kDa. Nestes três casos, foram obtidos grandes incrementos na atividade específica, durante a purificação progressiva. No entanto, os perfis eletroforéticos

apresentados mostram a presença de outras bandas protéicas, além das destacadas pelos autores. É interessante notar que, coincidentemente, certos mutantes do fungo Neurospora crassa, deficientes em oxidase alternativa, não apresentam uma banda de 35 kDa, em géis de SDS/poliacrilamida, presente na linhagem selvagem (BERTRAND et alii, 1979).

Mais recentemente, foi conseguido um melhor nível de purificação, possibilitando a obtenção de anticorpos produzidos a partir da oxidase alternativa de Sauromatum, que mostraram reação cruzada com proteínas de várias outras espécies (ELTHON & McINTOSH, 1987; ELTHON et alii, 1989a, 1989b).

#### 2.4. ACOPLAMENTO ENTRE O TRANSPORTE DE ELÉTRONS E A FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

O transporte de elétrons executado pela cadeia respiratória está acoplado à saída de prótons, através da membrana interna mitocondrial, que estabelece um gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu_{H^+}$ ), ou força protomotiva ( $\Delta p$ ), capaz de dirigir a fosforilação do ADP (MITCHELL, 1961, 1969). O gradiente eletroquímico de prótons compreende dois componentes: um componente elétrico, o potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ), negativo internamente, e um componente químico, o gradiente de pH ( $\Delta pH$ ), alcalino na matriz, que são interconvertíveis, e relacionados através da seguinte equação:

$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta\psi - 60 \Delta pH$$



Determinações experimentais de  $\Delta\psi$  têm mostrado valores muito altos para mitocôndrias de plantas, na faixa de 220-240 mV, (MANDOLINO et alii, 1983; DUCET et alii, 1983; DIOLEZ & MOREAU, 1985, MARTINS et alii, 1986) comparados aos de mitocôndrias animais, entre 150-180 mV, (AKERMAN & WIKSTROM, 1976; KAMO et alii, 1979; NICHOLLS, 1982). Além disso, o valor de  $\Delta pH$  em mitocôndrias de plantas parece ser inferior (20 a 30 mV) ao de mitocôndrias animais (30 a 70 mV) (MITCHELL & MOYLE, 1969; MOORE & RICH, 1985; DIOLEZ & MOREAU, 1985). Tais diferenças são atribuídas à presença de um trocador  $K^+/H^+$ , extremamente ativo em mitocôndrias de plantas, que promoveria o colapso de  $\Delta pH$ , resultando em aumento de  $\Delta\psi$  (HENSLEY & HANSON, 1975; BERNARDI & AZZONE, 1983; DIOLEZ & MOREAU, 1985). De fato, a nigericina, que converte  $\Delta pH$  em  $\Delta\psi$ , por promover a troca  $K^+/H^+$ , tem pouco (ou nenhum) efeito em mitocôndrias de plantas (MANDOLINO et alii, 1983; DUCET et alii, 1983; DIOLEZ & MOREAU, 1985).

A fosforilação do ADP é dirigida pelo fluxo de prótons, que atravessam a membrana através de um canal condutor de prótons, a porção  $F_0$  da ATP-sintetase, e é catalizada num sítio ativo localizado na porção  $F_1$  deste complexo enzimático (MITCHELL, 1961, 1969, 1976; BOYER et alii, 1977; NICHOLLS, 1982). Quando ADP está ausente (CHANCE & WILLIAMS, 1956), ou a razão extramitocondrial ATP/ADP estiver muito alta (DRY & WISKISCH, 1982),  $\Delta\mu H^+$  aumenta e restringe a taxa de transporte de elétrons (e consequente consumo de  $O_2$ ), resultando no chamado controle respiratório.

A hipótese do acoplamento quimiosmótico proposta por Mitchell é a melhor descrição disponível para a

fosforilação oxidativa mitocondrial (BOYER et alii, 1977; NICHOLLS, 1982; HATEFI, 1985; DURAND, 1986; SENIOR, 1988; FUTAI et alii, 1989). Entretanto, existem evidências de que a hipótese de Mitchell pode estar incompleta (WESTERHOFF et alii, 1984; FERGUSON, 1985). Existem propostas de modificações da hipótese do acoplamento quimiosmótico, tais como as de unidades de acoplamento localizado (WESTERHOFF et alii, 1984), ou a de interações diretas entre bombas de prótons (SLATER et alii, 1985; SLATER, 1987). Não está claro ainda se estas (e outras) propostas são um melhoramento da hipótese original de Mitchell, ou se os efeitos que elas tentam explicar são apenas artefatos experimentais (FERGUSON, 1985; DUSZYNSKI & WOJTCZAK, 1985; MURPHY, 1989).

O baixo rendimento da fosforilação oxidativa é devido à transdução incompleta da energia disponível nos substratos reduzidos ( $\Delta E_h$ ) em energia livre ( $\Delta G_p$ ), estocada na forma de ATP (MURPHY, 1989). De acordo com este autor, a oxidação e a fosforilação são incompletamente acopladas, devido à ocorrência de dois tipos de fenômenos: evasão ("slip") e vazamento ("leak") de espécies iônicas, ambos resultando em liberação de energia como calor.

De acordo com MURPHY (1989), ocorreria evasão (slip) quando decrescesse o número de prótons translocados através da membrana, em relação ao fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Neste caso, uma menor fração de  $\Delta E_h$  seria convertida em  $\Delta p$  e conseqüentemente em  $\Delta G_p$ . Esta situação seria resultante de alterações na estequiometria das bombas mitocondriais de prótons, que poderiam ocorrer como conseqüência de valores muito elevados de  $\Delta p$ , ou pela

exposição das bombas de prótons a certos compostos ou condições especiais (ácidos graxos livres, desacopladores artificiais). Adicionalmente, alterações na via de fluxo de elétrons do NADH até o oxigênio, podem alterar tal estequiometria. Um caso excepcional de evasão (slip) é o da existência de vias alternativas em mitocôndrias de plantas, onde se incluem a oxidase terminal alternativa e as diversas NAD(P)H adicionais (DOUCE & NEUBURGER, 1989), que representam possíveis desvios dos pontos de bombeamento de prótons.

A situação de vazamento (leak) é caracterizada pelo desvio no retorno de prótons, que voltam à matriz sem passar pela porção  $F_0$  da ATP-sintetase (MURPHY, 1989). Neste caso há completa conversão de  $\Delta E_h$  em  $\Delta p$ , mas parte da energia livre acumulada na forma de  $\Delta p$  é dissipada como calor. Vazamento ocorre em condições diversas, incluindo desde o aumento na condutância, promovido por valores elevados de  $\Delta \Psi$  (NICHOLLS, 1977; BRAND & MURPHY, 1987), à operação de carreadores de metabólitos e íons (troca glutamato/ aspartato, transporte de cálcio, trocador  $K^+/H^+$ , etc) (MEIJER & VAN DAM, 1974; MARTIN et alii, 1984; HANSFORD, 1985), até a situação especial da participação da proteína desacopladora do tecido adiposo marrom (NICHOLLS, 1979; KLINGENBERG & LIN, 1986; MURPHY, 1989).

## 2.5. O CONTROLE RESPIRATÓRIO

As preparações mitocondriais consomem oxigênio lentamente na ausência de substrato respiratório, ao que se denomina estado 1 (CHANCE & WILLIAMS, 1956; HALL et alii, 1982). A velocidade de consumo de  $O_2$  é aumentada pela adição de um intermediário do ciclo de Krebs. A adição de ADP ao meio de incubação causa novo aumento na taxa de consumo de  $O_2$ , que então declina, quando todo o ADP adicionado tiver sido fosforilado a ATP. A respiração acelerada em presença de ADP é denominada estado 3 e a respiração consecutiva (a partir do término da fosforilação do ADP) estado 4. O estado 2 é medido na presença de ADP, mas sem substrato, enquanto que o estado 5 é obtido na presença de ambos, mas na ausência de oxigênio.

O controle do ADP sobre a taxa de consumo de  $O_2$  é indicativo do grau de acoplamento da fosforilação oxidativa e é caracterizado pela razão entre a velocidade de respiração no estado 3 e no estado 4 (CHANCE & WILLIAMS, 1956). Quanto maior for o valor do controle respiratório, melhor é a qualidade da preparação mitocondrial, sendo que em mitocôndrias vegetais o controle respiratório geralmente está entre 2 e 10 (HALL et alii, 1982).

Na ausência de ADP,  $^{\Delta}pH^+$  aumenta e exerce retroinibição da cadeia respiratória, reduzindo o fluxo de elétrons e o consumo de  $O_2$  (DRY & WISKICH, 1982; DAY et alii, 1987); BRYCE et alii, 1990). O consumo de  $O_2$ , em presença

de um substrato específico e na ausência de ADP (estado 4), é, presumivelmente, determinado pela razão  $H^+/2e^-$  e pela condutância da membrana interna a prótons (DAY et alii, 1987). Por sua vez, a condutância é dependente da permeabilidade da membrana e do  $\Delta\mu H^+$ , seguindo um comportamento não ôhmico (DAY et alii, 1987; BRAND & MURPHY, 1987; WHITEHOUSE et alii, 1989; BRYCE et alii, 1990).

Mitocôndrias isoladas de plantas freqüentemente mostram taxas relativamente rápidas de consumo de  $O_2$  no estado 4 (DUCET, 1979; DIOLEZ & MOREAU, 1983; DAY et alii, 1987), o que conduz a razões de controle respiratório geralmente inferiores às obtidas com mitocôndrias animais. Este comportamento tem sido atribuído a fatores diversos, desde a alta permeabilidade da membrana interna a prótons (DUCET, 1979; DIOLEZ & MOREAU, 1985) até a operação de vias não fosforilativas (como a oxidase terminal alternativa, insensível a cianeto) (LATIES, 1982; DOUCE, 1985).

#### 2.6. ATUAÇÃO DE BSA E ACIDOS GRAXOS LIVRES SOBRE O ACOPLAMENTO MITOCONDRIAL

Há muito tem sido observado que a adição de BSA ao meio de reação, decresce, direta ou indiretamente, a permeabilidade de mitocôndrias de batata a prótons (DUCET, 1979; DIOLEZ & MOREAU, 1983). No entanto, o modo de ação da BSA não está inteiramente esclarecido. DUCET (1979) obteve evidências de que a BSA age diretamente ao nível da membrana, sendo incorporada reversivelmente e, assim,

modificando a sua estrutura, ao contrário das sugestões iniciais de WOJTCZAK & WOJTCZAK (1960) e de DALGARNO & BIRT (1963), de que a BSA agiria por se ligar a ácidos graxos. Mais tarde, DIOLEZ & MOREAU (1983) retornaram à idéia inicial de quelação de ácidos graxos, mostrando que a remoção de 50% dos ácidos graxos livres (através da purificação em gradiente de Percoll) decrescia a dependência de BSA para o estabelecimento do potencial de membrana. Demonstraram, ainda, que a liberação de ácidos graxos, pelo envelhecimento "in vitro", decrescia o controle respiratório, a razão ADP/O, e colapsava o potencial de membrana; a adição de BSA restaurava completamente o potencial de membrana e a fosforilação oxidativa.

Também é controvertida a maneira pela qual os ácidos graxos livres atuam sobre as mitocôndrias. WOJTCZAK (1976), numa revisão, afirma que os ácidos graxos livres e os acil-CoA aumentam a permeabilidade da membrana interna mitocondrial a cátions monovalentes (mas somente na ausência de  $Mg^{2+}$ ), e que, em altas concentrações, causam desacoplamento clássico (atuando como protonóforos, diretamente sobre a bicamada lipídica). Ao contrário, ROTTENBERG (1983) considerou a atuação dos ácidos graxos livres similar à atuação dos anestésicos gerais (estimulando a respiração no estado 4 e a atividade ATPásica, sem decrescer  $\Delta p$ ), e propôs para eles a designação de "decouplers". Entretanto, LUVISETTO et alii (1987) observaram decréscimo em  $\Delta p$ , por ação dos ácidos graxos, e propuzeram que eles atuam não só como desacopladores clássicos, mas também agem como desacopladores intrínsecos das bombas de prótons.

Mais recentemente, ANDREYEV et alii (1988) analisaram observações anteriores de que os ácidos graxos livres não aumentam a condutância de bicamadas lipídicas e de proteolipossomas contendo citocromo oxidase (ao contrário do que se obtém com desacopladores clássicos, que agem como protonóforos). Com isto, sugeriram que componentes protéicos da membrana estão envolvidos no desacoplamento promovido pelos ácidos graxos, à semelhança do que acontece com a bem esclarecida atuação da proteína desacopladora do tecido adiposo marrom. Estes mesmos autores chegaram à conclusão de que o trocador ATP/ADP está envolvido no desacoplamento por baixas concentrações de ácidos graxos, uma vez que o carboxiatractilato inibe o seu efeito. Sugeriram, ainda, que este transportador age facilitando a translocação do ânion palmitato através da membrana mitocondrial. Confirmando esta idéia, SCHONFELD (1990) mostrou que a sensibilidade ao desacoplamento promovido pelos ácidos graxos depende do tipo de mitocôndria, de acordo com o seu conteúdo de translocase de nucleotídeos de adenina.

## 2.7. MITOCÔNDRIAS DE TECIDO ADIPOSEO MARROM

Alguns mamíferos (incluindo os hibernantes, alguns roedores, e recém-nascidos humanos) possuem massas discretas de tecido adiposo marrom, predominantemente nas regiões torácicas e cervicais, caracterizado como tecido gerador de calor (NICHOLLS, 1979; NICHOLLS & LOCKE, 1984; KLINGENBERG &

LIN, 1986). Os adipócitos deste tipo de tecido apresentam numerosas gotículas multiloculares de triglicerídeos e um conteúdo extremamente elevado de mitocôndrias com membranas altamente invaginadas (NICHOLLS, 1979; NICHOLLS & RIAL, 1984).

A resposta metabólica do tecido adiposo marrom a um estresse frio agudo inclui queda quase total, e muito rápida, das reservas de triglicerídeos, em hamsters expostos a 4°C, e em jejum (NICHOLLS, 1979). Ao invés de gerar ATP, a maior parte da energia liberada pela oxidação é convertida em calor, em consequência da elevada condutividade a H<sup>+</sup> apresentada pela membrana interna deste tipo de mitocôndria (NICHOLLS, 1977). Neste caso, os íons H<sup>+</sup>, exportados pela cadeia respiratória, retornam à matriz, desviando-se da síntese de ATP, sem passar pela porção F<sub>0</sub> da ATP sintetase. O característico desacoplamento observado neste tipo de mitocôndria (SMITH et alii, 1966; PEDERSEN, 1970) é, portanto, explicado por este curto-circuito na corrente de prótons, através da membrana interna (NICHOLLS, 1977; NICHOLLS, 1979; KLINGENBERG & LIN, 1986).

A elevada permeabilidade das mitocôndrias do tecido adiposo marrom a H<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> pode ser inibida por nucleotídeos de purina di ou trifosfatados, (GDP, GTP, ATP, ADP) (PEDERSEN, 1970; NICHOLLS, 1974a,b; DESAULTELS et alii, 1978). Os sítios de ligação dos nucleotídeos, responsáveis pelo controle do acoplamento, foram localizados na face externa da membrana interna e identificados como diferentes dos sítios de translocação de ADP/ATP por RAFAEL & HELDT (1976) e NICHOLLS (1976).

Experimentos de fotoafinidade com azido-ATP



indicaram ligação associada a uma única banda protéica, na faixa de 32 kDa (HEATON et alii, 1978). Em seguida foi conseguido o isolamento de uma banda proeminente de 32 kDa, em gel de SDS-poliacrilamida, por RICQUIER et alii (1979) e por LIN & KLINGENBERG (1980). Devido ao seu papel termogênico, conseguido através do desacoplamento, esta proteína foi denominada de termogenina ou proteína desacopladora (UCP) (LIN et alii, 1980; CANNON et alii, 1982; KLINGENBERG & LIN, 1986).

Estudos de incorporação da UCP em lipossomas permitiram a confirmação de que esta proteína é responsável pelo aumento na condutância a  $H^+$  e  $Cl^-$ , podendo ser inibida por GDP (STRIELEMAN et alii, 1985a), sendo que apenas a condutância a  $H^+$  foi estimulada por ácidos graxos de cadeia longa (STRIELEMAN et alii, 1985b). O mesmo tipo de experimento permitiu, ainda, demonstrar que o sítio de ligação de nucleotídeos e o de translocação de prótons têm identidades separadas (KATYAR & SHRAGO, 1989).

É importante ressaltar as similaridades entre a UCP e o translocador ADP/ATP, que vão além dos pesos moleculares muito próximos e da capacidade de ligar nucleotídeos (KLINGENBERG, 1989, 1990). Ambos podem ser isolados por exclusão em hidroxiapatita, após solubilização por detergentes não aniônicos (LIN & KLINGENBERG, 1982, KLINGENBERG & LIN, 1986). Quando isolados, formam micelas semelhantes, contendo dímeros com somente um sítio de ligação por subunidade (LIN et alii, 1980; KLINGENBERG, 1989, 1990), o que deve refletir a sua organização funcional dimérica ao nível da membrana (RICCIO et alii, 1975, LIN &

KLINGENBERG, 1980). Também são grandes as similaridades na sua estrutura primária (AQUILA et alii, 1985), o que permitiu a AQUILA et alii (1987) proporem que estas duas proteínas, juntamente com o translocador de Pi, compõem uma família de proteínas homólogas, envolvidas no transporte de solutos relacionados com a transferência de energia na mitocôndria. KLINGENBERG (1990) explorou várias evidências de que a UCP atua como um translocador de H<sup>+</sup>, ao invés de formar canal na membrana, e propôs uma origem evolutiva recente para a UCP, uma vez que ela é encontrada apenas no tecido adiposo marrom, exclusivo de alguns mamíferos (RIAL & NICHOLLS, 1983; AQUILA et alii, 1987; MURPHY, 1989).

A termogênese do tecido adiposo marrom é controlada pelo sistema nervoso simpático, via noradrenalina (NEDEGAARD & LINDBERG, 1979; CUNNINGHAM & NICHOLLS, 1987). A noradrenalina interage com receptores  $\beta$ -adrenérgicos na superfície da célula, estimulando a produção de cAMP, via adenilato ciclase. O cAMP interage, então, com uma proteína quinase para ativar uma lipase, resultando na liberação de ácidos graxos (NICHOLLS & RIAL, 1988). Estes, além de atuarem como substrato respiratório, acionam um processo de vazamento (leak) na membrana interna mitocondrial, ao deslocarem os nucleotídeos que, ligados à UCP, inibiam a atividade desta proteína em translocar H<sup>+</sup> (LOCKE et alii, 1982a,b; CUNNINGHAM et alii, 1986; KLINGENBERG & LIN, 1986; KLINGENBERG, 1987; MURPHY, 1989).

## 2.8. OS ÍONS $\text{Ca}^{2+}$ E A TRANSDUÇÃO DE SINAIS

Os organismos vivos desenvolveram mecanismos pelos quais eles traduzem sinais extracelulares em eventos intracelulares. As bases bioquímicas da transdução dos sinais extracelulares têm sido intensivamente estudadas em células animais, onde os sistemas de sinalização usam "segundos mensageiros" tais como cAMP, cGMP e  $\text{Ca}^{2+}$  (BERRIDGE, 1985; BOCKAERT, 1986; CARAFOLI, 1988; NICHOLLS & RIAL, 1988; RAWN, 1989).

Em plantas, sinais extracelulares (como luz, hormônios e gravidade) regulam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento, incluindo divisão celular, alongamento celular, gravitropismo, senescência, abscisão, secreção enzimática e germinação de esporos (MARMÉ, 1982; HEPLER & WAYNE, 1985). Um número cada vez maior de pesquisas tem revelado a participação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  como um "segundo mensageiro", nos mecanismos de transdução destes estímulos extracelulares, (MOORE & AKERMAN, 1984; MARMÉ, 1985; GILROY et alii, 1987; POOVAIAH et alii, 1987; 1988, PERDUE et alii, 1988; BOSSEN et alii, 1990).

Se as concentrações elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (em torno de  $10^{-3}$  M) fossem as mesmas no citosol, elas seriam deletérias às funções celulares normais (HEPLER & WAINE, 1985; GILROY et alii, 1987; RASMUSSEN, 1989). Apesar das dificuldades técnicas, tem sido possível estimar-se a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico em torno de  $10^{-7}$  M, tanto em

vegetais inferiores (WILLIANSO & ASHLEY, 1982; BROWLEE & WOOD, 1986), quanto em células de vegetais superiores (GILROY et alii, 1986; CLARKSON et alii, 1988), à semelhança do que também se observa em células animais (FISKUM, 1985; CARAFOLI, 1987, 1988).

A função do  $\text{Ca}^{2+}$  como um transmissor de informação exige a sua manutenção dentro das células em níveis muito baixos de concentração livre, assim como exige maneiras de variar rápida e precisamente a sua concentração em diferentes compartimentos celulares (CARAFOLI, 1988; RASMUSSEN, 1989).

O controle da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático em células vegetais é alcançado, como nas células animais, pela extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  para fora da célula (através da membrana plasmática) e pelo seu acúmulo em organelas como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias (MARMÉ, 1985; BUSH & SZE, 1986; GIANNINI et alii, 1987a, 1987b; GILROY et alii, 1987; CARAFOLI, 1988; VERCESI et alii, 1989). Registros recentes indicam que as plantas possuem sistemas adicionais de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , localizados no tonoplasto (MARMÉ, 1985; BUSH & SZE, 1986; MacroBBIE, 1989) e nos cloroplastos (MOORE & AKERMAN, 1984; KREIMER et alii, 1985; CHIANG & DILLEY, 1987; KAUSS, 1987).

Apesar da importância destes processos de transporte, eles ainda não estão completamente esclarecidos. As melhores caracterizações referem-se à captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (DE MEIS & VIANA, 1979) e ao bombeamento para fora da célula, especialmente em membranas de eritrócitos (HOLMES, 1985), ambos mediados por ATPases específicas.

Ao contrário da membrana celular e do retículo, o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias não é mediado por ATPase, ocorrendo por um processo eletroforético. Sua função parece estar mais relacionada com a regulação do metabolismo oxidativo da própria mitocôndria (através do controle da atividade de três desidrogenases da matriz mitocondrial) do que com a regulação da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  (HANSFORD, 1985; McCORMAK & DENTON, 1986).

Este sistema de transporte através da membrana mitocondrial interna tem sido muito estudado, desde a sua descoberta simultânea por DE LUCA & ENGSTRON (1961) e VASINGTON & MURPHY (1962). Os mecanismos moleculares de captação mitocondrial do  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como os de liberação, ainda estão sob investigação em diversos tecidos animais (DENTON & McCORMACK, 1980; FISKUM & LEHNINGER, 1981; NICHOLLS & AKERMAN, 1982; VERCESI, 1984a,b; HANSFORD, 1985; McCORMAK & DENTON, 1986; VERCESI et alii, 1989; GUNTER & PFEIFER, 1990). Recentemente, estes estudos têm sido feitos, também, em mitocôndrias de protozoários (DOCAMPO & VERCESI, 1989a,b; VERCESI et alii, 1990) e de vegetais (WISKICH, 1977; HANSON & DAY, 1980; DAY & WISKICH, 1984; MOORE & AKERMAN, 1984; DOUCE, 1985; MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS et alii, 1986, CARNIERI et alii, 1987; VERCESI et alii, 1989; RUGOLO et alii,, 1990).

### 2.8.1. O TRANSPORTE DE $\text{Ca}^{2+}$ POR MITOCÔNDRIAS ANIMAIS

Quando se adiciona  $\text{Ca}^{2+}$  a uma suspensão de mitocôndrias energizadas, observa-se a captação do íon pela organela, além de um estímulo na respiração e na extrusão de prótons (CHANCE, 1965; BRAND et alii, 1976; REYNAFARJE & LEHNINGER, 1977; VERCESI et alii, 1978).

O  $\text{Ca}^{2+}$  entra com duas cargas positivas, através de um translocador sensível a vermelho de rutênio e lantanídeos (MELA, 1969; VAINIO et alii, 1970; SCARPA & AZZONE, 1970; MOORE, 1971; VASINGTON et alii, 1972; REED & BYGRAVE, 1974; MOYLE & MITCHELL, 1977; LEHNINGER et alii, 1978). Este transportador tem grande afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , com  $K_m$  entre 1 e 10  $\mu\text{M}$ , dependendo da origem da mitocôndria e da composição do meio de reação (BYGRAVE, 1977; CARAFOLI & CROMPTON, 1978; SARIS & AKERMAN, 1980; NICHOLLS & AKERMAN, 1982; VERCESI, 1984a). Ele também liga e transporta outros cátions bivalentes, com a seguinte ordem de afinidade:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  (SARIS, 1963; CARAFOLI, 1965; DRAHOTA et alii, 1969; VAINIO et alii, 1970).

Esta captação ocorre por um processo eletroforético, em resposta ao potencial elétrico de membrana ( $\Delta\psi$ ), principal componente do potencial eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) (MITCHELL, 1961, 1976), gerado pela atividade respiratória ou por hidrólise de ATP. Embora a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  esteja diretamente relacionada ao potencial de membrana

(SCARPA & AZZONE, 1970; SELWIN et alii, 1970; NICHOLLS & AKERMAN, 1982), a força motriz, responsável pelo acúmulo do íon é o próprio gradiente eletroquímico de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}}$ ), que relaciona-se ao potencial de membrana pela equação:

$$\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}} = 2 \Delta\psi - 60 \log [\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}} / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$$

onde  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  e  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  são as atividades de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial e no citosol, respectivamente (LEHNINGER, 1970; BYGRAVE, 1977; CARAFOFI & CROMPTON, 1978; LEHNINGER et alii, 1978; SARIS & AKERMAN, 1980; FISKUM & LEHNINGER, 1981; NICHOLLS & AKERMAN, 1982).

Como existe uma relação inversa entre a velocidade de respiração e o valor de  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  (MITCHELL, 1961; 1969), a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na mitocôndria resulta em uma diminuição de  $\Delta\psi$ , induzindo estímulo na respiração e ejeção de prótons, para manter  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  constante. Com maior ejeção de prótons, há um aumento no  $\Delta\text{pH}$ , resultando na manutenção de  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ . Portanto, a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  converte o potencial de membrana em gradiente de pH, que passa a inibir a respiração e a limitar a entrada de mais  $\text{Ca}^{2+}$  (NICHOLLS, 1978).

A capacitância elétrica da membrana interna mitocondrial é muito baixa, o que faz com que o acúmulo de 1,0 nmol de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína seja suficiente para colapsar  $\Delta\psi$ , se não ocorrer nenhum outro movimento iônico simultâneo (NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Porém, se o processo ocorrer em presença de ânions capazes de atravessar a membrana interna na forma protonada (a fim de neutralizar o gradiente de pH e permitir que a cadeia respiratória restabeleça o valor de  $\Delta\psi$ ), maior quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser captada pelas mitocôndrias (LEHNINGER, 1974; LEHNINGER et alii, 1967; SARIS &

AKERMAN, 1980; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Alguns desses ânions acumulam-se na matriz, em resposta ao gradiente de pH, permeando a membrana interna mitocondrial de maneira eletroneutra, por co-transporte com prótons (ou troca por hidroxila), como ocorre com fosfato e o bicarbonato (ELDER & LEHNINGER, 1973; HARRIS, 1978). Outros, como o acetato, o propionato, o  $\beta$ -hidroxibutirato, o butirato e o lactato, atravessam a membrana na forma protonada, por serem lipofílicos (LEHNINGER, 1974).

Quando o ânion permeante é o fosfato inorgânico, tanto a taxa de captação quanto a quantidade total de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado são fortemente aumentadas (ROSSI & LEHNINGER, 1964). Isto se deve à precipitação de fosfato de cálcio insolúvel, na matriz, resultando na formação de depósitos, visíveis ao microscópio eletrônico como grânulos eletrodensos (GREENAWALT, et alii, 1964). As mitocôndrias parecem ser relativamente pouco perturbadas, estrutural e funcionalmente, pelo acúmulo de fosfato de cálcio, até que quantidades muito grandes de carregamento sejam alcançadas. Este fenômeno seria um mecanismo de segurança que capacitaria as mitocôndrias a tamponarem grandes quantidades extras de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando a sua concentração no citosol aumentasse patologicamente (CARAFOLI, 1986, 1987).

#### 2.8.2. EFLUXO DE $\text{Ca}^{2+}$ MITOCONDRIAL

Considerando-se que a distribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana interna mitocondrial segue a equação de Nernst,



e que o  $\text{Ca}^{2+}$  é transportado com duas cargas positivas, para um valor de 180 mv (negativo internamente), a razão  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int/ext}}$  seria aproximadamente igual a  $10^6$  (CARAFOLI, 1979). Entretanto, os valores experimentais, encontrados para mitocôndrias "in situ", indicam que este gradiente varia entre 0 e  $10^2$  (DENTON et alii, 1972; DENTON & McCORMACK, 1980; HANSFORD & CASTRO, 1982). Esta discrepância indica a contribuição de fatores adicionais na distribuição do cátion através da membrana interna mitocondrial. Neste sentido, foi proposto que o transportador eletroforético opera essencialmente no sentido da captação e que deve ocorrer liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediada por um sistema paralelo (para revisão, ver AKERMAN & NICHOLLS, 1983).

Uma das evidências clássicas da existência de uma via de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial é o fato de que a inibição da via de influxo, por vermelho de rutênio, induz efluxo líquido do cátion (MOORE, 1971; VASINGTON et alii, 1972; PUSKIN et alii, 1976; FISKUM & LEHNINGER, 1981; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Além de ser insensível ao vermelho de rutênio, a via de efluxo é independente e opera em oposição à via de influxo, permitindo a ocorrência de movimento cíclico de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana interna (CROMPTON et alii, 1976; AKERMAN & NICHOLLS, 1983).

O  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial pode ser liberado por uma via eletroneutra, que troca um íon  $\text{Ca}^{2+}$  por dois  $\text{Na}^+$  externos, particularmente ativa em tecidos excitáveis (CARAFOLI et alii, 1974; CROMPTON et alii, 1976), mas que também está presente em mitocôndrias hepáticas, com atividade limitada (NEDERGAARD, 1984). Em mitocôndrias de fígado, acredita-se

que o processo dominante para a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  opere por uma via que troca um íon  $\text{Ca}^{2+}$  por dois  $\text{H}^+$  externos (AKERMAN, 1978; NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1981; BRAND, 1985).

O efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial pode também ocorrer pelo reverso da via eletroforética de entrada. Isto pode ser observado quando se diminui a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  externo com uso de quelantes (como EGTA ou EDTA), pela redução do potencial elétrico de membrana por desacopladores (FCCP, DNP) ou por inibidores da respiração (rotenona, antimicina-A, cianeto) (PUSKIN et alii, 1976; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Este efluxo pode ser induzido, também, pelo uso de oligomicina, quando o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  usa energia da hidrólise de ATP.

A operação simultânea de vias distintas de captação e liberação resulta em um movimento cíclico e contínuo de  $\text{Ca}^{2+}$ , através da membrana interna mitocondrial. A sua operação em velocidades muito lentas em condições fisiológicas (CARAFOLI, 1986) caracteriza a existência de uma verdadeira condição de fluxo constante (CROMPTON et alii, 1976; AKERMAN & NICHOLLS, 1983). A operação simultânea destes dois fluxos, em sentidos opostos, fornece as bases para uma regulação cinética da distribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  entre os compartimentos intra e extramitocondriais, cujo equilíbrio pode ser alterado pela ativação ou inibição de um ou ambos os caminhos (NICHOLLS, 1978; NICHOLLS & AKERMAN, 1982).

O significado biológico deste movimento simultâneo é controverso. Considerando-se que a velocidade máxima de influxo é cerca de duas ordens de magnitude maior que a

velocidade de efluxo, foi proposto que este sistema mitocondrial de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  teria a função de regular a atividade de uma série de processos citosólicos dependentes deste cátion (FISKUM & LEHNINGER, 1981; AKERMAN & NICHOLLS, 1983).

É necessário que a via de efluxo esteja saturada, para que tal tamponamento ocorra nas condições fisiológicas, onde a velocidade de influxo deve ser balanceada pela de efluxo (HANSFORD, 1985). Entretanto, mostrou-se que a concentração iônica de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico era menor que 200 nM (TSIEN, 1981), ou seja, cerca de 10 a 50 vezes mais baixa que o  $K_m$  aparente de captação do íon (CROMPTON et alii, 1976). Adicionalmente, a presença de concentrações fisiológicas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  exige que o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial seja de pelo menos 10 nmoles por mg de proteína mitocondrial (HANSFORD, 1985; McCORMACK & DENTON, 1986), enquanto que os resultados têm indicado um conteúdo "in vivo" de cerca de 1 a 3 nmoles por mg de proteína (SOMLYO et alii, 1981; HANSFORD & CASTRO, 1981; SHEARS & KIRK, 1984). Estes resultados são incompatíveis com as características cinéticas de influxo e efluxo, que permitiriam um tamponamento preciso da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico pelas mitocôndrias (HANSFORD, 1985).

Outros pesquisadores defendem a idéia de que os transportadores mitocondriais de  $\text{Ca}^{2+}$  seriam importantes para a regulação da concentração do íon na matriz da própria organela (DENTON & McCORMACK, 1985; HANSFORD, 1985). Isto porque três desidrogenases com papel importante na regulação do ciclo de Krebs (2-oxoglutarato desidrogenase, NAD-isoci-

trato desidrogenase e piruvato desidrogenase) têm suas atividades reguladas pela concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre (SOMLYO et alii, 1981). Foi então proposto que uma elevação fisiológica na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, estimulada por hormônios ou outros agentes extracelulares resultaria no aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz mitocondrial, estimulando a respiração, através do estímulo destas enzimas.

Por outro lado, existem registros de que o  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial pode inibir a fosforilação oxidativa (SORDHAL, 1974; VILLALOBO & LEHNINGER, 1980; ROMAN et alii, 1981; MORENO-SANCHEZ, 1983). Com isto, foi proposto um possível papel do sistema de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  na regulação do metabolismo energético da célula, através da modulação da atividade da enzima  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP sintetase. Entretanto, FAGIAN et alii, 1986 argumentam fortemente contra este possível papel regulatório do metabolismo celular, sob condições normais, sugerindo que esta inibição seja um fator adicional no mecanismo de toxicidade celular, associado ao aumento patológico da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

#### 1.9. TRANSPORTE DE $\text{Ca}^{2+}$ EM MITOCÔNDRIAS VEGETAIS

Muita controvérsia existe em relação ao transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias de plantas. Dentre os primeiros registros se destaca o de CHEN & LEHNINGER (1973), que, analisando 13 espécies vegetais e um fungo, observaram

diferenças dependentes da espécie, sendo que algumas provavelmente não apresentavam o carreador específico de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além das diferenças específicas, DIETER & MARMÉ (1980) registraram, também, diferenças relacionadas com a idade e o tipo de órgão utilizado. Entretanto, em função da baixa atividade de transporte e da baixa afinidade pelo íon, MOORE & AKERMAN (1984) consideram pouco provável que o controle da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  seja exercido pelas mitocôndrias. Semelhantemente, MARMÉ (1985) sugere que a baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma de células vegetais seja mantida por uma ATPase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina, localizada mais provavelmente na membrana plasmática.

A maior parte dos dados da literatura indica que o sistema de transporte presente em mitocôndrias de plantas opera por um mecanismo diferente daquele das organelas animais (DOUCE, 1985; DOUCE & NEUBURGUER, 1989). Muitos pesquisadores defendem características especiais para o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocôndrias de plantas. Dentre elas podemos destacar: a) não está associada a estímulo da respiração e despolarização do potencial de membrana (AKERMAN & MOORE, 1983); b) é dependente do substrato respiratório (ELZAM & HODGES, 1968; DAY et alii, 1978); c) apresenta dependência absoluta pela presença de fosfato (MILLARD et alii, 1965, KENEFIK & HANSON, 1966; HANSON & HODGES, 1967; DAY et alii, 1978; AKERMAN & MOORE, 1983; DAY & WISCKICH, 1984); d) é insensível ao vermelho de rutênio e  $\text{Mg}^{2+}$ , pelo menos em algumas espécies (CHEN & LEHNINGER, 1973; AKERMAN & MOORE, 1983).

As dificuldades em se obter mitocôndrias vegetais acopladas, dependentes das diferentes fontes utilizadas, foram responsabilizadas pelas discrepâncias nos dados disponíveis a respeito do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocôndrias de plantas (KAUSS, 1985; MARTINS & VERCESI, 1985). Diante desta premissa, MARTINS & VERCESI (1985) tentaram esclarecer algumas características do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocôndrias acopladas, obtidas de coleóptiles de milho e de folhas brancas de repolho, estabelecendo um paralelo com mitocôndrias de fígado de rato. Utilizando mitocôndrias funcionalmente intactas, obtiveram evidências de que as mitocôndrias de milho, mas não as de repolho, tinham a habilidade de tamponar o  $\text{Ca}^{2+}$ , mantendo uma concentração externa livre na faixa de 2  $\mu\text{M}$ , mesmo quando o equilíbrio era alterado por adições de EGTA ou de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Logo em seguida, MARTINS et alii (1986) registraram características mais detalhadas do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocôndrias de milho, que indicavam uma maior afinidade para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{0.5} = 31 \mu\text{M}$ ) do que a anteriormente registrada por DIETER & MARMÉ (1983), que obtiveram  $K_m = 250 \mu\text{M}$ . Também registraram que a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  era acompanhada por estímulo transitório no consumo de  $\text{O}_2$  e queda no potencial elétrico de membrana, além de ser reduzida por  $\text{Mg}^{2+}$  e completamente inibida por vermelho de rutênio. Adicionalmente, CARNIERI (1986) obteve resultados semelhantes aos registrados por MARTINS et alii (1986), utilizando, além do próprio milho, feijão, soja e café, com dados indicativos de que o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias vegetais deve ter um papel na homeostase do

Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Dúvidas também persistem quanto ao efluxo mitocondrial de Ca<sup>2+</sup>. A inibição da via de influxo, pelo vermelho de rutênio, induz efluxo líquido, que não é afetado por Na<sup>+</sup> (DIETER & MARMÉ, 1980; MARTINS et alii, 1986; RUGOLO et alii, 1990).

Das diferenças apontadas para o transporte de Ca<sup>2+</sup> por mitocôndrias de plantas, em comparação às de vertebrados, persiste apenas a exigência absoluta por Pi, além de uma atividade um pouco mais baixa (MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS et alii, 1986; CARNIERI et alii, 1987; VERCESI et alii, 1989). No entanto, mesmo em revisões recentes estes resultados são totalmente ignorados (DOUCE & NEUBURGER, 1989), ou apenas parcialmente explorados (RUGOLO et alii, 1990).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

##### 3.1.1. MATERIAL VEGETAL

Foram isoladas mitocôndrias a partir de tubérculos de batata (Solanum tuberosumL.), raízes de beterraba (Beta vulgaris L. ), e coleóptiles de milho (Zea mayz L. cv Maya-Normal). A batata e a beterraba eram compradas no mercado e mantidas em sacos plásticos, sob refrigeração (4 a 10°C) por períodos variáveis até o momento do uso. As sementes de milho eram provenientes do Banco de Germoplasma do Departamento de Genética, I.B., UNICAMP, e também armazenadas sob refrigeração até serem preparadas para germinação.

##### 3.1.2. MEIOS UTILIZADOS DURANTE O ISOLAMENTO

O rompimento dos tecidos vegetais era feito em "Meio de extração", que consistia de:



Manitol	400 mM
HEPES	10 mM, pH 7,6
EGTA	1 mM
BSA	0,1 %
Cisteína	3 mM

O primeiro sedimento mitocondrial obtido era ressuspense em "Meio de lavagem", e submetido a nova centrifugação. O "Meio de lavagem" continha:

Manitol	300 mM
HEPES	10 mM, pH 7,2
EGTA	0,1 mM
BSA	0,1 %

Em geral, as mitocôndrias eram ressuspensas em "Meio de isolamento", que diferia do "Meio de lavagem" apenas por não conter EGTA.

### 3.1.3. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE BATATA

As mitocôndrias isoladas a partir de tubérculos de batata foram obtidas tomando-se como base o método descrito por DIOLEZ & MOREAU (1983), com algumas modificações.

Após serem descascadas, as batatas foram cortadas em pedaços alongados e passadas através do ralo de um extrator doméstico de sucos (centrífuga Walita). O rompimento dos tecidos ocorria sob a adição simultânea do "meio de extração" gelado (4 °C). Foi utilizado 1,0 ml de meio para cada 1,0 g de tecido. Os resíduos foram

descartados e o extrato filtrado através de 8 camadas de gaze e uma rede de nylon (com malha de 50  $\mu$ m). Após ajuste do pH do filtrado para 7,2, uma primeira centrifugação a 700x g, por 5 min, foi feita, no sentido de eliminar o amido. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação a 1200x g, por 10 minutos, sendo o precipitado descartado. O sobrenadante foi centrifugado a 9000x g, por 10 min, e o sedimento de mitocôndrias, assim obtido, foi suspenso em "meio de lavagem".

A suspensão mitocondrial foi submetida a uma última centrifugação a 6000x g, por 10 minutos e o precipitado obtido foi suspenso em "Meio de isolamento", de modo a ter uma suspensão mitocondrial com cerca de 80 mg de proteína por ml. Todo o procedimento foi desenvolvido entre 0 e 4 °C.

Quando as mitocôndrias se destinavam a experimentos onde BSA não estaria presente no meio de reação, ou ao isolamento de proteína, o BSA era omitido de todos os meios utilizados.

#### 3.1.4. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE BETERRABA

A obtenção de mitocôndrias de beterraba foi feita de modo semelhante ao descrito para a batata, não sendo necessária a centrifugação inicial a 700x g, uma vez que este material não apresenta grandes reservas de amido. Ao contrário, após a centrifugação a 6000x g, as mitocôndrias

foram ressuspensas em meio de isolamento e novamente sedimentadas a 6000x g. Esta centrifugação adicional objetivava a eliminação do pigmento hidrossolúvel na suspensão final.

### 3.1.5. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE MILHO

As sementes de milho foram esterilizadas em uma solução de hipoclorito de sódio 0,2%, por 60 minutos, e lavadas em água destilada. Após duas horas de embebição, as sementes foram colocadas para germinar sobre papel de filtro umedecido e mantidas no escuro a 28 °C. Decorridos 3 a 10 dias de germinação, os coleóptiles das plântulas foram extraídos e utilizados para o isolamento de mitocôndrias.

Os coleóptiles foram picados finamente com tesoura, no meio de extração, e suspensos na proporção de 1,0 g de tecido para cada 5,0 ml de meio. O rompimento dos tecidos foi feito em homogeneizador Polytron (PT 10/35) durante 4 segundos, no nível 5. A suspensão obtida foi filtrada através de 8 camadas de gaze e uma rede de nylon (malha de 50 µm), sendo o pH ajustado para 7,2. A primeira centrifugação foi feita a 1200x g, por 10 minutos, seguindo-se, a partir de então, o mesmo procedimento desenvolvido para o isolamento de mitocôndrias de batata.

### 3.1.6. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo SCHNEIDER & HOGEBOM (1950), utilizando-se ratos adultos Wistar pesando 180 a 250 g, mantidos em jejum por 12 horas.

O fígado, retirado após a morte do animal por concussão cerebral, foi lavado em solução de sacarose 250 mM, contendo EGTA 0,5 mM e tampão HEPES 2.0 mM, pH 7,2. Em seguida foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. Este material foi então centrifugado a 2500x g, por 5 minutos, o sobrenadante mantido em banho de gelo e o sedimento novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados durante 10 minutos a 11500x g, sendo a fase lipídica superior retirada com uma pipeta Pasteur. O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspense em sacarose 250 mM contendo EGTA 0,3 mM, tamponada com HEPES 1,0 mM em pH 7,2 e novamente centrifugado nas condições anteriores. A seguir, as mitocôndrias foram ressuspensas em solução de sacarose 250 mM contendo HEPES 1,0 mM pH 7,2, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 100 mg de proteína por ml.

### 3.2. DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (GORNALL et alii, 1949), modificado pela adição de colato 1% (KAPLAN & PEDERSEN, 1983). Uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

### 3.3. MEIOS DE REAÇÃO

A avaliação das diversas características funcionais das mitocôndrias isoladas de plantas foi feita, em geral, no seguinte "Meio básico de reação":

Manitol	300 mM
KCl	20 mM
HEPES	2 mM, pH 7,2
BSA	0,1 %

Para mitocôndrias de fígado utilizava-se o mesmo meio, onde a concentração de manitol era reduzida para 240 mM.

Nos experimentos em que se pretendia avaliar a captação ou o efluxo de fosfato pelas mitocôndrias, o manitol foi substituído por sacarose, na mesma concentração.

Os experimentos foram realizados a 30 °C, em

câmaras de vidro termostatzadas, com agitação magnética constante. Outras adições, feitas durante os diferentes experimentos, estão especificadas nas legendas de cada figura.

#### 3.4. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

A atividade respiratória mitocondrial foi medida através do consumo de oxigênio, determinado polarograficamente com eletrodo específico, tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), ligado a um oxígrafo Gilson. Neste caso, utilizava-se o meio básico de reação, acrescido de succinato 2 mM, rotenona 5  $\mu$ M e fosfato 2 mM.

O registro do consumo de oxigênio permitiu a determinação do "Controle respiratório", que servia como um indicativo da qualidade da cada preparação mitocondrial. O controle respiratório é definido como uma razão entre a velocidade de consumo de  $O_2$  no estado respiratório 3 (obtida com a adição de ADP e sua conseqüente fosforilação) e a velocidade de respiração no estado respiratório 4 (respiração de repouso, subseqüente ao término da fosforilação do ADP) (CHANCE & WILLIAMS, 1956).

### 3.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA

O potencial elétrico de membrana ( $\Delta\psi$ ) foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio ( $\text{TPP}^+$ ), entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, com eletrodo específico construído no Laboratório de Bioenergética, Departamento de Bioquímica, IB-UNICAMP, de acordo com KAMO et alii (1979). Neste eletrodo utilizava-se uma membrana de cloreto de polivinila (PVC), contendo tetrafenilborato ( $\text{TPB}^-$ ) como trocador de ions. Para o preparo da membrana adicionavam-se 3 ml de tetrafenilborato de sódio 10 mM (dissolvido em tetrahydrofurano), a 10 ml de tetrahydrofurano contendo 0,5 g de cloreto de polivinila e 1,5 ml de dioctilftalato. O solvente era então evaporado lentamente à temperatura ambiente, em placa de Petri (60 cm<sup>2</sup> de área).

A membrana assim obtida era transparente e tinha de 0,15 a 0,20 cm de espessura. Um fragmento desta membrana era colado, com o uso de tetrahydrofurano, à extremidade de um tubo de PVC que era preenchido com uma solução de  $\text{TPP}^+$  10 mM ( $[\text{TPP}^+]_{\text{int}}$ ). O contato entre esta solução de  $\text{TPP}^+$  com um eletrodo Ag/AgCl era feito através de uma ponte de ágar (1,5 % dissolvido em KCl saturado), conforme esquematizado na Figura 1.

A diferença da força eletromotriz ( $\Delta E$ ) entre o eletrodo de  $\text{TPP}^+$  e um eletrodo de referência foi medida por uma potenciômetro (Beckman Expandometric SS-2) ligado a um

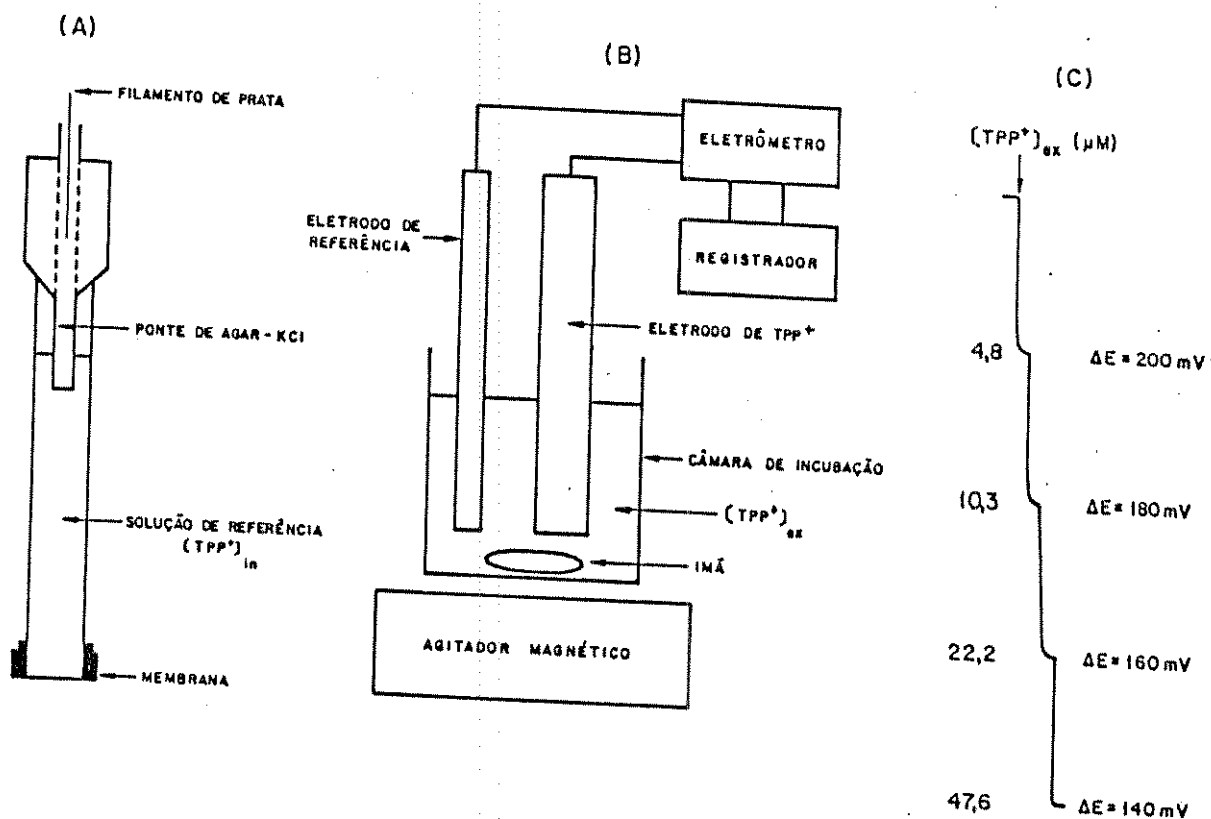


Figura 1. Representação esquemática do sistema utilizado para avaliar o potencial elétrico de membrana de mitocôndrias. (A) eletrodo de TPP<sup>+</sup>; (B) diagrama da aparelhagem utilizada; (C) curva de calibração do eletrodo.



registrador potenciométrico (Linear Instrument Corp.). As concentrações de TPP<sup>+</sup> no meio de reação foram monitoradas continuamente e os valores de  $\Delta\psi$  calculados, usando-se a seguinte equação :

$$\Delta\psi = 2,3 RT/F \log v/V - 2,3 RT/F \log (10^{F\Delta E/2,3 RT} - 1)$$

onde v, V e E representam, respectivamente, o volume mitocondrial, o volume do meio de reação e o potencial do eletrodo, fornecido pelo gradiente de concentração de TPP<sup>+</sup> ( $[TPP^+]_{in} / [TPP^+]_{out}$ ) através da membrana do mesmo (Figura 1). Os valores de  $\Delta E$  foram calculados pela equação de Nernst:

$$\Delta E = 2,3 RT/F \log ([TPP^+]_{in} / [TPP^+]_{out})$$

onde  $[TPP^+]_{out}$  refere-se à concentração de TPP<sup>+</sup> no meio de reação. Os sinais do eletrodo ( $\Delta E$ ) foram quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições sucessivas de TPP<sup>+</sup> ao meio de reação (Figura 1C). O volume mitocondrial foi considerado igual a 1,0  $\mu$ l por mg de proteína para mitocôndrias de vegetais (MANDOLINO et alii, 1983; DOUCE, 1985) e 1,4  $\mu$ l por mg de proteína para mitocôndrias de fígado (KAMO et alii, 1979). Os valores obtidos desta maneira foram corrigidos de acordo com JENSEN et alii, 1986.

### 3.6. DETERMINAÇÃO DE Ca<sup>2+</sup> NO MEIO DE REAÇÃO

As variações nas concentrações de Ca<sup>2+</sup> livre no meio de reação foram acompanhadas por um eletrodo seletivo (Calcium Selectrode F2112, Radiometer) (MADEIRA, 1975). Os

sinais eram amplificados através de um voltímetro de alta impedância (Sargent-Welch Scientific Co.), ligado a um registrador potenciométrico.

A cada experimento, o eletrodo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi calibrado por adições de solução padrão deste íon ao meio de reação, para concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  total acima de  $10\mu\text{M}$ , como mostrado na Figura 2. A calibração para a faixa de concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, entre  $0,25$  e  $10\mu\text{M}$ , foi obtida adicionando-se ao meio de reação uma mistura de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA, usando-se o valor de  $4,5 \times 10^{-6}$  M para a constante de dissociação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA a pH 7,2 e  $30^\circ\text{C}$  (PORTZEHL et alii, 1964; BECKER et alii, 1980).

A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  contaminante do meio de reação foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (Atomic Absorption Spectrophotometer Perkin Elmer, modelo 303). As amostras foram diluídas em uma mistura de óxido de lantânio, HCl, n-Butanol e água, de acordo com GOCHMAN & GILVEBER (1970) e as leituras comparadas com os valores obtidos de uma curva padrão de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.7. DETERMINAÇÃO DE $\text{Ca}^{2+}$ E FOSFATO INTRAMITOCONDRIAIS

As variações no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfato da matriz mitocondrial foram seguidas através da coleta de amostras, a intervalos de tempo definidos ao longo do experimento. Cada amostra de  $1,0\text{ ml}$  foi colocada num tubo Ependorf e centrifugada, por 2 minutos, a  $15000 \times g$ . O

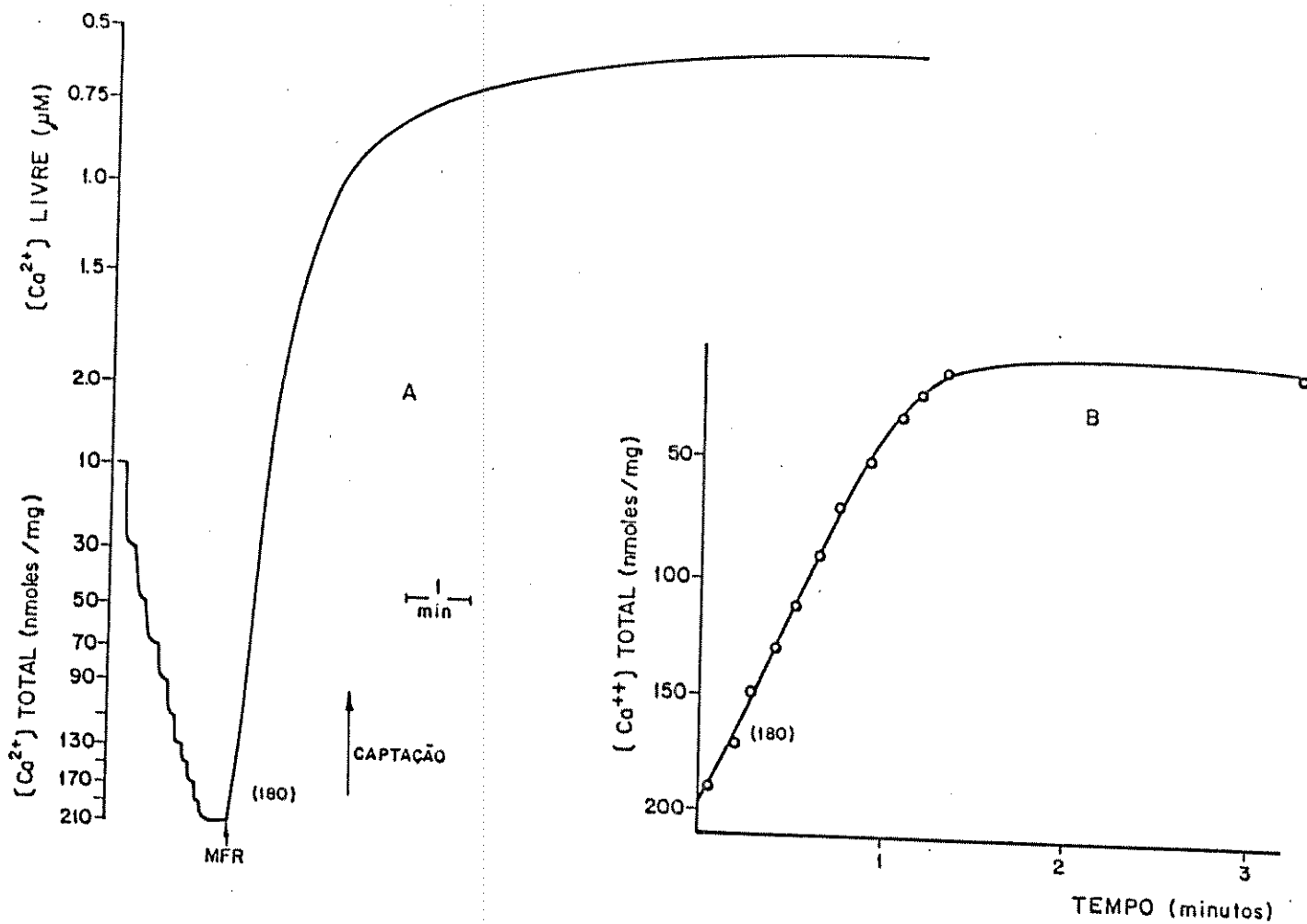


Figura 2. Calibração do eletrodo seletivo de  $Ca^{2+}$  (A) e gráfico linearizado (B), a partir dos dados de calibração. A adição de 200 nmoles de  $Ca^{2+}$ , em pulsos de 20 nmoles, ao meio básico de reação (1,0 ml, 28-30°C) permite observar a resposta não linear do eletrodo (A) e fornece os dados para a linearização gráfica da parte B. A calibração, em termos de  $Ca^{2+}$  livre, foi feita com adição inicial de uma mistura  $Ca^{2+}$ /EGTA para produzir uma concentração de  $Ca^{2+}$  livre igual a 2,0  $\mu M$ , seguida de adições seqüenciais de EGTA para se obter os pontos correspondentes a 1,50, 1,0, 0,75 e 0,5  $\mu M$ . Como exemplo, está sendo mostrado que a adição de mitocôndrias de fígado (1,0 mg) era seguida de diminuição do  $Ca^{2+}$  presente no meio, a uma velocidade de 180 nmoles/mg.min até que a concentração de  $Ca^{2+}$  livre extramitocondrial atingisse valores na faixa de 0,5  $\mu M$ .

sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com meio de reação livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfato. O precipitado foi ressuspenso em 0,1 ml de água deionizada, seguindo-se a adição de 0,3 ml de ácido perclórico 3,75 %. Após 15 minutos de repouso, a 4 °C, o volume foi completado para 1,0 ml e as proteínas removidas por uma nova centrifugação a 15000x g. Foram retiradas amostras do sobrenadante para avaliação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfato.

A determinação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  foi feita por espectrofotometria de absorção atômica, conforme a descrição ao final do item 3.6.

A concentração de fosfato foi avaliada através de reação colorimétrica, de acordo com GRINDEY & NICHOL (1970).

### 3.8. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DO VOLUME MITOCONDRIAL

As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença no índice de refração entre o conteúdo da matriz e do meio, sendo que qualquer processo que diminui esta diferença diminui, também, a luz espalhada (NICHOLLS, 1982). Assim, um aumento no volume mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio, com conseqüente diminuição do espalhamento de luz. Este fenômeno pode ser acompanhado através de um espectrofotômetro, onde o inchamento

mitocondrial resulta em queda na absorbância da suspensão. Esta técnica representa um método simples, bastante sensível e rápido, e que fornece informações sobre o fluxo de solutos através da membrana interna mitocondrial.

Em nossos experimentos, as variações no volume mitocondrial foram acompanhadas, a 520 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU-2, acoplado a um registrador. Foram adicionados 0,5 mg de proteína mitocondrial a 1,0 ml de meio contendo KCl 150 mM, tamponado com MES 2 mM (para pH entre 6,0 e 6,8) ou com HEPES 2 mM (para pH entre 7,2 e 7,8) e 1,0 µg de oligomicina por mg de proteína. Outras adições, peculiares a cada experimento, encontram-se assinaladas nas legendas das figuras.

### 3.9. DETERMINAÇÃO DA LIGAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS A MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

A ligação de nucleotídeos de purina (ATP e GTP), foi feita pelo "Método de Sedimentação", descrito por KLINGENBERG et alii (1986), associando-se algumas das condições utilizadas por NICHOLLS (1976).

Foi adicionado 1,0 mg de proteína mitocondrial a 0,5 ml do meio básico de reação descrito no item 3.3, no qual o tampão utilizado variava de acordo com o pH desejado (MES, para pH entre 6,0 e 6,8, ou HEPES, para pH entre 7,2 e 7,8). Após 2 minutos de pré-incubação, a 25 °C, adicionou-se GTP (100 µM de concentração final e 0,1 µCi de [<sup>3</sup>H]GTP).

Decorridos 5,0 minutos de incubação a suspensão foi centrifugada a 15000x g, por 2 minutos. O sobrenadante foi recolhido para avaliação da radioatividade total utilizada em cada ensaio (representada pela soma dos valores encontrados no sobrenadante e no precipitado). O precipitado foi lavado e suspenso em 1,0 ml do meio de pré-incubação. Uma nova centrifugação a 15000x g, por 2 minutos, foi feita, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 0.38 ml de H<sub>2</sub>O. Adicionou-se a esta solução 20 µl de SDS a 10% e dela foram retiradas alíquotas de 10 µl para avaliação de proteína, pelo método de Lowry modificado (WANG & SMITH, 1975.) Alíquotas de 0,35 ml foram adicionadas a 2,5 ml de coquetel de cintilação, para avaliação da radioatividade presente, que corresponde ao nucleotídeo ligado às mitocôndrias. O coquetel era composto por 667 ml de tolueno, 333 ml de Triton X-100, 4,0 g de PPO e 50 mg de POPOP. A avaliação da radioatividade foi feita num Contador de Cintilação Líquida Beckman, modelo LS 100 C.

Quando a ligação era feita com ATP, o meio de pré-incubação era acrescido de Ap5A (50 µM de concentração final) e de CAT 30 µM. Neste caso, utilizava-se 100 µM de ATP, contendo 0,1 µCi de [<sup>3</sup>H]ATP.

### 3.10. ISOLAMENTO DE UMA PROTEÍNA DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA, COM POSSÍVEL FUNÇÃO DESACOP-LADORA

A purificação de uma proteína, com função possivelmente desacopladora, de mitocôndrias de tubérculos de batata foi feita com base no método descrito por LIN & KLINGENBERG (1982), para o isolamento da proteína desacopladora de tecido adiposo marrom de hamster.

A suspensão mitocondrial, contendo 100 mg de proteína foi diluída em 6 ml de meio contendo sacarose 300 mM, EDTA 2 mM, TRIS 10 mM pH 7,2 e LUBROL WX 3,2% (w/v). Após 30 minutos de incubação a 4 °C, sob agitação constante, a suspensão foi centrifugada a 100 000x g por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e a fração residual de membranas foi solubilizada em 1,0 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20 mM, contendo EDTA 1 mM, MES 20 mM pH 6,7 e 75 mg de TRITON X-100. Decorridos outros 30 minutos sob agitação constante, a 4 °C, a solução foi centrifugada novamente a 100 000x g, por 45 minutos. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de 8 ml de hidroxapatita, pré-equilibrada com tampão MES 20 mM pH 6,7. A eluição foi feita com este mesmo tampão, à temperatura ambiente, a um fluxo de 20 ml/h, coletando-se frações de 2,0 ml. Cada fração foi avaliada quanto à concentração de TRITON, através da leitura de sua absorbância a 280 nm. Procedeu-se à avaliação da concentração de proteína, nas frações que continham TRITON, utilizando-se o método de

Lowry modificado (WANG & SMITH, 1975). As frações que continham proteína foram estocadas em nitrogênio líquido até o momento de sua utilização. A eficiência da purificação foi avaliada através de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

### 3.11. ELETROFORESE EM GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA

As eletroforeses foram executadas de acordo com (LAEMMLI, 1970). Foram montadas placas de gel de SDS-poliacrilamida, num sistema descontínuo, onde a concentração de poliacrilamida era de 12% no gel de resolução e de 3,5% no de empacotamento.

O preparo das amostras foi feito de duas maneiras distintas, dependendo da concentração de proteína da fração. Em geral, alíquotas eram diluídas em igual volume de uma solução contendo TRIS 63 mM pH 6,8, SDS 2% e glicerol 10%. A mistura era fervida em banho-maria, por 3 minutos, e era adicionado azul de bromofenol (0,01% de concentração final) como indicador de corrida. Eram aplicados de 2 a 10  $\mu$ g de proteína em cada poço. Quando a concentração de proteína da amostra era muito baixa, eram separadas alíquotas de 100  $\mu$ l, às quais adicionavam-se diretamente 2 mg de SDS mais 10  $\mu$ l de glicerol, seguindo-se a fervura anteriormente descrita.

A corrida era desenvolvida por uma noite, aplicando-se uma diferença de potencial de 30 volts, ou por cerca de 4 horas, sob um potencial de 100 volts.



O gel era fixado em uma solução aquosa de metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,02%, seguindo-se a sua coloração com nitrato de prata, de acordo com BLUM et alii (1987).

Após a coloração o gel era secado à temperatura ambiente entre duas folhas de papel celofane, de acordo com a descrição de JUANG et alii (1984).

### 3.12. INCORPORAÇÃO DA PROTEÍNA EM BICAMADA LIPÍDICA

Os experimentos de incorporação da proteína possivelmente desacopladora em bicamada lipídica foram desenvolvidos no Laboratório de Biofísica de Membranas e Fisiologia Renal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

#### 3.12.1. OBTENÇÃO DAS BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS

As bicamadas lipídicas planas foram obtidas de acordo com o método descrito por MONTAL & MUELLER (1972). A técnica consiste na aposição de duas monocapas, em um orifício numa partição de teflon, que separa duas soluções eletrolíticas. Para isto, foi utilizada uma câmara subdividida em duas hemicâmaras, por um filme de teflon, que apresentava um orifício de 150  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Em cada hemicâmara foram colocados 2,0 ml de uma solução de KCl 0,1 M, tamponada com MES 5 mM, pH 6,0. Sobre estas soluções

aquosas, foram depositados 10 µl de uma solução da lecitina sintética (diftanoil-fosfatidilcolina a 1% w/v, Avanti-Inc.) em hexano. Após a evaporação do solvente (cerca de 10 minutos), os níveis das soluções das duas hemicâmaras foram elevados, pela injeção de mais 2,0 ml de solução, em cada lado. Assim, o filme de lipídio que cobria as soluções se estendia por cada lado da partição de teflon, com suas faces hidrofóbicas voltadas para a partição, sendo que a superposição das monocapas, no orifício, resultava em uma bicamada. A formação da bicamada era acompanhada pelo monitoramento contínuo da capacitância do sistema. Todas as membranas efetivamente utilizadas possuíam resistência elétrica entre  $5 \times 10^{11}$  e  $10^{13}$  ohms, quando na ausência de qualquer ionóforo.

### 3.12.2. CIRCUITO ELETRÔNICO ASSOCIADO

Cada hemi-câmara era conectada ao equipamento eletrônico através de um par de eletrodos de Ag/AgCl montados em pontes de ágar (2,5%, em KCl 4 M). O eletrodo da hemicâmara da frente (chamada de lado cis) era ligado a um gerador de pulsos de voltagem, construído no próprio Laboratório. O eletrodo da outra hemi-câmara (lado trans) era conectado a um amplificador operacional (OPA 111-Burr-Brown), configurado como conversor corrente-voltagem. A saída deste amplificador era ligada a um osciloscópio (Tektronix 5113) e a um polígrafo (Gould RS 3200), para

registro dos sinais em papel. Assim, aplicava-se níveis de potenciais constantes à membrana e registrava-se a corrente que fluía através da mesma. Nesta configuração, correntes positivas indicam fluxo de cátions do lado cis para o trans, ou de ânions em sentido contrário.

A câmara onde a bicamada era construída e o gerador de pulsos de voltagem eram protegidos por uma gaiola de Faraday, para evitar problemas devidos a interferências elétricas. Vibrações mecânicas eram atenuadas pela colocação deste conjunto sobre uma plataforma de concreto, apoiada sobre uma câmara de ar inflada. A temperatura ambiente era mantida a  $25 \pm 1$  °C.

### 3.12.3. INCORPORAÇÃO DA PROTEÍNA COM POSSÍVEL FUNÇÃO DESAPLADORA À BICAMADA LIPÍDICA

A incorporação da proteína desacopladora à bicamada era feita pela simples adição de 100 a 500 ng da proteína solubilizada em TRITON, ao lado cis, nas proximidades da bicamada.

A incorporação de um canal era detectada aplicando-se um pulso de voltagem constante (geralmente  $\pm 20$  mV) à membrana e acompanhando-se a ocorrência de incrementos na sua condutância. Se a incorporação não ocorresse em até 10 minutos, a solução era submetida a agitação e aguardava-se por cerca de mais 30 minutos. Se dentro deste período não se verificasse nenhuma incorporação, o

experimento era descartado e nova tentativa era feita, começando-se pela montagem de nova bicamada, utilizando-se outra câmara previamente limpa.

Em alguns experimentos a incorporação foi feita com a proteína incorporada previamente em vesículas lipídicas. Neste caso, as vesículas eram feitas de acordo com a técnica descrita por STRIELEMAN et alii (1985a). Para isto utilizava-se uma mistura de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e cardiolipina (49: 49: 1), dissolvidos em hexano. O solvente era deixado evaporar, até a formação de um filme na parede do frasco. Esta mistura era dispersa em uma solução de octilglicosídeo 40 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20 mM, MOPS 20 mM pH 6,8, de modo a se obter a concentração de 3,13 mg de lípidios por ml de solução. Adicionava-se a proteína purificada (5,0  $\mu\text{g}$  por mg de fosfolípido) e a mistura era dialisada, por 40 horas, contra uma solução contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20 mM e MOPS 20 mM pH 6,8. As vesículas assim obtidas eram adicionadas nas proximidades da bicamada lipídica, no lado cis da câmara, incorporando-se a proteína por um processo de fusão. A existência de um gradiente osmótico através da bicamada (KCl 0,3 M no lado cis e KCl 0,1 M no lado trans) facilitava em muito a incorporação da proteína à bicamada.

#### 4. RESULTADOS

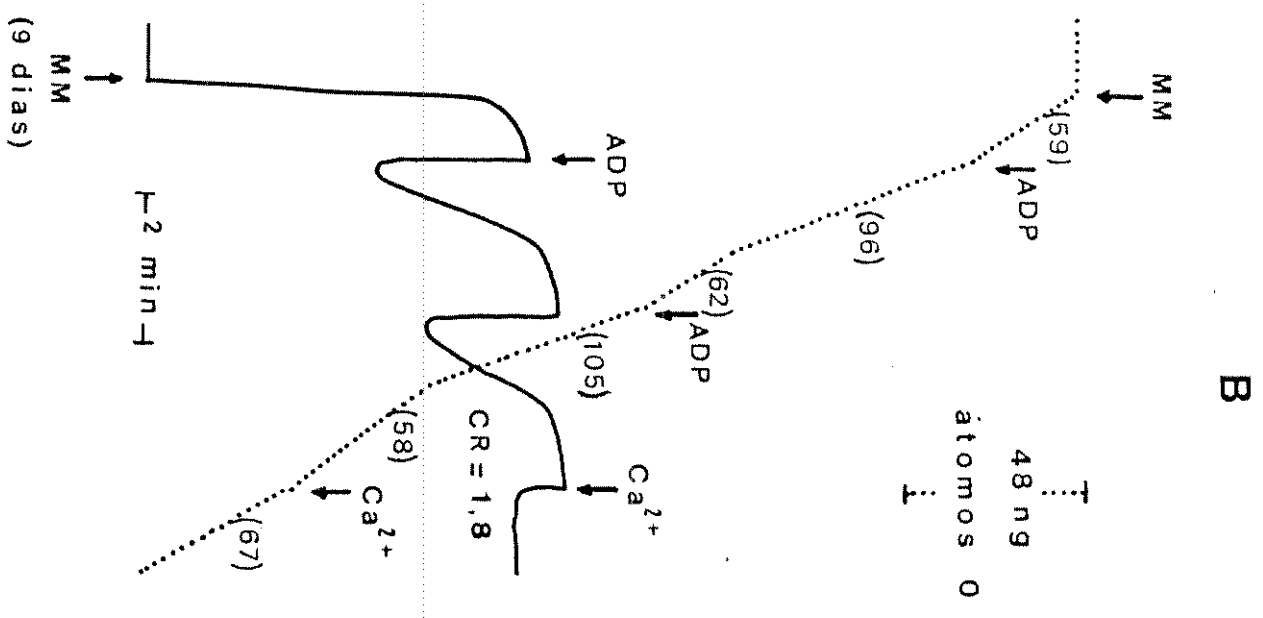
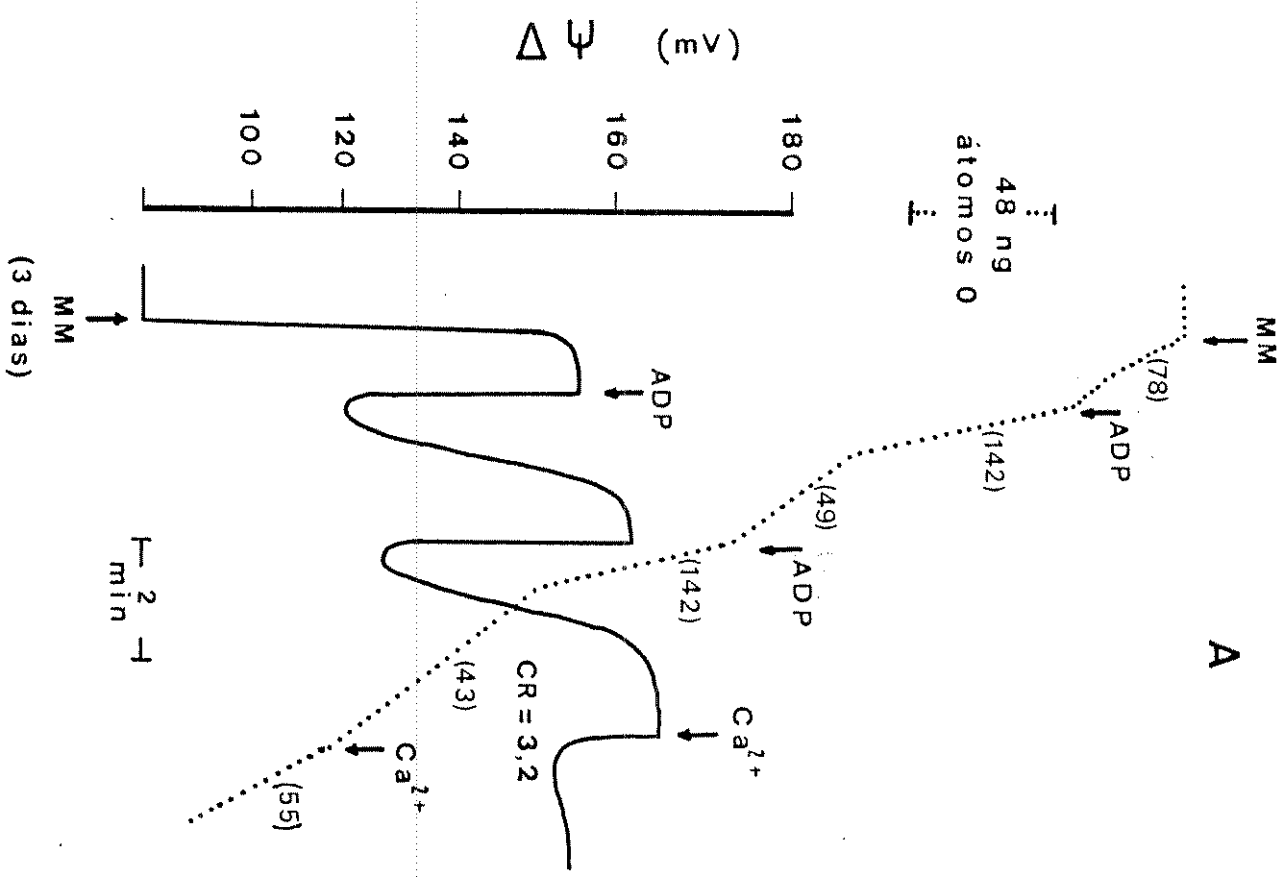
##### 4.1. CAPTAÇÃO DE $\text{Ca}^{2+}$ POR MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE DIFERENTES ÓRGÃOS VEGETAIS OU DE UM MESMO ÓRGÃO COM IDADES DIFERENTES

Dos aspectos relativos ao transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocôndrias de plantas, merece atenção o fato de que a capacidade de captação deste cátion é tida como dependente da espécie, do tecido e da idade do tecido utilizado para o isolamento das organelas.

No sentido de avaliar a dependência da idade do tecido (DIETER & MARMÉ, 1980), foram utilizadas mitocôndrias de coleóptiles de milho, isoladas de plântulas com 3 ou 9 dias após o início da germinação. Quanto à dependência da espécie, procurou-se ampliar a lista de espécies investigadas neste laboratório (CARNIERI et alii, 1987; VERCESI et alii, 1989), efetuando-se estudos com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata e de raízes de beterraba.

Antes de se fazer investigações mais detalhadas a respeito de qualquer atividade mitocondrial, é necessário ter controle sobre a qualidade das preparações obtidas. Dentre as maneiras de se avaliar a integridade das mitocôndrias isoladas, foram investigados o seu grau de acoplamento e a magnitude do potencial elétrico transmembrana.

Os traçados da Figura 3 permitem a avaliação

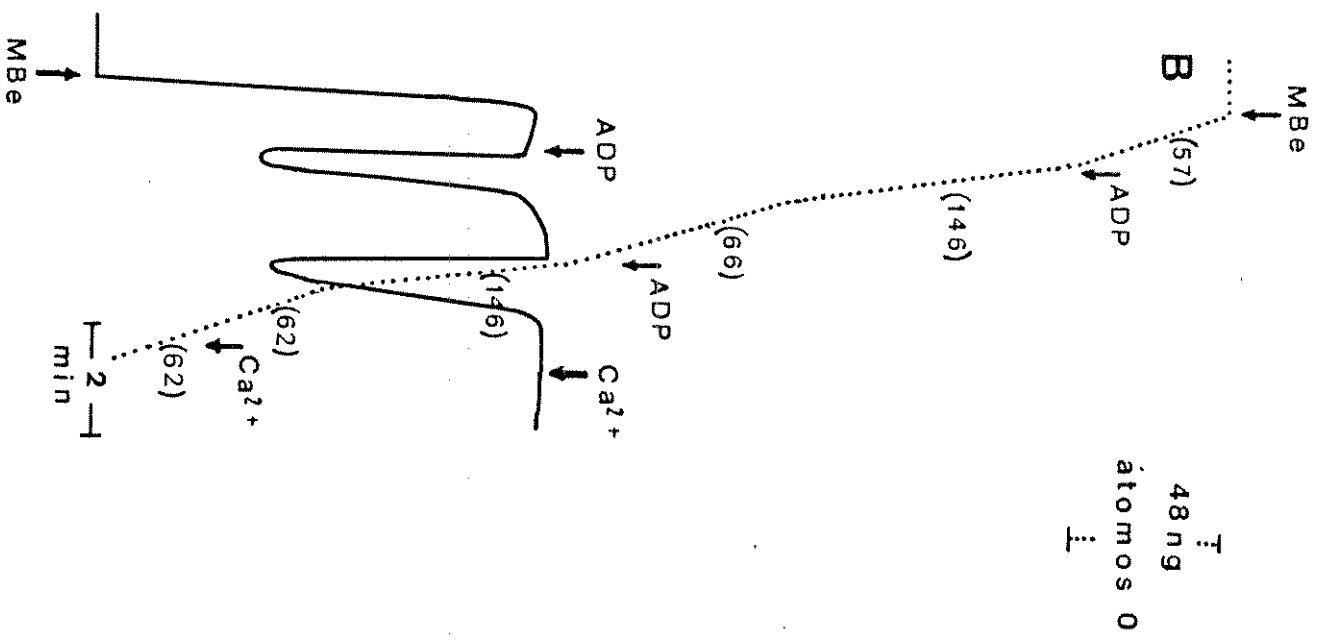
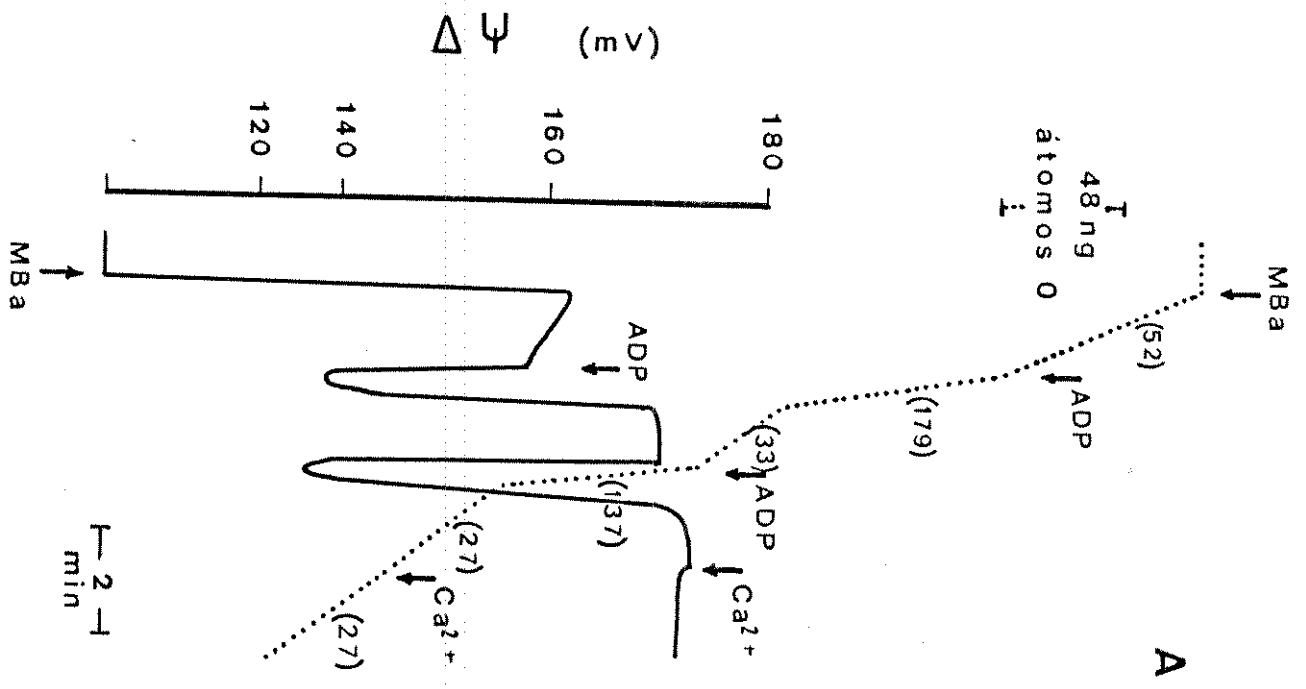


destas características em mitocôndrias de coleóptiles de milho, isoladas após 3 ou 9 dias de germinação. Observa-se que a adição de ADP ao meio de reação resultou em incremento na velocidade de consumo de  $O_2$  (estado respiratório 3), que voltou a valores inferiores, logo após a fosforilação de todo o ADP adicionado (estado respiratório 4). Os controles respiratórios, medidos após a segunda adição de ADP, foram de 3,2 (para as mitocôndrias isoladas aos 3 dias) e 1,8 (para aquelas de 9 dias). Tais valores indicam que, sistematicamente, o isolamento feito aos 3 dias de idade dos coleóptiles resultou em mitocôndrias com melhor grau de acoplamento, embora fossem obtidas mitocôndrias acopladas em ambas as situações.

A análise do potencial elétrico transmembrana indica que ambas foram capazes de construir potenciais com valores muito próximos, entre 150 e 160 mV, tanto para as mitocôndrias de coleóptiles de 3 dias quanto de 9 dias de idade. As quedas no potencial de membrana, após cada adição de ADP, confirmam o acoplamento indicado pelo controle respiratório e evidenciam a capacidade fosforilativa destas mitocôndrias.

Deve-se observar ainda que, em ambos os casos, a adição de  $Ca^{2+}$  ao meio de reação resultou em decréscimo no potencial de membrana, acompanhado de pequeno aumento na velocidade de consumo de  $O_2$ . Estas duas alterações indicam captação do  $Ca^{2+}$  adicionado, dirigida pelo potencial elétrico de membrana (SCARPA & AZZONE, 1970; NICHOLLS & AKERMAN, 1982).

A Figura 4 mostra o mesmo tipo de experimento, executado com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata



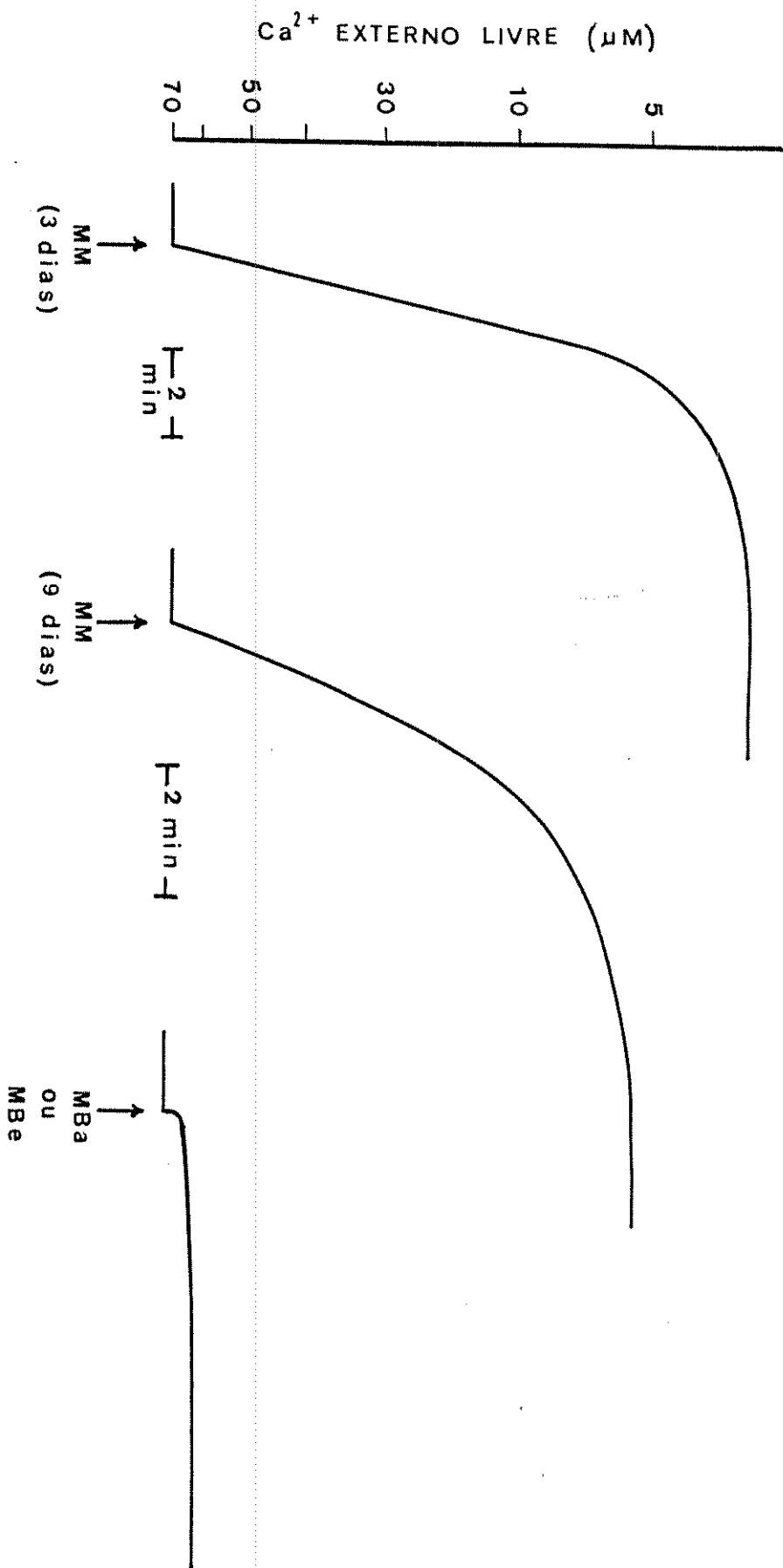


e de raízes de beterraba. Analogamente ao observado com as mitocôndrias de coleóptiles de milho, estas mitocôndrias encontram-se acopladas, mostrando estímulo respiratório transitório, em resposta à adição de ADP, acompanhado de queda no potencial de membrana, seguida de rápida recuperação. Deve ser destacado o elevado valor do controle respiratório obtido com as mitocôndrias de batata (5,1), bem superior ao comumente observado em mitocôndrias de plantas e indicativo de uma excelente preparação mitocondrial. Observa-se, ainda, que a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio de incubação não foi seguida de estímulo respiratório, nem de queda no potencial elétrico de membrana, indicando que o cátion não deve ter sido captado pelas mitocôndrias destas duas espécies.

Embora a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  possa ser inferida a partir das alterações no consumo de  $\text{O}_2$  e no potencial de membrana, a confirmação deve ser feita através de determinações diretas. Por exemplo, pode-se acompanhar as variações na concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  livre no meio de reação, utilizando-se um eletrodo seletivo.

A Figura 5 mostra as variações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de reação, após a adição de mitocôndrias de diferentes fontes, energizadas por succinato. Observa-se que as mitocôndrias de coleóptiles de milho de 3 dias de idade exibem maior atividade de captação do íon ( $160 \text{ nmoles.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ), embora as de 9 dias também sejam ativas na sua captação ( $130 \text{ nmoles.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ). A capacidade de tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  externo também foi maior nas organelas obtidas dos tecidos de menor idade, que conseguiram manter a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  externo livre em torno de  $3 \mu\text{M}$ , contra

Figura 5. Captação de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocôndrias de coleóptiles de milho, tubérculos de batata e raízes de beterraba. As condições são idênticas às da Figura 1, sendo que o meio de reação foi acrescido de 70 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Foram adicionados, onde indicado: 1 mg de mitocôndrias de milho (MM); mitocôndrias de batata (MBa); mitocôndrias de beterraba (MBe). Estes experimentos são representativos de uma série de 5.



valores de 5  $\mu\text{M}$  para as de 9 dias de idade. Apesar das diferenças detectadas, os valores obtidos nos dois casos são muito próximos e podem ser facilmente explicados pelos diferentes graus de acoplamento obtidos para as duas idades. Os coleóptiles mais velhos apresentam tecidos mais diferenciados, em especial maior quantidade de fibras lenhosas, exigindo um período mais prolongado para o seu rompimento durante os procedimentos de extração. Isto reflete-se na qualidade das preparações mitocondriais, resultando em organelas com menor grau de acoplamento, conforme o que pode ser constatado pela análise da Figura 3.

Na Figura 5 pode-se ver, ainda, que não houve captação de  $\text{Ca}^{2+}$  quando mitocôndrias de tubérculos de batata ou de raízes de beterraba foram adicionadas ao meio. Tal comportamento não se deve a problemas no isolamento destas mitocôndrias, nem à falta de acoplamento das mesmas, uma vez que a análise da Figura 4 já evidenciou que as mitocôndrias utilizadas apresentavam controle respiratório elevado (principalmente no caso da batata) e potencial de membrana suficiente para promover a captação de  $\text{Ca}^{2+}$ . Portanto, a explicação mais plausível é a inexistência do transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias destes órgãos, nestas espécies. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente neste Laboratório, estudando-se mitocôndrias isoladas de folhas brancas de repolho (MARTINS & VERCESI, 1985) e de brotos de cana-de-açúcar (Ione S. MARTINS, comunicação pessoal).

#### 4.2. DEPENDÊNCIA DE FOSFATO PARA A CAPTAÇÃO DE $\text{Ca}^{2+}$ POR MITOCÔNDRIAS DE COLEÓPTILES DE MILHO

As mitocôndrias isoladas de tecidos animais são capazes de captar  $\text{Ca}^{2+}$  sem exigir a adição de ions fosfato no meio de reação. Se o processo ocorrer na presença de ânions permeantes (como o próprio fosfato, acetato, bicarbonato, butirato, etc...), maiores quantidades do cátion podem ser acumuladas na matriz, porque estes ânions penetram em co-transporte com  $\text{H}^+$  e regeneram o potencial de membrana diminuído pela entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (LEHNINGER, 1974; SARIS & AKERMAN, 1980; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). No entanto, numerosos são os registros relativos à exigência da presença de ions fosfato no meio de reação, para que as mitocôndrias de plantas sejam capazes de captar  $\text{Ca}^{2+}$  (AKERMAN & MOORE, 1983; DAY & WISCKISCH, 1984; MARTINS et alii, 1986).

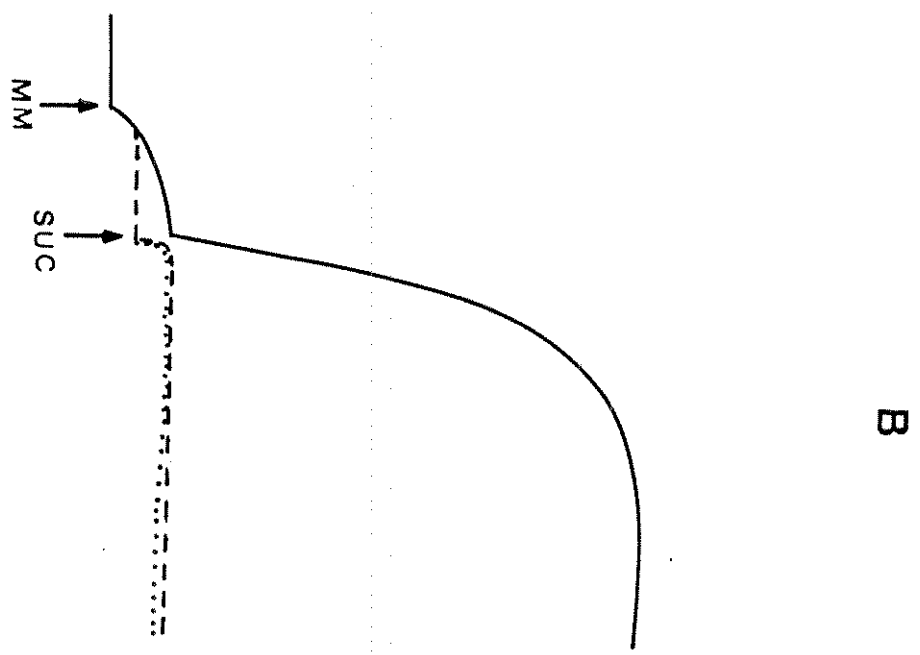
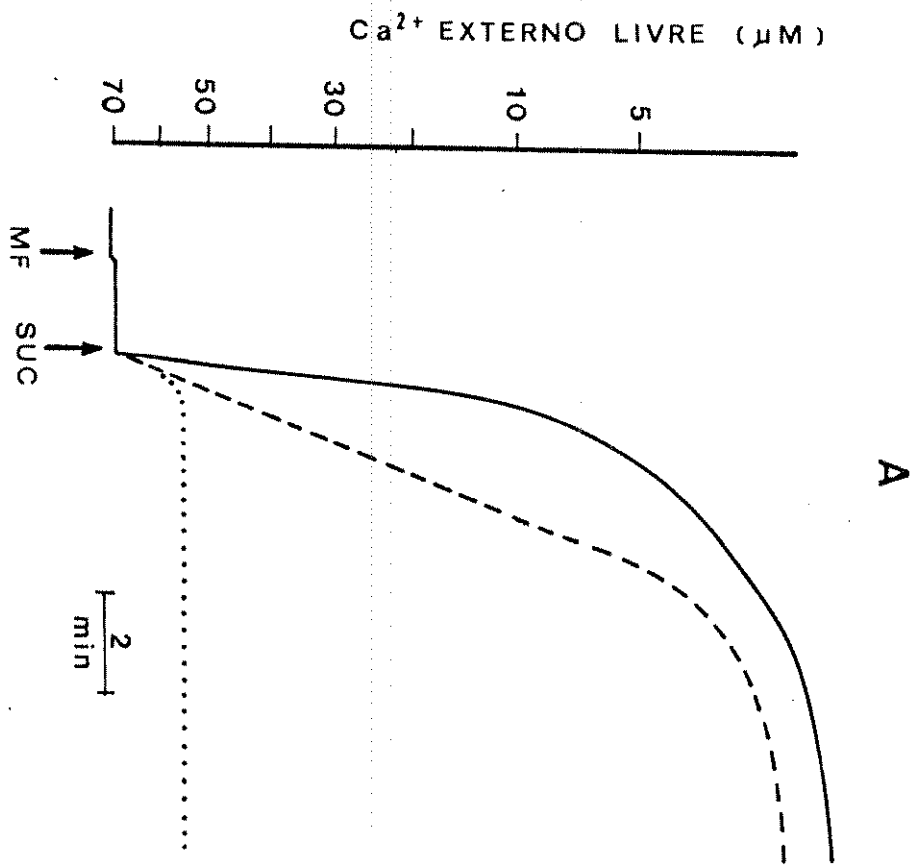
Os experimentos seguintes foram executados no sentido de investigar a possibilidade de substituição dos ions fosfato por outros possíveis ânions permeantes, assim como avaliar a participação dos translocadores de  $\text{P}_i$  no mecanismo de captação de  $\text{Ca}^{2+}$ , em mitocôndrias de milho. Para isso, em determinadas situações, foi utilizado um inibidor do transporte mitocondrial de  $\text{P}_i$ , o mersalil, de natureza mercurial e não penetrante (BRYLA, 1980), que inibe os dois translocadores de fosfato, o trocador  $\text{P}_i/\text{OH}^-$  e o translocador de dicarboxilatos, na faixa de concentração

utilizada (FONYÓ, 1979; WOHLRAB, 1986).

No experimento da Figura 6 procurou-se comparar o comportamento de mitocôndrias de fígado de rato com as de coleóptiles de milho. Observa-se que ambos os tipos de mitocôndrias captam  $\text{Ca}^{2+}$  quando o fosfato está presente no meio de reação. A presença de mersalil inibe totalmente a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias de milho e diminui muito a captação do cátion por mitocôndrias de fígado. Entretanto, em presença deste inibidor, apenas as mitocôndrias de fígado recuperam sua capacidade de retirar  $\text{Ca}^{2+}$  do meio, se a ele forem acrescentados íons acetato. A pequena captação de  $\text{Ca}^{2+}$ , por mitocôndrias de milho, antes da adição de succinato (parte B da Figura 6) é provavelmente devida à existência de substratos endógenos, não completamente inibidos pela rotenona (MOLLER & LIN, 1986; DOUCE & NEUBURGER, 1987). Além disso, a deflexão observada no momento da adição de succinato deve-se à sua complexação ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes resultados indicam que a captação simultânea de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Pi}$  (ou outro ânion permeante), em mitocôndrias de fígado deve-se apenas à necessidade de recomposição do potencial de membrana (LEHNINGER, 1974; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Por outro lado, em mitocôndrias de milho (e provavelmente de plantas, em geral) há real exigência de transporte de  $\text{Pi}$ , simultâneo ao de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Como há registros de que arsenato e sulfato são também translocados pelos translocadores de fosfato (HANSON, 1985), estes ânions também foram testados, no sentido de induzir captação de  $\text{Ca}^{2+}$ , tendo sido ambos inefetivos (resultados não mostrados).

Os registros da figura anterior indicam a captação



de  $\text{Ca}^{2+}$  com base na diminuição da concentração deste cátion no meio de reação. Procurou-se então avaliar este mesmo processo de captação através da dosagem de  $\text{Ca}^{2+}$  e de Pi acumulados na matriz. Pela Figura 7 vê-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  e o Pi foram acumulados na matriz de mitocôndrias de milho, mantendo, no equilíbrio, uma relação  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$  próxima a 1,5, indicativa da precipitação de hidroxiapatita (ELZAM & HODGES, 1968). Quando as mitocôndrias foram pré-incubadas com mersalil, os níveis endógenos destes dois íons mantiveram-se praticamente inalterados e próximos aos valores iniciais, confirmando que se a entrada de Pi estiver bloqueada não há captação de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 4.3. EFLUXO DE $\text{Ca}^{2+}$ EM MITOCÔNDRIAS DE COLEÓPTILES DE MILHO

As mitocôndrias retiram  $\text{Ca}^{2+}$  do meio até que seja alcançado um estado de equilíbrio dinâmico, no qual as velocidades de captação e de efluxo do íon se igualam, efetivando-se um verdadeiro movimento cíclico do mesmo (AKERMAN & NICHOLLS, 1983). É possível alterar este equilíbrio pelo uso de determinados inibidores, quando passa a ser observado efluxo líquido do  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio de reação. Nos experimentos que se seguem foram analisados alguns aspectos relativos ao efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias de coleóptiles de milho.

Na parte A da Figura 8 observa-se que, após ter



Ca<sup>2+</sup> E Pi INTRAMITOCONDRIAIS

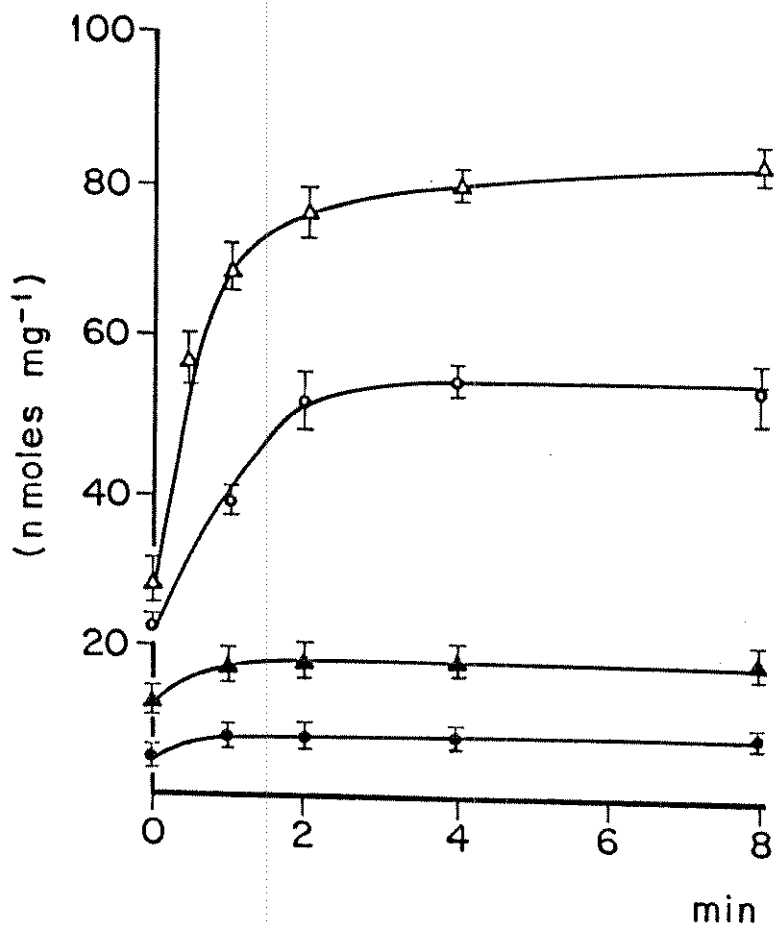
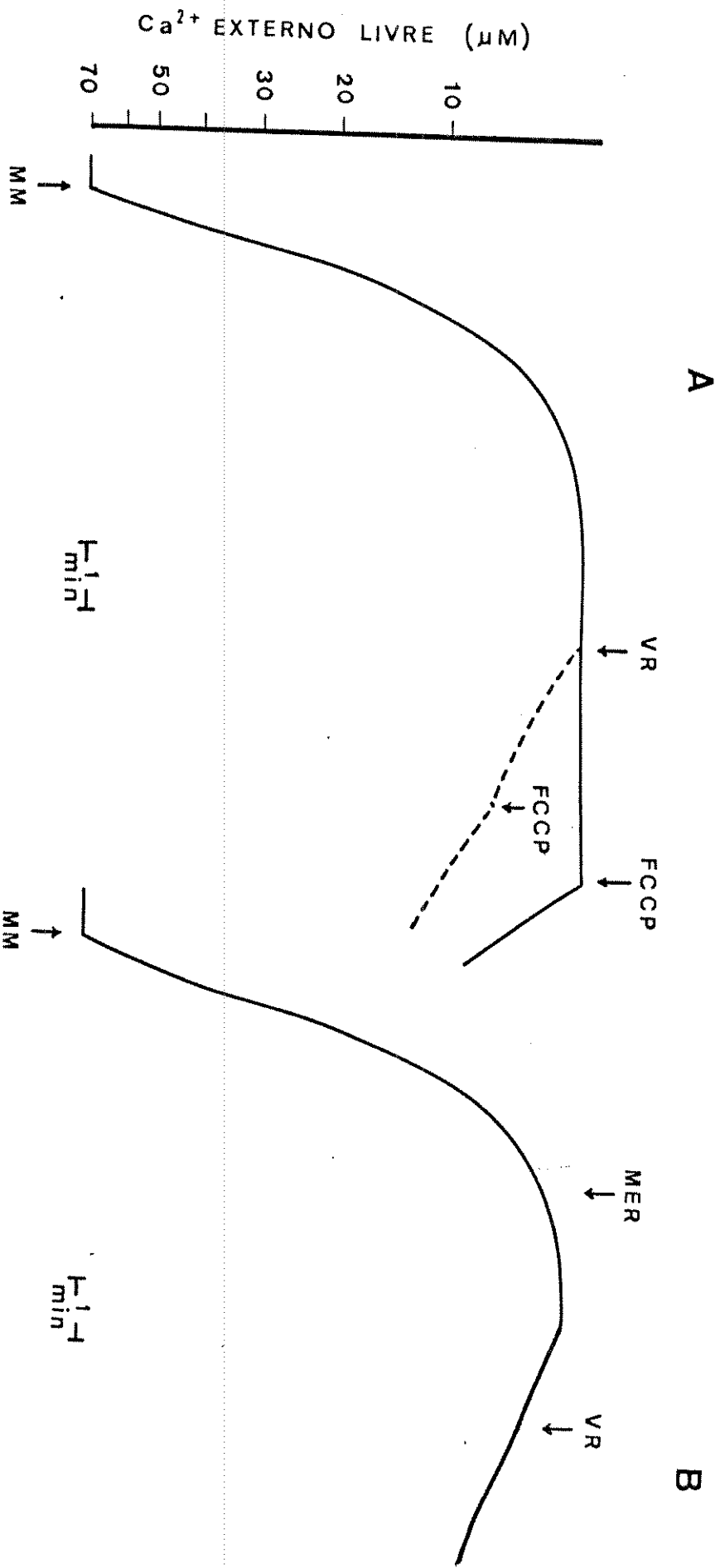


Figura 7. Captação de Ca<sup>2+</sup> e fosfato por mitocôndrias de coleóptiles de milho. A captação foi iniciada pela adição de succinato (2 mM) após as mitocôndrias terem sido incubadas por 4 minutos, no meio básico de reação contendo fosfato (1 mM), rotenona (5 μM) e Ca<sup>2+</sup> (82 μM), na presença de 40 μM de mersalil (símbolos escuros), ou na sua ausência (símbolos vazios). (Δ, ▲) Ca<sup>2+</sup> intramitocondrial; (O, ●) fosfato intramitocondrial. Os dados são médias, ± desvios padrões (n=5).



vido alcançada a situação de equilíbrio, as adições de vermelho de rutênio ou de FCCP ao meio de reação permitem a observação de efluxo líquido de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Nota-se que o efluxo promovido pelo vermelho de rutênio é mais lento (em torno de  $1,0 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Neste caso, há inibição específica da via de captação (por ligação do inibidor ao transportador), passando a prevalecer a via de efluxo (MOORE, 1971; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Em presença de FCCP o efluxo é mais rápido (em torno de  $5 \text{ nmoles} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Neste caso, o efluxo observado ocorre pelo reverso da via de entrada. Isto porque o FCCP, atuando como protonóforo, impede a manutenção do potencial elétrico de membrana, que representa a força motriz para a captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (SCARPA & AZZONE, 1970; NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Como a via de influxo é muito mais ativa que a de efluxo, o movimento de saída, neste caso, é mais rápido.

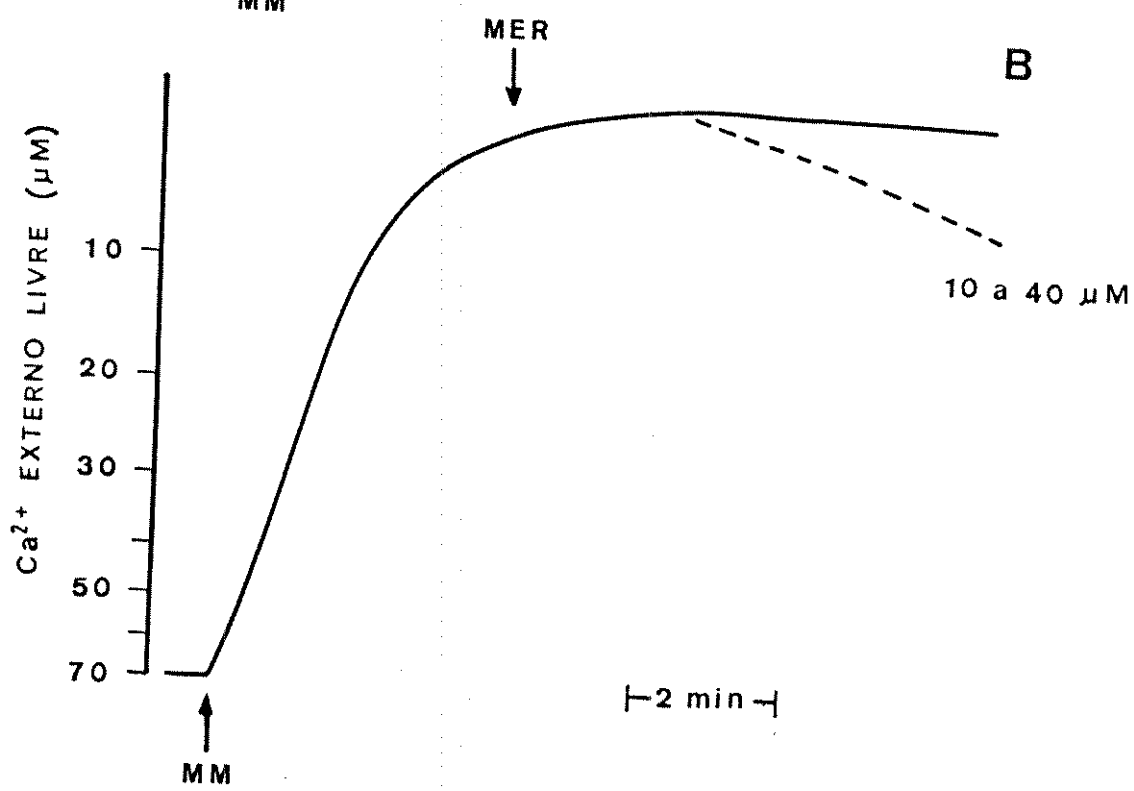
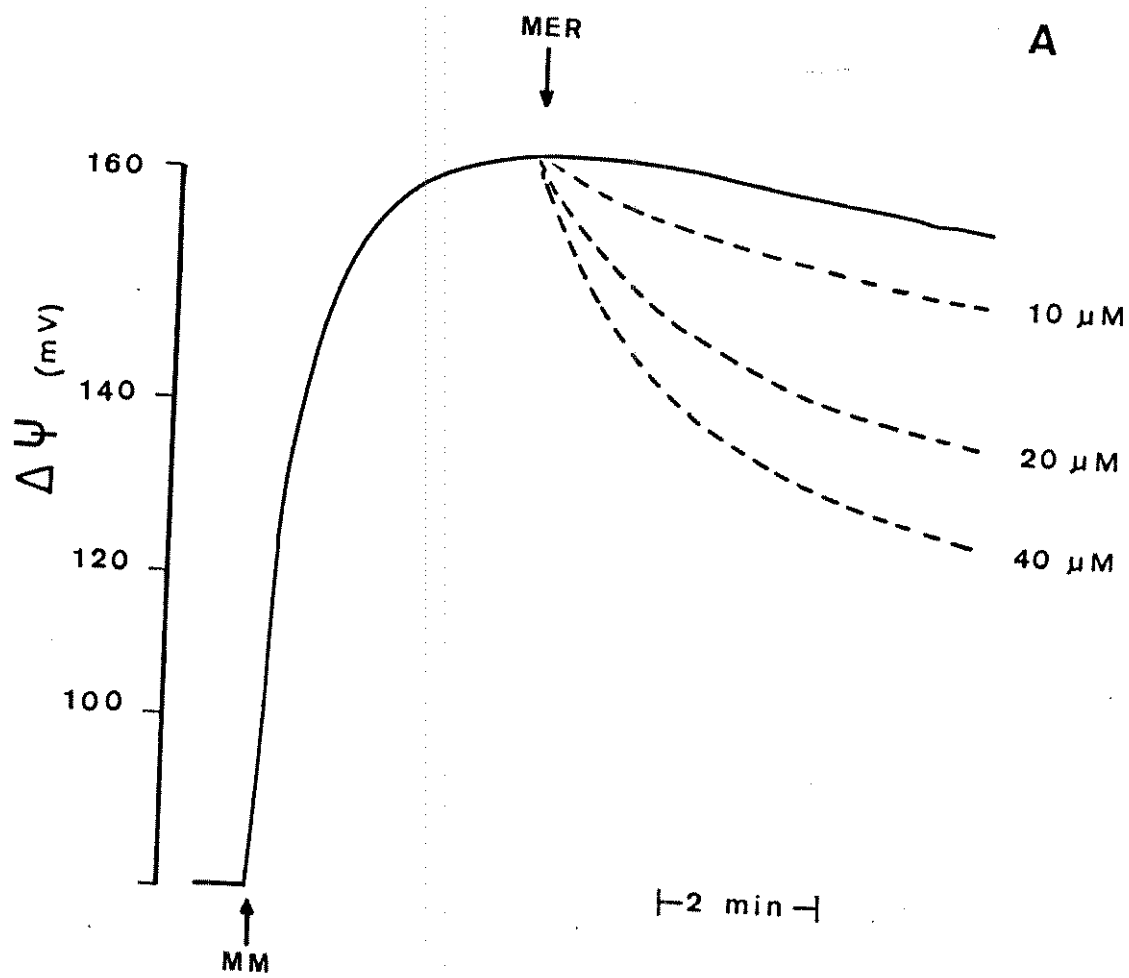
Nota-se, ainda, que a adição de FCCP é incapaz de acelerar significativamente o efluxo promovido pelo vermelho de rutênio. Tal observação vem confirmar as interpretações feitas no parágrafo anterior. O colapso no potencial de membrana não é suficiente para garantir o retorno do  $\text{Ca}^{2+}$  captado, via reverso da via de influxo, uma vez que ela está inibida pelo vermelho de rutênio.

Na parte B da Figura 8 observou-se que a adição de mersalil também foi capaz (após cerca de 2 minutos) de promover efluxo líquido de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, a velocidade deste efluxo não foi alterada pela adição de vermelho de rutênio. Como o mersalil impede a entrada de Pi, e o seu transporte é essencial para o captação de  $\text{Ca}^{2+}$  em

mitocôndrias de plantas, o efeito deste inibidor é análogo ao do vermelho de rutênio, ambos bloqueando a via de captação e permitindo a prevalência da via de efluxo.

A ocorrência de efluxo em presença de mersalil, com ou sem vermelho de rutênio, é um primeiro indicio de que a via de efluxo mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  não envolve o transporte simultâneo de fosfato, ao contrário do que ocorre para o influxo. Este aspecto foi o motivo da realização das investigações que se seguem, onde procurou-se avaliar a interferência do mersalil sobre o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias de milho.

Inicialmente foi feita uma avaliação dos efeitos do mersalil sobre o potencial elétrico de membrana, pela importância deste componente como responsável pelo processo de captação de  $\text{Ca}^{2+}$ , em mitocôndrias. Na Figura 9 (parte A) vê-se que a adição de mersalil ao meio resulta em queda gradativa de  $\Delta\psi$ , cuja magnitude é dependente da concentração utilizada do inibidor. Observa-se que o decréscimo no potencial foi de apenas cerca de 10 mV, para a concentração mais baixa de mersalil (10  $\mu\text{M}$ ), e em torno de 33 mV para a maior concentração (mersalil 40  $\mu\text{M}$ ), considerando-se o período de 6 minutos de acompanhamento do processo. Quanto ao movimento de  $\text{Ca}^{2+}$ , a parte B da Figura 9 mostra que a adição de mersalil resulta em efluxo líquido, cuja velocidade é independente da concentração do inibidor, e que só se inicia após cerca de 2,5 minutos da sua aplicação ao meio. Estes dados indicam que, embora o mersalil reduza  $\Delta\psi$ , o seu efeito (nos limites de concentração utilizados) não é suficiente para colapsar totalmente o potencial de membrana,



e se restringe a inibir a operação da via de captação de Pi e conseqüentemente a de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Em seguida, foi investigado o efeito do mersalil sobre o efluxo mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , conforme pode ser observado na Figura 10. A semelhança das observações referentes à Figura 8, nota-se inicialmente que o efluxo promovido por FCCP é mais intenso que o desencadeado pelo vermelho de rutênio. Constata-se, ainda, que apenas o efluxo promovido por FCCP teve a sua velocidade reduzida pela presença de mersalil. Seguindo-se o mesmo raciocínio anteriormente exposto, supõe-se que a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  promovida pelo vermelho de rutênio ocorra pela via de efluxo, independente da via de captação e de movimento de Pi. A operação da via de influxo, atuando pelo seu reverso, explicaria a necessidade de movimento de Pi e a interferência do mersalil ao reduzir o efluxo provocado pelo FCCP.

#### 4.4. INDEPENDÊNCIA DE FOSFATO PARA O EFLUXO DE $\text{Ca}^{2+}$ EM MITOCÔNDRIAS DE COLEÓPTILES DE MILHO

A utilização de mersalil, como inibidor do transportador de Pi, permitiu algumas deduções a respeito do movimento deste ânion, acompanhando ou não o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , em mitocôndrias de milho. No sentido de confirmar as sugestões feitas no item anterior, procurou-se avaliar simultaneamente o movimento de  $\text{Ca}^{2+}$  e de Pi, durante o efluxo promovido por FCCP e por vermelho de rutênio, em

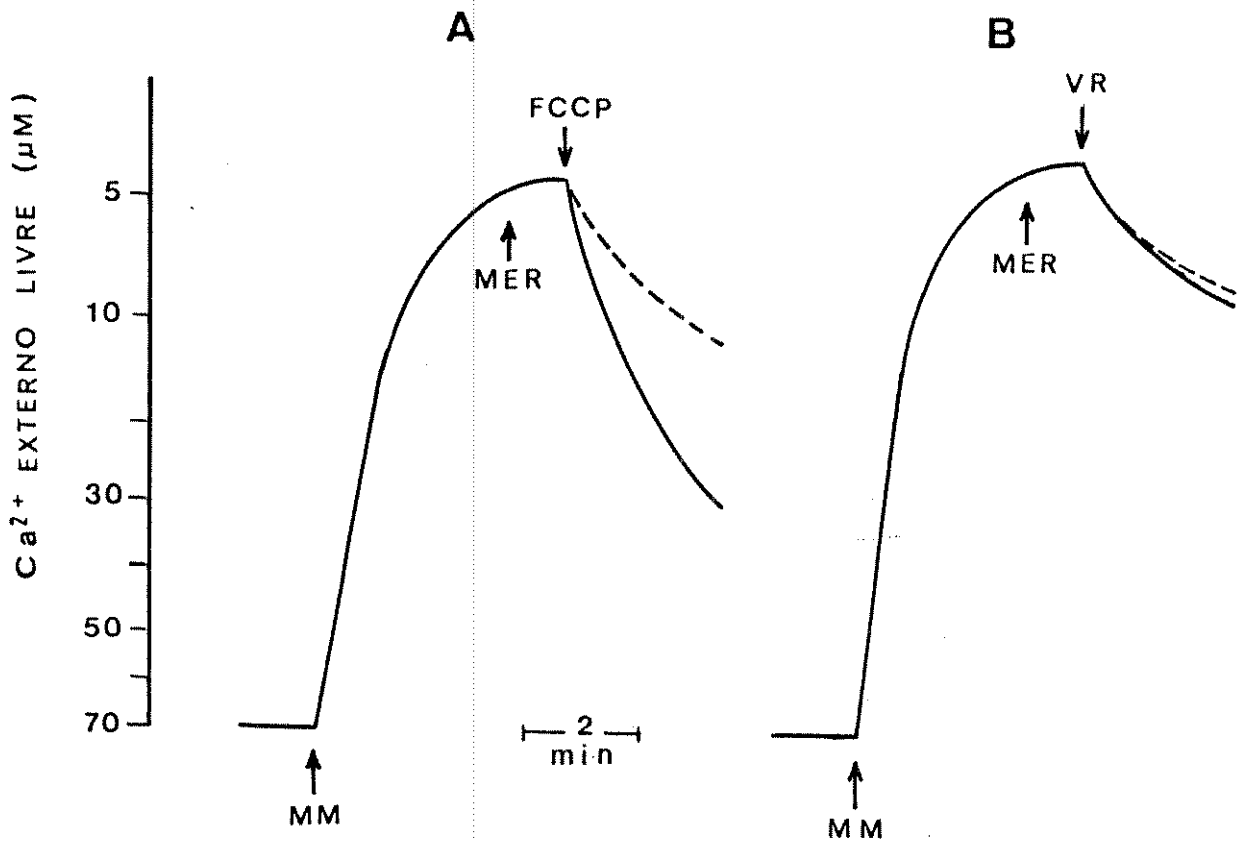


Figura 10. Efeito do mersalil sobre o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , induzido por FCCP (A), ou vermelho de rutênio (B), em mitocôndrias de coleóptiles de milho. As condições experimentais são as mesmas da Figura 5. Foram adicionados, onde indicado: mitocôndrias de milho (MM, 1 mg); FCCP (2  $\mu\text{M}$ ); mersalil (MER, 60  $\mu\text{M}$ ); vermelho de rutênio (VR, 5  $\mu\text{M}$ ). Os traçados contínuos representam experimentos controle, onde o mersalil não foi adicionado. Estes experimentos são representativos de uma série de 5.

presença ou não de mersalil. Nos experimentos seguintes foram feitas medidas do conteúdo intramitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  e de Pi, a partir do momento da adição do agente promotor de efluxo, conforme descrição do item 3.7.

No experimento da Figura 11, desenvolvido em pH 7,2, observa-se o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e de Pi, promovido por FCCP. Na ausência de mersalil, a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  é acompanhada por Pi, com uma estequiometria variando de 0,9 a 1,6, durante os 8 minutos de análise. Quando mersalil estava presente antes da adição de FCCP, a inibição no efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi maior que a inibição no efluxo de Pi. Neste caso, a razão  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$  variou de 0,6 a 1,2. Deve-se destacar que praticamente não houve inibição da liberação de Pi, embora mersalil estivesse presente na concentração de 60  $\mu\text{M}$ .

A ação do FCCP como protonóforo resulta em redução do pH da matriz, e há registro de que a acidificação intramitocondrial diminui a reatividade dos grupos SH dos translocadores de Pi com o mersalil (LIGETI & FONYÓ, 1987, 1989). Por isso, este experimento foi repetido em pH 7,6 (Figura 12). Na ausência de mersalil, os resultados foram semelhantes aos anteriores, mas um comportamento diferente foi observado na presença do inibidor. Neste caso, as velocidades de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e de Pi foram reduzidas para valores semelhantes ( $2 \text{ nmoles.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) e constantes, ao longo do tempo, com estequiometria em torno de 1,4. A persistência de efluxo de Pi pode ser devida à inibição incompleta pelo mersalil, permitindo saída de  $\text{Ca}^{2+}$  e de Pi pelo reverso da via de entrada, além do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  resultante da operação do possível antiporter  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ .



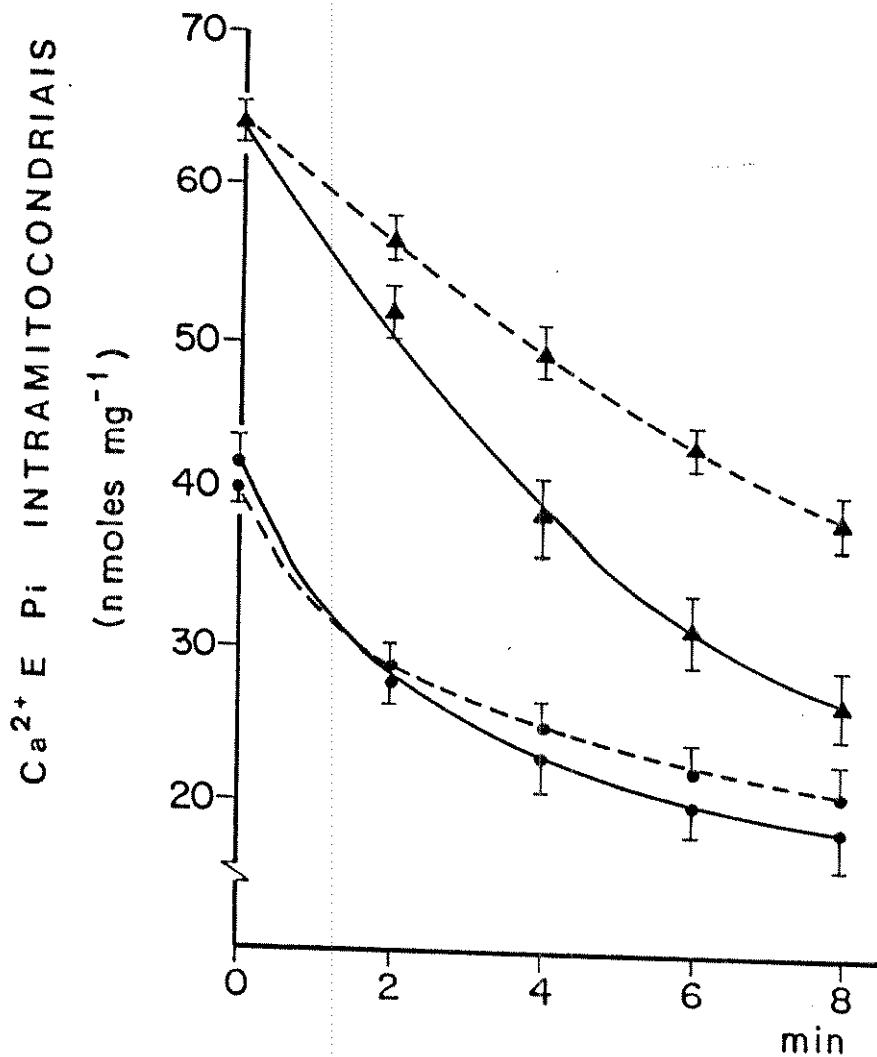


Figura 11. Efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfato induzido por FCCP, a pH 7,2, em mitocôndrias de coleóptiles de milho. As condições são as mesmas da Figura 5. A cada 2 minutos foram recolhidas amostras, como descrito em Materiais e Métodos, para determinação de  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi. O tempo zero corresponde ao momento da adição de FCCP, feita 4 minutos após o início da captação. Controle em ausência de mersalil (linhas contínuas); presença de  $60 \mu\text{M}$  de mersalil (linhas tracejadas); concentração intramitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\blacktriangle$ ); concentração intramitocondrial de Pi ( $\bullet$ ). Os dados são médias,  $\pm$  desvios padrões ( $n=9$ ).

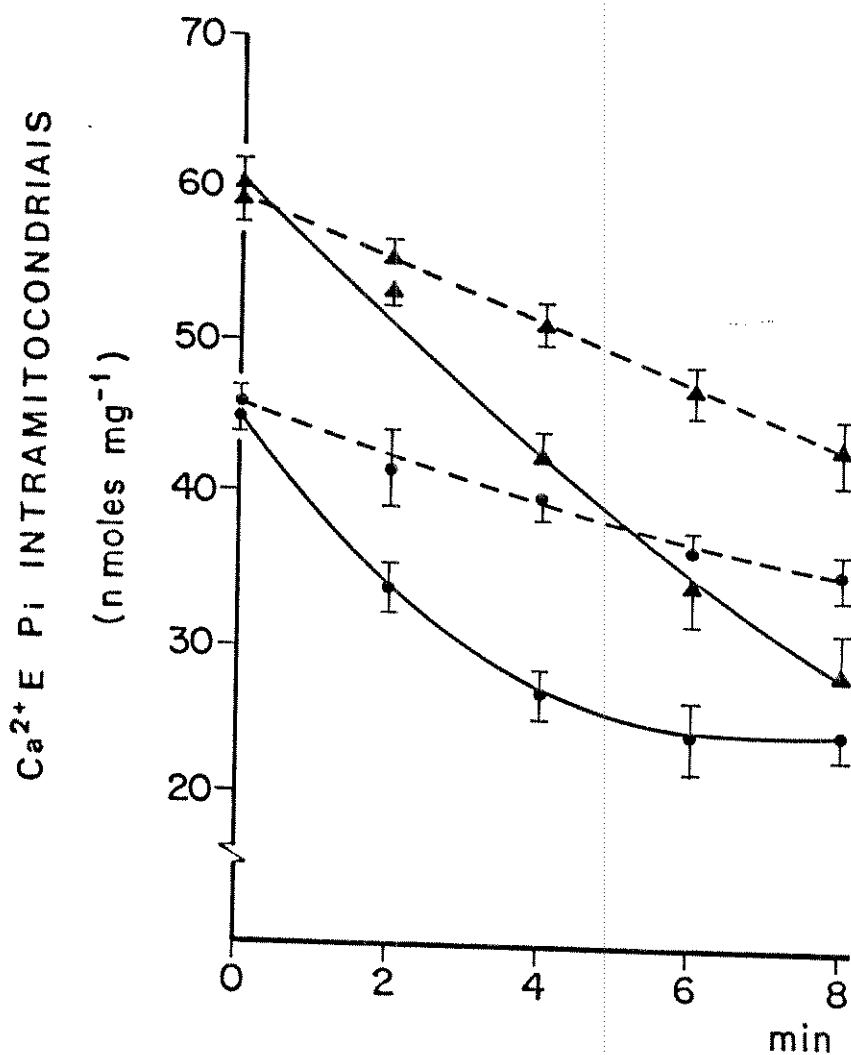


Figura 12. Efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfato, induzido por FCCP, a pH 7,6, em mitocôndrias de coleóptiles de milho. As condições são idênticas às da Figura 11, exceto que a concentração de HEPES, no meio de reação foi elevada para 10 mM, e o pH mantido em 7,6. Os símbolos representam as mesmas condições da figura anterior.

No experimento da Figura 13 a via de influxo foi bloqueada por vermelho de rutênio, permitindo que o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorresse em potencial de membrana elevado. Sob estas condições, a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  foi seguida por  $\text{Pi}$  somente nos 2 minutos iniciais. Nesta condição, embora o mersalil iniba totalmente a liberação de  $\text{Pi}$ , o padrão de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi o mesmo que na ausência do inibidor, em concordância com os resultados já mostrados nas Figuras 8 e 10. Portanto, tudo indica que o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por vermelho de rutênio é independente de  $\text{Pi}$ .

#### 4.5. NUCLEOTÍDEOS DE PURINA E ACOPLAMENTO EM MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULO DE BATATA

A observação de alguns experimentos analisados anteriormente (parte A das Figuras 3 e 4) mostra que mitocôndrias de milho e de batata apresentam-se com melhor grau de acoplamento após a fosforilação do ADP adicionado ao meio de reação. Muita discussão existe a este respeito, envolvendo explicações variadas que incluem o controle pela razão ADP/ATP (DRY & WISKICH, 1982; RUSTIN & VALAT, 1986, DAY et alii, 1987), a operação de vias alternativas (DAY et alii, 1987; BRYCE et alii, 1990) e o comportamento não ôhmico da membrana interna mitocondrial (WHITEHOUSE et alii, 1989).

Com o objetivo de examinar com mais detalhe estas observações, foram desenvolvidos os experimentos seguintes,

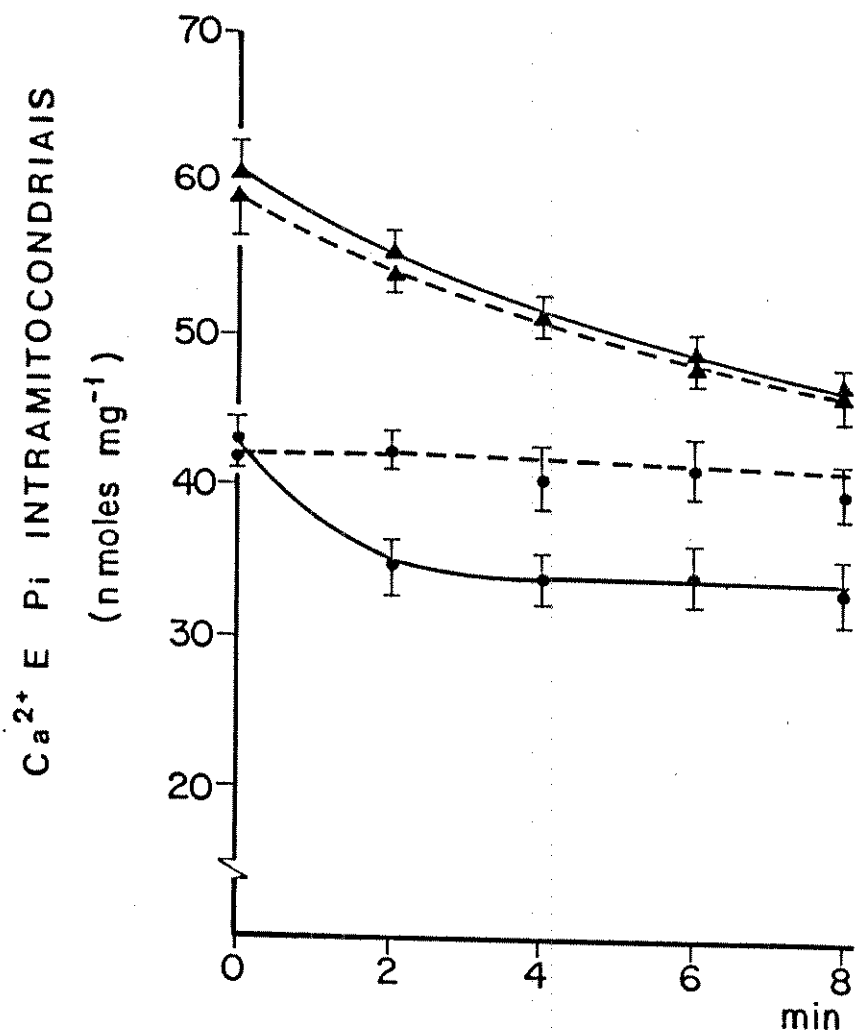


Figura 13. Efeito do mersalil sobre o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfato, induzido por vermelho de rutênio, em mitocôndrias de coleóptiles de milho. As condições são as mesmas da Figura 11, assim como os símbolos utilizados, com a diferença de que o tempo zero corresponde ao momento da adição de vermelho de rutênio ( $5 \mu\text{M}$ ).

utilizando-se mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, onde tais alterações mostraram-se mais pronunciadas. Na Figura 14 observa-se que o potencial de membrana alcançado após a fosforilação do ADP adicionado foi maior (170 mV) que o inicialmente estabelecido (162 mV). Isto pode indicar redução na permeabilidade da membrana interna a  $H^+$ , confirmada pelo fato de que a atividade respiratória no estado 4 passou a valores inferiores ( $33 \text{ ng O.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) aos observados antes da adição de ADP ( $52 \text{ ng O.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ). Observa-se, ainda, que a adição de ATP resulta nas mesmas alterações descritas acima.

É importante esclarecer que os nucleotídeos de adenina só foram adicionados nos momentos indicados nos traçados, não estando presentes desde o início da incubação. Nos experimentos do presente trabalho, toda vez que se pretendia trabalhar com mitocôndrias energizadas, o succinato foi utilizado para este fim, sem a utilização simultânea de ATP. Alguns pesquisadores incorporam ATP ao meio de reação, antes mesmo da adição de mitocôndrias, com o suposto objetivo de ativar a succinato desidrogenase (NEUBURGER, 1985; DJEBAR & MOREAU, 1987). Como pode ser observado pela Figura 14, a succinato desidrogenase já se encontrava ativa, mantendo uma atividade respiratória relativamente elevada, assim como um potencial elétrico de membrana suficiente para promover a atividade fosforilativa. Portanto, os nucleotídeos adicionados estão agindo também de uma outra forma, ao contribuírem para o maior acoplamento alcançado.

A literatura também registra amplamente que, para se obter mitocôndrias de plantas acopladas, é necessário o

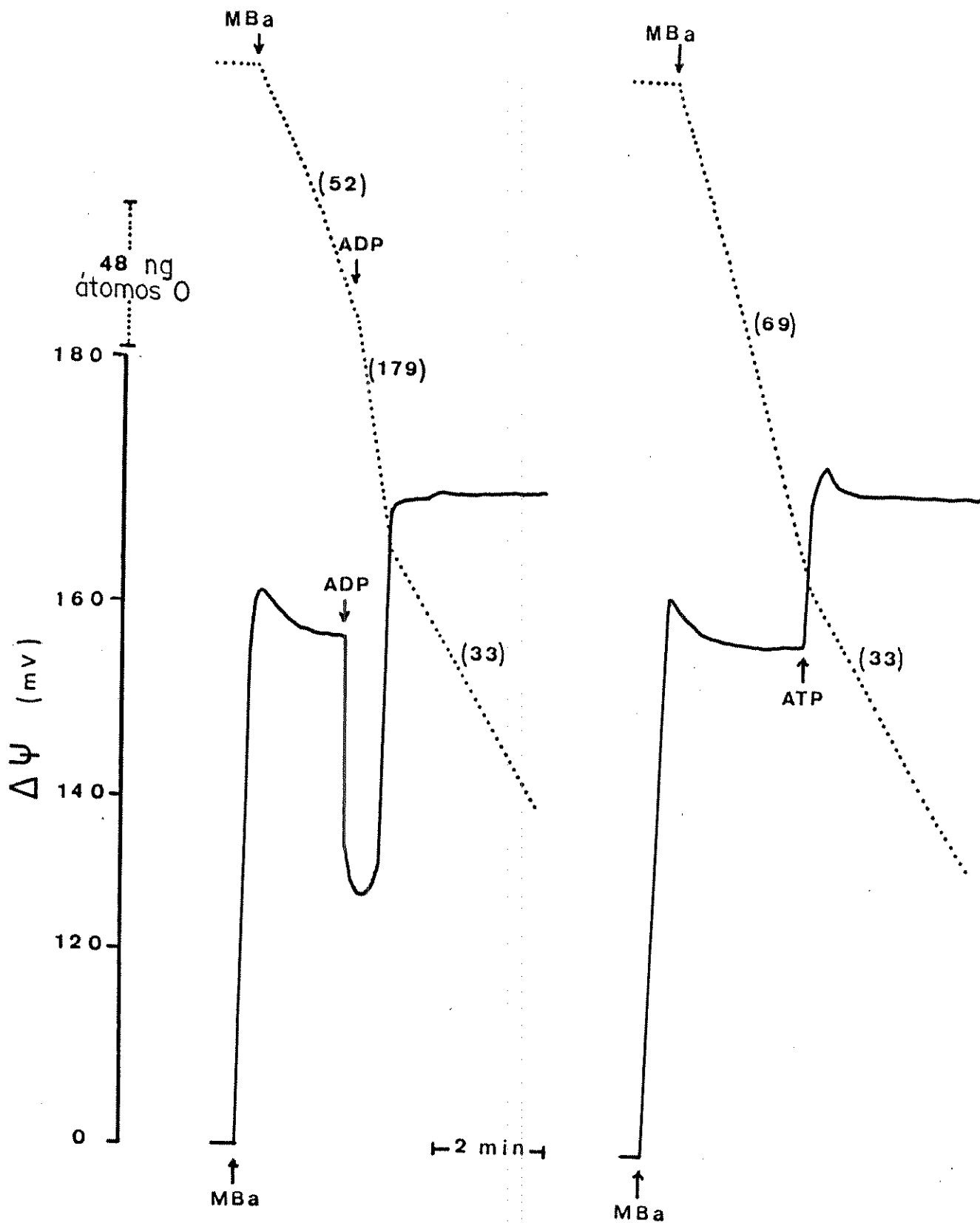


Figura 14. Efeitos de nucleotídeos de adenina sobre o potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) e o consumo de  $O_2$ , em mitocôndrias de tubérculos de batata. As condições são as mesmas da Figura 3. Foram adicionados, onde indicado: mitocôndrias de batata (MBa, 1 mg); ADP (100 nmoles); ATP (100 nmoles). Os números entre parênteses indicam o consumo de  $O_2$ , em ng átomos de  $O \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Estes experimentos são representativos de uma série de 5.

uso de BSA no meio de reação (DUCET, 1979; DIOLEZ & MOREAU, 1983; 1985). Diante disso, procurou-se avaliar a interferência do BSA nas alterações descritas nos parágrafos anteriores. Para isso, foram isoladas mitocôndrias de batata, sem a presença de BSA em quaisquer dos meios utilizados (desde o de extração até o de reação). Os experimentos desenvolvidos com estas mitocôndrias encontram-se representados na Figura 15. Vê-se que, na ausência de BSA, o potencial de membrana inicialmente construído é muito baixo (em torno de 125 mV) e que o seu valor é aumentado pela incorporação de BSA e/ou ATP ao meio de reação. O uso isolado de cada uma destas substâncias só foi capaz de elevar o potencial para cerca de 140-145 mV. Entretanto, o seu uso simultâneo permitiu que fossem atingidos potenciais de 160 mV, análogos aos obtidos com mitocôndrias isoladas em presença de BSA desde o início. Como o acréscimo de BSA acarreta aumento no potencial de membrana, e esta proteína é tida como capaz de se ligar a ácidos graxos livres (WOJTCZAK & WOJTCZAK, 1960; DIOLEZ & MOREAU, 1983), um fator adicional tem que ser considerado. De início supõe-se que a presença de ácidos graxos aumente a permeabilidade da membrana interna mitocondrial e que a atuação dos nucleotídeos seja independente deste efeito, uma vez que os seus efeitos são aditivos e independentes da ordem em que são acrescentados ao meio.

Pelos experimentos anteriores não se pode dizer se as alterações observadas eram devidas ao ATP produzido, ou ao próprio ADP adicionado, nem se era necessária a presença destes nucleotídeos no interior das mitocôndrias. Na tentativa de esclarecer estes aspectos, lançou-se mão de um

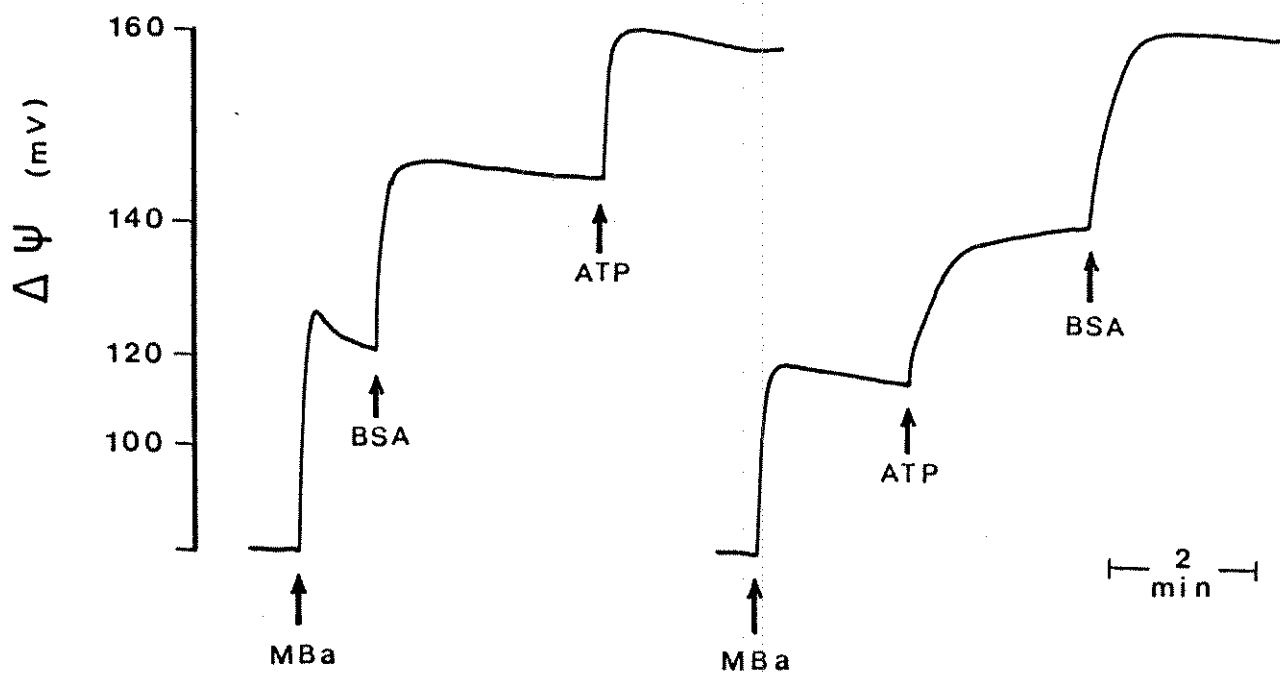


Figura 15. Alterações no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ), promovidas por BSA e ATP, em mitocôndrias de tubérculos de batata, isoladas na ausência de BSA. As condições são idênticas às da Figura 3, exceto que o meio de reação não continha BSA. Foram adicionados, onde indicado: mitocôndrias de batata (MBa, 1 mg); BSA (1 mg); ATP (100 nmoles). Estes experimentos são representativos de uma série de 5.



inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina (ou translocador ADP/ATP), o carboxiatractilato (CAT) (KLINGENBERG et alii, 1978), assim como de um inibidor da síntese de ATP, a oligomicina (NICHOLLS, 1982).

Os experimentos desenvolvidos na presença destes inibidores encontram-se representados na Figura 16. Observa-se que o potencial inicialmente estabelecido foi de cerca de 160 mV e que a própria adição de CAT resultou no aumento de cerca de 6 unidades em  $\Delta\psi$ . A adição de ADP ao meio não foi acompanhada de queda temporária no potencial, indicando que o inibidor foi ativo em impedir a entrada do nucleotídeo, e que este não foi fosforilado. Ao contrário, a adição de ADP resultou em elevação imediata na magnitude do potencial para valor próximo a 175 mV. Observa-se, ainda, o mesmo resultado quando o nucleotídeo adicionado é ATP, ou mesmo GDP. Estes resultados indicam que o efeito obtido é resultante da atuação de nucleotídeos de purina no lado externo da membrana mitocondrial interna. Embora a própria translocase de nucleotídeos de adenina possa interferir no nível de acoplamento destas mitocôndrias, o efeito da adição de nucleotídeos de purina deve ser independente deste translocador, uma vez que, neste experimento, o mesmo encontra-se inibido.

Ainda na Figura 16, pode ser visto que, mesmo em presença de oligomicina, a adição de ATP resultou em aumento no nível do potencial de membrana. Isto indica que o efeito obtido não é devido à hidrólise de ATP. O mesmo pode ser dito em relação ao outro tipo de nucleotídeo de purina testado (GTP). Deve ser ressaltado, entretanto, que o resul-

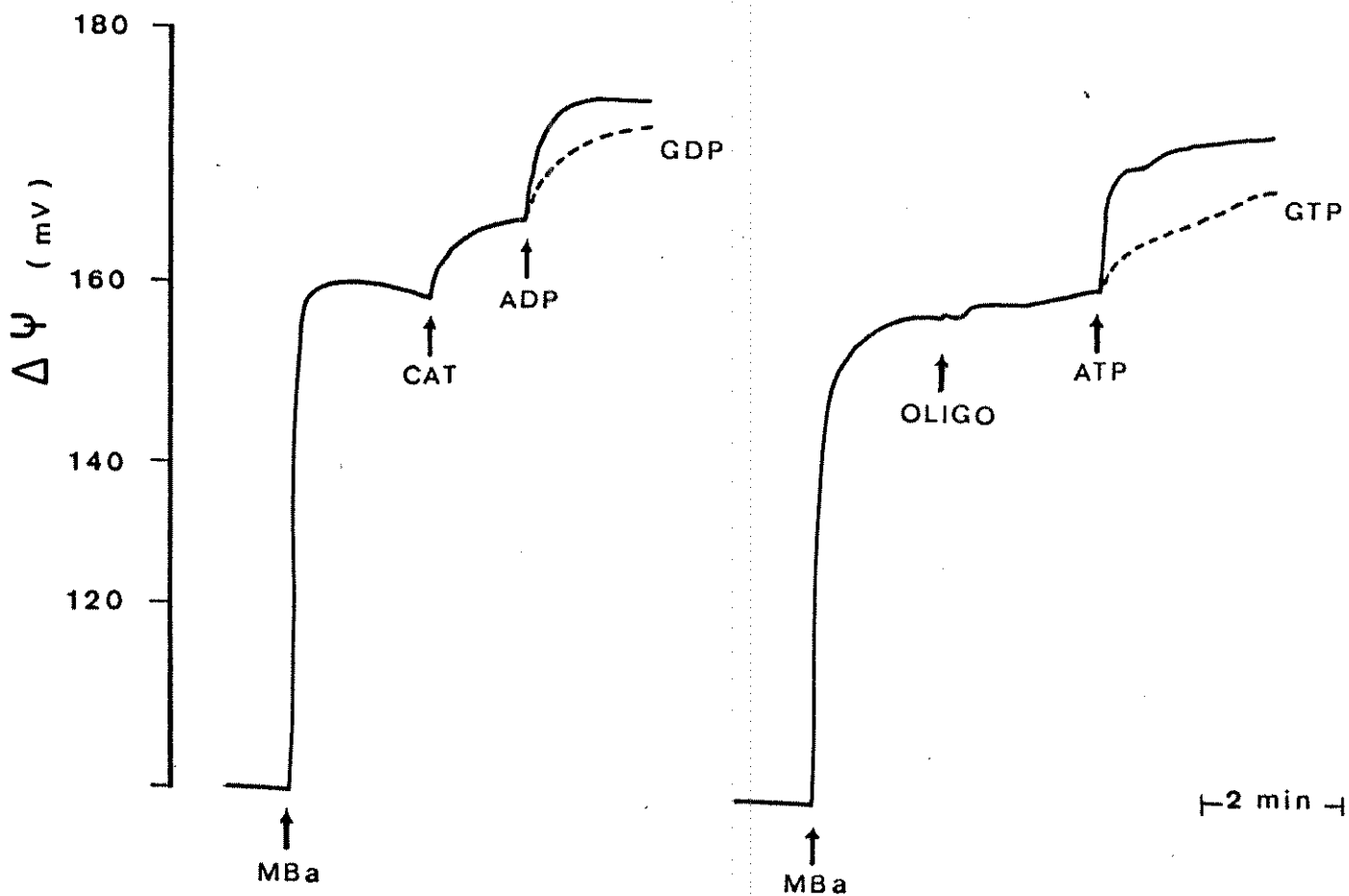


Figura 16. Alterações no potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ), em mitocôndrias de tubérculos de batata, promovidas por nucleotídeos de purina, em presença de carboxiatracetilato (CAT) ou de oligomicina (OLIGO). As condições são as mesmas da Figura 3. Foram adicionados, onde indicado, mitocôndrias de batata (MBa, 1 mg); CAT (20  $\mu\text{M}$ ); oligomicina (2  $\mu\text{g}$ ); ATP, ADP, GTP ou GDP (100 nmoles). Estes experimentos são representativos de uma série de 5.

tado da adição de nucleotídeos de adenina foi sempre mais rápido e conduziu a níveis mais elevados de  $\Delta\psi$  do que os obtidos com o uso dos nucleotídeos de guanina.

#### 4.6. LIGAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DE PURINA A MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO E DE BATATA

Diante dos resultados descritos no item anterior, indicativos da atuação dos nucleotídeos ao nível externo da membrana interna, procurou-se avaliar a ligação de ATP e de GTP a mitocôndrias de batata, em comparação com mitocôndrias de fígado de rato, cujo valor de  $\Delta\psi$  não é afetado por estes nucleotídeos. Neste caso as organelas encontravam-se desenergizadas, e os resultados encontram-se representados na Figura 17. Nota-se que a ligação, tanto de ATP quanto de GTP a mitocôndrias de fígado, manteve-se em níveis sempre inferiores aos observados com as organelas de batata. Além disso, a ligação em fígado mostrou-se independente do pH, ao contrário do observado em batata, onde a ligação foi máxima no pH mais baixo testado (6,0). Neste pH, a ligação de ATP e de GTP a mitocôndrias de batata foi cerca de 3 vezes superior à de fígado. Em ambos os casos houve maior ligação de ATP que de GTP. Deve ser ressaltado que, nos experimentos desenvolvidos com ATP, o meio de reação era acrescido de CAT (no sentido de evitar a ligação à translocase de nucleotídeos de adenina) e de Ap5A (para inibir a atividade da adenilato quinase). Não se esperava ligação alguma dos nucleotídeos, sob estas condições, a mitocôndrias de fígado.

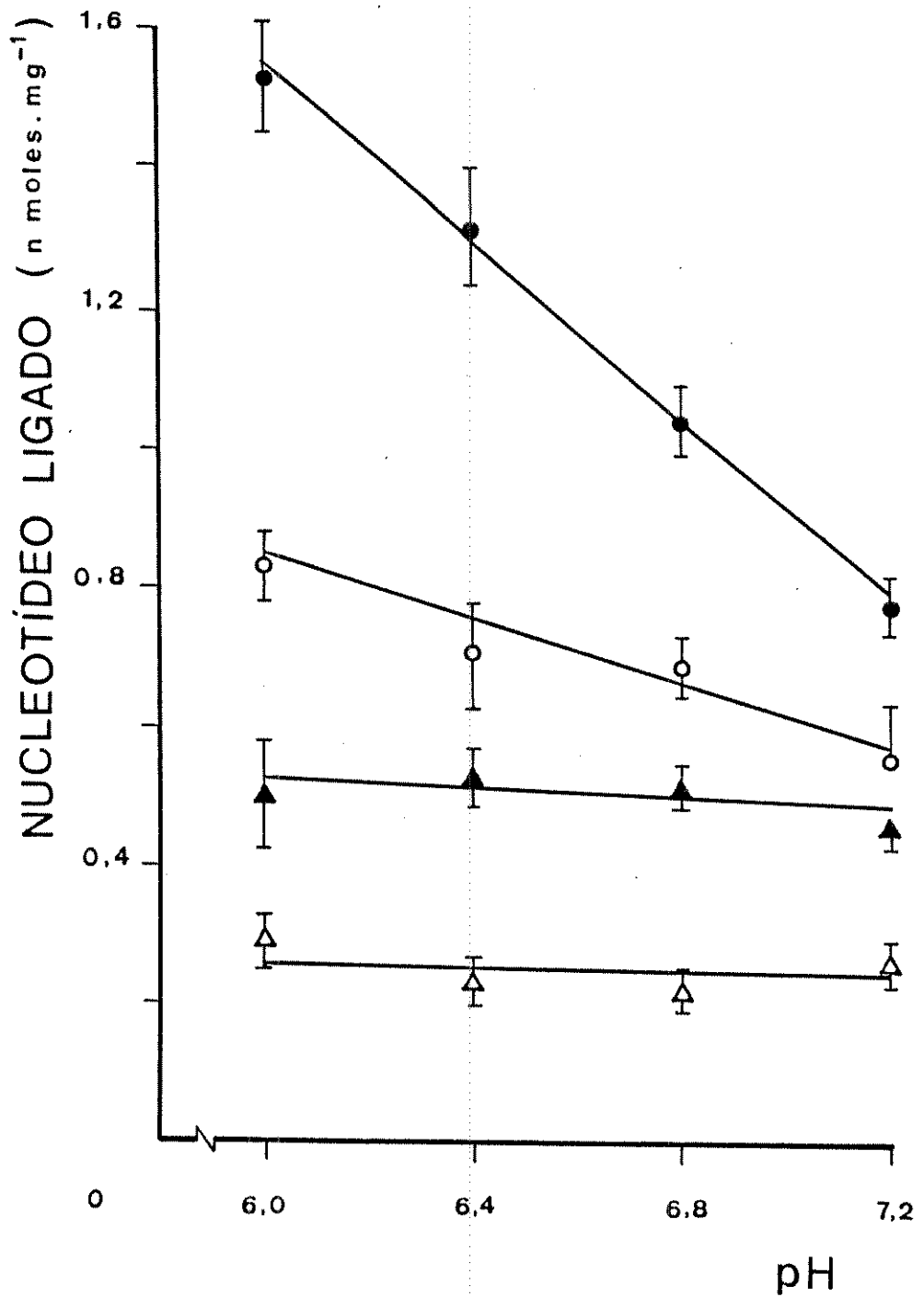


Figura 17. Ligação de nucleotídeos de purina a mitocôndrias isoladas de fígado de rato e de tubérculos de batata, em função do pH. As mitocôndrias foram incubadas em "meio básico de reação", conforme descrito em Materiais e Métodos. Mitocôndrias de batata (○,●); mitocôndrias de fígado (△,▲); incubação com GTP (○,△); incubação com ATP (●,▲). Os dados representam médias  $\pm$  desvios padrões (n=9).

Os valores encontrados podem ser devidos a ligações inespecíficas, ou mesmo à retenção no espaço intermembranas. Os níveis mais elevados e a dependência do pH indicam que, no caso das mitocôndrias de batata, os valores obtidos devem corresponder à ligação efetiva, além das ligações inespecíficas.

#### 4.7. ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE A $K^+$ E/OU $Cl^-$ PROMOVIDAS POR BSA E NUCLEOTÍDEOS DE PURINA EM MITOCÔNDRIAS DE BATATA

Em mitocôndrias de plantas está presente um antiporter  $K^+/H^+$ , extremamente ativo, que lhes confere uma elevada permeabilidade ao  $K^+$  (HENSLEY & HANSON, 1975; JUNG & BRIERLEY, 1979; FLUEGEL & HANSON, 1981). A atividade deste antiporter é responsabilizada pelo reduzido valor de  $\Delta pH$  e elevado  $\Delta \Psi$  apresentado por estas mitocôndrias (DIOLEZ & MOREAU, 1987). Além disso, MURPHY (1989) considera que a atuação deste trocador resulta em vazamento de prótons (leak), acarretando em transdução incompleta do  $\Delta \mu H^+$  em ATP.

Como a atividade deste trocador  $K^+/H^+$  interfere no potencial de membrana, foi procurado um relacionamento entre a atuação de BSA e dos nucleotídeos de purina sobre a permeabilidade a  $K^+$  e  $Cl^-$ . Para isto, foram executados experimentos de inchamento mitocondrial, em meio isosmótico de KCl (150 mM), utilizando-se mitocôndrias isoladas de

tubérculos de batata, na ausência de BSA.

Um experimento típico de inchamento mitocondrial encontra-se representado na Figura 18. Observa-se que em pH 7,8 a simples incorporação de mitocôndrias ao meio já resulta em inchamento espontâneo, indicativo da elevada permeabilidade destas mitocôndrias ao  $K^+$  e ao  $Cl^-$ , neste pH. Esta permeabilidade é reduzida se no meio estiverem presentes GDP ou BSA. Com o BSA observou-se redução mais intensa, sendo que a presença de ambos resultou em efeito cumulativo.

Este fenômeno é extremamente dependente do pH, conforme pode ser visto na Figura 19, onde se evidencia queda no inchamento espontâneo, acompanhando a queda no pH do meio de reação. A presença de BSA e/ou GDP no meio reduziu o inchamento observado, com efeitos mais pronunciados em valores de pH mais elevados. É importante notar que só a presença de BSA foi suficiente para reduzir drasticamente o inchamento espontâneo deste tipo de mitocôndria. Sem a presença de BSA, apenas o abaixamento do pH para 6,0 também resultou em supressão quase completa do inchamento. Isto indica uma participação de ácidos graxos, que poderiam estar ativando algum canal dependente de pH ou o próprio trocador  $K^+/H^+$ .

Pela Figura 20 pode ser observado que também o ATP é capaz de inibir o inchamento espontâneo de mitocôndrias de batata, em meio sem BSA a pH 7,8, com efeito mais acentuado que o do GDP. Nota-se, ainda, que tais efeitos não podem ser atribuídos à ligação dos nucleotídeos de purina ao trocador ADP/ATP, uma vez que a presença de CAT não interfere nos seus efeitos, nem altera o inchamento inicialmente observado.

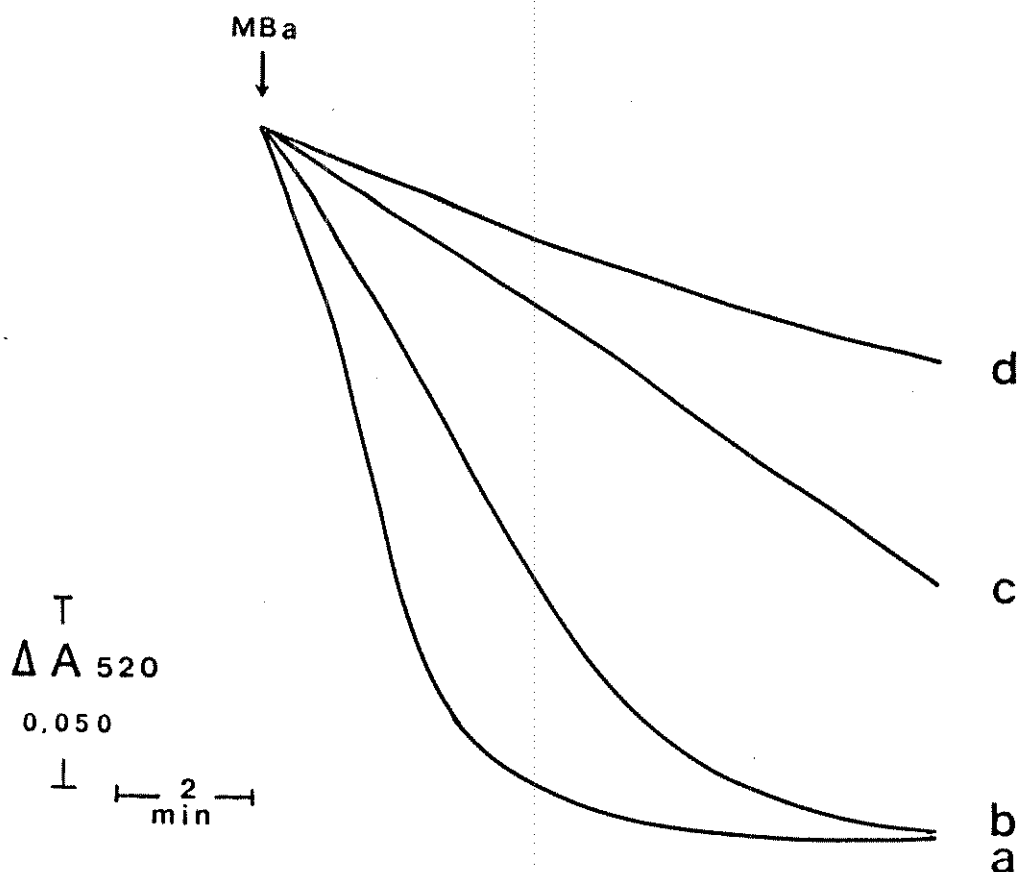


Figura 18. Efeito de BSA e de GDP sobre o inchamento de mitocôndrias de tubérculos de batata. 0,5 mg de proteína mitocondrial foi adicionada (onde indicado por MBa) a 1,0 ml de meio contendo KCl (150 mM), HEPES (2 mM), pH 7,8 e oligomicina (2  $\mu$ g/ml). Controle (a); meio acrescido de 1 mM de GDP (b); BSA 0,5 mg/ml (c); BSA + GDP (d). Estes experimentos são representativos de uma série de 5.

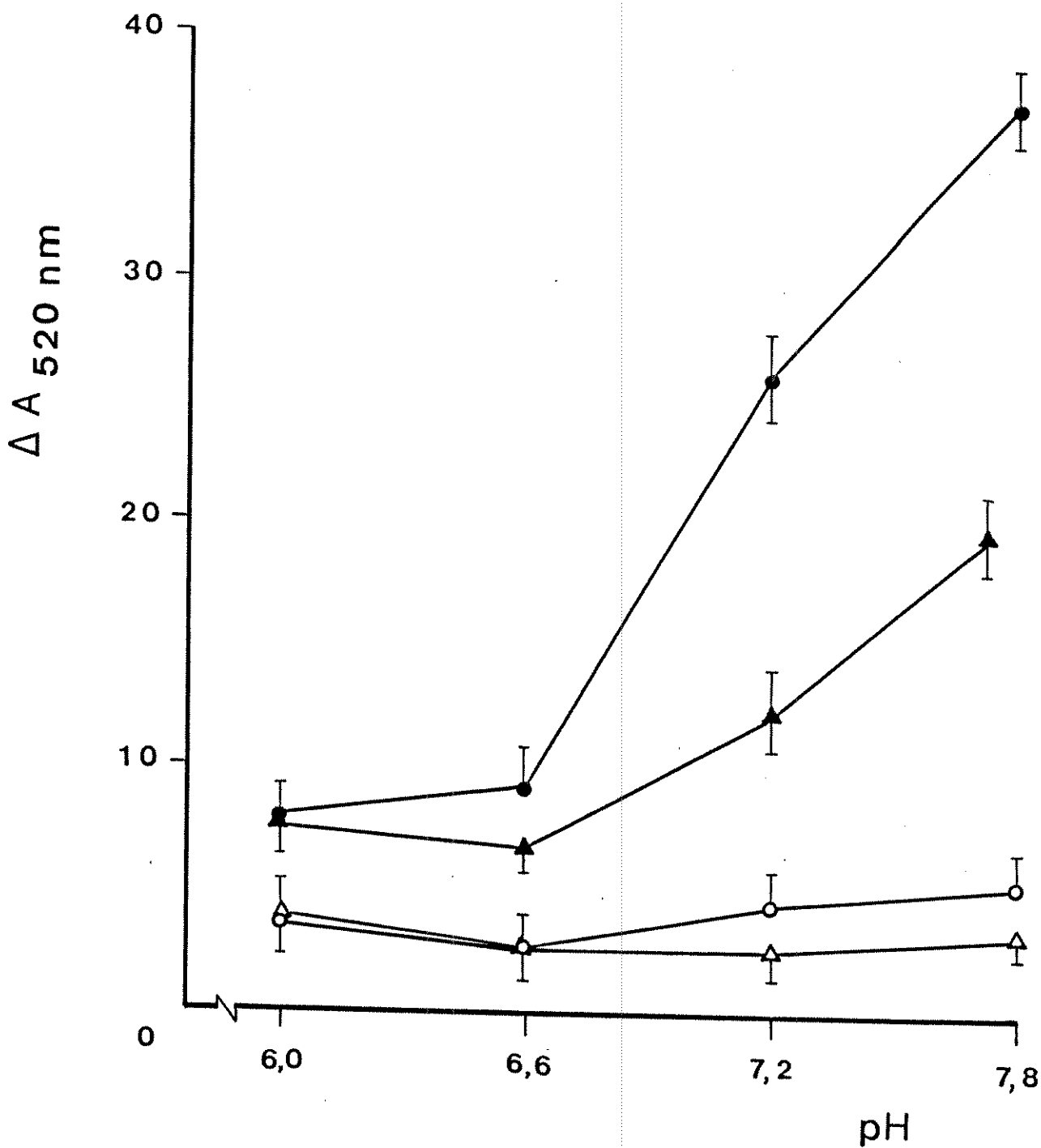


Figura 19. Efeito de BSA e de GDP sobre o inchamento de mitocôndrias de tubérculos de batata, em função do pH. As condições foram as mesmas da Figura 18, considerando-se intervalos de 4 minutos. Controle (●); GDP (▲); BSA (○); GDP + BSA (△). Os dados são médias  $\pm$  desvios padrões (n=3).



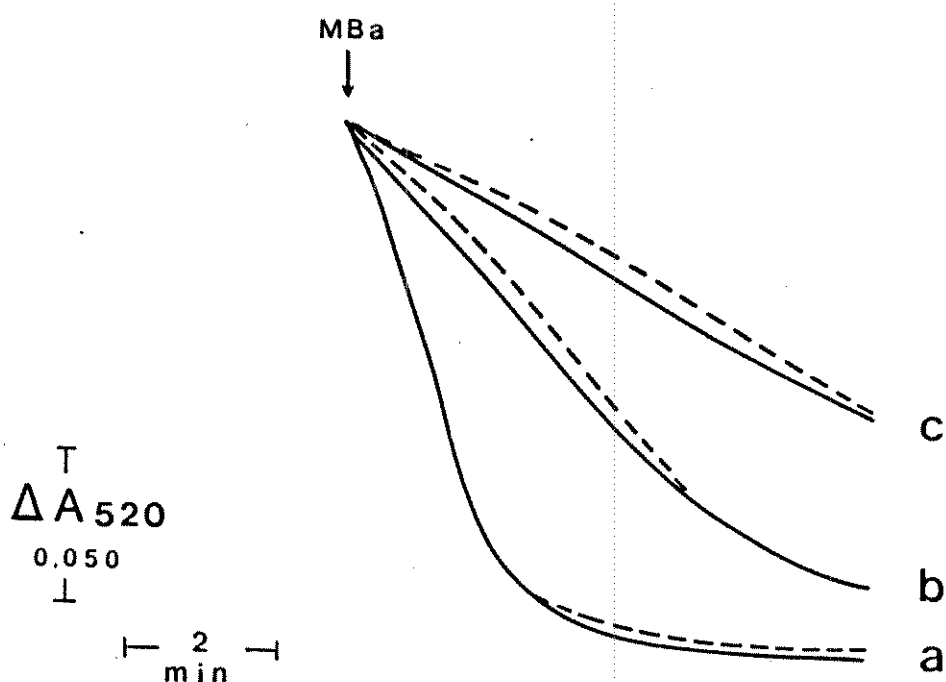


Figura 20. Alterações no inchamento de mitocôndrias de tubérculos de batata, promovidas por ATP ou GDP, em presença de carboxiatractilato. As condições foram as mesmas da Figura 18. As linhas tracejadas representam condições onde o CAT estava presente, na concentração de  $30 \mu\text{M}$ , e as linhas contínuas na sua ausência. Controle (a); meio acrescido de GDP  $1 \text{ mM}$  (b); meio com ATP  $1 \text{ mM}$  (c). Estes experimentos são representativos de uma série de 5.

O experimento da parte A da Figura 21 permite observar o reduzido inchamento mitocondrial que ocorre em pH 7,2. Nesta situação foi necessária a adição de valinomicina para a ocorrência de um inchamento mais pronunciado. Como a valinomicina atua como ionóforo de  $K^+$  (PRESSMAN, 1976) pode-se inferir que o abaixamento do pH reduz a atividade do antiporter  $K^+/H^+$ , sem interferir no transporte de  $Cl^-$ . Como, mesmo em presença do ionóforo de  $K^+$ , houve redução do inchamento pela adição prévia de GDP ou ATP ao meio, é provável que os mesmos estejam atuando ao nível do transporte de  $Cl^-$ , reduzindo a atividade de algum canal da membrana interna mitocondrial.

Resultados análogos são obtidos a pH 7,8, desde que BSA esteja presente no meio, conforme representado na parte B da Figura 21. A análise é semelhante, sugerindo que o trocador  $K^+/H^+$  seja ativado por ácidos graxos (uma vez que sua atividade é inibida por BSA). Também neste caso, os nucleotídeos adicionados devem atuar sobre o transporte de  $Cl^-$ , ao nível de algum possível canal.

#### 4.8. ISOLAMENTO DE UMA PROTEÍNA DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA COM POSSÍVEL FUNÇÃO DESACOPLADORA

Algumas das características de mitocôndrias de plantas, evidenciadas pelos resultados apresentados nos itens anteriores, fazem lembrar as características especiais de mitocôndrias de tecido adiposo marrom (JEZEK et alii,

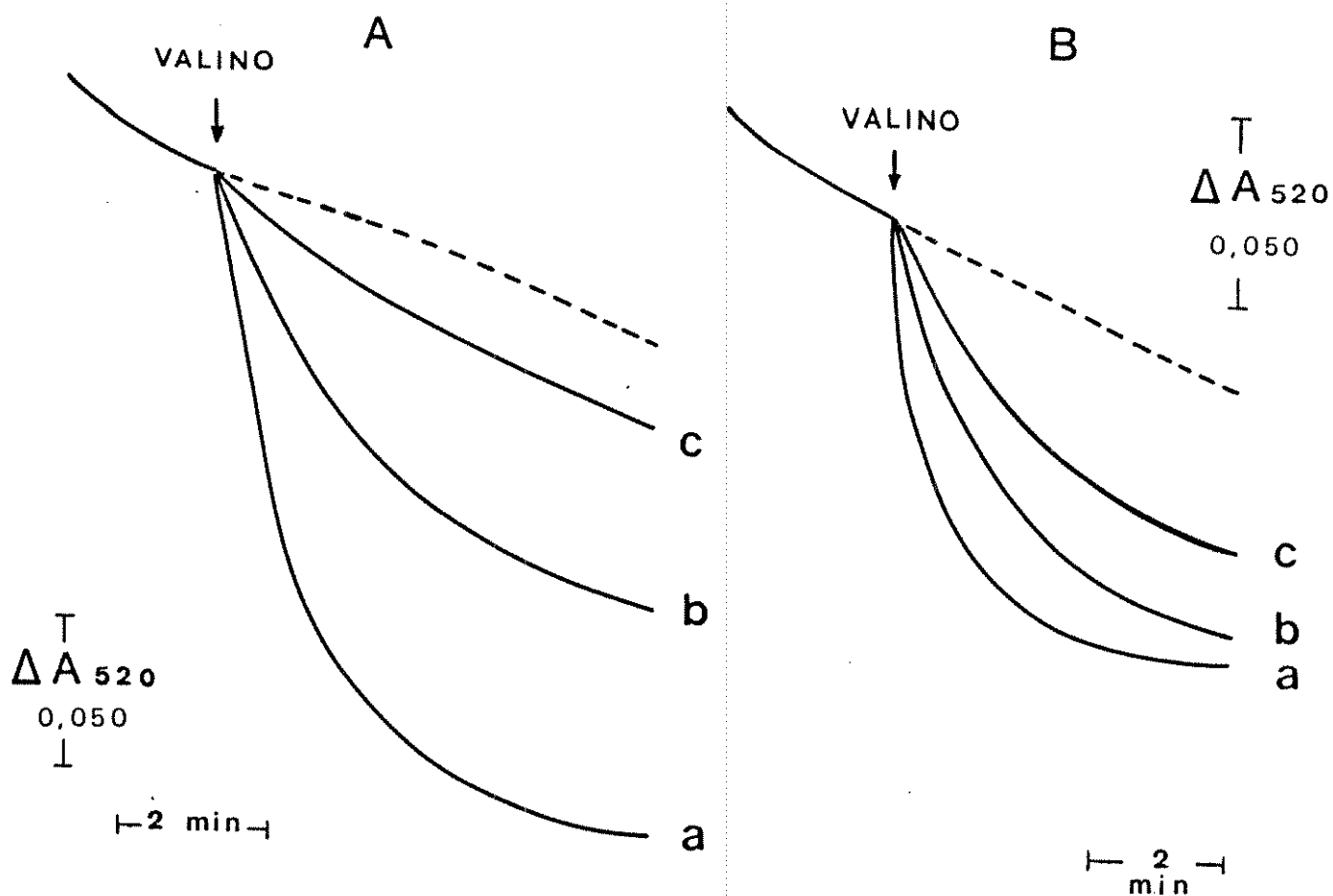


Figura 21. Inchamento de mitocôndrias de tubérculos de batata, promovido por valinomicina. As condições foram as mesmas da Figura 18, sendo que em A o pH do meio foi reduzido para 7,2 e em B foi mantido em 7,8, mas acrescido de BSA (0,5 mg/ml). As linhas tracejadas representam controles desenvolvidos sem adição de valinomicina. Controle (a); 1 mM de GDP (b) e 1 mM de ATP (c). As setas indicam a adição de valinomicina (0,06  $\mu$ M). Estes experimentos são representativos de uma série de 5.

1988). Em uma revisão, NICHOLLS (1979) relata que as primeiras preparações de mitocôndrias de tecido adiposo marrom não demonstravam controle respiratório e falhavam em executar qualquer função relacionada com conservação de energia. As falhas foram relacionadas à presença de concentrações desacopladoras de ácidos graxos, suplantadas pelo uso de altas concentrações de BSA. Resultados análogos encontram-se representados na Figura 15, considerando-se mitocôndrias de batata. Nicholls cita, ainda, que adições seqüenciais de ADP geralmente conduziam a uma melhoria progressiva do controle respiratório, com o aumento da concentração total do nucleotídeo no meio. É o que também ocorre com mitocôndrias de plantas, conforme encontra-se registrado nas Figuras 3 e 4. Este mesmo autor cita que um grupo de nucleotídeos (GTP, GDP, ATP E ADP) é efetivo na promoção da melhoria citada. No caso de mitocôndrias de batata foram observados resultados semelhantes (Figuras 14 a 16).

Outras semelhanças podem ser destacadas. Dentre elas a capacidade de mitocôndrias de batata ligarem GTP e de manterem ligação elevada de ATP, em presença de CAT (Figura 17), semelhantemente ao registrado por NICHOLLS (1976). Outro aspecto refere-se à inibição do inchamento mitocondrial por BSA e nucleotídeos de purina, aqui ilustrado pelas Figuras 18 e 19, de modo extremamente semelhante ao registro de NICHOLLS (1974).

Estas semelhanças sugerem a possibilidade de existência, nas mitocôndrias de batata, de uma proteína que permeabilize a membrana mitocondrial interna a prótons e

Cl<sup>-</sup>, à semelhança do que faz a proteína desacopladora de mitocôndrias de tecido adiposo marrom (NICHOLLS, 1974b, 1979; NICHOLLS & RIAL, 1984; GARLID, 1990).

Procurou-se, então, isolar uma proteína com possível atividade desacopladora a partir de mitocôndrias de tubérculos de batata. Contando com a colaboração dos Professores Antônio C. Bianco (USP- SP) e Wamberto A. Varanda (USP- Ribeirão Preto) foi feito um primeiro isolamento utilizando-se paralelamente mitocôndrias de tubérculos de batata e de tecido adiposo marrom de rato. O método utilizado é específico para a proteína citada (por razões que serão discutidas posteriormente) e resulta, no caso do tecido adiposo marrom, na obtenção uma única banda protéica de peso molecular de 32 kDa.

A eletroforese mostrada na Figura 22 é resultante de um dos isolamentos feitos com mitocôndrias de tubérculos de batata. Após um tratamento inicial com Lubrol, e solubilização das proteínas de membrana com Triton X-100, o extrato foi passado através de uma coluna de hidroxiapatita, à temperatura ambiente. Amostras das frações que apresentavam proteína foram aplicadas ao gel de SDS-poliacrilamida (12%), e correspondem às colunas de 3 a 6 na Figura 22. Vê-se que as frações encontram-se altamente purificadas, apresentando uma banda protéica mais evidente, com peso molecular em torno de 35 kDa. Muitos foram os isolamentos com resultados semelhantes. Em alguns, onde a resolução da eletroforese parece ter sido maior, foram observadas duas manchas fortes (de igual intensidade e muito próximas) nas faixas de 35 e 34 kDa, além de uma mancha muito fraca na

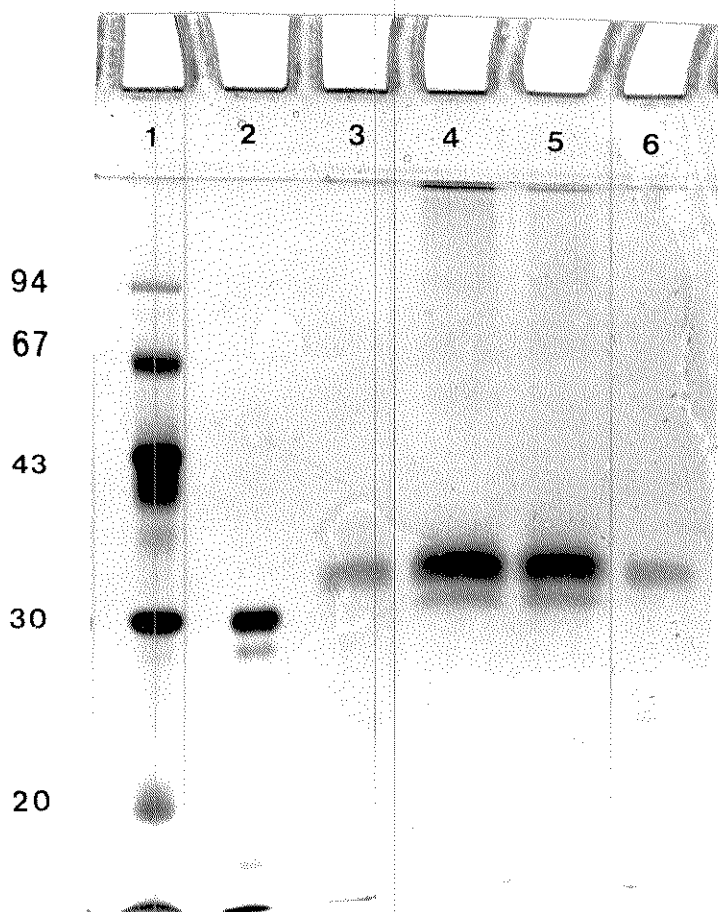


Figura 22. Eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamida de frações contendo uma proteína com possível função desacopladora, purificada de mitocôndrias de tubérculos de batata. Coluna 1: padrões de peso molecular; 2: anidrase carbônica; 3: Fração A; 4: Fração B; 5: Fração C; 6: Fração D. As frações A a D foram recolhidas, em seqüência, após a passagem do extrato em coluna de hidroxiapatita, conforme descrito no item 3.11. Os valores à esquerda correspondem aos pesos moleculares (em kDa) dos padrões utilizados.

região de 30 kDa, conforme pode ser observado na Figura 23.

É difícil comparar estes resultados com outros de vegetais, uma vez que são raríssimos os registros de isolamento de proteínas integrais de mitocôndrias de plantas. Uma das exceções se refere ao isolamento da translocase de nucleotídeos de adenina, a partir de mitocôndrias de milho, registrado por HAWKESFORD & LEAVER (1987), que é mostrada como tendo peso molecular em torno de 30 kDa, como também ocorre com este translocador em mitocôndrias de animais (KLINGENBERG et alii, 1978). Portanto, é provável que a mancha na faixa de 30 kDa, observada na Figura 23, seja correspondente a esta translocase.

É interessante ressaltar que o método utilizado para o isolamento da proteína desacopladora é uma adaptação daquele utilizado para o isolamento do trocador ADP/ATP (LIN & KLINGENBERG, 1982; KLINGENBERG & LIN, 1986). A única diferença refere-se à passagem pela coluna de hidroxipatita, que para a UCP é feita à temperatura ambiente, ao invés de 4 °C.

#### 4.9. INCORPORAÇÃO DAS PROTEÍNAS ISOLADAS EM BICAMADAS LIPÍDICAS

Os resultados descritos a seguir foram obtidos a partir da incorporação da proteína isolada a bicamadas lipídicas planas. Este tipo de experimento baseia-se na possibilidade de observação eletrofisiológica de vias condu-

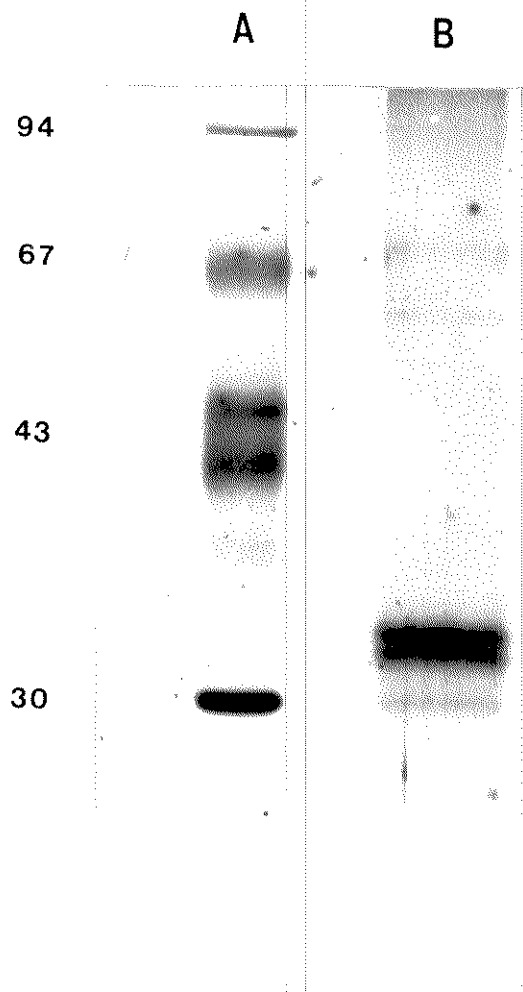


Figura 23. Eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamida da proteína com possível função desacopladora de mitocôndrias de tubérculos de batata. Os padrões de peso molecular foram corridos na coluna A (com pesos anotados à esquerda) e o extrato resultante do isolamento aplicado na coluna B.



tivas induzidas por proteínas (canais). Para tanto, mede-se, num primeiro passo, a condutância da bicamada pura e, então, na presença de um agente supostamente formador de canal. A incorporação do canal é evidenciada por saltos discretos na condutância do sistema, indicando a transição entre os estados conformacionais abertos e fechados, possíveis de serem adotados pela proteína. A Figura 24 mostra um experimento típico. Em A a condutância da membrana foi medida na ausência da proteína. Nota-se que a aplicação de uma diferença de potencial de +50 mV (seta) resulta apenas num transiente capacitivo, com a corrente estacionária muito próxima de zero, apesar da manutenção da voltagem. A resistência desta membrana é maior que  $10^{12}$  ohms. Em B tem-se a mesma membrana em presença da proteína, adicionada ao lado cis. A aplicação de + 20 mV resulta no aparecimento de uma corrente que flutua entre níveis discretos, indicando a incorporação de vias condutivas na membrana (canais). O painel C mostra o mesmo canal, porém em escalas de tempo e corrente ampliadas. Chama a atenção o fato do canal permanecer a maior parte do tempo no estado aberto (probabilidade de encontrá-lo aberto é maior que 90%), com fechamentos episódicos de duração média ao redor de 500 ms.

Os traçados da Figura 25 mostram o comportamento do canal em função da voltagem aplicada através da membrana. Nota-se que a cinética de abertura e fechamento é praticamente independente da voltagem; ou seja, para qualquer voltagem o canal permanece aberto pelo menos 90% do tempo de observação. Outro dado que chama a atenção é o fato de não observarmos saltos de condutância com tamanho único.

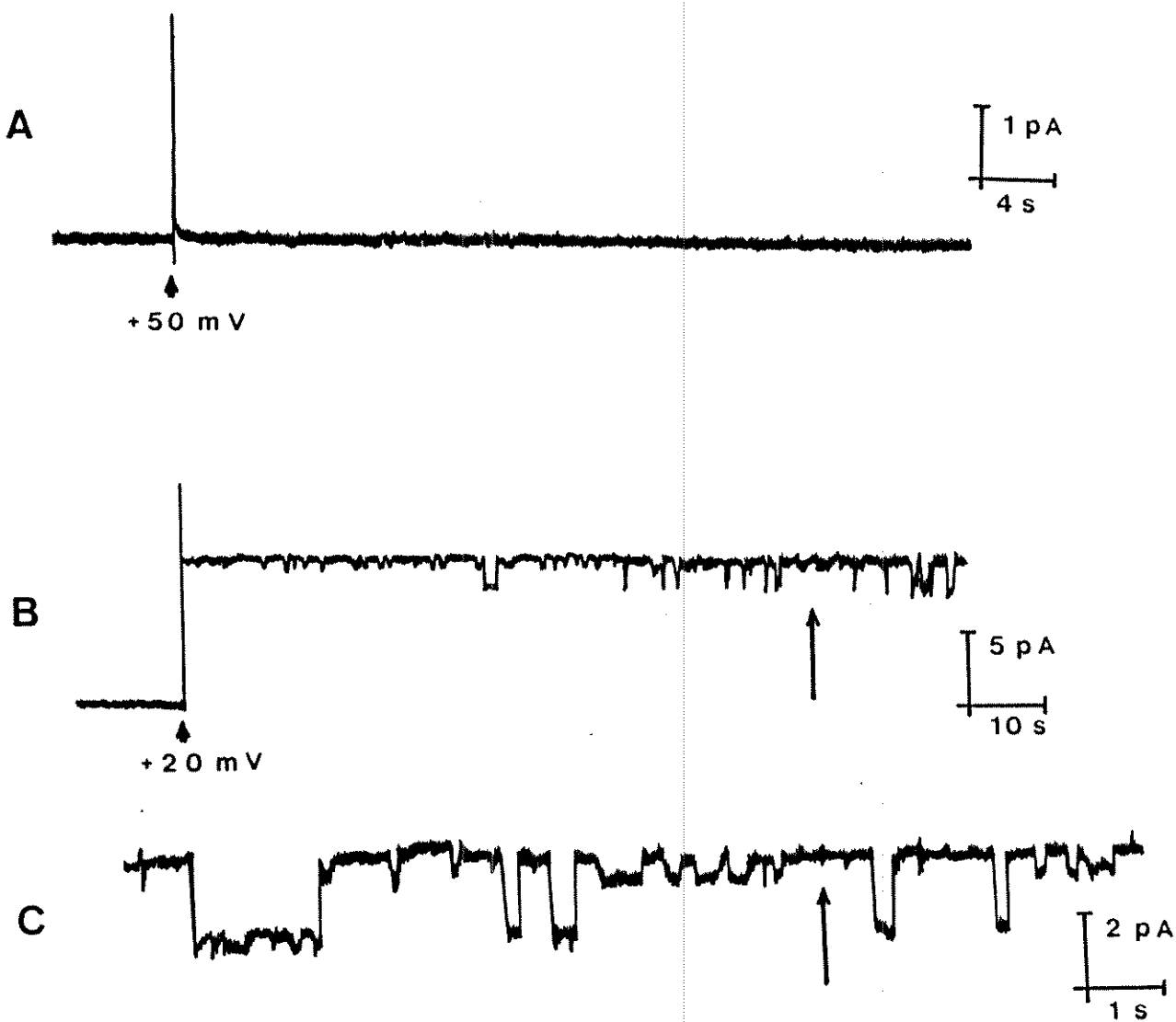
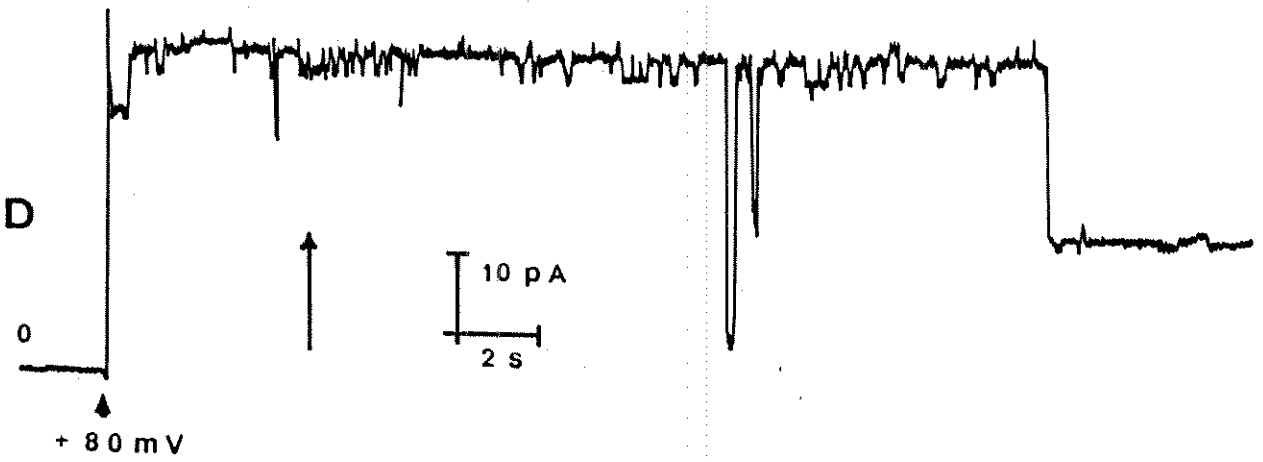
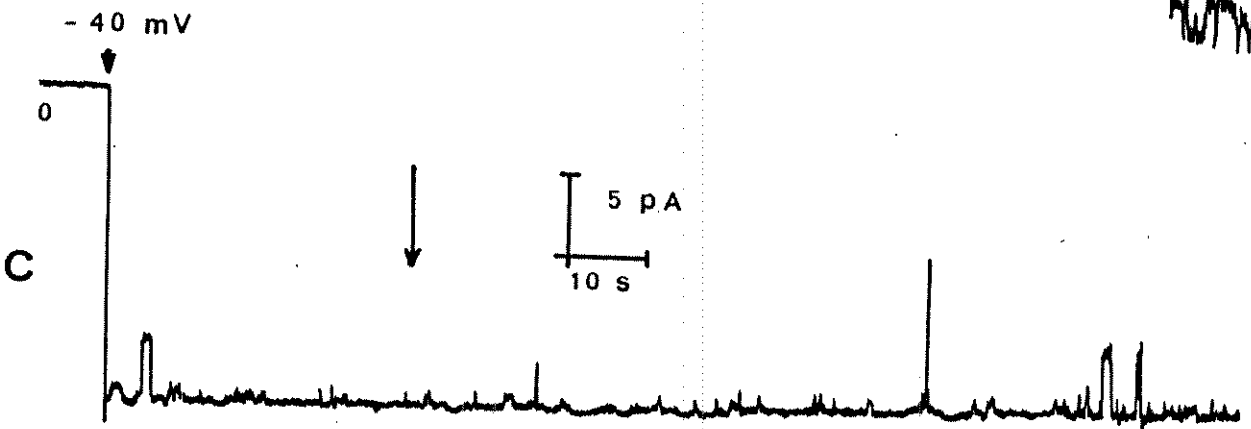
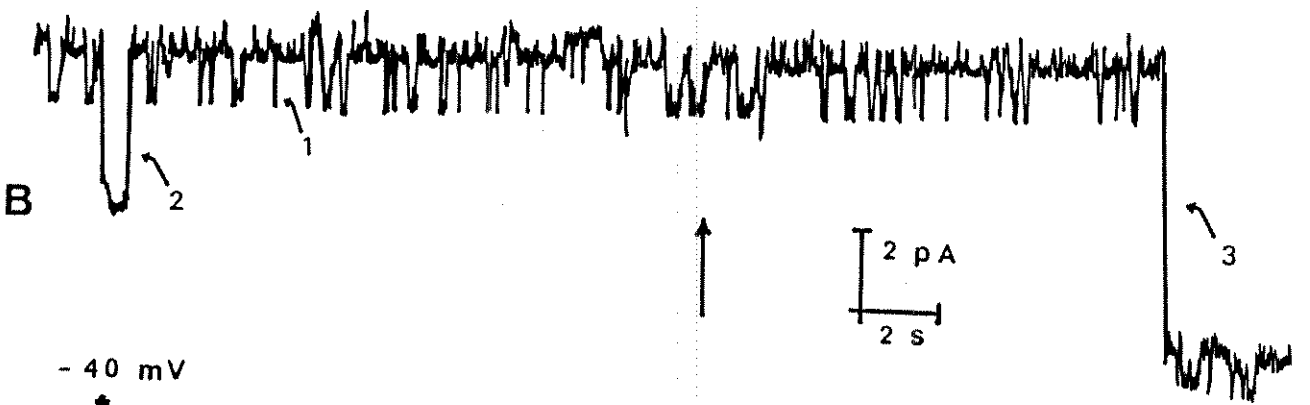
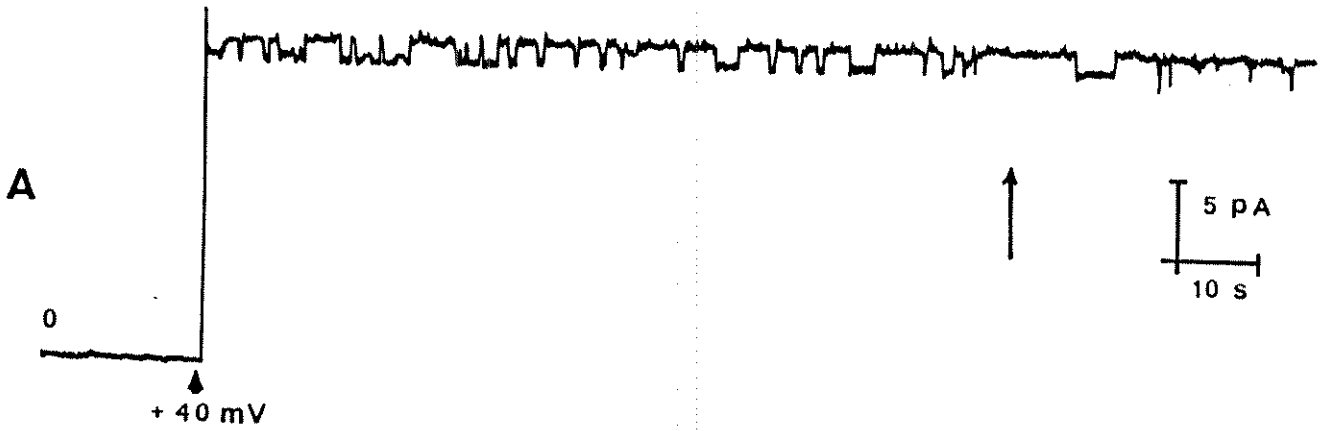


Figura 24. Fluxos de corrente iônica através da proteína com possível função desacopladora, isolada de mitocôndrias de tubérculos de batata, incorporada em bicamada lipídica, em condições controle. Em A a voltagem foi fixada em + 50 mV, a partir do momento indicado pela seta. Nos demais a voltagem foi fixada em +20 mV, sendo que em B o registro foi feito com ganho baixo e em C com ganho aumentado. As setas indicam o sentido de abertura do canal.

Figura 25. Fluxos de corrente iônica através da proteína com possível função desacopladora, isolada de mitocôndrias de tubérculos de batata, incorporada em bicamada lipídica, submetida a diferentes voltagens. A: membrana submetida a +40 mV, a partir do momento indicado pela seta; B: idem A, com ganho ampliado; C: -40 mV; D: +80 mV. As setas indicam o sentido de abertura do canal.



Assim, na parte B (Figura 25) pode-se distinguir claramente pelo menos 3 níveis discretos de condutância, indicados pelos números 1, 2 e 3. O traçado D, além de confirmar todas as informações descritas, mostra que quando um dos estados grandes desaparece (fecha) o menor não se manifesta (parte final do traçado). Isto indica que o canal incorporado é único, com estados diferentes de abertura, não se tratando de três canais diferentes.

As condutâncias observadas indicam que pelo menos  $10^7$  íons devem permear o canal por segundo, o que indica que a proteína obtida não se trata de uma translocase (BENTRUP, 1989; HEDRICH & SCHROEDER, 1989). No caso de um carregador não se espera mais que  $10^3$  íons por segundo, e isto não seria detectável pelo sistema, já que a corrente resultante seria muito pequena.

A análise de diversos traçados de corrente contra tempo permitiu a montagem da Figura 26, onde se relacionam as voltagens aplicadas e as correntes correspondentes a cada transição encontrada. As transições de 35 pS foram as mais freqüentes, seguidas pelas de 110 pS. As de 300 pS são raras e permanecem quase 100% do tempo no estado aberto. A linearidade observada em todos os casos sugere que o canal possui um comportamento ôhmico, não variando sua condutância com a voltagem.

Na Figura 27 observa-se a relação  $I \times V$ , para o canal em estudo, submetido a um gradiente de concentração de KCl de 3:1. No lado cis da câmara havia KCl 0,3 M e do outro lado KCl 0,1 M. Nota-se que a reta que descreve os pontos experimentais não passa pelo zero, ou seja, nesta condição

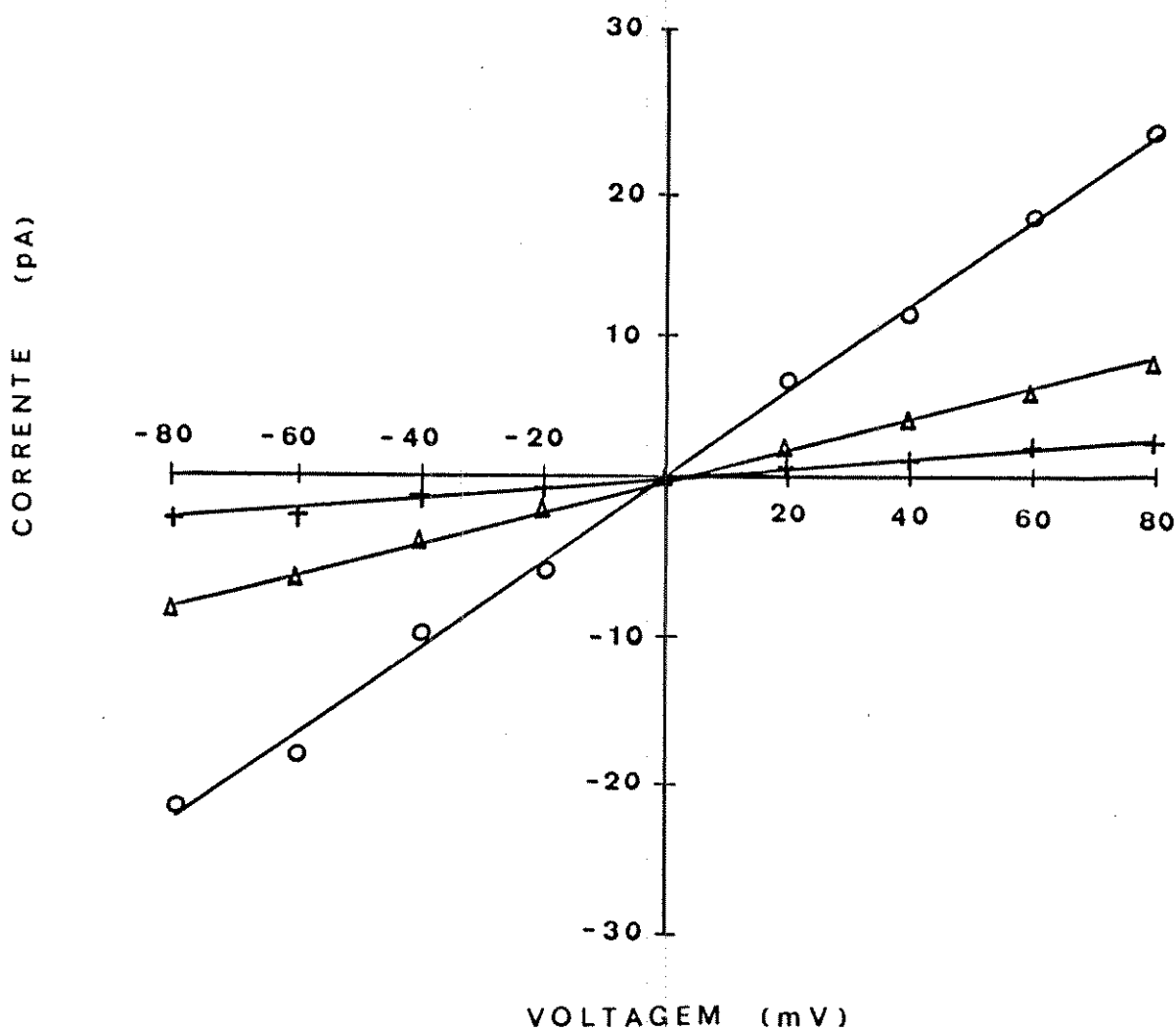


Figura 26. Relação entre corrente e voltagem através da membrana para o canal da proteína com possível função desacopladora, isolada de mitocôndrias de tubérculos de batata, incorporada em bicamada lipídica. Canais com condutância ao redor de: 35 pS (+); 110 pS ( $\Delta$ ); 300 pS (O). Cada ponto representa a média de pelo menos 50 leituras, nos traçados de corrente contra tempo. O erro padrão não foi mostrado, por ser desprezível.

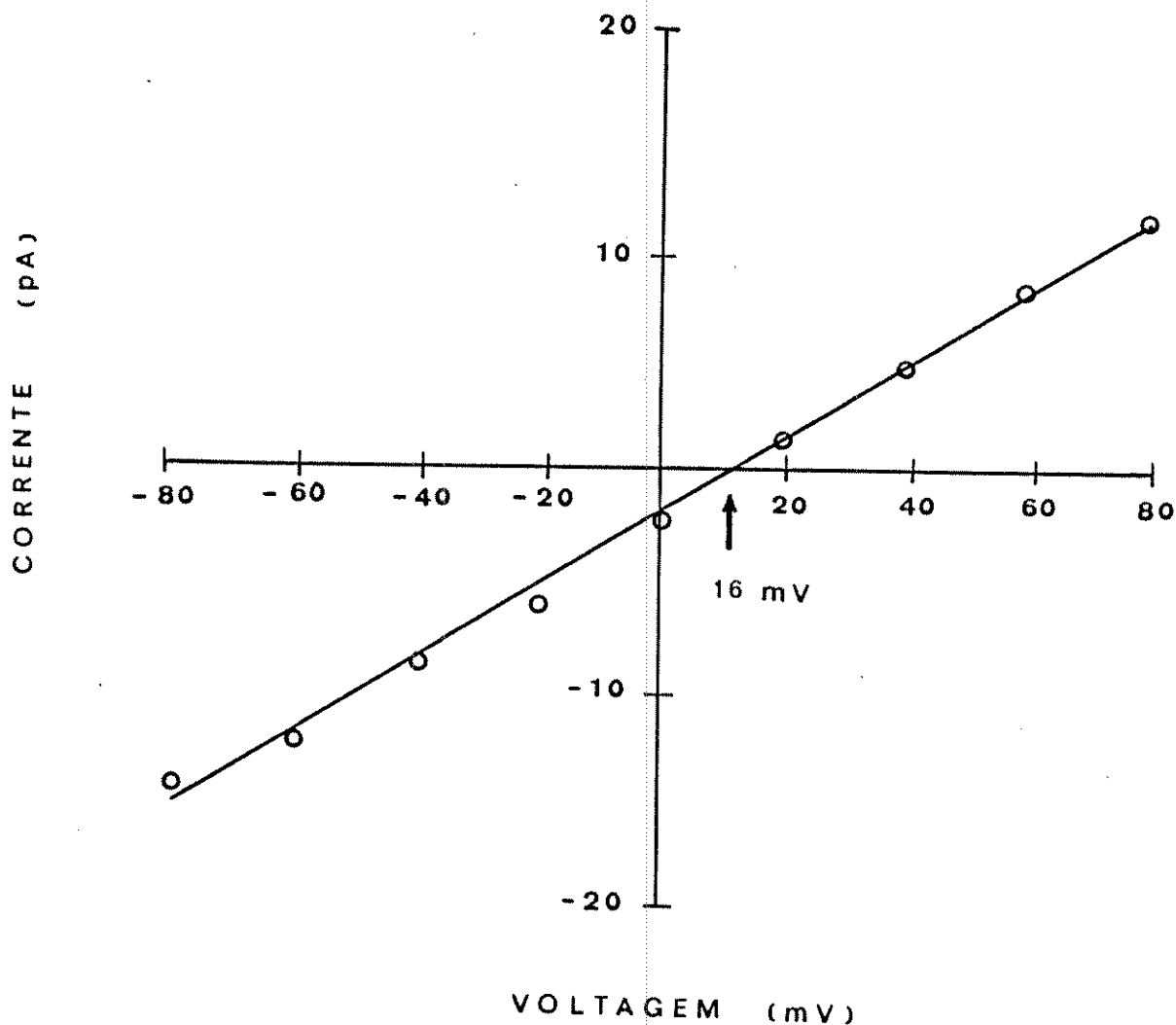


Figura 27. Relação entre corrente e voltagem para o canal da proteína com possível função desacopladora, isolada de mitocôndrias de tubérculos de batata, incorporada em bicamada lipídica, na presença de um gradiente de concentração de KCl de 3:1. No lado cis havia KCl 0,3 M. O canal em evidência é o de 110 pS. Cada ponto representa a média de pelo menos 50 leituras, nos traçados de corrente conta tempo, nas voltagens indicadas. A seta indica o potencial de reversão.

existe corrente através da membrana, mesmo sem a aplicação de qualquer potencial externo. Na verdade, a corrente só é zero quando a diferença de potencial aplicada é igual a +16 mV. Este é o potencial de reversão, que, pelo valor positivo obtido, indica seletividade a ânions maior que a cátions, ou seja, os ânions migram preferencialmente do lado cis ao trans. A magnitude do mesmo indica que o cloreto é cerca de 10 x mais permeável que o potássio, por este canal. Esta razão de permeabilidade pode ser calculada aplicando-se a equação de Goldman, Hodgkin & Katz ao sistema. Embora tenha sido representada apenas a transição de 110 pS, a mesma seletividade é observada com as outras (35 e 300 pS).

Procurou-se investigar o efeito do ATP sobre o canal incorporado à bicamada. É o que se observa na Figura 28, que apresenta traçados de corrente contra tempo, com voltagem fixada em +20 mV, tendo sido adicionado ATP (0,5 mM) ao lado cis. Nota-se, no traçado A, que a corrente total que passa pela membrana em presença de ATP, é cerca da metade da que passava na situação controle (traçado B da Figura 24). Com as escalas expandidas (traçado C) observa-se que as subunidades maiores desaparecem do traçado. Além disso, as subunidades de condutância menores invertem seu comportamento cinético em relação ao controle, ou seja, ficam agora grande parte do tempo fechadas e os saltos de corrente são mais freqüentes no sentido de abertura. Estes dados evidenciam que o ATP tem efeito sobre o canal aqui reconstituído semelhante ao observado em mitocôndrias intactas (maior acoplamento). Isto vem reforçar a idéia de que a proteína isolada possa funcionar como desacopladora.



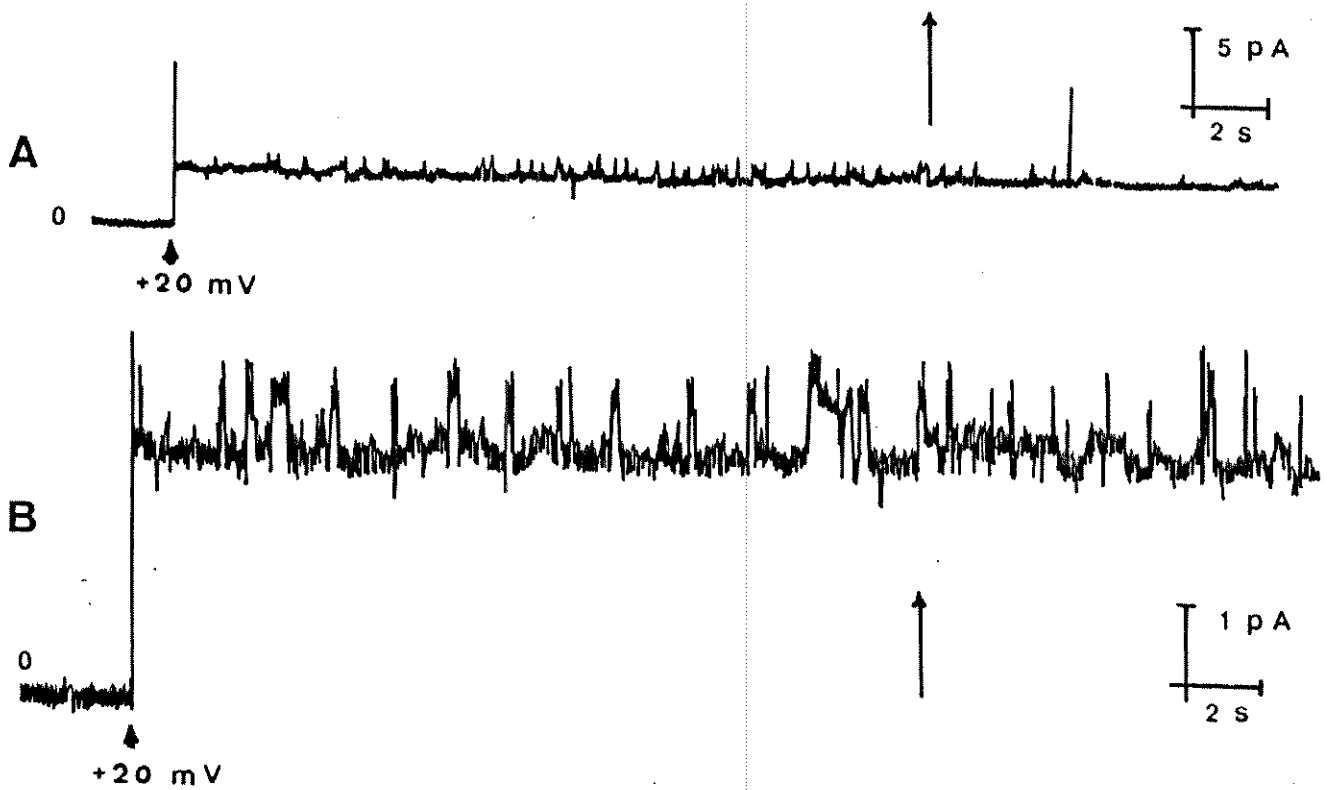


Figura 28. Efeito do ATP sobre a corrente iônica através da proteína com possível função desacopladora, isolada de mitocôndrias de tubérculos de batata, incorporada em bicamada lipídica. As condições são idênticas às da Figura 23, exceto que ATP foi adicionado ao lado cis, na concentração de 0,5 mM. Em A o ganho está reduzido em relação a B. A seta indica o sentido de abertura do canal.

Na Figura 29 observa-se o comportamento do mesmo canal submetido a -20, -40 e - 80 mV. Em todos os traçados observa-se que a magnitude da corrente total que passa pelo canal é muito menor que as observadas na ausência de ATP (Figura 25). Em A observa-se o fechamento progressivo do canal, restando, após alguns segundos, apenas o subestado menor. Este subestado menor encontra-se registrado no traçado B (com escalas ampliadas), onde se ressalta a tendência no sentido de tentativas de abertura, mas permanecendo fechado a maior parte do tempo, isto é, inverte-se o padrão cinético. No traçado D nota-se a abertura curta do estado grande e seu fechamento definitivo em poucos segundos. Após este fechamento, só a subunidade menor se manifesta.

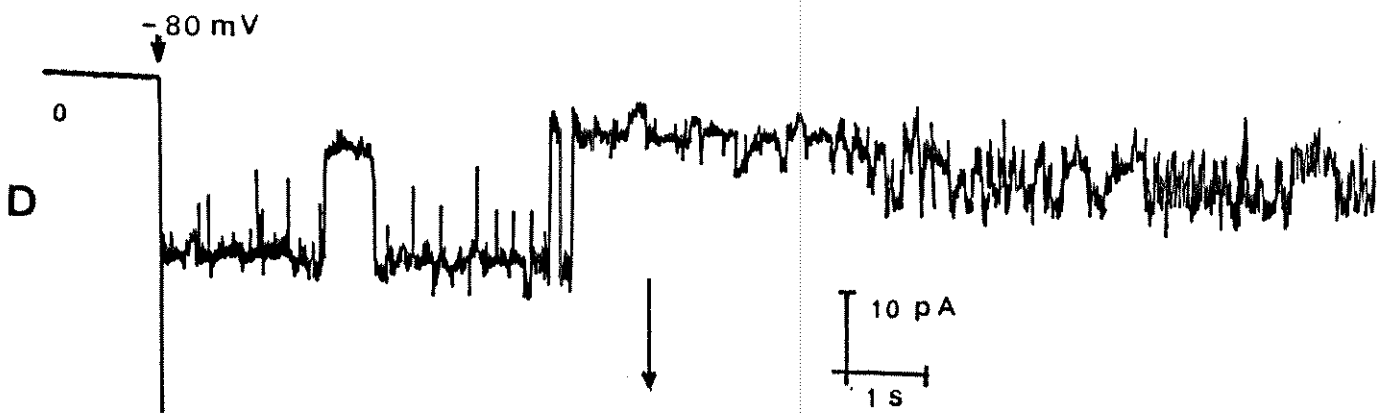
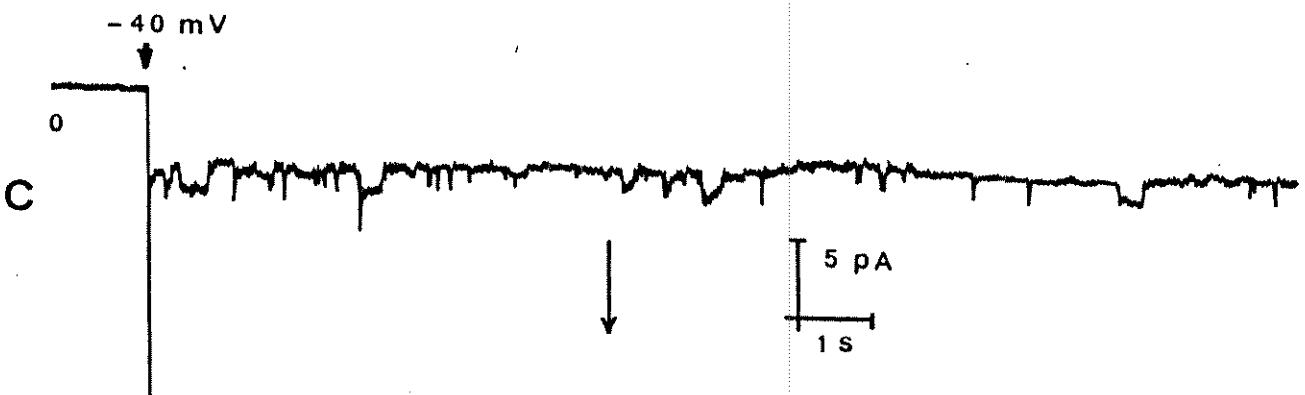
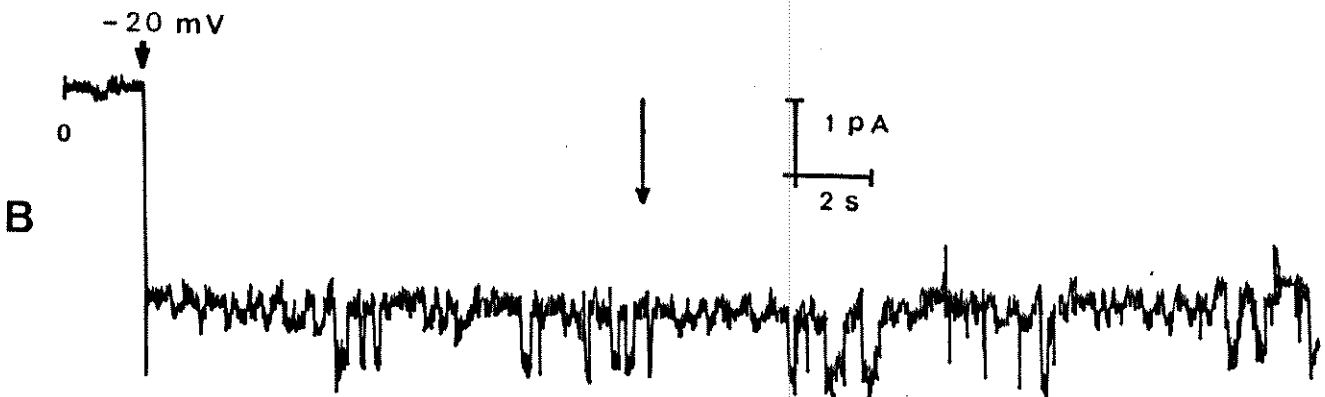
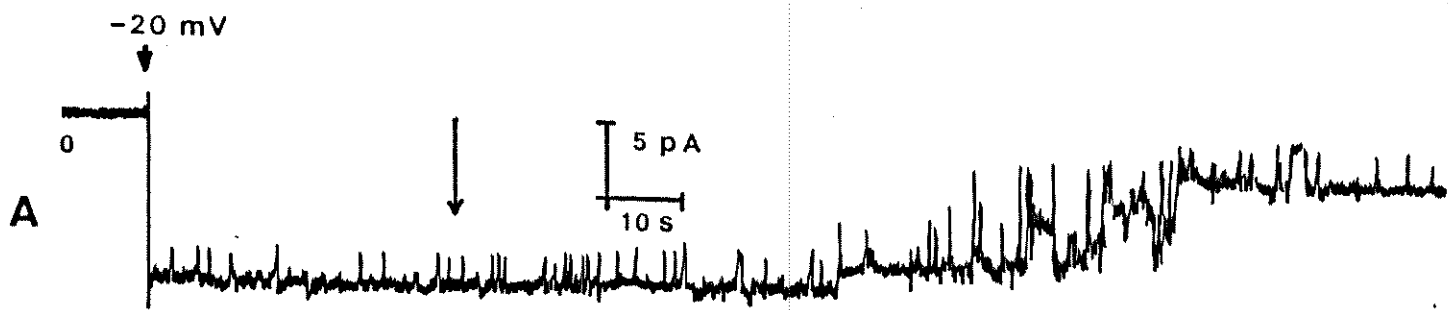
Esta série de experimentos também foi desenvolvida utilizando vesículas lipídicas, contendo as mesmas proteínas isoladas, e a incorporação destas vesículas à bicamada. Os resultados foram semelhantes aos já descritos, e por isso não estão mostrados.

Também foi testada a adição de CAT ao meio de incubação, sem que fossem observadas alterações no comportamento dos canais incorporados.

É ainda importante ressaltar que foram tentados isolamentos protéicos semelhantes, partindo-se de mitocôndrias de fígado de rato, e que as frações obtidas foram testadas em bicamadas, não se obtendo nenhum resultado que se assemelhasse aos obtidos com as proteínas isoladas de batata.

É pouco provável que o Triton presente esteja

Figura 29. Comportamento do canal da proteína com possível função desacopladora, isolada de de mitocôndrias de tubérculos de batata, submetido a diferentes voltagens, em presença de ATP. Em A o canal foi submetido a -20 mV, assim como em B, onde o ganho está ampliado. Em C, -40 mV, e em D, -80 mV. As setas indicam o sentido de abertura do canal.



determinando os fenômenos observados, uma vez que a sua concentração final no meio de incubação ficou em torno de 0,005 % e que a perfusão da câmara (com solução livre de proteína e Triton) não remove os canais já incorporados à bicamada. Além disso, foram feitos experimentos controles, com a adição de apenas Triton à câmara, na mesma faixa de concentração utilizada anteriormente, sendo que a bicamada não mostrou alterações significativas de condutância.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. ASPECTOS RELACIONADOS AO TRANSPORTE DE $Ca^{2+}$

Os sistemas transportadores de  $Ca^{2+}$  presentes em mitocôndrias de plantas têm revelado mais semelhanças aos encontrados em animais do que se pensava inicialmente. Com a intensificação das pesquisas, muitas interpretações iniciais puderam ser revistas, sendo possível atualmente distinguir as interferências decorrentes de alguns artefatos de preparação das organelas, daquelas características realmente particulares de mitocôndrias de vegetais.

Trabalhos recentes têm confirmado a presença de um sistema transportador de  $Ca^{2+}$ , semelhante ao de animais, em mitocôndrias isoladas de plântulas de milho, feijão, soja e café (MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS et alii, 1986; CARNIERI et alii, 1987; VERCESI et alii, 1989) e em mitocôndrias de tubérculos de alcachofra-de-Jerusalém (RUGOLO et alii, 1990).

Os registros iniciais indicavam a presença de um sistema transportador de  $Ca^{2+}$  em apenas algumas espécies vegetais. CHEN & LEHNINGER (1973) concluíram que apenas as mitocôndrias obtidas de batata e de batata-doce apresentavam sítios de alta afinidade e captavam  $Ca^{2+}$ , através de mecanismos bastante rudimentares, quando comparados aos de mitocôndrias de animais. Segundo estes autores, as

mitocôndrias das outras espécies analisadas (cenoura, beterraba, nabo, cebola, repolho, alcachofra, couve-flor, abacate, feijão e milho) não apresentavam transporte eletroforético de  $\text{Ca}^{2+}$ . DIETER & MARMÉ (1980) também não obtiveram captação de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias de coleóptiles de aveia e mostarda, bem como em raízes de milho, mas registraram resultados positivos em coleóptiles de abóbora, células de cenoura em suspensão e coleóptiles e folhas de milho. Ressalta-se a discordância entre estes autores no que se refere às mitocôndrias de milho. Este aspecto foi esclarecido por MARTINS & VERCESI (1985), mostrando que mitocôndrias de coleóptiles de milho se comportavam como as obtidas de raízes, com atividade de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  muito mais elevada que as anteriormente registradas, para qualquer outro tipo de material vegetal. Estes últimos autores também registraram ausência do transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  em folhas de repolho, em concordância com os dados iniciais de CHEN & LEHNINGER (1973).

No presente trabalho, estão apresentadas evidências de que também as mitocôndrias de tubérculos de batata e de raízes de beterraba não apresentam transportadores mitocondriais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figuras 4 e 5). No que se refere à beterraba, estes dados coincidem com os de CHEN & LEHNINGER (1973), mas são discordantes em relação aos tubérculos de batata. Diante dos valores de controle respiratório obtidos, assim como dos níveis alcançados de potencial de membrana (em torno de -160 mV) e da capacidade fosforilativa, evidenciada pela resposta à adição de ADP, torna-se claro que a não captação de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de mitocôndrias de

batata e de beterraba se deve à inexistência do transportador nas organelas destas espécies.

É de se esperar que o rol de espécies vegetais com mitocôndrias capazes de captar  $\text{Ca}^{2+}$  se altere ao longo do tempo, à medida que forem obtidas preparações com maior grau de integridade e capacidade de gerar potencial elétrico de membrana, condição essencial para o influxo eletroforético do cátion.

Não há registros na literatura de possíveis explicações sobre a inexistência do transportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  em alguns tipos de plantas. Os autores apenas se referem ao fato de ser uma característica geneticamente determinada e própria de determinada espécie ou tecido. Apenas CHEN & LEHNINGER (1973) tentaram alguma análise a respeito, avaliando o teor de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior das mitocôndrias das 13 espécies de plantas por eles investigadas. É difícil discutir os dados apresentados por estes autores, uma vez que há grandes discordâncias quanto às espécies consideradas por eles como capazes de captar  $\text{Ca}^{2+}$ , e os resultados do presente trabalho. É importante considerar que as divergências foram atribuídas à qualidade das preparações mitocondriais, como um reflexo do grau de integridade da membrana interna, que pode alterar os valores dos níveis endógenos de  $\text{Ca}^{2+}$  e outros ions.

Existe a possibilidade de que a inexistência do transportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  se deva a algum mecanismo protetor das mitocôndrias destas espécies. Dados obtidos pela análise das cinzas mostraram teores de  $\text{Ca}^{2+}$  em batata e beterraba mais de duas vezes superiores aos de coleóptiles



de milho ( $20,4 \text{ nmoles.mg}^{-1}$  de matéria seca no milho, contra 48,5 e 71,5 na batata e na beterraba, respectivamente). Ao contrário, o teor de  $\text{Mg}^{2+}$  nos coleóptiles de milho é o dobro ( $102,1 \text{ nmoles.mg}^{-1}$ ) do encontrado nos tubérculos de batata e nas raízes de beterraba. Assim, na batata e na beterraba a razão  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  é cerca de 5 vezes maior que nos coleóptiles de milho. Estes dados são importantes quando se considera que o complexo  $\text{Mg}^{2+}$ -ADP é o verdadeiro substrato da ATP sintetase, e que o  $\text{Ca}^{2+}$  atua como inibidor da fosforilação oxidativa, por competir com o  $\text{Mg}^{2+}$  na formação deste complexo (FAGIAN et alii, 1986; VERCESI et alii, 1989). Além disso, assim como a fosforilação oxidativa, a captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  é dependente do potencial elétrico de membrana. Tanto que, se ADP e  $\text{Ca}^{2+}$  forem adicionados simultaneamente a uma suspensão mitocondrial, enquanto todo o  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado não tiver sido captado o ADP não é fosforilado (ROSSI & LEHNINGER, 1964; VERCESI et alii, 1978). Com isso, a inexistência do transportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  nestas espécies poderia ser um importante mecanismo protetor no sentido de garantir uma plena atividade fosforilativa.

Outros aspectos do presente trabalho podem ser comparados aos apresentados por DIETER & MARMÉ (1980), que mostraram resultados dependentes do método de preparação, da espécie, do tecido ou mesmo da idade do tecido utilizado. Por exemplo, considerando-se mitocôndrias de plântulas de milho, as de coleóptiles de 3,5 dias de idade apresentavam características semelhantes, independente do método de

isolamento. Entretanto, aos 6,5 dias de idade a atividade encontrada, ao utilizarem um dos métodos, era 5 vezes menor que aos 3,5 dias, e apenas duas vezes inferior quando o outro método era utilizado.

Ao contrário, no presente trabalho foi possível mostrar que mitocôndrias obtidas de coleóptiles de milho de 3 dias e de 9 dias de idade apresentam atividades semelhantes de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 5), apesar das diferenças obtidas no grau de acoplamento destas organelas (Figura 3). Também neste caso a qualidade das preparações mitocondriais deve ser responsável pelas diferenças. Ressalta-se que DIETER & MARMÉ (1980) obtiveram resultados diferentes, dependendo do método de isolamento utilizado. Os dados aqui apresentados resultam de isolamentos feitos de modo idêntico ao executado por MARTINS & VERCESI (1985), que consideram a melhora na qualidade da preparação mitocondrial como a responsável pela maior atividade de captação do cátion. Reforçando esta idéia, deve ser lembrado que a velocidade de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  foi dependente do grau de acoplamento dos isolamentos obtidos (Figuras 3 e 5).

Todos os dados discutidos até aqui foram obtidos através de experimentos desenvolvidos em meio de reação contendo fosfato, em função dos numerosos registros de que mitocôndrias de plantas exigem a presença deste ânion para efetuar captação de  $\text{Ca}^{2+}$  (ELZAM & HODGES, 1968; DAY et alii, 1978; MOORE & AKERMAN, 1984; MARTINS et alii, 1986; RUGOLO et alii, 1990). As tentativas de substituir o fosfato por acetato (Figura 6) e por sulfato ou arsenato (dados não mostrados) foram infrutíferas, confirmando todos estes registros. Estes resultados também estão de acordo com os de

WILSON & MINTON (1974), que tentaram substituir o Pi por arsenato, acetato e oxalato (em mitocôndrias de feijão), com os de AKERMAN & MOORE (1983), que tentaram o uso de acetato, sulfato e tiosulfato (em feijão), e com os de MARTINS et alii (1986), que tentaram o uso de acetato, tiosulfato e  $\beta$ -hidroxibutirato (em milho).

Adicionalmente, foi possível avaliar a entrada de fosfato, acompanhando a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 7). Foi obtida uma razão de 1,5  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$ , indicando a precipitação de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita em concordância com a sugestão de ELZAM & HODGES (1968) e a observação de acúmulo de grânulos eletrondensos na matriz (GREENAWALT, 1964; PEVERLY et alii, 1974).

O conjunto destes dados indica que há uma real exigência pelo fosfato, sendo pouco provável a sua simples atuação como ânion permeante. Ficam reforçadas as sugestões de que o fosfato entra em cotransporte com o  $\text{Ca}^{2+}$ , carregando menos que duas cargas positivas (DAY et alii, 1978; MARTINS et alii, 1986). Entretanto, não se pode excluir a possibilidade do fosfato estar se movendo separadamente, através do carreador  $\text{Pi}/\text{H}^+$ , em resposta ao gradiente de pH gerado pela ejeção de  $\text{H}^+$  durante o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Neste caso, o papel do fosfato poderia ser, não apenas colapsar  $\Delta\text{pH}$  e regenerar  $\Delta\psi$ , mas, também, promover a retenção de  $\text{Ca}^{2+}$ , na forma de precipitado de fosfato de cálcio.

Na expectativa de esclarecer este problema, tentou-se investigar a liberação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , induzida por FCCP ou por vermelho de rutênio, em presença ou

não de mersalil. O primeiro colapsa  $\Delta\psi$ , resultando em liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo reverso da via de influxo (NICHOLLS & AKERMAN, 1982). O segundo inibe seletivamente a via de influxo (MOORE, 1971; NICHOLLS & AKERMAN, 1982) permitindo a determinação do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  sob  $\Delta\psi$  elevado, e o mersalil inibe a translocação de fosfato (FONYÓ, 1979; BRYLA, 1980; WOHLRAB, 1986).

O uso de vermelho de rutênio resultou em efluxo líquido de  $\text{Ca}^{2+}$ , semelhante ao obtido pela adição de mersalil (Figuras 8 a 10), sem que um alterasse o efeito do outro. Estes dois inibidores acabam resultando em efeitos semelhantes, certamente como consequência da inibição da via de influxo, indicando uma possível atuação sobre um mesmo sítio, que estaria envolvido, ao mesmo tempo, no transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfato. Sugere-se a participação de um transportador cálcio/fosfato, sensível a vermelho de rutênio e mersalil. Nestes casos, com a inibição da via de entrada, detecta-se a operação da via de efluxo, que se mostra insensível ao vermelho de rutênio e ao mersalil, presumivelmente um antiporter  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ , semelhante ao encontrado em mitocôndrias de vertebrados (FISKUM & LEHNINGER, 1981; GUNTER et alii, 1983; GUNTER & PFEIFFER, 1990). A análise da Figura 13 confirma que a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  pela via de efluxo não precisa ser acompanhada por movimento de fosfato.

Ao contrário, o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  promovido pelo colapso no potencial de membrana (provocado pela adição de FCCP), além de ter um comportamento cinético diferente, é dependente do movimento simultâneo de  $\text{P}_i$ . Isto pode ser

observado pelos dados das Figuras 10 a 12, onde se nota que o mersalil (inibindo a translocação de Pi) é capaz de inibir o efluxo promovido pela incorporação de FCCP ao meio. Isto porque, neste caso, a maior parte do  $Ca^{2+}$  acumulado é liberada pelo reverso da via de captação, que é dependente de Pi e de  $\Delta\psi$ . O efluxo de  $Ca^{2+}$  promovido por FCCP não é completamente inibido pelo mersalil devido à operação simultânea da via de efluxo, que, conforme discutido no parágrafo anterior, é insensível ao mersalil e independente do transporte de Pi. Neste caso, a saída residual de Pi é, provavelmente, devida à redução na sensibilidade do translocador de Pi ao mersalil, em consequência do abaixamento do pH intramitocondrial, resultante do uso do agente desacoplador (LIGETI & FONYÓ, 1989).

Os dados referentes ao efluxo de  $Ca^{2+}$  concordam, em sua maior parte, com o registro recente de RUGOLO et alii (1990). Entretanto, estes autores obtiveram efluxos de  $Ca^{2+}$  semelhantes, tanto pela adição de mersalil, quanto de FCCP. Eles responsabilizam a queda em  $\Delta\psi$  pelo efluxo rápido promovido por mersalil, não levando em conta o fato deste inibidor poder estar bloqueando a via de captação (dependente de transporte simultâneo de Pi), também pelo seu reverso. Na verdade, eles mesmos mostram efeitos diferentes do mersalil e do FCCP sobre o potencial de membrana, onde o mersalil não foi capaz de colapsar totalmente  $\Delta\psi$ , promovendo apenas uma queda em torno de 20 mV, análoga à obtida no presente trabalho (Figura 9). A análise desta figura permite a constatação de efeitos independentes do mersalil sobre o potencial de membrana e sobre o efluxo de  $Ca^{2+}$ . Enquanto o

efeito do mersalil sobre o potencial foi dependente da dose utilizada, a resposta foi sempre a mesma, considerando-se o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a concentração do inibidor. Adicionalmente, o conjunto dos dados das Figuras 8 a 13 reforça as interpretações feitas nos parágrafos anteriores, indicando independência de movimento simultâneo de Pi apenas para a via de efluxo eletroneutra, insensível ao vermelho de rutênio e ao mersalil.

O significado fisiológico do movimento cíclico de  $\text{Ca}^{2+}$  continua sendo motivo de discussão. É possível que as mitocôndrias desempenhem apenas um papel secundário (juntamente com o retículo endoplasmático) na regulação da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  (MOORE & AKERMAN, 1984; CARAFOLI, 1988). O papel mais importante nesta regulação deve ser desempenhado pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (GUNTER & PFEIFFER, 1990). É importante lembrar que além dos sistemas transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  mais ativos, presentes nas células animais, as de plantas possuem sistemas adicionais localizados nas membranas dos cloroplastos (MOORE & AKERMAN, 1984; CHIANG & DILLEY, 1987; KAUSS, 1987) e no tonoplasto (MARMÉ, 1985; BUSH & SZE, 1986; MacROBBIE, 1989).

Considerando-se as células animais, alguns autores defendem que o transporte mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  serviria para regular a própria concentração intramitocondrial do cátion, no sentido de controlar o nível de ativação de três desidrogenases sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (SOMLYO et alii, 1981; DENTON & McCORMARK, 1985; HANSFORD, 1985). Não há evidências, até o momento, de que o mesmo ocorra em relação às

mitocôndrias de plantas. Ao contrário, as três desidrogenases preparadas de mitocôndrias de plantas não exibem sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (McCORMACK & DENTON, 1986; Ione S. MARTINS, comunicação pessoal). Apenas alguns dados mais recentes indicam que o  $\text{Ca}^{2+}$  livre na matriz de mitocôndrias de plantas pode participar da regulação de algumas enzimas mitocondriais. Por exemplo, RUSTIN & LANCE (1989) registraram que o  $\text{Ca}^{2+}$  reduz fortemente o efeito do  $\text{Mn}^{2+}$  sobre a enzima málica dependente de  $\text{Mn}^{2+}$ , localizada na matriz mitocondrial. MIERNYK & RANDALL (1987a,b) avaliaram algumas propriedades regulatórias do complexo piruvato desidrogenase de mitocôndrias de ervilha, mostrando a exigência de cátion divalente, melhor satisfeita por  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , sendo que o  $\text{Ca}^{2+}$ , além de não atuar como ativador, pode antagonizar a ativação por outros cátions divalentes. Merece menção, ainda, o controle exercido pelo  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a atividade da NADH desidrogenase localizada no lado citosólico da membrana interna de mitocôndrias de plantas (COLEMAN & PALMER, 1971; MOLLER & PALMER, 1981; EDMAN et alii, 1985; MOLLER & LIN, 1986).

## 5.2. ASPECTOS RELACIONADOS AO ACOPLAMENTO EM MITOCÔNDRIAS DE BATATA

Quando se trabalha com mitocôndrias isoladas de tecidos vegetais, são necessários maiores cuidados para que as organelas obtidas apresentem-se íntegras e perfeitamente

acopladas. Isto devido, em parte, à necessidade de aplicação de forças drásticas para a ruptura dos tecidos, em consequência da presença de paredes celulósicas rígidas. Além disso, o rompimento dos vacúolos ácidos pode resultar na liberação de hidrolases e fenol-oxidases, capazes de acarretar danos estruturais e funcionais nas organelas isoladas.

Dentre os expedientes normalmente utilizados para superar algumas destas dificuldades encontra-se o uso de BSA nos meios de extração, isolamento e reação. É de aceitação geral que a BSA, presente nos meios de extração e isolamento, tem um efeito protetor, atuando como substrato alternativo para as hidrolases ou como quelante de ácidos graxos, que poderiam estar presentes em níveis desacopladores (DOUCE et alii, 1985; NEUBURGER, 1985).

É possível obter mitocôndrias de tubérculos de batata acopladas, sem o uso de BSA no meio de extração, desde que nele esteja presente um agente anti-oxidante (como a cisteína). Neste caso, a presença de BSA no meio de reação não é dispensada, conforme foi observado na Figura 15, onde se constata, também, a importância da presença de ATP exógeno. O efeito análogo da adição de ATP poderia indicar que a atividade de hidrólise de ATP seria a responsável pelo incremento no potencial de membrana, observado na Figura 15. Entretanto, a presença de oligomicina não consegue evitar a ocorrência de aumentos em  $\Delta\psi$  (Figura 16), o que descarta esta possibilidade. Também não se pode lançar mão da necessidade de ativação da succinato desidrogenase, defendida por NEUBURGER (1985) e DJEBAR & MOREAU (1987), uma



vez que o conjunto de dados deste experimento (em especial os da Figura 14) mostra que esta enzima não necessita ser ativada pela adição de ATP.

A exigência de BSA nos meios de reação, para experimentos com mitocôndrias de plantas, tem sido amplamente registrada, com destaque para os trabalhos de DUCET (1979) e DIOLEZ & MOREAU (1983, 1985). Apesar de existirem outras linhas de pensamento, prevalece a sugestão de WOJTCZAK & WOJTCZAK (1960) e de DALGARNO & BIRT (1963), reforçada pelos resultados de DIOLEZ & MOREAU (1983), de que a atuação do BSA se deve à sua ligação a ácidos graxos.

Quanto ao modo de ação dos ácidos graxos, alguns autores defendem a sua atuação direta como protonóforos, à semelhança dos desacopladores clássicos (WOJTCZAK, 1976; LUVISETTO et alii, 1987). Entretanto, uma atuação indireta, ao nível de determinadas proteínas de membrana, é reforçada pelos dados experimentais de ANDREYEV et alii (1988) e de SCHONFELD (1990), que relacionam o conteúdo de translocase de nucleotídeos de adenina com o efeito desacoplador dos ácidos graxos livres. Um caso excepcional se refere ao papel dos ácidos graxos no controle da atividade da proteína desacopladora de mitocôndrias do tecido adiposo marrom de certos vertebrados. Esta proteína é a responsável pela elevada condutância a  $H^+$  e  $Cl^-$ , sendo estimulada por ácidos graxos de cadeia longa e inibida por nucleotídeos de purina (STRIELEMAN et alii, 1985a,b; KLINGENBERG & LIN, 1986; MURPHY, 1989).

De acordo com este raciocínio, é provável que o efeito do BSA sobre mitocôndrias de batata (e provavelmente

de plantas em geral) se deva, também, à sua ligação com ácidos graxos, impedindo a atuação destes sobre a atividade de alguma proteína de membrana. É possível que a translocase de nucleotídeos de adenina tenha uma pequena participação no fenômeno de desacoplamento. Isto porque a inibição de sua atividade, pela adição de carboxiatractilato, resulta em ligeira queda na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, evidenciada pelo acréscimo em  $\Delta\psi$ , observado na Figura 16. Entretanto, a análise desta mesma figura mostra que, mesmo se este translocador estiver inibido, outros nucleotídeos de purina são também capazes de promover novos incrementos em  $\Delta\psi$ . Constata-se, também, que os nucleotídeos não necessitam penetrar nas mitocôndrias para efetivarem sua atuação, o que indica que eles devem estar atuando sobre sítios localizados na superfície citoplasmática da membrana mitocondrial. Portanto, supõe-se a participação de uma outra proteína, que possa explicar, ao mesmo tempo, os efeitos da BSA e dos nucleotídeos de purina.

Comparando-se a ligação de ATP e GTP, em mitocôndrias de fígado e de batata, os dados da Figura 17 também indicam a participação desta outra proteína. Apenas as mitocôndrias de batata mostraram ligação dependente de pH, mantendo, a pH 6,0, uma ligação insensível ao CAT três vezes superior à obtida para as organelas de fígado. Considerando-se os níveis mais baixos como correspondentes a ligações inespecíficas, os dados indicam que apenas em batata devem existir sítios de ligação de GTP. Quando se lembra que os experimentos de ligação de ATP foram executados em presença de CAT, percebe-se que, novamente, apenas em mitocôndrias de batata devem existir sítios

adicionais de ligação de ATP, insensíveis ao inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina.

Existem sugestões sobre a existência de uma via adicional de transporte de ADP, em mitocôndrias de plantas, insensível ao CAT (ABOU-KHALIL & HANSON, 1977; 1979a,b). A existência de um translocador adicional explicaria, pelo menos em parte, os níveis elevados de ligação observados. Entretanto, se tal translocador adicional estiver presente nas mitocôndrias aqui utilizadas, ele também se mostrou sensível ao CAT, uma vez que este inibidor foi efetivo em bloquear a entrada e consequente fosforilação do ADP (Figura 16, parte A).

Experimentos de inchamento mitocondrial (Figuras 18 a 21) evidenciaram que BSA e nucleotídeos de purina também foram capazes de reduzir a permeabilidade a  $K^+$  e/ou  $Cl^-$ , em mitocôndrias de batata. Tal inchamento é espontâneo, principalmente em pHs mais elevados (Figura 19), sendo que a participação do trocador ADP/ATP deve ser descartada, uma vez que a presença de CAT não interfere na atuação dos nucleotídeos (Figura 20).

A ocorrência de inchamento espontâneo é indicativa da elevada permeabilidade da membrana mitocondrial ao  $K^+$ , provavelmente devida à atuação do trocador  $K^+/H^+$ , muito ativo em mitocôndrias de plantas (HENSLEY & HANSON, 1975; JUNG & BRIERLEY, 1979; FLUEGEL & HANSON, 1981). A atividade deste trocador resulta em um tipo de vazamento de prótons ("leak"), acarretando em transdução incompleta do  $\Delta\mu H^+$  em

ATP (MURPHY, 1989), sendo a responsável pelo reduzido valor do  $\Delta pH$  apresentado por mitocôndrias de plantas (DIOLEZ & MOREAU, 1987).

A redução no inchamento, resultante do abaixamento do pH ou da incorporação de BSA ao meio, pode ser suplantada pela adição de valinomicina (Figura 21). Como a valinomicina é um ionóforo de  $K^+$  (PRESSMAN, 1976), estes resultados indicam atuação dos ácidos graxos ao nível do trocador  $K^+/H^+$  sem a interferência direta sobre o transporte de  $Cl^-$ . Mesmo quando o inchamento é promovido pela adição de valinomicina, há inibição por nucleotídeos de purina (Figura 21), indicando o seu controle ao nível do transporte de  $Cl^-$ . Assim, o trocador seria ativado por pH elevado e/ou por ácidos graxos livres, enquanto que os nucleotídeos estariam controlando o movimento de  $Cl^-$ . Este ânion pode estar sendo transportado por outro sítio deste antiporter, outro tipo de translocador ou por alguma proteína que funcione como canal, como o canal aniônico da membrana interna (IMAC), caracterizado por BEAVIS & GARLID (1987, 1988) e BEAVIS (1989a,b).

De maneira geral, os efeitos de BSA e dos nucleotídeos de purina sobre as mitocôndrias de tubérculos de batata são extremamente semelhantes aos seus efeitos sobre as mitocôndrias de tecido adiposo marrom de vertebrados. A maioria dos resultados apresentados neste trabalho são comparáveis (com extremo grau de identidade) aos registros iniciais de NICHOLLS (1974a,b, 1976, 1979), que utilizou mitocôndrias de tecido adiposo marrom. Nestes tecidos animais, a presença de uma proteína desacopladora é a responsável pelas particularidades observadas (LIN et alii, 1980, CANNON et alii, 1982; RIAL et alii, 1983; NICHOLLS & RIAL, 1984, 1988).

Foram acumuladas evidências de que a ligação de nucleotídeos de purina à proteína desacopladora inibe sua atividade de translocação de H<sup>+</sup>, e que os ácidos graxos atuam deslocando os nucleotídeos (STRIELEMAN et alii, 1985a,b; KLINGENBERG & LIN, 1986; KLINGENBERG, 1987; MURPHY, 1989).

Diante das semelhanças constatadas, a existência, em tubérculos de batata, de uma proteína desacopladora semelhante à de tecido adiposo marrom, conseguiria explicar a maior parte dos dados apresentados no presente trabalho. Por isso, foram feitas tentativas de isolar, a partir de mitocôndrias de batata, uma proteína que apresentasse características semelhantes à do tecido adiposo marrom de vertebrados.

Existem alguns métodos (muito semelhantes) tidos como específicos para o isolamento da proteína desacopladora de tecido adiposo marrom (RICQUIER et alii, 1979; LIN & KLINGENBERG, 1980, 1982; STRIELEMAN et alii, 1985a; KLINGENBERG & LIN, 1986). Esta proteína apresenta um peso de 32 kDa, se caracterizando pela capacidade exclusiva de ligar GTP ou GDP, com maior afinidade em pH ácido, num processo inibido por Mg<sup>2+</sup> (KLINGENBERG et alii, 1986).

Seguindo o procedimento descrito por LIN & KLINGENBERG (1982) foi possível obter, a partir de mitocôndrias de batata, algumas frações protéicas altamente puras, constituídas por apenas uma ou duas bandas de proteínas, com peso molecular aparente em torno de 34-35 kDa (Figuras 22 e 23).

A simples obtenção de proteína com peso molecular próximo, através do método considerado como específico, já representa um ponto positivo. Entretanto, muita cautela deve ser tomada, uma vez que estes dados são insuficientes para assegurar que a proteína purificada corresponde a uma proteína desacopladora similar à de tecido adiposo marrom. Maior cuidado, ainda, deve ser tomado, quando se considera que o método utilizado é extremamente semelhante ao que permite o isolamento da translocase de nucleotídeos de adenina. Ambos os métodos se baseiam no mesmo princípio, ou seja, a exclusão da proteína, durante a passagem do extrato por uma coluna de hidroxiapatita (KLINGENBERG & LIN, 1986). Duas pequenas diferenças são fundamentais. Quando se deseja isolar o trocador ADP/ATP, a eluição, para retirada da proteína da coluna, deve ser feita a 4°C, no sentido de preservar a estrutura do peptídeo, que é extremamente termolábil. Além disso, é necessário adicionar CAT ao preparado mitocondrial, porque o complexo inibidor-translocador é mais estável e, assim, se preserva melhor durante a passagem pela coluna de hidroxiapatita. Ao contrário, a proteína desacopladora é mais estável, devendo ser eluída à temperatura ambiente e na ausência de CAT. Nesta temperatura a translocase de nucleotídeos de adenina desnatura-se e fica retida na coluna, permitindo a obtenção da proteína desacopladora purificada, sem contaminações.

Descarta-se a possibilidade da proteína isolada no presente trabalho ser a translocase de nucleotídeos de adenina, por duas razões. A primeira leva em consideração as explicações feitas no parágrafo anterior, argumentando, que nas condições utilizadas, tal carreador deve ficar retido na

coluna. Um argumento mais forte deve-se ao registro de HAWKESFORD & LEAVER (1987), mostrando que este translocador, de mitocôndrias de milho, apresenta-se com peso molecular na faixa de 30 kDa, à semelhança do que ocorre em animais (KLINGENBERG et alii, 1978; AQUILA et alii, 1987).

Ainda deve ser considerado o fato de que a proteína desacopladora apresenta várias características estruturais e funcionais semelhantes às de outro translocador da membrana interna mitocondrial: o carreador de fosfato. AQUILA et alii (1987) chegaram a propor, mostrando evidências conclusivas, que a proteína desacopladora, a translocase de nucleotídeos de adenina e o carreador de fosfato fazem parte de uma mesma família de proteínas homólogas, provavelmente derivadas de um gene ancestral comum. Portanto, não é ao acaso que também o carreador de fosfato pode ser isolado de maneira semelhante (mas não idêntica) aos outros dois transportadores, envolvendo o uso de hidroxapatita, a 4 °C (WOHLRAB, 1980; KOLBE et alii, 1982; WOHLRAB & FLOWERS, 1982; WOHLRAB et alii, 1984). Os melhores resultados foram obtidos com o uso adicional de SDS e uréia, durante a cromatografia com hidroxapatita, mas, como todos os outros, mantendo certa quantidade de contaminação pela translocase de nucleotídeos de adenina (KOLBE et alii, 1984). Esta translocase apresenta-se como uma banda na região de 30 kDa, enquanto que o carreador de fosfato constitui-se de duas bandas ( $\alpha$  e  $\beta$ , na razão 1:1), com mobilidades similares (34 kDa).

A diferenciação entre estas proteínas é feita com

base no transporte de seus substratos específicos, ou através do uso dos inibidores característicos de cada uma delas. Nem sempre é possível avaliar a ligação simples do translocador com o substrato, ou com o inibidor, sendo necessária a incorporação, da proteína isolada, em vesículas lipídicas, para que seja possível detectar a sua atividade (BOUILLAUD et alii, 1983; KLINGENBERG & WINKLER, 1986).

No caso da proteína desacopladora, é mais fácil identificá-la pela sua capacidade de ligar nucleotídeos de purina di ou trifosfatados (em especial GTP e GDP), do que pela sua atividade de translocação de H<sup>+</sup>. Alguns métodos de ligação foram descritos por KLINGENBERG et alii (1986), além do utilizado por FRENCH et alii (1988).

No presente trabalho foi tentada a ligação de GTP à proteína isolada, através de adaptações dos métodos de cromatografia de exclusão (em Sephadex), descrito por KLINGENBERG et alii (1986) e de fluorimetria (FRENCH et alii, 1988). As tentativas de adaptações foram infrutíferas em ambos os casos (dados não mostrados). Ambos os métodos ressaltam a necessidade do uso de quantidades relativamente elevadas da proteína isolada e da retirada do excesso de triton das amostras. Os isolamentos obtidos sempre apresentavam concentração protéica muito baixa (em torno de 100 a 200 µg/ml) e elevada concentração de Triton (de 1 a 5%). Foram feitas algumas tentativas de reduzir o teor de Triton das amostras, sem entretanto se obter o sucesso relatado nos métodos testados (HOLLOWAY, 1973; KLINGENBERG & LIN, 1986).

Foi possível incorporar a proteína isolada em



bicamada lipídica e verificar que ela ali se mostra como um canal ânion seletivo, com cinética independente da voltagem aplicada (Figuras 24 a 27). Além disso, adição de ATP à solução banhante (Figuras 28 e 29) leva a bloqueio do canal, com mudança no seu padrão de comportamento. Isto é condizente com a atividade de uma proteína desacopladora, regulável por nucleotídeos de purina, cuja função mais característica é a de permeabilizar a membrana interna mitocondrial a prótons, mas que também é capaz de transportar  $\text{Cl}^-$  (NICHOLLS & LINDBERG, 1973; GARLID, 1990; JEZEK & GARLID, 1990).

Entretanto, novamente, é necessário ter cautela na utilização destes resultados como reforço de que o isolamento, conseguido no presente trabalho, corresponde à proteína desacopladora (análoga à do tecido adiposo marrom). Existem discussões a respeito do mecanismo de ação da proteína desacopladora, alguns deles argumentando a favor de sua atividade como translocase e não como canal (AQUILA et alii, 1987; KLINGENBERG, 1990). Estes últimos autores consideram a baixa velocidade com que os prótons são transportados através da membrana, e o grande número de moléculas necessárias para tal atividade, como indicativos da atuação da proteína desacopladora como um translocador. Por outro lado, embora não haja dados publicados, a proteína desacopladora isolada de tecido adiposo marrom também se comporta como canal, quando incorporada a bicamadas lipídicas, em condições semelhantes às utilizadas para a proteína de batata (Wamberto A. Varanda, comunicação pessoal).

Outro ponto a ser considerado é a existência, em mitocôndrias de animais, de um canal aniônico (caracterizado inicialmente por GARLID & BEAVIS, 1986), controlado fisiologicamente pelo pH e íons  $Mg^{2+}$ . Embora tal canal não tenha ainda sido isolado, até o momento, muitos estudos existem a seu respeito, principalmente envolvendo o transporte de  $Cl^-$  (BEAVIS & GARLID, 1987, 1988; BEAVIS, 1989a,b; BEAVIS & POWERS, 1989). Além disso, existem atualmente evidências de que este canal está presente em mitocôndrias de tubérculos de batata (Andrew Beavis, comunicação pessoal). Merece destaque o fato de que BEAVIS (1989b) fez algumas considerações a respeito de semelhanças (quanto à sensibilidade e ação de certos inibidores) entre este canal e as proteínas incluídas por AQUILA et alii (1987) como pertencentes a uma mesma família de translocadores (a proteína desacopladora, a translocase de nucleotídeos de adenina e o carreador de fosfato).

O conjunto de dados, acumulados no presente trabalho é indicativo da existência de uma proteína desacopladora em mitocôndrias de tubérculos de batata. Uma proteína como esta explicaria algumas das características especiais de mitocôndrias de batata destacadas aqui, tais como: a) a necessidade do uso de BSA para a obtenção de mitocôndrias acopladas; b) a dependência de nucleotídeos de purina para um melhor nível de acoplamento; c) a ocorrência de sítios de ligação de GTP; d) o elevado nível de ligação de ATP, insensível ao CAT e maior afinidade em pH mais baixo; e) a ocorrência de inchamento mitocondrial espontâneo, dependente de pH, que pode ser reduzido por BSA e nucleotídeos de purina; f) a obtenção de uma banda proteica na faixa de 34-35

kDa, quando se procede ao isolamento indicado para a UCP; e  
g) o comportamento desta proteína isolada como canal, regulável por ATP.

## 6.0 RESUMO

Com o objetivo de acrescentar dados que pudessem ajudar a esclarecer algumas particularidades da fisiologia de mitocôndrias de plantas, foram investigadas algumas das características do funcionamento de mitocôndrias isoladas de milho, batata e beterraba.

Numa primeira parte deste trabalho foram estudados alguns aspectos relacionados ao transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , em mitocôndrias isoladas de coleóptiles de milho. Foi possível observar que o fosfato é estequiometricamente acumulado com o  $\text{Ca}^{2+}$ , mantendo uma razão  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$  próxima a 1,5, e que a atividade do transportador é independente da idade dos coleóptiles utilizados. A inibição da via de influxo, por vermelho de rutênio, induz efluxo líquido de  $\text{Ca}^{2+}$  sem movimento simultâneo de Pi. Ao contrário, em presença de FCCP, que colapsa  $\Delta\psi$ , o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é acompanhado pelo efluxo de Pi, podendo ser reduzido pela presença de mersalil. Estes dados indicam que mitocôndrias de milho possuem duas vias de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ : uma via de influxo eletroforética, que transporta um complexo de fosfato de cálcio, com pelo menos uma carga positiva, e outra via de efluxo, independente de fosfato, que, por analogia com mitocôndrias de vertebrados pode ser um antiporter  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ . Também foi observado que mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata e de raízes de beterraba são incapazes de acumular  $\text{Ca}^{2+}$ .

Numa segunda parte foram estudados alguns aspectos

relacionados a alterações no grau de acoplamento de mitocôndrias de tubérculos de batata. A construção de um potencial de membrana em torno de  $-170$  mV é dependente da presença de BSA e de ATP no meio de reação. A adição de nucleotídeos de purina (di ou trifosfatados) também contribui para um maior acoplamento, evidenciado por incrementos em  $\Delta\psi$  e por redução no consumo de  $O_2$  no estado 4. Estas alterações não são devidas à hidrólise de ATP, e os nucleotídeos devem agir do lado externo da membrana interna mitocondrial, uma vez que seus efeitos continuam a ser observados em presença de oligomicina e de carboxiatractilato. BSA e nucleotídeos de purina também são efetivos em reduzir o inchamento de mitocôndrias de batata, em meio de KCl, num processo dependente de pH. Além disso, os dados indicam que, ao contrário de mitocôndrias de fígado, estas mitocôndrias devem possuir sítio de ligação de GTP, além de sítio adicional de ligação de ATP insensível a carboxiatractilato. Utilizando um procedimento descrito como específico para o isolamento da proteína desacopladora de tecido adiposo marrom de vertebrados, foi possível obter frações relativamente puras, constituídas de uma banda protéica principal (às vezes duas muito próximas) na região de 34-35 kDa. A proteína isolada foi incorporada a bicamadas lipídicas, onde apresentou comportamento típico de um canal voltagem independente, com pelo menos 3 subestados de condutância. ATP muda a cinética de abertura e fechamento do canal, mantendo-o fechado a maior parte do tempo. Este conjunto de dados indica que o acoplamento de mitocôndrias de batata deve ser regulado pelos níveis de

ácidos graxos e de nucleotídeos de purina, de modo análogo ao de mitocôndrias de tecido adiposo marrom. Sugere-se que tal regulação seja devida a uma possível proteína desacopladora, com peso molecular aparente de 34-35 kDa.

## 7.0 SUMMARY

The first part of this work was dedicated to some aspects related to  $\text{Ca}^{2+}$  transport by corn coleoptile mitochondria. It was observed that the activity of the  $\text{Ca}^{2+}$  carrier is independent of the coleoptile age and that phosphate is accumulated together with  $\text{Ca}^{2+}$  keeping a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$  ratio near to 1.5. The inhibition of the influx pathway (by ruthenium red) result in net  $\text{Ca}^{2+}$  efflux without simultaneous Pi movement. On the other hand, FCCP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  efflux is sensitive to mersalyl and is followed by simultaneous efflux of Pi. These data indicate that corn coleoptile mitochondria possess two pathways for  $\text{Ca}^{2+}$  transport; an electrophoretic influx pathway, that transport a calcium-Pi complex with at least one positive charge, and a phosphate-independent efflux pathway, that might be a  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$  antiporter, by analogy with vertebrate mitochondria. It was also observed that mitochondria from potato tubers and from red beet roots were unable to accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  and probably do not possess the  $\text{Ca}^{2+}$  carrier.

In a second part of this work some aspects related to changes in the coupling degree of potato tuber mitochondria were studied. It was observed that the presence of BSA and ATP in the reaction medium increased  $\Delta\psi$  from 120 to 160 mV. Purine nucleotides (di or triphosphates) also improved potato mitochondrial coupling, as suggested by the increased  $\Delta\psi$  and reduction in state 4 respiration rate.

These changes are not due to ATP hydrolysis and the nucleotide effects are mediated by their binding to sites located on the outer surface of the inner membrane because the effects are still observed in presence of oligomycin and carboxyatractylate. BSA and purine nucleotides are also effective in reducing both the rate and extent of potato tuber mitochondria swelling in KCl medium, by a mechanism sensitive to changes in medium pH. Furthermore, the data indicate that, contrary to rat liver mitochondria, potato tuber mitochondria might possess carboxyatractyloside-insensitive ATP-binding sites which also bind GTP. The use of an hydroxylapatite column permitted the isolation of a 34-35 kDa protein. The isolated protein was incorporated in planar lipid bilayers, where it showed a typically channel behaviour, voltage-independent, with at least 3 conductance sub-levels. The addition of ATP changes its kinetic behaviour, keeping the channel closed near all the time. These data indicate that the coupling degree of potato tuber mitochondria may be regulated by free fatty acids and purine nucleotides, in a way similar to the brown adipose tissue mitochondria. Probably such regulation is due to the existence of an uncoupling protein similar to that present in vertebrate brown adipose tissue.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-KHALIL, S & HANSON, J.B. 1977. Net adenosine diphosphate accumulation in mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 183: 581-587.
- ABOU-KHALIL, S. & HANSON, J.B. 1979a. Energy-linked adenosine diphosphate accumulation by corn mitochondria. I. General characteristics and effect of inhibitors. Plant Physiol., 64: 276-280.
- ABOU-KHALIL, S. & HANSON, J.B. 1979b. Energy-linked adenosine diphosphate accumulation by corn mitochondria. II. Phosphate and divalent cation requirement. Plant Physiol., 64: 281-284.
- AKERMAN, K.E.O. 1978. Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. Biochim. Biophys. Acta, 502: 359-366.
- AKERMAN, K.E.O. & MOORE, A.L. 1983. Phosphate dependent, ruthenium red insensitive  $Ca^{2+}$  uptake in mung bean mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 114 (3): 1176-1181.
- AKERMAN, K.E.O. & NICHOLLS, D.G. 1983. Physiological and bioenergetics aspects of mitochondrial calcium transport. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 9: 149-201.

- AKERMAN, K.E.O. & WIKSTROM, M.K.F. 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett., 68: 191-197.
- ANDREYEV, A.Y.; BONDAREVA, T.O.; DEDUKOVA, V.I.; MOKHOVA, E. N.; SKULACHEV, V.P. & VOLKOV, N.I. 1988. Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids. FEBS Lett., 226 (2): 265-269.
- apREES, T. FULLER, W.A. & WRIGHT, B. 1977. Measurements of glycolytic intermediates during the onset of thermogenesis in the spadix of Arum maculatum. Biochim. Biophys. Acta, 461: 274-282.
- AQUILA, H.; LINK, T.A. & KLINGENBERG, M. 1985. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier: Analysis of sequence homologies and folding of the protein in the membrane. EMBO J., 4: 2369-2376.
- AQUILA, H.; LINK, T.A. & KLINGENBERG, M. 1987. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. FEBS Lett., 212 (1): 1-9.
- AZCON-BIETO, J.; DAY, D.A. & LAMBERS, H. 1983. The effect of photosynthesis and carbohydrate status on photosynthesis and the involvement of the alternative path in leaf respiration. Plant Physiol., 72: 598-603.

- BEAVIS,A.D. 1989a. On the inhibition of the mitochondrial inner membrane anion uniporter by cationic amphiphiles and other drugs. J. Biol. Chem., 264 (3): 1508-1515.
- BEAVIS,A.D. 1989b. The mitochondrial inner-membrane anion channel possess two mercurial-reactive regulatory sites. Eur. J. Biochem., 185: 511-519.
- BEAVIS,A.D. & GARLID,K.G. 1987. The mitochondrial inner membrane anion channel. Regulation by divalent cations and protons. J. Biol. Chem., 262 (31): 15085-15093.
- BEAVIS,A.D. & GARLID,K.G. 1988. Inhibition of the mitochondrial inner membrane anion channel by dicyclohexylcarbodiimide. Evidence for a specific transport pathway. J. Biol. Chem., 263 (16): 7574-7580.
- BEAVIS,A.D. & POWERS,M.F. 1989. On the regulation of the mitochondrial inner membrane anion channel by magnesium and protons. J. Biol. Chem., 264 (29): 17148-17155.
- BECKER,G.L.; FISKUM,G. & LEHNINGER,A.L. 1980. Regulation of free  $Ca^{2+}$  by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 255: 9009-9012.
- BENDALL,DS. & BONNER,W.D. 1971. Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. Plant Physiol., 47: 236-245.
- BENTRUP,F. 1989. Cell electrophysiology and membrane transport. Progress in Botany, 51: 70-79.

- BERNARDI, P & AZZONE, G.F. 1983. Regulation of  $Ca^{2+}$  efflux in rat liver mitochondria. Role of membrane potential. Eur. J. Biochem., 134: 377-383.
- BERRIDGE, M.J. 1985. The molecular basis of communication within the cell. Sci. Am., 253 (4): 124-134.
- BERTRAND, H.; ARGAN, C.A. VANDERLEYDEN, J. & SZAKACS, N.A. 1979. Genetic control of inducible cyanide-insensitive respiratory activity in Neurospora crassa. Genetics, 92: s9.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8: 93-99.
- BOCKAERT, J. 1986. Les récepteurs membranaires. La Recherche, 17: 892-900.
- BONNER, W.D. & RICH, P.R. 1978. Molecular aspects of cyanide/antimycin-resistant respiration. In: Ducet, G & Lance, C. (eds.), Plant Mitochondria. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 241-247.
- BONNER, W.D.; CLARKE, S.D. & RICH, P.R. 1986. Partial purification and characterization of the quinol oxidase activity of Arum maculatum mitochondria. Plant Physiol., 80: 838-842.

- BOSSSEN, M.E.; KENDRICK, R.E. & VREDENBERG, W.J. 1990. The involvement of a G-protein in phytochrome-regulated,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent swelling of etiolated wheat protoplasts. Physiol. Plant., 80: 55-62.
- BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; GULIK-KRZYWICKI, T. & GARY-BOBO, C. M. 1983. The possible proton translocating activity of the mitochondrial uncoupling protein of brown adipose tissue. Reconstitution studies in liposomes. FEBS Lett., 164 (2): 272-276.
- BOYER, P.D.; CHANCE, B.; ERNSTER, L.; RACKER, E. & SLATER, E.C. 1977. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Annu. Rev. Biochem., 46: 955-1026.
- BRAND, M.D. 1985. Electroneutral efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  from liver mitochondria. Biochem. J., 225: 413-419.
- BRAND, M.D. & MURPHY, M.P. 1987. Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. Biol. Rev., 62: 141-193.
- BRAND, M.D.; REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A.L. 1976. Re-evaluation of  $\text{H}^+$ /site ratio of mitochondrial electron transport with oxygen pulse technique. J. Biol. Chem., 251: 5670-5696.
- BROWLEE, C. & WOOD, J.W. 1986. A gradient of cytoplasmic free calcium in growing rhizoid cells of Fucus serratus. Nature, 320: 624-626.

- BRYCE, J.H. & apREES, T. 1985. Effects of sucrose on the rate of respiration of the roots of Pisum sativum. J. Plant Physiol., 120: 363-367.
- BRYCE, J.H.; AZCON-BIETO, J.; WISKICH, J.T. & DAY, D.A. 1990. Adenylate control of respiration in plants : the contribution of rotenone insensitive electron transport to ADP-limited oxygen consumption by soybean mitochondria. Physiol. Plant., 78: 105-111.
- BRYLA, J. 1980. Inhibitors of mitochondrial anion transport. Pharmac. Ther., 10: 351-397.
- BUSH, D.R. & SZE, H. 1986. Calcium transport in tonoplast and endoplasmic reticulum vesicles isolated from cultured carrot cells. Plant Physiol., 80: 549-555, 1986.
- BYGRAVE, F.L. 1977. Mitochondrial calcium transport. Curr. Top. Bioenerg., 6: 259-318.
- CANNON, B. ALEXSON, S. & NEDERGAARD, J. 1982 Peroxisomal-oxidation in brown fat. Ann. N. Y. Acad. Sci., 386: 40-57.
- CARAFOLI, E. 1965. Active accumulation of  $Sr^{2+}$  by rat liver mitochondria Biochim. Biophys. Acta, 97: 107-117.
- CARAFOLI, E. 1979. The calcium cycle of mitochondria. FEBS Lett., 104: 1-5.

- CARAFOLI, E. 1986. Mitochondrial Pathology: An overview. Ann. N. Y. Acad. Sci., 468: 1-18.
- CARAFOLI, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. Annu. Rev. Biochem., 56: 395-433.
- CARAFOLI, E. 1988. The role of calcium in the control of cell function. In: Lemasters, J.J.; Hackenbrok, R.; Thurman, R.G. & Westerhoff, H.V. (eds.), Integration of mitochondrial function. Plenum Press, New York, pp. 475-485.
- CARAFOLI, E. & CROMPTON, M. 1978. The regulation of intracellular calcium. Curr. Top. Membr. Transp. 10: 151-216.
- CARAFOLI, E.; TIOZZO, R.; LUGLI, G. CROVETTI, F. & KRATZING, C. 1974. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J. Mol. Cell Cardiol., 6: 361-371.
- CARNIERI, E.G.S. 1986. Transporte de Ca<sup>2+</sup> por Mitocôndrias Vegetais. Tese Doutorado, Curitiba, PR, 74 p.
- CARNIERI, E.G.S.; MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. 1987. The mechanism and biological role of calcium transport by plant mitochondria. Brazilian J. Med. Biol. Res., 20: 635-638.
- CHANCE, B. 1965. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. J. Biol. Chem., 240: 2729-2748.

- CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol. 17: 65-134.
- CHEN, C. & LEHNINGER, A.L. 1973.  $Ca^{2+}$  transport activity in mitochondria from some plant tissues. Arch. Biochem. Biophys., 157: 183-196.
- CHIANG, G. & DILEY, R.A. 1987. Evidence for  $Ca^{2+}$ -gated proton fluxes in chloroplast thylakoid membranes:  $Ca^{2+}$  controls a localized to delocalized proton gradient switch. Biochemistry, 26: 4911-4916.
- CLARKSON, D.T.; BROWLEE, C. & AYLING, S.M. 1988. Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plant cells: results from fluorescence ratio of fura-2. J. Cell Sci., 91: 71-80.
- COLEMAN, J.O.D. & PALMER, J.M. 1971. Role of  $Ca^{2+}$  in the oxidation of exogenous NADH by plant mitochondria. FEBS Lett., 17: 203-208.
- CRIDDLE, R.S.; PACKER, L. & SHIEH, P. 1977. Oligomycin-dependent ionophoric protein subunit of mitochondrial adenosine-triphosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 4306-4310.
- CROMPTON, M.; CAPANO, M. & CARAFOLI, E. 1976. The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria; a possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J. Biochem., 69: 453-462.



- CUNNINGHAM, S.A. & NICHOLLS, D.G. 1987. Induction of functional uncoupling protein in guinea pigs infused with noradrenaline. Studies with isolated brown adipocytes. Biochem. J., 245: 485-491.
- CUNNINGHAM, S.A. ; WIESINGER, H. & NICHOLLS, D.G. 1986. Quantification of fatty acid activation of the uncoupling protein in brown adipocytes and mitochondria from the guinea pig. Eur. J. Biochem., 157: 415-420.
- DALGARNO, L. & BIRT, L.M. 1963. Free fatty acids in carrot-tissue preparations and their effect on isolated carrot mitochondria. Physiol. Vég., 10: 181-198.
- DAY, D.A. & WISKICH, J.T. 1984. Transport processes of isolated plant mitochondria. Physiol. Vég., 22: 241-261.
- DAY, D.A.; BERTAGNOLLI, B.L. & HANSON, J.B. 1978. The effect of calcium on the respiratory responses of corn mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 502: 289-297.
- DAY, D.A.; NEUBURGER, M & DOUCE, R. 1985a. Interactions between glycine decarboxylase, the tricarboxylic acid cycle and the respiratory chain in pea leaf mitochondria. Aust. J. Plant Physiol., 12: 119-130.
- DAY, D.A.; NEUBURGER, M. & DOUCE, R. 1985b. Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from pea leaves. Aust. J. Plant Physiol., 12: 219-228.

- DAY, D.A.; WISKICH, J.T.; BRYCE, J.H. & DRY, I.B. 1987. Regulation of ADP-limited respiration in isolated plant mitochondria. In: Moore, A.L. & BEECHY, R.B. (eds.), Plant Mitochondria: Structural, Functional and Physiological Aspects. Plenum, New York, pp. 59-66.
- DE LUCA, H.F. & ENGSTRON, G.W. 1961. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47: 1744-1750.
- DE MEIS, L. & VIANA, A.L. 1979. Energy interconversion by the  $Ca^{2+}$  dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochem., 48: 275-292.
- DENTON, R.M. & McCORMAK, J.G. 1980. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. FEBS Lett., 119: 1-8.
- DENTON, R.M. & McCORMAK, J.G. 1985.  $Ca^{2+}$  transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. Am. J. Physiol., 249: 543-554.
- DENTON, R.M.; RANDLE, P.J. & MARTIN, B.R. 1972. Stimulation by calcium ions by pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. Biochem. J., 128: 161-163.
- DeSANTIS, A.; ARRIGONI, O. & PALMIERI, F. 1976. Carrier-mediated transport of metabolites in purified bean mitochondria. Plant & Cell Physiol., 17: 1221-1233.

- DESAUTELS, M.; ZAROR-BEHRENS, G. & HIMMS-HAGEN, J. 1978. Increased purine nucleotide binding, altered polypeptide composition, and thermogenesis in brown adipose tissue mitochondria of cold-acclimated rats. Can. J. Biochem., 56: 378-383.
- DIETER, P. & MARMÉ, D. 1980. Ca<sup>2+</sup> transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher plants. Planta, 150: 1-8.
- DIETER, P. & MARMÉ, D. 1983. The effect of calmodulin and far-red light on the kinetic properties of the mitochondrial and microsomal calcium-ion transport system from corn. Planta, 159: 277-281.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F. 1983. Effect of bovine serum albumin on membrane potential in plant mitochondria. Physiol. Plant., 59: 177-182.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F. 1985. Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 806: 56-63.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F. 1987. Relationships between membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria. In: Moore, A.L. & Beechey, R.B. (eds.), Plant Mitochondria: Structural, Functional and Physiological Aspects. Plenum, New York, pp. 17-25.

- DJEBAR, M. & MOREAU, F. 1987. Effects of ethylene on membrane potential and phosphorylating properties of isolated plant mitochondria. Plant Physiol. Biochem., 25 (2): 111-116.
- DOCAMPO, R. & VERCESI, A.E. 1989a. Characteristics of  $Ca^{2+}$  transport by Trypanosoma cruzi mitochondria "in situ". Arch. Biochem. Biophys., 272 (1): 122-129.
- DOCAMPO, R. & VERCESI, A.E. 1989b.  $Ca^{2+}$  transport by coupled Trypanosoma cruzi mitochondria in situ. J. Biol. Chem., 264: 108-111.
- DOUCE, R. 1985. Mitochondria in higher plants: structure, function, and biogenesis. Academic, Orlando, 327p.
- DOUCE, R. & BONNER, W.D. Jr. 1972. Oxaloacetate control of Krebs cycle oxidation in purified plant mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 619-624.
- DOUCE, R. & NEUBURGER, M. 1987. General organization of the respiratory chain and matrix-associated specific dehydrogenases in higher plant mitochondria. In: Moore, A.L. & Beechey, R.B. (eds.), Plant Mitochondria. Structural, Functional and Physiological Aspects. Plenum, New York, pp. 1-16.
- DOUCE, R. & NEUBURGER, M. 1989. The uniqueness of plant mitochondria. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40: 371-414.

- DOUCE,R.; BLIGNY,R.; JOURNET,E. & NEUBURGER,M.1985. Specific properties of higher plant mitochondria. In: Packer,L. (ed.), Recent Advances in Biological Studies. Plenum, New York, pp.237-257.
- DOUCE.R.; BLIGNY,R. & NEUBURGER,M. 1987. Molecular architecture of plant mitochondrial membranes. In: Newman,D.W. & Wilson, K.D. (eds.), Models in Plant Physiology and Biochemistry. v.1, CRC Press, Boca Raton, pp. 113-116.
- DRAHOTA,Z.; GAZZOTTI,P. & CARAFOLI,E. 1969. A comparison of the effects of different cations on a number of mitochondrial reactions linked to ion translocation. Arch. Biochem. Biophys., 130: 267-273.
- DRY,I.B. & WISKICH.J.T. 1982. Role of the external adenosine triphosphate/adenosine diphosphate ratio in the control of plant mitochondrial respiration. Arch. Biochem. Biophys., 217 (1): 72-79.
- DUCET,G. 1979. Influence of bovine serum albumine on the proton conductance of potato mitochondria membranes. Planta, 147: 122-126.
- DUCET,G. GIDROL,X. & RICHAUD,P. 1983. Membrane potential changes in coupled potato mitochondria. Physiol. Vég., 21 (3): 385-394.
- DURAND,R. 1986. L'assemblage des mitochondries. La Recherche, 174 (17): 163-171.

- DUZYNSKI, J. & WOJTCZAK, L. 1985. The apparent non-linearity of the relationship between the rate of respiration and the proton-motive force of mitochondria can be explained by heterogeneity of mitochondrial preparations. FEBS Lett., 182: 243-248.
- EDMAN, K.; ERICSON, I. & MOLLER, I.M. 1985. The regulation of exogenous NAD(P)H oxidation in spinach (Spinacia oleracea) leaf mitochondria by pH and cations. Biochem. J., 232: 471-477.
- ELDER, J.A. & LEHNINGER, A.L. 1973. Respiration dependent transport of carbon dioxide into rat liver mitochondria. Biochemistry, 12: 976-982.
- ELTHON, T.E. & McINTOSH, L. 1986. Characterization and solubilization of the alternative oxidase of Sauromatum guttatum mitochondria. Plant Physiol., 82: 1-6.
- ELTHON, T.E. & McINTOSH, L. 1987. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. Proc. Natl. Acad. USA, 84: 8399-8403.
- ELTHON, T.E.; NICKELS, R.L. & McINTOSH, L. 1989a. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. Plant Physiol., 89: 1311-1317.
- ELTHON, T.E.; NICKELS, R.L. & McINTOSH, L. 1989b. Mitochondrial events during development of termogenesis in Sauromatum guttatum (Schott). Planta, 180: 82-89.

- ELZAM, O.E. & HODGES, T.K. 1968. Characterization of energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in maize mitochondria. Plant Physiol., 43: 1108-1114.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DA-SILVA; VERCESI, A.E. 1986. Inhibition of oxidative phosphorylation by  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Sr}^{2+}$ : a competition with  $\text{Mg}^{2+}$  for the formation of adenine nucleotide complexes. Biochim. Biophys. Acta, 852: 262-258.
- FERGUSON, S.J. 1985. Fully delocalised chemiosmotic or localised proton flow pathways in energy coupling ? A scrutiny of experimental evidence. Biochim. Biophys. Acta, 811: 47-95.
- FISKUM, G. 1985. Intracellular levels and distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in digitonin-permeabilized cells. Cell Calcium, 6: 25-37.
- FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. 1981. In: Cheung, W.Y. (ed.), Calcium and Cell Functions. Academic, New York, v.2, pp. 38-89.
- FONYÓ, A. 1979. Inhibitors of mitochondrial phosphate transport. Pharmac. Ther., 7: 637-645.
- FLUEGEL, M.J. & HANSON, J.B. 1981. Mechanisms of passive potassium influx in corn mitochondria. Plant Physiol., 68: 257-271.

- FRENCH, R.R.; GORE, M.G. & YORK, D.A. 1988. A study of GDP binding to purified thermogenin protein from brown adipose tissue. Biochem. J., 251: 385-389.
- FUTAI, M.; NOUMI, T. & MAEDA, M. 1989. ATP synthase (H<sup>+</sup>-ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. Annu. Rev. Biochem. 58: 111-136.
- GARLID, K.D. 1990. New insights into mechanisms of anion uniport through the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 1018: 151-154.
- GARLID, K.D. & BEAVIS, A.D. 1986. Evidence for the existence of an inner membrane channel in mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 853: 187-204.
- GIANNINI, J.L.; GILDENSOPH, L.H.; REYNOLDS-NIESMAN, I. & BRISKIN, D.P. 1987a. Calcium transport in sealed vesicles from red beet (Beta vulgaris L.) storage tissue. Characterization of a Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase associated with the endoplasmic reticulum. Plant. Physiol., 85: 1129-1136.
- GIANNINI, J.L.; RUIZ-CRISTIN, J. & BRISKIN, D.P. 1987b. Calcium transport in sealed vesicles from red beet (Beta vulgaris L.) storage tissue. II. Characterization of <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake into plasma membrane vesicles. Plant Physiol., 85: 1137-1142.



- GILROY, S.; HUGHES, W.A. & TREWAVAS, A.J. 1986. The measurement of intracellular calcium levels in protoplasts from higher plant cells. FEBS Lett., 199: 217-221.
- GILROY, S. BLOWERS, D.P. & TREWAVAS, A.J. 1987. Calcium: a regulation system emerges in plant cells. Development, 100: 181-184.
- GOCHMAN, N. & GILVEBER, H. 1970. Automated, simultaneous determination of calcium and magnesium by atomic absorption. Clin. Chem., 16: 229-234.
- GOMEZ-SILVA, B.; STERN, A.I.; SAIDHA, T. & SCHIFF, J.A. 1985. Oxidative phosphorylation coupled to respiration in highly purified intact Euglena mitochondria. J. Plant Physiol., 120: 431-440.
- GORNAL, A.G.; BARDWILL, C.J. & DAVID, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 177: 751.
- GREENAWALT, J.W.; ROSSI, C.S. & LEHNINGER, A.L. 1964. Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat-liver mitochondria. J. Cell Biol., 23: 21-38.
- GRINDEY, G.B. & NICHOL, C.A. 1970. Microprocedure for determination of pyrophosphate and orthophosphate. Anal. Biochem., 33: 114-119.

- GUNNING, B.E.S. & STEER, M.W. 1975. Ultrastructure and the Biology of Plant Cells. Edward Arnold, London.
- GUNTER, T.E. & PFEIFER, D.R. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Am. J. Physiol., 258: C755-C786.
- GUNTER, T.E.; CHACE, H.H.; PUSKIN, J.S. & GUNTER, K.K. 1983. Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. Biochemistry, 22: 6341-6351.
- HALL, J.L.; FLOWERS, T.J. & ROBERTS, R.M. 1982. Plant Cell Structure and Metabolism. Longman, New York, 2nd edition, 543p.
- HANSFORD, R.G. 1985. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. Rev. Physiol. Pharmacol., 102: 1-72.
- HANSFORD, R.G. & CASTRO, F. 1981. Effect of micromolar concentrations of free calcium ions on the reduction of heart mitochondrial NAD(P) by 2-oxoglutarate. Biochem. J., 198: 525-533.
- HANSFORD, R.G. & CASTRO, F. 1982. Intramitochondrial and extra-mitochondrial free calcium concentrations of suspensions of heart mitochondria with very low, plausibly physiological, contents of total calcium. J. Bioenerg. Biomemb., 14: 361-376.

- HANSON, J.B. & DAY, D.A. 1980. Plant Mitochondria. 1980. In: Tolbert (ed.), The Biochemistry of Plants. Academic, New York, v.1, pp. 315-357.
- HANSON, J.B. & HODGES, T.K. 1967. Energy-linked reaction of plant mitochondria. Curr. Top. Bioen., 2: 65-98.
- HANSON, M. 1985. Membrane transport systems of plant mitochondria. In: Douce, R. & Day, D.A. (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology. v.18, Springer-Verlag, Berlin, pp. 248-280.
- HARRIS, E.J. 1978. Importance of CO<sub>2</sub> for Ca<sup>2+</sup> uptake by some mitochondria. Nature, 274: 820-821.
- HARWOOD, J.L. 1985. Plant mitochondria lipids: structure, function and biosynthesis. In: Douce, R. & Day, D.A. (eds.) Encyclopedia of Plant Physiology. v.18. Springer-Verlag, Berlin, pp. 37-71.
- HATEFI, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu. Rev. Biochem., 54: 1015- 1069.
- HAWKESFORD, M.J. & LEAVER, C.J. 1987. Structure and biogenesis of the plant mitochondrial inner membrane. In: Moore, A.L. & Beechey, R.B. (eds.), Plant Mitochondria: Structural, Functional and Physiological Aspects. Plenum, New York, pp. 251-262.

- HEATON, G.M.; WAGENVOORD, R.J.; KEMP, A. & NICHOLLS, D.G. 1978. Brown-adipose-tissue mitochondria: Photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. Eur. J. Biochem., 82: 515-521.
- HEDRICH, R. & SCHROEDER, J.I. 1989. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 40: 539-569.
- HENRIKA-WAGNER, A.M.; GUDE, H.; MARISSSEN, N.; VANDER PLAS, L.H.W. & VERLEUR, J.D. 1986. Compartmentation of alternative oxidase in plant mitochondria. Plant Cell Physiol., 27 (3): 499-503.
- HENRY, M.F. & NINS, E.J. 1975. Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. Sub-Cell Biochem., 4: 1-65.
- HENSLEY, J.R. & HANSON, J.B. 1975. The action of valinomycin in uncoupling corn mitochondria. Plant Physiol., 56: 13-18.
- HEPLER, P.K. & WAINE, R.O. 1985. Calcium and plant development. Annu. Rev. Plant Physiol., 36: 391-439.
- HOLLOWAY, P.W. 1973. A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. Anal. Biochem., 53: 304-308.

- HOLMES, R.P. 1985. The influence of membrane lipids on the permeability of membrane to  $\text{Ca}^{2+}$ . In: Benga, G. (ed.), Structure and Properties of Cell Membranes. Boca Raton, v.2, pp. 53-76.
- HUQ, S. & PALMER, J.M. 1978. Oxidation of durohydroquinone via the cyanide-insensitive respiratory pathway in higher plant mitochondria. FEBS Lett., 92: 317-320.
- JENSEN, B.D.; GUNTER, K.K. & GUNTER, T.E. 1986. The efficiencies of the component steps of oxidative phosphorylation. II. Experimental determination of the efficiencies in mitochondria and examination of the equivalence of membrane potential and pH gradient in phosphorylation. Arch. Biochem. Biophys., 248 (1): 305-323.
- JEZEK, P. & GARLID, K.D. 1990. New substrates and competitive inhibitors of the  $\text{Cl}^-$  translocating pathway of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. J. Biol. Chem., 265 (31): 19303-19311.
- JEZEK, P.; HOUSTEK, J. & DRAHOTA, Z. 1988. Alkaline pH, membrane potential, and magnesium cations are negative modulators of purine nucleotide inhibition of  $\text{H}^+$  and  $\text{Cl}^-$  transport through the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. J. Bioenerg. Biomemb., 20 (5): 503-622.
- JUANG, R.; CHANG, Y.; SUNG, H. & SU, J. 1984. Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich. Anal. Biochem., 141: 348-350.

- JUNG, D.W. & BRIERLEY, G.P. 1979. Swelling and contraction of potato mitochondria. Plant Physiol., 64: 948-953.
- KAMO, N.; MURATSUGU, M.; HONGO, R. & KOBATAKE, J. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. J. Memb. Biol., 49: 105-121.
- KAPLAN, R.S. & PEDERSEN, P.L. 1983. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. Biochem. J., 212: 279-283.
- KATIYAR, S.S. & SHRAGO, E. 1989. Reconstitution of purified brown adipose tissue mitochondria uncoupling protein: Demonstration of separate identity of nucleotide binding and proton translocation sites by chemical probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2559-2562.
- KAUSS, H. 1985. Callose biosynthesis as a  $Ca^{2+}$ -regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. J. Cell Sci., 2: 89-103.
- KAUSS, H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol., 38: 47-72.

- KENEFIK, D.G. & HANSON, J.B. 1966. Contracted state as an energy source for  $\text{Ca}^{2+}$  binding and  $\text{Ca}^{2+}$  + inorganic phosphate accumulation by corn mitochondria. Plant Physiol., 41: 1601-1609.
- KLINGENBERG, M. 1987. Uncoupling protein, prototype of simple proton translocator: structure and function. In: Ozawa, T. & Papa, S. (eds.), Bioenergetics: Structure and function of energy transducing systems. Japan Sci. Soc. Press, Toquio, pp 3-17.
- KLINGENBERG, M. 1989. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 270: 1-14.
- KLINGENBERG, M. 1990. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. Trends Biochem. Sci., 15: 108-112.
- KLINGENBERG, M. & LIN, C. 1986. Isolation and hydrodynamic characterization of the uncoupling protein from brown adipose tissue. Methods Enzymol., 126: 490-498.
- KLINGENBERG, M. & WINKLER, E. 1986. Reconstitution of an  $\text{H}^+$  translocator, the "uncoupling protein" from brown adipose tissue mitochondria, in phospholip vesicles. Methods Enzymol., 127: 772-779.

- KLINGENBERG, M.; RICCIO, P. & AQUILA, H. 1978. Isolation of the ADP, ATP carrier as the carboxyatractylate-protein complex from mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 503: 193-210.
- KLINGENBERG, M.; HERLT, M. & WINKLER, E. 1986. Nucleotide binding assay for uncoupling protein from brown fat mitochondria. Methods Enzymol., 126: 498-504.
- KOEPPE, D. E. & SIEDOW, J. N. 1987. Mitochondrial electron transport: Chemiosmosis. In: Newmann, D. W. & Wilson, K. G. (eds.), Models in Plant Physiology and Biochemistry. v. I, CRC Press, Boca Raton, pp. 105-108.
- KOLBE, H. V. J.; COSTELLO, D.; WONG, A.; LU, R. C. & WOHLRAB, H. 1984. Mitochondrial phosphate transport. J. Biol. Chem., 259 (14): 9115-9120.
- KOLBE, H. V. J.; MENDE, P. & KADENBACH, B. 1982. The protein components of the isolated phosphate-transport system of mitochondria. Eur. J. Biochem., 128: 97-105.
- KREIMER, G.; MELKONIAN, M.; HOLTUM, J. A. M. & LATZKO, E. 1985. Characterization of calcium fluxes across the envelope of intact spinach chloroplasts. Planta, 166: 515-523.
- LAEMMLI, U. L. 1979. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.



- LAMBERS, H. 1980. The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plant. Plant Cell Physiol., 3: 293-303, 1980.
- LANCE, C.; CHAUVEAU, M. & DIZENGREMEL, P. 1985. The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria. In: Douce, R. & Day, D.A. (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology. v.18, Springer-Verlag, Berlin, pp. 207-247.
- LANCE, C. & RUSTIN, P. 1984. The central role of malate in plant metabolism. Physiol. Vég., 22: 625-641.
- LATIES, G.G. 1982. The cyanide-resistant, alternative path in higher plant respiration. Annu. Rev. Plant Physiol. 33: 519-555.
- LEHNINGER, A.L. 1970. Mitochondria and calcium ion transport: The fifth jubilee lecture. Biochem J., 199: 129-138.
- LEHNINGER, A.L. 1974. Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration coupled transport of calcium by mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 1520-1524.
- LEHNINGER, A.L.; CARAFOLI, E. & ROSSI, C.S. 1967. Energy linked ion movements in mitochondrial systems. Adv. Enzymol., 29: 259-320.

- Trasport and accumulation of calcium in mitochondria. Ann. N. Y. Acad. Sci., 307: 160-176.
- LIGETI, E. & FONYÓ, A. 1987. Mitochondrial phosphate carrier. Functional role of its SH-groups and interrelations within the carrier unit. Eur. J. Biochem., 167: 167-173.
- LIGETI, E. & FONYÓ, A. 1989. Phosphate transport protein of rat heart mitochondria: location of its SH-groups and exploration of their environment. Biochim. Biophys. Acta, 973: 170-175.
- LIN, C.S. & KLINGENBERG, M. 1980. Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. FEBS Lett., 113 (2): 299-303.
- LIN, C.S. & KLINGENBERG, M. 1982. Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria. Biochemistry, 21: 2950-2956.
- LIN, C.S.; HACKENBERG, H. & KLINGENBERG, M. 1980. The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study. FEBS Lett., 113 (2): 304-306.
- LOCKE, C.S.; RIAL, E. & NICHOLLS, D.G. 1982. The acute regulation of mitochondrial proton conductance in cells and mitochondria from the brown fat of cold-adapted and warm-adapted guinea pigs. Eur. J. Biochem. 129: 381-387.

- LOCKE, R.M.; RIAL, E.; SCOTT, I.D. & NICHOLLS, D.G. 1982. Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown-fat mitochondria. Eur. J. Biochem., 129: 373-380.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 65-275.
- LUVISETTO, S.; PIETROBON, D. & AZZONE, G.F. 1987. Uncoupling of oxidative phosphorylation. 1. Protonophoric effects account only partially for uncoupling. Biochemistry, 26: 7332-7338.
- LYR, H. & SCHEWE, T. 1975. On the mechanism of the cyanide-insensitive alternative pathway of respiration in fungi and higher plants. Acta Biol. Med. Ger., 34: 1631-1636.
- MacROBBIE, .E.A.C. 1989. Calcium influx at the plasmalemma of isolated guard cells of Commelina communis. Effects of abscisic acid. Planta, 178: 231-241.
- MADEIRA, V.M.C. 1975. A rapid and ultrasensitive method to measure Ca<sup>2+</sup> movements across biological membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 64: 870-876.
- MANDOLINO, G.; DE SANTIS, A. & MELANDRI, . 1983. Localized coupling in oxidative phosphorylation by mitochondria from Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus). Biochim. Biophys. Acta, 723: 428-439.

- MARMÉ, D. 1982. The role of  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin in plants. Physiol. Plant., 13: 37-40.
- MARMÉ, D. 1985. The role of calcium in the cellular regulation of plant metabolism. Physiol. Vég., 23(6): 945-953.
- MARTIN, W.H.; BEAVIS, A.D. & GARLID, K.D. 1984. Identification of an 82,000 dalton protein responsible for  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiport in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 258: 2062-2065.
- MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. 1985. Some characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in plant mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm., 129 (3): 943-948.
- MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G. & VERCESI, A.E. 1986. Characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by corn mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 850: 49-56.
- MCCORMAK, J.C. & DENTON, R.M. 1983.  $\text{Ca}^{2+}$  as a second messenger within mitochondria. Trends Biochem. Sci., 11: 258-262.
- MEEUSE, B.J.D. 1975. Thermogenic respiration in aroids. Annu. Rev. Plant Physiol., 26: 117-126.
- MEIJER, A.J. & VAN DAM, K. 1974. The metabolic significance of anion transport in mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 346: 213-244.

- MELA, L. 1969. Inhibition and activation of calcium effects of lanthanides and local anesthetic drugs. Biochemistry, 8: 2481-2486.
- MIERNYK, J.A. & RANDALL, D.D. 1987a. Some kinetic and regulatory properties of the Pea mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. Plant Physiol. 83: 306-310.
- MIERNYK, J.A. & RANDALL, D.D. 1987b. Some properties of Pea mitochondrial phospho-pyruvate dehydrogenase-phosphatase. Plant Physiol. 83: 311-315.
- MILLARD, D.L.; WISKISCH, J.T. & ROBERTSON, R.N. 1965. Ion uptake and phosphorylation in mitochondria: Effect of monovalent ions. Plant Physiol. 40: 1129-1135.
- MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191: 144-148, 1961.
- MITCHELL, P. 1969. Chemiosmotic coupling and energy transduction. In: Cole, A. (ed.), Theoretical and experimental biophysics. Dekker, New York, pp. 160-216.
- MITCHELL, P. 1976. Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by protocity. Biochem. Soc. Trans., 4: 399-430.
- MITCHELL, P. 1980. Protonmotive cytochrome system of mitochondria. Annu. Rev. Acad. Sci., 341: 564.

- MITCHELL, P. & MOYLE, J. 1969. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 7: 471-484.
- MOLLER, I.M. 1986. NADH dehydrogenases in plant mitochondria. Physiol. Plant., 67: 517-520.
- MOLLER, I.M. & LIN, W. 1986. Membrane-bound NAD(P)H oxidation in plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol., 37: 309-334.
- MOLLER, I.M. & PALMER, J.M. 1981. The inhibition of exogenous NAD(P)H oxidation in plant mitochondria by chelators and mersalyl as a function of pH. Physiol. Plant., 53: 413-420.
- MOLLER, I.M. & PALMER, J.M. 1982. Direct evidence for the presence of a rotenone-resistant NADH dehydrogenase on the inner surface of the inner membrane of plant mitochondria. Physiol. Plant., 54: 267-274.
- MONTAL, M. & MUELLER, P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 3561-3566.
- MOORE, C.L. 1971. Specific inhibition of mitochondrial  $Ca^{2+}$  transport by ruthenium red. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42: 298-305.

- MOORE, A.L. & AKERMAN, K.E.O. 1984. Calcium and plant organelles. Plant Cell Envir., 7: 423-429.
- MOORE, A.L. & RICH, P.R. 1985. Organization of the respiratory chain and oxidative phosphorylation. In: Douce, R. & Day, D.A. (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology. v.18, Springer-Verlag, Berlin, pp. 134-172.
- MORENO-SANCHEZ, R. 1983. Inhibition of oxidative phosphorylation by a  $Ca^{2+}$  induced diminution of the adenine nucleotide translocation. Biochim. Biophys. Acta, 724: 278-85.
- MOYLE, J. & MITCHELL, P. 1977. The lanthanide-sensitive calcium phosphate porter of rat liver mitochondria. FEBS Lett., 77 (2): 136-140.
- MURPHY, M.P. 1989. Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, 977: 123-141.
- MUSGRAVE, M.E. & SIEDOW, J.N. 1987. The cyanide-resistant respiratory pathway. In: Newman, D.W. & Wilson, K.G. (eds.), Models in Plant Physiology and Biochemistry. v.1, CRC Press, Boca Raton, pp. 109-112.
- NEDERGAARD, J. 1984.  $Na^+$ -dependent regulation of intra-mitochondrial  $Ca^{2+}$  by rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 144: 159-168.

- NEDERGARRD, J. & LINDBERG, O. 1979. Norepinephrine-stimulated fatty-acid release and oxygen consumption in isolated hamster brown-fat cells. Eur. J. Biochem., 95: 139-145.
- NEUBURGER, M. 1985. Preparation of plant mitochondria, criteria for assessment of mitochondrial integrity and purity, survival in vitro. In: Douce, R. & Day, D.A. (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology. v.18, Springer-Verlag, Berlin, pp. 7-24.
- NEUBURGER, M. & DOUCE, R. 1983. Slow passive diffusion of NAD<sup>+</sup> between intact isolated plant mitochondria and suspending medium. Biochem. J., 216: 443-450.
- NEUBURGER, M.; JOURNET, E.P.; CARDE, J.P. & DOUCE, R. 1982. Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. Arch. Biochem. Biophys., 217: 312-323.
- NICHOLLS, D.G. 1974a. Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The control of respiration and the electrochemical potential gradient by possible physiological effectors of the proton conductance of inner membrane. Eur. J. Biochem., 49: 573-583.
- NICHOLLS, D.G. 1974b. Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The chloride permeability of the inner membrane under respiring conditions, the influence of purine nucleotides. Eur. J. Biochem., 49: 585-593.



- NICHOLLS,D.G. 1976. Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. Eur. J. Biochem., 62: 223-228.
- NICHOLLS,D.G. 1977. The effective proton conductance of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue: dependency of proton electrochemical gradient. Eur. J. Biochem., 77: 349-356.
- NICHOLLS,D.G. 1978. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. Biochem. J., 176: 464-474.
- NICHOLLS,D.G. 1979. Brown adipose tissue mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 549: 1-29.
- NICHOLLS,D.G. 1982. Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory. Academic Press, New York, 190 p.
- NICHOLLS,D.G. & AKERMAN,K. 1982. Mitochondrial calcium transport. Biochim. Biophys. Acta, 683: 57-88.
- NICHOLLS,D.G. & LINDBERG,O. 1973. Brown adipose tissue mitochondria: the influence of albumin and nucleotides on passive permeabilities. Eur. J. Biochem., 37: 523-530.
- NICHOLLS,D.G. & LOCKE,R.M. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. Physiol. Rev., 64: 1-64.

- NICHOLLS, D.G. & RIAL, E. 1984. Brown fat mitochondria. Trends Biochem. Sci. 9: 489-491.
- NICHOLLS, D.G. & RIAL, E. 1988. The function of the uncoupling protein in the brown fat cell. In: Lemasters, J.J.; Hackenbrock, R.; Thurman, R.G. & Westerhoff, H.V. (eds), Integration of mitochondrial function. Plenum Press, New York, pp. 517-526.
- NORLING, B.; HAMASUR, B. & GLASER, E. 1987. Cross-reconstitution of isolated  $F_1$ -ATPase from potato tuber mitochondria with  $F_1$ -depleted beef heart and yeast submitochondrial particles. FEBS Lett., 223 (2): 309-314.
- PALMER, J.M. 1976. The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. Annu. Rev. Plant Physiol., 27: 133-157.
- PALMER, J.M. & MOLLER, I.M. 1982. Regulation of NAD(P)H dehydrogenases in plant mitochondria. Trends Biochem. Sci., 7: 258-261.
- PALMER, J.M. & WARD, J.A. 1985. The oxidation of NADH by plant mitochondria. In: Douce, R. & Day, D.A. (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology. v.18, Springer-Verlag, Berlin, pp. 173-201.
- PEDERSEN, J.I. 1970. Coupled endogenous respiration in brown adipose tissue mitochondria. Eur. J. Biochem., 16: 12-18.

- PERDUE, D.O.; LAVAVRE, A.K. & LEOPOLD, A.C. 1988. Calcium in the regulation of gravitropism by light. Plant Physiol., 86: 1276-1280.
- PETIT, P. & CANTREL, C. 1986. Mitochondria from Zea mays leaf tissues: differentiation of carbon assimilation and photorespiratory activity between mesophyll and bundle sheath cells. Physiol. Plant., 67: 442-446.
- PEVERLY, J.H.; MILLER, R.J.; MALONE, C.P. & KOEPPE, D.E. 1974. Ultrastructural evidence for calcium phosphate deposition by isolated corn shoot mitochondria. Plant Physiol., 54: 408-411.
- POOVAIAH, B.W.; REDDY, A.S.N. & McFADDEN, J.J. 1987. Calcium messenger system: Role of protein phosphorylation and inositol bisphospholipids. Physiol. Plant., 69: 569-573.
- POOVAIAH, B.W.; FRIEDMANN, M.; REDDY, A.S.N. & RHEE, J.K. 1988. Auxin-induced delay of abscission: The involvement of calcium ions and protein phosphorylation in bean explants. Physiol. Plant., 73 (3): 354-359.
- PORTZEHL, H.; CALDWELL, P.C. & RUEGG, J.G. 1964. The dependence of contraction and relaxation of muscle fibers from the crab Maia squinado on the internal concentration of free calcium ions. Biochim. Biophys. Acta, 79: 581-591.
- PRESSMAN, B.C. 1976. Biological applications of ionophores. Annu. Rev. Biochem., 45: 501-529.

- PUSKIN, J.S.; GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K. & RUSSEL, P.R. 1976. Evidence for more than one calcium transport mechanism in mitochondria. Biochemistry, 15: 3834-3842.
- RAFAEL, J. & HELDT, H.W. 1976. Binding of guanine nucleotides to the surface of the inner membrane of guinea-pig brown fat mitochondria in correlation with the thermogenic capacity of the tissue. FEBS Lett., 63: 304-308.
- RASMUSSEN, H. 1989. The cycling of calcium as an intracellular messenger. Sci. Am.: 44-51.
- RAWN, J.D. 1989. Biochemistry. Neil Patterson Pub., Burlington, pp. 237-262.
- REED, K.D. & BYGRAVE, F.L. 1974. The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanids and ruthenium red. Biochem. J., 140: 143-155.
- REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A.L. 1977. Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 77: 1273-1279.
- RIAL, E. & NICHOLLS, D.G. 1983. The regulation of the proton conductance of brown fat mitochondria. Identification of functional and non-functional nucleotide-binding sites. FEBS Lett. 161 (2): 284-288, 1983.

- RIAL, E.; POUSTIE, A. & NICHOLLS, D.G. 1983. Brown-adipose-tissue mitochondria: the regulation of the 32 000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. Eur. J. Biochem., 137: 197-203.
- RICCIO, P.; AQUILA, H. & KLINGENBERG, M. 1975. Purification of the carboxyatractylate binding protein from mitochondria. FEBS Lett., 56 (1): 133-138.
- RICH, P.E. 1978. Quinol oxidation in Arum maculatum mitochondria and its application to the assay, solubilisation and partial purification of the alternative oxidase. FEBS Lett., 96: 252-256.
- RICQUIER, D.; GERVAIS, C.; KADER, J.C. & HEMON, P. 1979. Partial purification by guanosine-5'-diphosphate-agarose affinity chromatography of the 32 000 molecular weight polypeptide from mitochondria of brown adipose tissue. FEBS Lett., 101 (1): 35-38.
- ROMAN, I.; CLARK, A. & SWANSON, P.D. 1981. The interaction of calcium transport and ADP phosphorylation in brain mitochondria. Membr. Biochem., 4: 1-9.
- ROSSI, C.S. & LEHNINGER, A.L. 1964. Stoichiometry of respiratory stimulation of calcium and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 239: 3971-3980.

- ROTTENBERG, H. 1983. Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria by general anesthetics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 (11): 3313-3317.
- RUGOLO, M.; PISTOCCHI, R. & ZANNONI, D. 1990. Calcium ion transport in higher plant mitochondria (Helianthus tuberosus). Physiol. Plant., 79: 297-302.
- RUSTIN, P. & LANCE, C. 1989. The divalent cation pump and its role in the regulation of malic enzyme activity in purified mitochondria from potato tuber. Plant Cell Physiol., 30 (4): 505-512.
- RUSTIN, P. & VALAT, M. 1986. The control of malate dehydrogenase activity by adenine nucleotides in purified potato tuber (Solanum tuberosum L.) mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 247 (1): 62-67.
- RUSTIN, P.; MOREAU, F. & LANCE, C. 1980. Malate oxidation in plant mitochondria via malic enzyme and the cyanide-insensitive electron transport pathway. Plant Physiol., 66: 457-462.
- SARIS, N.E.L. 1963. The calcium pump in mitochondria. Comments. Phys. Natl. Soc. Sci. Finn. (suppl), 28: 1-59.
- SARIS, N.E.L. & AKERMAN, K.E.O. 1980. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. Curr. Top. Bioenerg., 10: 103-171.

- SCARPA, A. & AZZONE, G.F. 1970. The mechanism of ion translocation in mitochondria. -coupling of  $K^+$  efflux with  $Ca^{2+}$  uptake. Eur. J. Biochem., 12: 328-335.
- SCHNEIDER, W.C. & HOGEBOM, G.H. 1950. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome in rat liver homogenates. J. Biol. Chem., 183: 123-128.
- SCHONFELD, P. 1990. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? FEBS Lett., 264 (2): 266-248.
- SELWIN, M.J.; DAWSON, A.P. & DUNNETT, S.J. 1970. Calcium transport in mitochondria. FEBS Lett., 10: 1-5.
- SENIOR, A.E. 1988. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. Physiol. Rev., 68 (1): 177-231.
- SHEARS, S.B. & KIRK, C.J. 1984. Characterization of a rapid cellular fractionation technique for hepatocytes. Application in the measurement of mitochondrial potential "in situ". Biochem. J., 219: 375-382.
- SIEDOW, J.N. & BERTHOLD, D.A. 1986. The alternative oxidase: A cyanide-resistant respiratory pathway in higher plants. Physiol. Plant. 66: 569-573.

- SLATER, E.C. 1987. The mechanism of the conservation of energy by biological oxidations. Eur. J. Biochem., 166: 489-504.
- SLATER, E.C.; BERDEN, J.A. & HERWIJER, M.A. 1985. A hypothesis for the mechanism of respiratory-chain phosphorylation not involving the electrochemical gradient of protons as obligatory intermediate. Biochim. Biophys. Acta, 811: 217-231.
- SMITH, R.E.; ROBERTS, J.C. & HITTELMAN, K.J. 1966. Non-phosphorylating respiration of mitochondria from brown adipose tissue of rats. Science, 154: 653-654.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V.; SHUMAN, H.; ENDO, M. & INESI, G. 1981. Mitochondria do not accumulate significant  $Ca^{2+}$  concentrations in normal cells. In: Bonner, W. & Peterlick, M. (eds.), Calcium and phosphate transport across biomembranes. Academic, New York, p. 87-93.
- SORDHAL, L.A. 1974. Effects of magnesium, ruthenium red and antibiotic ionophore A-23187 on initial rates of calcium uptake and release by heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 167: 104-115.
- STOREY, B.T. 1980. Electron transport and energy coupling in plant mitochondria. In: Davies, D.D. (ed.), The Biochemistry of Plants. v.II, Metabolism and Respiration, Academic, New York, pp. 125-195.



- STRIELEMANN, P.J.; SCHALINSKE, K.L. & SHRAGO, E. 1985a. Fatty acid activation of the reconstituted brown adipose tissue mitochondria uncoupling protein. J. Biol. Chem., 260 (25): 13402-13405.
- STRIELEMANN, P.J.; SCHALINSKE, K.L. & SHRAGO, E. 1985b. Partial purification and functional reconstitution of GDP sensitive brown adipose tissue mitochondria uncoupling protein using octyl glucoside. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127 (2): 509-516.
- TOLBERT, N.E. 1980. Photorespiration. In: Davies, D.D. (ed.), The biochemistry of plants. v.II, Metabolism and respiration. Academic, New York, pp. 487-523.
- TSIEN, R.I. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. Nature, 290: 527.
- VAINIO, H.; MELA, L. & CHANCE, B. 1970. Energy dependent bivalent cation transport in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 12: 387-391.
- VASINGTON, F.D. & MURPHY, J.V. 1962.  $Ca^{2+}$  uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation J. Biol. Chem., 237: 2670-2676, 1962.

- VASINGTON, F.D.; GAZZOTI, O.; TIOZZO, R. & CARAFOLI, E. 1972. The effect of ruthenium red on  $\text{Ca}^{2+}$  transport and respiration in rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 256 (1): 43-54.
- VERCESI, A.E. 1984a. Dissociation of  $\text{NAD(P)}^+$  stimulated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from swelling and membrane damage. Arch. Biochem. Biophys., 232 (1): 86-91.
- VERCESI, A.E. 1984b. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport. Characteristics of  $\text{NAD(P)}^+$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  efflux. Arq. Biol. Tecnol., 27: 477.
- VERCESI, A.E.; REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A.L. 1978. Stoichiometry of  $\text{H}^+$  ejection and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem., 253 (18): 6379-6385.
- VERCESI, A.E.; PEREIRA DA SILVA, L.; MARTINS, I.S., CARNIERI, E. G.S.; BERNARDES, C.F. & FAGIAN, M.M. 1989.  $\text{Ca}^{2+}$  transport by liver and plant mitochondria. Aspects linked to the biological role. In: Fiskum, G. (ed.), Cell Calcium Metabolism. Plenum, New York, pp. 103-111.
- VERCESI, A.E.; MACEDO, D.V.; LIMA, S.A.; GADELHA, F.R. & DOCAMPO, R. 1990.  $\text{Ca}^{2+}$  transport in digitonin-permeabilized trypanosomatides. Mol. Biochem. Parasitol., 42: 119-124.

- VILLALOBO, A. & LEHNINGER, A.L. 1980. Inhibition of oxidative phosphorylation in ascites tumor mitochondria and cells by intramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ . J. Biol. Chem., 255: 2457-2464.
- WANG, C.S. & SMITH, R.L. 1975. Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100. Anal. Biochem., 63: 414-417.
- WESTERHOFF, H.V.; MELANDRI, B.A.; VENTUROLI, G.; AZZONE, G.F. & KELL, D.B. 1984. Mosaic protonic coupling hypothesis for free energy transduction. Biochim. Biophys. Acta. 768: 257-292.
- WHITEHOUSE, D.G.; FRICAUD, A. & MOORE, A.L. 1989. Role of nonohmicity in the regulation of electron transport in plant mitochondria. Plant Physiol., 91: 487-492.
- WILLIANSO, R.E. & ASHLEY, C.C. 1982. Free  $\text{Ca}^{2+}$  and cytoplasmic streaming in the alga Chara. Nature, 296: 647-651, 1982.
- WILSON, D.E. & MINTON, G.A. 1974. The comparative uptake of  $\text{Ba}^{2+}$  and other alkaline earth metals by plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 333: 22-27.
- WISKICH, J.T. 1977. Mitochondrial metabolite transport. Annu. Rev. Plant Physiol., 28: 45-69.

- WISKICH, J.T. & DRY, I.B. 1985. The tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. In : Douce, R. & Day, D.A. (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology. vol. 18, Springer-Verlag, Berlin, pp. 281-313.
- WISKICH, J.T.; MORTON, R.K. & ROBERTSON, R.N. 1960. The respiratory chain of beetroot mitochondria. Aust. J. Biol. Sci., 13: 109-122.
- WOHLRAB, H. 1980. Purification of a reconstitutively active mitochondrial phosphate transport protein. J. Biol. Chem., 110: 8170-8173.
- WOHLRAB, H. 1986. Molecular aspects of inorganic phosphate transport protein. Biochim. Biophys. Acta, 853: 115-134.
- WOHLRAB, H. & FLOWERS, N. 1982. pH gradient-dependent phosphate transport catalyzed by the purified mitochondrial phosphate transport protein. J. Biol. Chem., 257: 28-31.
- WOHLRAB, H.; COLLINS, A. & COSTELLO, D. 1984. Purified mitochondrial phosphate transport protein. Improved proteoliposomes and some properties of protein sulfhydryl groups. Biochemistry, 23: 1057-1064.
- WOJTCZAK, L. 1976. Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport and energy-coupling processes. J. Bioenerg. Biomemb., 8: 293-311.

WOJTCZAK, L. & WOJTCZAK, A.B. 1960. Uncoupling of oxidative phosphorylation and inhibition of ATP-Pi exchange by a substance of insect mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 39: 277-286.

ZOGLOWEK, C.; KROMER, S. & HELDT, H.W. 1988. Oxaloacetate and malate transport of plant mitochondria. Plant Physiol. 87: 109-115.