

HELENA MARIA FERREIRA LEITE

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
HELENA MARIA FERREIRA
LEITE
e aprovada pela Comissão Julgadora.

A. M. V.
21/01/93

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE 35 KDa
ISOLADA DE MITOCÔNDRIAS DE BATATA COM
POSSÍVEL FUNÇÃO TERMOGÊNICA

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, UNICAMP, para obtenção
do título de mestre em Bioquímica.

ORIENTADOR Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi

CAMPINAS, 1992

L536c

18860/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Ao professor Anibal Eugênio Vercesi por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

A professora Ione Salgado Martins por ter me aceito inicialmente como sua orientada.

Ao Dr. Marco Aurélio, pelo apoio inicial e fundamental para a realização deste trabalho.

Aos professores Hernan Chaimovich, Iolanda Midea Cuccovia, Pedro Araújo e Mário Politti pela oportunidade e orientação nos experimentos de reconstituição das proteínas, realizados no IQUSP.

A Profa. Wirla e a Profa. Maria Arita pela orientação nos experimentos com anticorpos.

A Profa. Edwiges Hoffmann, coordenadora do projeto RHAE, pela sua colaboração.

A todos os professores que direta ou indiretamente, me ajudaram durante mais esta etapa. A Profa. Nilce, à Satie e à Arita pelas críticas e sugestões a este trabalho.

A Regina Célia Rosseto pelo apoio técnico e ao pessoal da secretaria pela atenção dispensada.

Aos amigos que aqui fiz, que me apoiaram e estimularam para a conclusão deste trabalho: Sônia, Ana Lia, Lúcia, Márcia, Mariza, Ana Célia, Fátima e todos os outros. À Celene por ceder mitocôndrias de *T. cruzi* para alguns experimentos. Um agradecimento, em especial a Valderez, por sua amizade e pela imensa ajuda na redação final deste trabalho.

A todo o pessoal da USP, que se tornaram amigos queridos: Márcia, Palmira, Ana Paula, Fábio, T.C., Cláudia, Catarina, Xud's e todos os outros. Um agradecimento especial à Palmira e à Cláudia por realizarem as leituras de espalhamento de luz.

As amigas Mara, Fabricia e Rezende que acompanharam de perto todas as fases deste trabalho.

A minha família, meu pai e irmãos pelo apoio e incentivo, em especial à Bia e a Lu, pela convivência e compreensão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida, em especial ao projeto RHAE, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

"...Tanto os meus fracassos quanto minhas vitórias duraram pouco. Não há nenhuma vitória profissional ou amorosa que garanta que a vida finalmente se arranjou e nenhuma derrota que seja uma condenação final. As vitórias se desfazem, como castelos de areia atingidos pelas ondas, e as derrotas se transformam em momentos que prenunciam um começo novo. Enquanto a morte não nos tocar, pois só ela é definitiva, a sabedoria nos diz que vivemos sempre à mercê do imprevisível dos acidentes. "Se é bom ou se é mau só o futuro dirá..."

Rubem Alves

ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina-5'-fosfato
AMP-PNP	- Adenil-imido-difosfato
Ap5A	- Diadenosina penta-fosfato
ATP	- Adenosina-5'-trifosfato
BSA	- Albumina de soro bovino
CAT	- Carboxiatractilato
CMC	- Concentração micelar crítica
CR	- Controle respiratório
DCCD	- N, N'- dicyclohexylcarbodiimide
DNA	- Ácido desoxi-ribonucléico
DTT	- Ditionitrosol
EDTA	- Ácido etileno diamino tetra acético
EGTA	- Ácido etileno glicol-bis-(β -aminoetil eter) N N' -tetra acético
FCCP	- p-trifluoro-metoxicarbonil cianeto fenil hidrazina
F ₀	- Porção da ATP-sintetase sensível à oligomicina
F ₁	- Porção catalítica da ATP-sintetase
GDP	- Guanosina-5'-difosfato
GTP	- Guanosina-5'-trifosfato
HEPES	- Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico
HTP	- Hidroxiapatita
Ig	- Imunoglobulina
IMAC	- inner membrane anion channel

KDa	- Quilo -dalton
MBa	- Mitocôndrias de batata
MBe	- Mitocôndrias de beterraba
MFig	- Mitocôndrias de fígado de rato
MM	- Mitocôndrias de milho
MES	- Ácido morfolino-etano-sulfônico
MOPS	- Ácido morfolino-propano-sulfônico
NEM	- N' ethylmaleimide
Pi	- Fosfato inorgânico
PIMAC	- Plant inner membrane anion channel
POPOP	- 1,4-bis-(5-fenil oxazol-2)-benzeno
PPO	- 2,5-difenil oxazol
SDS	- Dodecil-sulfato de sódio
SUC	- Succinato
TES	- N-[Tris (hidroxymethyl)-methyl]-2 amino ethanesulfonic acid
TPB ⁻	- tetrafenilborato
TPP ⁺	- Tetrafenilfosfônio
TRIS	- Tris (hidroximetil) aminometano
UCP	- Proteína desacopladora
VAL	- Valinomicina
ΔpH	- Gradiente químico de prótons
$\Delta \mu H^+$	- Gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta \psi$	- Potencial elétrico de membrana

ÍNDICE

1.0. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Membranas biológicas.....	01
1.1.1. Membranas mitocondriais- componentes lipídicos...03	
1.1.2. Membranas mitocondriais- componentes proteicos...04	
1.2. Tecido Adiposo Marron.....	08
1.3. Sistemas Artificiais.....	13
2.0. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1. Isolamento de mitocôndrias.....	17
2.1.1. Isolamento de mitocôndrias de batata.....	17
2.1.2. Isolamento de mitocôndrias de beterraba.....	18
2.1.3. Isolamento de mitocôndrias de milho.....	18
2.1.4. Isolamento de mitocôndrias de feijão.....	19
2.1.5. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	20
2.1.6. Isolamento de mitocôndrias de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	20
2.1.7. Isolamento de mitocôndrias de tecido adiposo marron.....	21
2.2. Dosagem de Proteína mitocondrial.....	22
2.3. Ligação de nucleotídeos em mitocôndrias de fígado de rato e de tubérculos de batata.....	22
2.4. Determinação do Consumo de Oxigênio.....	24
2.5. Isolamento de uma proteína de mitocôndrias de tubérculos de batata e da UCP de tecido adiposo marron.....	24
2.6. Eletroforese em Gel SDS-poliacrilamida.....	25
2.7. Avaliação do potencial elétrico de membrana.....	27

2.8. Obtenção do soro de coelho anti-proteína de mitocôndrias de batata.....	30
2.9. Western Blotting.....	31
2.10. Retirada de Triton X-100 das amostras de proteínas e troca por octyl glucoside.	32
2.11. Reconstituição das proteínas isoladas em vesículas formadas por diálise.....	32
2.12. Preparação das vesículas por fase reversa.....	33
2.13. Permeabilidade à prótons.....	33
2.14. Técnica de espalhamento de luz.....	34
3.0. RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO.....	36
3.1. Efeito de nucleotídeos de purina à mitocôndrias de fígado e de batata.....	36
3.2. Efeito de BSA e nucleotídeos de purina sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) em mitocôndrias de diversas origens....	43
3.3. Isolamento de uma proteína de mitocôndrias de tubérculos de batata com possível função desacopladora e obtenção de anticorpos.....	48
3.4. Reconstituição da proteína isolada de mitocôndrias de tubérculos de batata e a UCP isolada de tecido adiposo marrom em sistemas artificiais.....	51
4.0. DISCUSSÃO.....	67
5.0. RESUMO.....	76
6.0. SUMMARY.....	78
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1.0. INTRODUÇÃO

Estudos preliminares (SILVA, M.A.P., 1991) feitos com mitocôndrias intactas de tubérculos de batata, sugeriram a existência de uma proteína, nestas mitocôndrias, com funções similares às da proteína desacopladora (UCP), encontrada em mitocôndrias de tecido adiposo marrom. (RICQUIER, *et al*, 1979 ; LIN & KLINBENBERG, 1982).

Nesta introdução serão abordados aspectos relacionados às membranas biológicas, em especial às membranas mitocôndriais quanto aos seus componentes lipídicos e proteicos e uma descrição mais detalhada sobre mitocôndrias de tecido adiposo marrom e a proteína desacopladora, (UCP). Acrescentamos uma revisão sobre o uso de sistemas artificiais, mostrando a utilidade do mesmo como modelo para estudos de fenômenos biológicos.

1.1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Todas as membranas biológicas consistem de uma camada dupla de moléculas lipídicas onde várias proteínas de membrana estão embebidas. A bicamada lipídica é fluida, com moléculas lipídicas

individuais capazes de difundir rapidamente dentro da própria monocamada onde se encontram. O modelo mosaico fluido para membranas biológicas proposto por SINGER & NICOLSON (1972) propõe um arranjo dos fosfolípidios em bicamadas onde proteínas estruturais ou funcionais participam deste complexo. A composição lipídica e a presença de determinadas proteínas caracterizam as diferentes membranas biológicas (DAUM, 1985).

Os lípidios constituintes das membranas são moléculas anfipáticas que espontaneamente formam bicamadas quando em contato com meio aquoso. Há três classes de lípidios, que normalmente formam as bicamadas: fosfolípidios, colesterol e glicolípidios. A bicamada lipídica serve como solvente para proteína de membranas (ALBERTS, *et al.*, 1983). As membranas biológicas definem compartimentos intracelulares bem como a comunicação entre eles. Elas são mais que uma simples barreira, funcionam como filtro de alta seletividade que mantém diferentes concentrações de íons de cada lado da membrana, controlando o fluxo livre de íons. A permeabilidade das membranas biológicas observada é devida a presença de canais proteicos que permitem o fluxo de íons através da bicamada lipídica essencialmente impermeável. DEAMER, (1982) fez um estudo comparativo sobre permeabilidade a H^+ por diferentes membranas biológicas e concluiu que a bicamada lipídica possui permeabilidade intrínseca equivalente a 10^{-3} cm/segundo a prótons maior que para outros íons. Mesmo assim, a membrana funciona como barreira para o fluxo destes íons,

pois consegue manter o gradiente eletroquímico de prótons transmembrana.

Numa extensa revisão, HOCH (1992) analisou o papel individual dos lipídios constituintes de biomembranas, em particular da cardiolipina. A cardiolipina é um fosfoglicerídeo "duplo" encontrado em grandes quantidades na membrana interna mitocondrial. Este autor verificou o envolvimento da mesma nos mecanismos de permeabilidade a H^+ , suas interações com proteínas, a qual orienta o posicionamento das mesmas nas membranas e as condições em que a composição lipídica pode ser alterada.

1.1.1. MEMBRANAS MITOCONDRIAIS

-componentes lipídicos

As mitocôndrias que são organelas parcialmente autônomas (pois contém espécies únicas de DNA e RNA e são capazes de sintetizar aproximadamente 10 % de sua própria massa proteica) possuem duas membranas, uma interna e outra externa. Embora estas membranas estejam em íntimo contato, elas diferem tanto em composição lipídica e proteica como nas suas funções (DAUM, 1985). A função bioquímica da mitocôndria é fortemente dependente dos lipídios constituintes de suas membranas, especialmente os

fosfolipídios, que influem diretamente na estrutura e estabilidade destas membranas, interagindo com as proteínas presentes. A composição lipídica das membranas mitocondriais (animais e vegetais) apresenta alta porcentagem de cardiolipina (18%), fosfatidilcolina (40%), fosfatidiletanolamina (30%) e pequenas quantidades de esteróis e esfingolipídios (DAUM, 1985). As mitocôndrias vegetais, em particular, possuem algumas classes de esteróis livres, esterificados e glicosilados (DUPERON, *et al*, 1975). Os lipídios constituintes das membranas mitocondriais além de possuir funções estruturais, influenciam consideravelmente as proteínas de membranas, como também a estabilidade e o comportamento osmótico da mitocôndria, sua atividade respiratória, a produção de energia, sua permeabilidade entre outros aspectos (DAUM, 1985).

1.1.2. MEMBRANAS MITOCONDRIAIS

-componentes proteicos

A membrana interna mitocondrial possui, no mínimo doze diferentes proteínas carreadoras envolvidas no transporte de ânions e prótons. (LA NOUE, 1979). O mecanismo de translocação de íons através de carreadores e canais é uma questão fundamental em bioquímica.

Um grupo particular e diversificado de carreadores de substratos é encontrado na membrana interna mitocondrial. Estes catalisam o intenso fluxo de solutos do citosol para a matriz mitocondrial e vice-versa. Podemos diferenciar dois grupos de carreadores de solutos em mitocôndrias: aqueles que estão envolvidos com a transferência de metabólitos e aqueles relacionados com a transferência de energia. Este segundo grupo compreende três carreadores principais: o transportador de ADP/ATP; o transportador de Pi e o transportador de H^+ . As funções dos carreadores de Pi e de ADP/ATP no tráfico de energia em células eucariontes são bem conhecidas. Eles suprem o citosol com o ATP gerado intramitocondrialmente a partir de Pi e ADP provenientes do citosol (NICHOLLS & LOCKE, 1984). Em outras palavras, esses carreadores são responsáveis pelo transporte de ADP e Pi para a mitocôndria onde ocorrerá a síntese de ATP. A proteína desacopladora, (UCP), encontrada em mitocôndrias de tecido adiposo marrom, tem uma função contrária aos translocadores redox de H^+ responsáveis pela conversão de energia de oxido redução em potencial eletroquímico de prótons. Esta proteína permite a dissipação deste potencial sob a forma de calor, transportando H^+ de volta para o interior da mitocôndria. (AQUILA, *et al*, 1987). Similaridades como peso molecular entre a proteína desacopladora de tecido adiposo marrom (UCP), 32.000; o carreador ATP-ADP, 30.000; o transportador de fosfato, 33.000, a maneira como estas proteínas são extraídas (exclusão em hidroxiapatita na presença de detergentes não iônicos) bem como a

existência de domínios funcionalmente comuns sugerem que elas devam relacionar-se evolutivamente (AQUILA, *et al*, 1987; RUNSWIRCH, *et al*, 1987; KLINGENBERG, 1990). Têm sido proposto que carreadores mitocondriais façam parte de uma família de proteínas, geneticamente relacionadas. As estruturas primárias do carreador de fosfato, carreador ADP-ATP e a UCP revelam que cada uma tem domínios homólogos com 100 resíduos positivamente carregados (AQUILA, *et al*, 1987). Cada domínio compreende duas seções homólogas de α -hélice separadas por um segmento hidrofílico (RUNSWICK, *et al*, 1987). Todas estas proteínas citadas são funcionais na forma dimérica e funcionam através de um mecanismo que envolve H^+ -ânion cotransporte, exceto a proteína desacopladora (UCP) (KLINGENBERG, 1990). Estudos recentes feitos por WIESENBERGER, *et al* (1991), com genes de *Saccharomyces cerevisiae* evidenciaram a presença de mais duas proteínas pertencentes a esta família, produtos dos genes MRS3 e MRS4 estudados. Estas proteínas se localizariam na membrana mitocondrial interna, e teriam função carreadora para substratos que ainda não foram identificados.

O mecanismo de transporte de ânions e prótons é de fundamental importância para a regulação do volume mitocondrial. Desde os primeiros estudos com mitocôndrias isoladas, elas se mostraram como perfeitos osmômetros. A regulação do volume mitocondrial ocorre pelo controle do fluxo de sais através da membrana interna. A respiração mitocondrial pode direcionar o

influxo e o efluxo de sais por vias eletroforéticas e/ou eletroneutras. O grupo de carreadores envolvidos com transporte de ânions é descrito a seguir com maiores detalhes.

Mitocôndrias normalmente exibem baixa permeabilidade eletroforética para ânions fisiologicamente importantes como cloreto, bicarbonato, fosfato, succinato, citrato, entre outros. Numa extensa revisão sobre mecanismos de transporte de ânions por mitocôndrias de fígado de rato e coração de boi, GARLID & BEAVIS (1986), melhor caracterizaram a existência de uma proteína integral de membrana interna, a qual é capaz de transportar ânions por mecanismos eletroforéticos. Esta proteína funciona como canal seletivo para ânions, chamado por estes autores de IMAC (inner membrane anion channel), o que significa canal aniônico presente na membrana interna. Este canal é inibido fisiologicamente por prótons, cálcio e magnésio endógenos (BEAVIS & GARLID, 1983). Este canal é também inibido reversivelmente por quinina (base hidrofóbica) e irreversivelmente por DCCD (N,N'- dicyclohexylcarbodiimide), um agente alquilante não seletivo, que ataca grupos carboxyl, sulfidryl e fenólicos. Estes autores propõe que o canal aniônico está localizado na membrana interna mitocondrial e que é formado por proteínas. Este canal teria basicamente três funções fisiológicas: possibilitar à mitocôndria recuperar seu volume normal após um inchamento patológico; regular possíveis ciclos termogênicos e controlar a dissipação de energia (GARLID & BEAVIS, 1986). A

existência deste canal ânion seletivo foi sugerida por BEAVIS & GARLID (1983) após análise do comportamento mitocondrial quanto ao seu inchamento e contração, onde se observou uma via de transporte para ânions monovalentes, sensível a presença de Mg^{++} e dependente de pH. Experimentos realizados com mitocôndrias incubadas *in vitro* na presença de agentes alquilantes (N' ethylmaleimide) e agentes mercuriais (mersalyl), indicaram reação destes compostos com o canal aniônico (IMAC) num sítio comum. A ligação destes compostos interferiram com a regulação deste canal por H^+ , Mg^+ e propanolol (BEAVIS, 1991).

BEAVIS & VERCESI, (1992), demonstraram a existência de um canal aniônico em mitocôndrias isoladas de batata. Eles verificaram que estas mitocôndrias possuem um canal aniônico semelhante ao IMAC encontrado em mitocôndrias animais, porém com algumas propriedades diferentes. A principal diferença é a ausência de inibição do canal vegetal por Mg^{++} endógeno. As mitocôndrias vegetais possuem maior permeabilidade a haletos e isto pode ser devido a ausência de inibição por Mg^{++} . Esta permeabilidade até então era considerada como não mediada por carreadores. A inibição por H^+ da matriz é a maior evidência descrita por BEAVIS & VERCESI (1992) de que mitocôndrias de batata possuem um canal aniônico semelhante ao IMAC, o qual denominaram de PIMAC (Plant inner membrane anion channel).

1.2. TECIDO ADIPOSEO MARROM

O processo de termogênese por ocasião do nascimento é um processo vital para a maioria, senão para todos os mamíferos. Para este propósito, os mamíferos apresentam tecido adiposo marrom, no qual ácidos graxos são substratos oxidativos. Adipócitos marrons são distinguidos por sua alta quantidade de mitocôndrias e estas por serem ricas em UCP (proteína desacopladora) (KLINGENBERG, 1990).

O tecido adiposo marrom encontrado em mamíferos recém nascidos e animais hibernantes é especializado na produção de calor, e é controlado pelo sistema nervoso simpático. A homeostase termal de mamíferos recém nascidos é grandemente dependente da termogênese deste tecido. As mitocôndrias deste tecido são bastante desacopladas, isto é, possuem alta permeabilidade à prótons (KLINGENBERG & WINKLER, 1985). A produção de calor resulta de um curto circuito fisiológico de H^+ através da membrana mitocondrial destes tecidos, via proteína desacopladora (LIN & KLINGENBERG, 1980 e 1982).

A mitocôndria tipicamente termogênica funcional é caracterizada por possuir alta capacidade oxidativa, baixa atividade de síntese de ATP e altas quantidades de UCP. Mamíferos que sofrem mudanças climáticas e necessitam de adaptação, requerem o potencial

termogênico deste tecido, que é controlado por hormônios (catecolaminas e triiodotironina). BIANCO & SILVA, (1987a; 1987b; 1988) e CARVALHO, *et al*, 1991 verificaram a atuação de tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) na expressão da UCP em tecido adiposo marrom. Estes autores trabalharam com ratos pré-tratados ao frio, em outros casos, com ratos tireoidectomizados. HOUSTEK, *et al*, (1990), verificaram grande diferenciação de síntese de proteínas individuais durante a biogênese de mitocôndrias de tecido adiposo marrom em culturas de células e *in situ*. Eles confirmaram inclusive que a principal via regulatória da termogênese deste tecido provém de catecolaminas via receptores β -adrenérgicos. BIANCO, *et al*, 1988 estudaram o processo de transcrição do gene da UCP em ratos tratados com norepinefrina (NE) onde ocorre o aumento da quantidade de RNAm e da taxa de transcrição deste gene nestas condições.

As primeiras tentativas de isolamento da proteína desacopladora, de peso molecular 32.000, de mitocôndrias de tecido adiposo marrom foram feitas por RICQUIER *et al*, (1979). Contudo, a purificação foi parcial. LIN & KLINGENBERG, (1980 e 1982) conseguiram um método melhor de isolamento desta proteína.

Estudos *in vitro* realizados com mitocôndrias de tecido adiposo marrom, mostraram que a translocação de prótons pela UCP é sensível, ou seja, inibida na presença de nucleotídeos de purina, enquanto que sua atividade é potencializada na presença de

ácidos graxos (NICHOLLS & LOCKE, 1984 ; CUNNINGHAM, *et al*, 1986). A natureza da interação de nucleotídeos purínicos di ou trifosfatados com mitocôndrias intactas de tecido adiposo marrom foi estudada por NICHOLLS, (1976). O sítio de ligação destes nucleotídeos foi identificado na face externa da membrana interna, sendo distinto da translocase de nucleotídeos de adenina e de sítios inespecíficos encontrados em outras classes de mitocôndrias, pois os experimentos foram realizados na presença de CAT (inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina). Pelos resultados obtidos por NICHOLLS, (1976), este sítio de ligação de nucleotídeos sugeriu fortemente ser o responsável pela inibição da via de condutância de ions H^+ . KATIVAR & SHRAGO, (1989) verificaram que o sítio de ligação de GDP na proteína desacopladora é diferente do sítio de translocação de H^+ . Eles identificaram a arginina como um resíduo crítico no sítio de ligação do nucleotídeo, no qual modificações resultam em completa inibição da ligação de GDP mas não afeta a atividade translocadora da UCP.

A habilidade de ácidos graxos exógenos desacoplarem a respiração em adipócitos de tecido adiposo marrom intacto foi estudada por CUNNINGHAM *et al*, (1986). Foi observado, neste estudo, que os ácidos graxos atuam neste tecido por mecanismos semelhantes aos observados em mitocôndrias isoladas. Observou-se que ácidos graxos interagem diretamente com a proteína desacopladora e que sua habilidade de desacoplar mitocôndrias de animais pré-adaptados ao

frio está relacionada com a indução da síntese da proteína desacopladora. Foi verificado por estes autores que concentrações nanomolares de ácidos graxos livres são requeridas; o estímulo da respiração foi dependente da presença da proteína desacopladora em mitocôndrias *in situ* e que a presença de noradrenalina estimula o desacoplamento de células pré-tratadas ao frio ou não. Estes autores concluíram que os ácidos graxos são ativadores necessários e suficientes para que a proteína desacopladora atue em células intactas.

Estudos em sistemas reconstituídos (STRIELEMAN, *et al.*, 1985), mostraram o efeito de ácidos graxos sobre a condutância de íons pela UCP incorporada em vesículas lipídicas. Foi verificado que baixas concentrações de ácido palmítico induzem aumento na condutância a prótons neste sistema e que somente ácidos graxos de cadeia longa têm efeito sobre a UCP e que este efeito ativador está reduzido na presença de GDP.

NICHOLLS & LINDBERG (1973), verificaram a existência de transporte eletroforético de Cl^- em mitocôndrias isoladas de tecido adiposo marrom, o qual foi atribuído à presença da UCP. Este transporte foi inibido por nucleotídeos de purina, porém não foi ativado por ácidos graxos. (NICHOLLS, 1979). Este transporte, de íons cloreto foi também observado em sistemas de reconstituição com a UCP incorporada. Neste sistema a UCP gerou condutância a Cl^-

sensível à GDP (JEZEK, *et al.*, 1990). Foram analisados parâmetros cinéticos deste transporte, inclusive de Br^- , obtendo-se dados coerentes com aqueles encontrados para mitocôndrias intactas. Foi verificado que mersalyl e outros reagentes SH, além de DCCD e propranolol não afetam o transporte de cloreto. Concluíram que a UCP forma uma via de condutância para ânions haletos, que o transporte de Cl^- é eletroforético e sensível a GDP. GARLID, (1990) e JEZEK & GARLID, (1990), verificaram transporte de novos substratos aniônicos pela UCP que inibem competitivamente o transporte de Cl^- e são dependentes da hidrofobicidade do ânion a ser transportado. Considerando as características aqui descritas para o transporte de cloreto pela UCP é importante estabelecermos um paralelo com as características descritas sobre o transporte de cloreto por outras mitocôndrias animais (BEAVIS, 1991; GARLID & BEAVIS, 1983 e 1986) e vegetais (BEAVIS & VERCESI, 1992).

Existem três teorias a respeito de como a UCP poderia transportar $\text{H}^+(\text{OH}^-)$ e Cl^- . NICHOLLS, (1974) propõe que Cl^- e OH^- competem por uma via comum. JEZEK, *et al.*, (1989) sugere que a UCP possui duas estruturas independentes onde ocorrem o transporte de H^+ e Cl^- respectivamente. Apesar destes estudos mostrando o transporte de cloreto pela UCP, outros estudos (KLINGENBERG & WINKLER, 1985) sugerem que a UCP simplesmente transporta H^+ e que os resultados obtidos de transporte de Cl^- são devido à impurezas no processo de reconstituição.

1.3. SISTEMAS ARTIFICIAIS

A bicamada lipídica é considerada elemento importante na estrutura e função de membranas biológicas, por isso as propriedades destas bicamadas em vários sistemas modelos têm sido intensamente estudados. Sistemas artificiais vêm sendo grandemente utilizados como modelo para o estudo das membranas biológicas. DEAMER, (1982) fez comparações entre sistemas artificiais e membranas biológicas quanto à permeabilidade a prótons. A bicamada lipídica tem papel importante como barreira ao fluxo de H^+ e íons de uma forma geral. Esta propriedade é essencial para que a célula ou organelas intracelulares sejam capazes de manter gradiente de concentração de certos íons e um pH intracelular constante. Foi verificado maior permeabilidade à prótons em sistemas artificiais em comparação às membranas naturais (DEAMER, 1982). O estudo avaliou também as diferentes técnicas e os possíveis artefatos que podem alterar os resultados obtidos. Concluiu-se que sistemas artificiais são um bom modelo para os estudos de permeabilidade. Sistemas artificiais foram utilizados para o estudo de interações de diferentes antibióticos (valinomicina, anfotericina B e gramicidina) com membranas lipídicas, analisando alterações de permeabilidade (HERVÉ, *et al*, 1985).

As propriedades das membranas artificiais e dos lipídios que as compõe têm sido intensamente estudadas com o auxílio de sondas. Sondagens são moléculas orgânicas com propriedades particulares que auxiliam na avaliação do comportamento e da caracterização das membranas. Em estudos de permeabilidade, a sonda fluorescente, piranina (8-hidroxy-1,3,6-pirenotrisulfonato) é muito útil para estudos de alterações de pH no meio aquoso interno de vesículas, micelas, etc. (CLEMENT & GOULD, 1981 ; KANO & FENDLER, 1978). A sonda 9-aminoacridina também é utilizada para medidas de permeabilidade em sistemas artificiais (NICHOLS, *et al.*, 1980). Outra sonda também utilizada em sistemas artificiais é a pralidoxima (PAM). É uma molécula orgânica caracterizada por ter a propriedade de prevenir efeitos tóxicos de venenos de animais com componentes organofosforados. Possui a propriedade de se protonar e desprotonar conforme o pH em que se encontra, mudando o espectro de absorvância (KONDRITZER, *et al.*, 1961 ; WILSON *et al.*, 1958). Interações eletrostáticas de lipídios carregados de membranas artificiais foram estudadas com o auxílio de dansyl (5-dimethylaminonaphthaleno-1-sulfonyl), cromóforo sensível a pH (VAZ, *et al.*, 1978). ELAMRANI & BLUME (1983), utilizaram a sonda vermelho de cresol (o-cresolsulfonphthalein), que é sensível ao pH para analisar efeitos da fase de transição de lipídios nas cinéticas de difusão de H^+ e OH^- em bicamadas lipídicas.

O estudo do tamanho de vesículas lipídicas artificiais preparadas em diferentes condições sugerem que algumas propriedades funcionais da bicamada lipídica são devidas à sua curvatura (SHEETZ & CHAN, 1972). NOZAKI & TANFORD (1981) verificaram que vesículas artificiais preparadas em diferentes pH possuem a permeabilidade alterada a Cl^- , Na^+ e prótons. Eles verificaram que a permeabilidade em vesículas preparadas em pH 10, aparentemente já danificadas, é cinco vezes maior em relação às vesículas preparadas em pH 4 ou 7. Análises cinéticas e considerações termodinâmicas sobre o fluxo de íons (Na^+ e Cl^-) através da bicamada lipídica em vesículas foram realizadas por HAUSER, *et al* (1973). O fluxo de prótons em resposta à imposição de um potencial de membrana e gradiente de pH em vesículas unilamelares foi estudado por REDELMEIER, *et al* (1989), com o auxílio das sondas TPP^+ e MeAm (metilamina) para o potencial de membrana e gradiente de pH, respectivamente.

No presente trabalho procurou-se caracterizar melhor o papel de uma proteína de 35 KDa presente na membrana interna de mitocôndrias de batata e estabelecer um paralelo entre o comportamento destas mitocôndrias com mitocôndrias de outras origens. Tentou-se estabelecer uma relação entre a função desta proteína isolada de mitocôndrias de batata e a UCP, isolada de mitocôndrias de tecido adiposo marrom. A existência desta proteína em mitocôndrias de outros vegetais foi também investigada.

2.0. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

2.1.1. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE BATATA

O isolamento de mitocôndrias de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) foi feito segundo DIOLEZ E MOREAU (1985), com algumas modificações. As batatas foram compradas no mercado e mantidas sob refrigeração (5 a 10°C), por períodos variáveis até o momento do uso. As batatas (aproximadamente um quilo, descascadas e cortadas em pedaços grandes), foram passadas por uma centrifuga Wallita e o caldo foi coletado num becker contendo aproximadamente 400 ml do meio de extração (Manitol 400mM; tampão Hepes 10mM, pH 7,6; EGTA 1mM; soroalbumina bovina 0,1% ; cisteína 3mM. Foi utilizado 1,0 ml de meio para cada 1,0 g de tecido. Este caldo foi filtrado em gaze (8 camadas) e o pH acertado para 7,2. A suspensão foi centrifugada a 751 xg por cinco minutos para eliminação do amido. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 1200 xg por dez minutos para precipitação de núcleos e células não rompidas. O sobrenadante foi centrifugado a 9.200 xg por dez minutos para sedimentação das mitocôndrias. Estas foram então ressuspensas em cerca de 20 ml de meio de isolamento (Manitol 300mM; tampão Hepes 10mM, pH 7,2; EGTA 0,1mM; soroalbumina bovina 0,1%) e então centrifugadas a 6.000 xg por dez minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso num mínimo de volume do meio

de isolamento. Todo o procedimento foi realizado entre 0 e 4°C.

OBSERVAÇÃO: A partir dos resultados obtidos por BEAVIS & VERCESI, (1992) os meios de extração e isolamento foram modificados. Passou-se a utilizar sacarose 250 mM como suporte osmótico ao invés de manitol 400 mM e o pH acertado para 8,0 e 7,0 para o meio de extração e isolamento, respectivamente.

2.1.2. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE BETERRABA

As beterrabas também foram compradas no mercado e mantidas sob refrigeração (5 a 10°C) por períodos variáveis até o momento do uso. A obtenção de mitocôndrias de beterraba foi feita de modo semelhante ao descrito para a batata, não sendo necessária a centrifugação inicial de 751xg, uma vez que as reservas de amido deste material dispensam esta etapa. Após a centrifugação de 6.000 xg, as mitocôndrias foram ressuspensas em meio de isolamento e novamente sedimentadas a 6.000 xg. Esta centrifugação adicional teve por objetivo a eliminação do pigmento hidrossolúvel presente na suspensão final.

2.1.3. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE MILHO

As sementes de milho foram obtidas do banco de Germoplasma de Departamento de Genética, IB , UNICAMP. Estas sementes foram esterilizadas em uma solução de hipoclorito de sódio

0,2% por 60 minutos e lavadas em água destilada. Após duas horas de entumescimento, as sementes foram colocadas para germinar sobre papel de filtro umedecido e mantidas no escuro e a temperatura de 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 (igual ao descrito para batata), 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 50µm), sendo o pH ajustado para 7,2. A primeira centrifugação foi feita a 1200 xg, por 10 minutos, seguindo-se, a partir de então, o mesmo procedimento desenvolvido para o isolamento de batata.

2.1.4. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FEIJÃO

As sementes de feijão foram compradas no mercado e guardadas sob refrigeração (4 a 10°C) por períodos variáveis até o momento do uso. Estas sementes foram esterilizadas e colocadas para germinar de modo idêntico ao descrito para o milho. O processo de isolamento foi também desenvolvido da mesma forma.

2.1.5. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

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 250mM, contendo EGTA 0,5mM e tampão HEPES 2,0mM, pH 7,2. Em seguida foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. Este material foi então centrifugado a 2.500 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e 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 11.500 xg, sendo a fase lipídica superior retirada com uma pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio de sacarose 250mM contendo EGTA 0,3mM, tamponada com HEPES 1,0mM, pH 7,2 e novamente centrifugado nas condições anteriores. A seguir, as mitocôndrias foram ressuspensas em solução de sacarose 250mM contendo tampão HEPES 1,0 mM, pH 7,2, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 100 mg de proteína por ml.

2.1.6. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE EPIMASTIGOTAS DE

T. cruzi

As mitocôndrias foram obtidas à partir de 140 mg de

células de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A permeabilização da membrana plasmática foi realizada por tratamento com digitonina 8,9 mM, mediante agitação magnética, em banho de gelo, durante 25 segundos. Em seguida, a suspensão foi diluída com a adição de 28 ml de meio contendo sacarose 300 mM, tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,2; EGTA 1 mM e BSA 0,2g% . Desta forma, a concentração de digitonina na suspensão foi diluída dez vezes. Após diluição, a suspensão foi centrifugada duas vezes a 7800 xg por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso no mesmo meio, procurando-se assim, obter uma suspensão livre de digitonina. Esta suspensão foi submetida a uma outra centrifugação a 500 xg por 12 minutos e as mitocôndrias foram coletadas por centrifugação da fração do sobrenadante a 12300 xg por 10 minutos. As mitocôndrias sedimentadas foram suspensas em 10,0 ml de meio contendo sacarose 300 mM; tampão Tris/HCL 10 mM, pH 7,2; EGTA 0,15mM e BSA 0,2 g% . Esta suspensão foi submetida a uma segunda centrifugação a 7800 xg por 10 minutos e o sedimento foi suspenso em meio contendo sacarose 300 mM; tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,2 e de BSA 0,2 g%, obtendo-se, desta forma, uma suspensão de mitocôndrias de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Todo o procedimento foi realizado entre 0 e 4°C.

2.1.7. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE TECIDO ADIPOSEO

MARROM

As mitocôndrias foram preparadas de tecido adiposo marrom de hamsters adaptados ao frio, (4°C) durante uma semana,

segundo CANNON, *et al.*, (1979). O tecido adiposo cervical foi cuidadosamente retirado e colocado em meio contendo Sacarose 320 mM; EDTA 2 mM; Tris-HCl 10 mM; BME 5 mM. O tecido foi então homogenizado com o mesmo tampão, em homogenizador Potter-Elvehjem. Foi feita uma centrifugação a 1000 xg por 10 minutos. O sedimento foi descartado e o sobrenadante centrifugado novamente a 10.000 xg por vinte minutos. A suspensão foi rapidamente congelada.

2.2. DOSAGEM DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

A concentração de proteína da suspensão mitocondrial foi determinada segundo método de biureto (GORNAL, *et al.*, 1949), modificado pela adição de colato 1% segundo KAPLAN & PEDERSEN (1983), usando albumina de soro bovino como padrão e determinando-se a absorvância em 540 nm.

2.3. LIGAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO E DE TUBÉRCULOS DE BATATA

A ligação de nucleotídeos de purina (ATP, ADP e GTP), foi feita pelo "método de sedimentação", descrito por KLINGENBERG, *et al.* (1986), associando-se algumas condições utilizadas por NICHOLLS (1976).

Foi adicionado um miligrama de proteína mitocondrial

a 0,5ml do meio : Manitol 300 mM; KCl 20 mM; MES 2 mM, pH 6,7; BSA 0,1% ; carboxiatractilato 30 μ M ; Ap5A 20 μ M, para inibir a ligação de nucleotídeos à translocase e para inibir a ação da adenilato quinase, respectivamente. (LIENHARD *et al*, 1973; WEIDEMAN *et al*, 1970 e VIGNAIS, 1986).

Após dois minutos de pré-incubação, a 25 C°, adicionou-se 50 μ l do seguinte meio: Manitol 0,3M; KCL 20mM, MES 2mM pH 6,7; BSA 0,1%; [³H] ATP ou [³H]ADP ou [³H]GTP 0,8 - 1,2 x 10⁵ CPM/nmol, ou seja 0,1 μ Ci; Decorridos de 0,3 a 5 minutos de incubação a suspensão foi centrifugada 15.000xg, por 2 minutos. O sobrenadante foi recolhido para avaliação da radioatividade total utilizada em cada ensaio, e o precipitado foi lavado e suspenso em 1,0 ml do meio de pré-incubação. Uma nova centrifugação a 15.000xg foi feita por 2 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 0,38ml de água. Adicionou-se a esta solução 20 μ l de SDS 10% e dela foram retiradas alíquotas de 10 μ l para avaliação de proteína, pelo método de Lowry modificado (WANG & SMITH, 1975). Alíquotas de 0,35ml foram adicionados a 2,5ml de coquetel de cintilação, para avaliação da radioatividade presente. O coquetel era composto por Tolueno/triton (2/1); 2,5 diphenyloxazole PPO 0,4%; 1,4bis[2-(5-Phenyloxazoly)]benzene 0,005% . A avaliação da radioatividade foi feita num contador de cintilação Líquida Beckman, modelo LS 100 C.

2.4. 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, utilizou-se o meio básico de reação Sacarose 0,25 mM; Hepes 10 mM; BSA 0,1% ; EGTA 0,1 mM; $MgCl_2$ 3 mM; rotenona $4\mu M$; fosfato 5 mM e succinato 10 mM adicionado na hora, segundo BEAVIS & VERCESI (1992).

O registro do consumo de oxigênio permitiu a determinação do "controle respiratório", que serviu como um indicativo de qualidade de 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 consequente fosforilação) e a velocidade de respiração no estado respiratório 4 (respiração de repouso, subsequente ao término da fosforilação do ADP) (CHANCE & WILLIAMS, 1956).

2.5. ISOLAMENTO DE UMA PROTEÍNA DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA E DA UCP DE TECIDO ADIPOSEO MARROM

O isolamento foi feito segundo LIN & KLINGENBERG, (1982), com algumas modificações.

A suspensão mitocondrial contendo em torno de 100mg

de proteína foi diluída em 6 ml de meio contendo sacarose 300 mM; EDTA 2 mM; Tris 10 mM, pH 7,2; Lubrol 3,2% e incubada sob agitação em banho de gelo por 30 minutos. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 100.000 xg, por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em um ml de meio contendo sulfato de sódio 20 mM; EDTA 1 mM; tampão MOPS 20 mM, pH 6,7 e 75mg de TRITON X-100. Esta suspensão foi incubada durante 30 minutos sob agitação em banho de gelo. Uma nova centrifugação foi feita a 100.000 xg por 45 minutos. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de hidroxapatita pré equilibrada com tampão MES 20 mM, pH 6,7 e eluído com o mesmo tampão, à temperatura ambiente. Foram coletadas frações de 2ml e estas foram avaliadas quanto à concentração de TRITON, através da leitura de sua absorbância a 280nm. A dosagem de proteína nestas frações foi feita utilizando o método de Lowry modificado (WANG & SMITH, 1975).

2.6. ELETROFORESE EM GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA

As eletroforeses foram feitas segundo LAEMMLI, (1970). As placas de gel de SDS-poliacrilamida, foram montadas num sistema descontínuo. O gel de resolução continha acrilamida 12% , Tris/HCl 0,375 M, pH 8,8 e SDS 0,1% . A polimerização química foi feita pela adição de persulfato de amônio 0,075% e tetrametiletilenodiamina 0,06%, ambas concentrações finais. O gel de empacotamento, continha acrilamida 3,75% , tampão Tris/HCl 0,125M , pH 6,8 e SDS 0,1% . A polimerização química foi feita de maneira semelhante à do

gel de resolução.

O preparo das amostras foi o seguinte: alíquotas de 100µl de cada fração eluída da coluna de hidroxapatita foram separadas e nelas foram acrescentados 2mg de SDS e 10µl de glicerol, seguindo-se o aquecimento a 100°C em banho-maria por 3 minutos. Após o aquecimento, foi colocado azul de bromofenol (concentração final de 0,01%). Concentrações de 2 a 10 µg de proteína foram aplicadas em cada poço. As amostras de mitocôndrias inteiras (1 mg de proteína), foram colhidas e submetidas a inchamento com água deionizada e posterior congelamento-descongelamento (3 vezes por 1 min cada) em nitrogênio líquido para rompimento da membrana e liberação das proteínas da matriz. Após centrifugação por 2 minutos a 10.000 xg, o sedimento obtido foi lavado com água deionizada e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após desprezar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 100µl de solução contendo SDS 5% ; Tris/HCl 250mM, pH 7,4; EDTA 10 mM e sacarose 1,25 M (LIU *et al*, 1977). As amostras foram aquecidas a 100°C por 3 minutos. Todas as concentrações proteicas finais foram dosadas pelo método de Lowry modificado.

A eletroforese foi 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 foi fixado em uma solução aquosa de metanol

50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,02%, seguindo-se a sua coloração em nitrato de prata, de acordo com BLUM *et al* (1987).

Após a coloração, o gel foi seco à temperatura ambiente entre duas folhas de papel celofane, de acordo com a descrição de JUANG *et al* (1984).

2.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA

O potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (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 al* (1979). Neste eletrodo utiliza-se uma membrana de cloreto de polivinila (PVC) contendo tetrafenilborato (TPB^-) como trocador de íons. Esta membrana é preparada adicionando-se 3 ml de tetrafenilborato de sódio 10 mM (dissolvidos em tetraidrofurano) a 10 ml de tetraidrofurano contendo 0,5g de cloreto de polivinila e 1,5 ml de dioctilftalato. A solução final é colocada em placa de Petri de 60cm de área e o solvente evaporado lentamente à temperatura ambiente. A membrana assim obtida é transparente e possui de 0,15 a 0,20 cm de espessura. Um fragmento desta membrana é colado, com o uso de tetraidrofurano, à extremidade de um tubo de PVC (3,5cm de comprimento/0,5cm de diâmetro) que, por sua vez, é preenchido com TPP^+ 10mM ($[\text{TPP}^+]_{in}$). O contato entre esta solução de TPP^+ e o

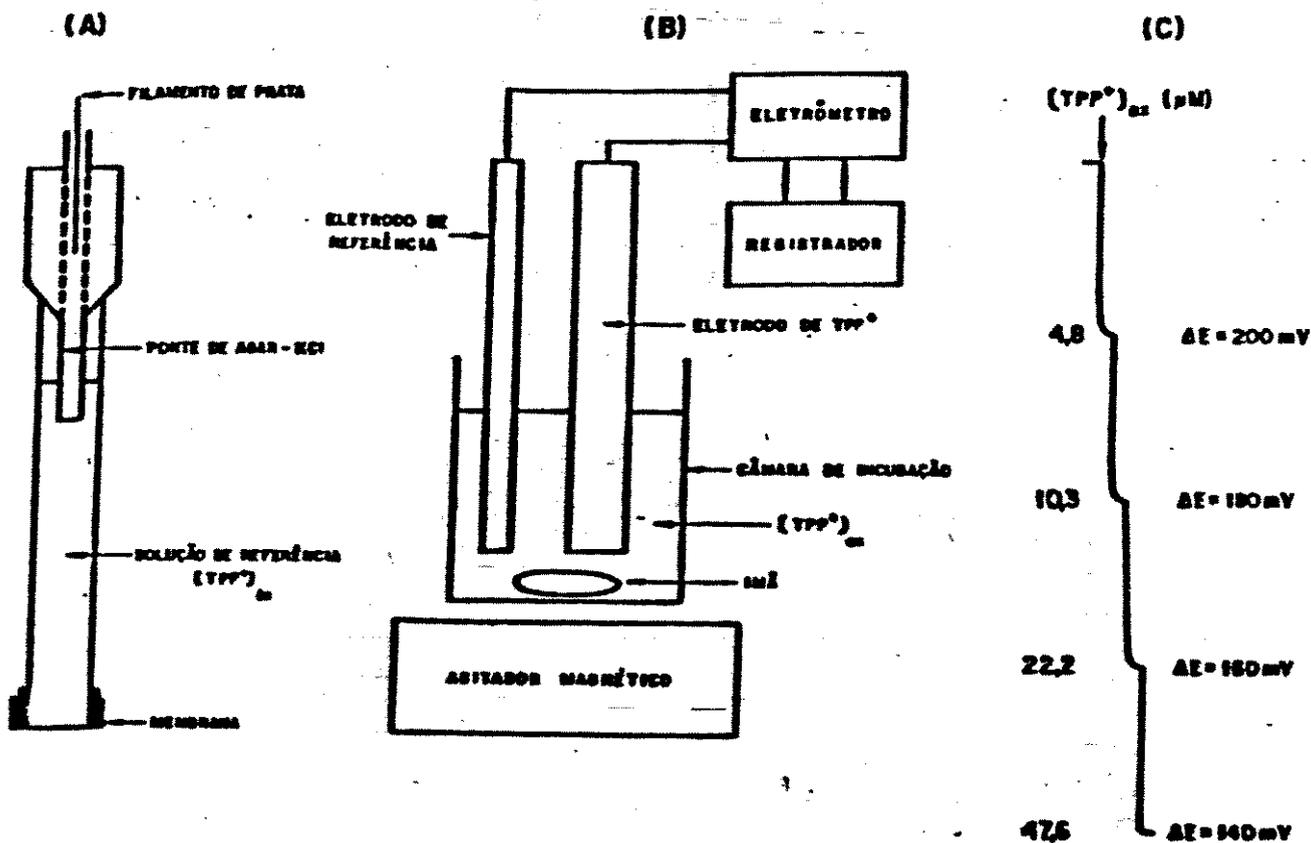
eletrodo Ag/AgCl é feito através de uma ponte de agar (1,5% dissolvido em KCl saturado), conforme mostrado no esquema 1.

As concentrações de TPP⁺ no meio de reação foram monitoradas continuamente e os valores de Δψ calculados através da equação

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

onde v representa o volume mitocondrial por mg de proteína, considerado 1,4μl (KAMO *et al*, 1979) para mitocôndrias animais e 1,0μl (MANDOLINO *et al*, 1983; DOUCE, 1985) para mitocôndrias vegetais. V o volume do meio de incubação e ΔE o potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de TPP⁺ ($\frac{[TPP^+]_{in}}{[TPP^+]_{ex}}$) através da membrana, sendo que [TPP⁺]_{ex} refere-se à concentração de TPP⁺ no meio de reação. Esta equação foi derivada assumindo-se que a distribuição de TPP⁺ entre as mitocôndrias e o meio segue a equação de Nernst (MURATSUGU *et al*, 1977). Entretanto, uma quantidade significativa de TPP⁺ se liga às membranas mitocondriais (JENSEN *et al*, 1986) e os valores de potencial elétrico obtidos foram corrigidos utilizando-se a equação

$$\Delta\psi = \frac{\Delta\psi \text{ eletrodo} - 66,16 \text{ mV}}{0,92}$$



ESQUEMA 1- Representação do sistema utilizado para avaliar o potencial elétrico de membrana de mitocôndrias (A)- eletrodo de TPP^+ ; (B)- diagrama da aparelhagem utilizada; (C)- curva de calibração do eletrodo.

Os sinais no eletrodo (AE) foram quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de TPP⁺ ao meio de reação básico, que continha sacarose 250 mM; Hepes 10 mM, pH 7,2; BSA 0,1%; EGTA 0,1 mM; MgCl₂ 3 mM; rotenona 4 μM; fosfato 5 mM; succinato 10 mM. Os experimentos foram iniciados pela adição de 1mg proteína mitocondrial/ml meio de reação e foram realizados em câmara de vidro termostatizada (30°C), com agitação magnética, e eletrodo acoplado a um registrador potenciométrico.

2.8. OBTENÇÃO DO SORO DE COELHO ANTI-PROTEÍNA DE MITOCÔNDRIAS DE BATATA

Os coelhos foram inoculados com a proteína isolada de mitocôndrias de batata em adjuvante completo de Freund (1:1) na concentração de aproximadamente 190μg/ml; nas doses de reforço foi feita mais uma inoculação da mesma forma. O esquema de imunização empregado foi:

1^o inoculação- Antígeno emulsificado em adjuvante completo de Freund (190μg/ml), injetado intradermicamente em 5 locais no dorso do animal.

2^o inoculação- Foi realizada 21 dias após a primeira,

com o antígeno preparado da mesma maneira. A aplicação foi feita de maneira semelhante à primeira inoculação. Inoculações subsequentes foram efetuadas, conforme a intensidade de resposta imunológica do animal, isto é, com alguns animais foi necessário maior número de inoculações.

2.9. WESTERN BLOTTING

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para a fita de nitrocelulose em solução de tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%, pH 8,3, durante 2 horas, 60 volts à temperatura ambiente. (TOWBIN *et al*, 1979).

Após a transferência, a fita foi corada com Ponceaus-S (0,5% em 1% ácido acético) para localização das proteínas padrões. A seguir a fita foi bloqueada em solução contendo BSA 1% em solução salina 0,15M tamponada com fosfato de sódio 0,02M (PBS-BSA) por 1 hora à temperatura ambiente. As tiras foram então tratadas com soro imune anti proteína de mitocôndrias de batata diluído 1:30 em PBS-BSA, durante 18 horas a 4°C. Após três lavagens em PBS, as tiras foram incubadas com IgG de carneiro anti Ig de coelho conjugada com peroxidase diluída a 1:500 em PBS-BSA. As fitas foram novamente lavadas em PBS e a reação foi desenvolvida pela adição de solução contendo diaminobenzidina (600µg/ml) e água oxigenada (5µl/10ml) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Soro pré imune foi sempre utilizado

como controle negativo.

2.10. RETIRADA DE TRITON X-100 DAS AMOSTRAS DE PROTEÍNAS E TROCA POR OCTYL GLUCOSÍDEO

As amostras de proteínas isoladas ou igual volume de soluções controle (MES 20 mM; Na₂SO₄ 20 mM, pH 6,70) contendo TX-100 5% foram adicionadas a uma mistura de 5 mg de lecitina e octyl glucosídeo 40 mM. Após a padronização da quantidade de BioBeads, foram acrescentadas as amostras 1 g desta resina (LEVY, *et al*, 1990). A resina foi pré tratada com metanol e lavada com água, segundo HOLLOWAY (1973). As amostras foram mantidas em banho de gelo, sob agitação. Aliquotas de 10µl foram retiradas em intervalos regulares de 30 minutos para monitoramento a 280nm. A leitura foi feita acrescentando 990µl de água.

2.11. RECONSTITUIÇÃO DAS PROTEÍNAS ISOLADAS EM VESÍCULAS FORMADAS POR DIÁLISE

O sistema utilizado por nós foi uma adaptação dos sistemas descritos por STRIELEMAN, *et al* (1985a ;1985b) e KATIVAR & SHRAGO, (1989). Após a etapa da retirada do triton que foi trocado por octyl glucosídeo, as amostras foram adicionadas ou igual volume de tampão (experimentos controle) a uma mistura de lecitina 82% e cardiolipina 18% na presença de octyl glucosídeo 40 mM. A razão molar de octyl glucosídeo para os fosfolipídios foi mantida em torno

de 2:1 (40mM octyl e 24mM lipídio) e a concentração de lipídio inicial foi de 20mg/ml. A solução (2ml) foi dialisada por 40-44h, usando membrana de diálise Spectrapor (cut off de 3.500) contra 250ml de tampão MES 20 mM; Na_2SO_4 20 mM, pH 6,70. O tampão foi trocado 4 vezes. O monitoramento da remoção de octyl glucosideo foi feito colhendo amostras (700 μ l) do tampão de diálise, em intervalos de tempos. O açúcar foi dosado pelo método de anthrona (UMBRUT & STAUFFER, 1972).

2.12. PREPARAÇÃO DAS VESÍCULAS POR FASE REVERSA

As vesículas de lecitina/cardiolipina (82:18) foram preparadas por fase reversa segundo SZOKA & PAPAHDJOUPOLOS (1978). Após a preparação de um filme, com o auxílio de gás N_2 , acrescentou-se 2ml de meio (MES 20mM ; Na_2SO_4 20mM, pH 6,70) e mais 6ml de éter dietílico. Foi feita uma sonicação a 100 watts por 2 minutos, até a formação de uma emulsão e esta foi colocada num rotavapor até evaporação completa do éter.

2.13. PERMEABILIDADE À PRÓTONS

O meio externo das vesículas foi trocado por TES 0,5 mM; Na_2SO_4 20 mM, pH 6,70 por cromatografia em gel numa coluna 1 x 30cm de Sephadex G-25 à 4°C. As frações (1ml) coletadas da coluna, contendo as vesículas foram usadas para o ensaio de permeabilidade. 1,5ml das vesículas dialisadas ou 0,5ml das vesículas preparadas por

fase reversa (acrescentando 1,0ml de TES 0,5mM; Na₂SO₄ 20mM, pH 6,70) foram incubadas com 150 µg de anidrase carbônica durante 20 a 30 minutos. A amostra esteve sob leve agitação a 25°C num sistema fechado e saturado com N₂. Um eletrodo de pH conectado a um pHmetro (PHM 82 Standard pHmeter) e a um registrador (REC 80 SERVOGRAPH, Radiometer Copenhagen) estavam acoplados ao sistema. Sulfato de Potássio (K₂SO₄ 240 mM, dissolvido em TES 0,5 mM; Na₂SO₄ 20mM, pH6.70) foi adicionado à amostra (concentração final de 5mM) e a amostra foi levemente agitada até estabilização do pH (aproximadamente um minuto). Valinomicina, dissolvida em etanol foi adicionada (1µg/ml) para gerar um potencial de membrana e a mudança resultante no pH externo foi registrada. O delta (Δ) total de prótons pôde ser observado após adição de FCCP (5 µM). A passagem de prótons foi monitorada a partir da mudança de pH induzida pelo efluxo de prótons do interior das vesículas.

A dosagem de proteína destas amostras incorporadas foi feita inicialmente pelo método descrito por SMITH, *et al*, (1985), usando ácido bichinchônico. Este método se mostrou sensível à presença de lipídios, conforme descrito por KESSLER & FANESTH, (1986). Utilizou-se então o método descrito por UPRETI, *et al*, (1988), que é uma modificação do método de Lowry, com 20% SDS.

2.14 TÉCNICA DE ESPALHAMNETO DE LUZ

O espalhamento de luz é uma técnica baseada na

propriedade das substâncias atuarem como osciladores quando uma radiação eletromagnética incide nestas substâncias. Estes osciladores são fontes emissoras de luz, uma vez que, cargas aceleradas emitem luz. A técnica de espalhamento de luz dinâmico é baseada na medida da intensidade de espalhamento de uma determinada solução em função do tempo. Os dados de intensidade são analisados segundo uma função de correlação temporal de onde obtém-se diretamente o coeficiente de difusão médio das partículas em solução. Obtem-se também utilizando os valores de difusão e empregando-se diversos tratamentos matemáticos, o valor do raio hidrodinâmico dos sistemas estudados. Através da técnica de espalhamento de luz estática, pode-se obter o parâmetro de raio de giração médio que é um parâmetro espacial médio das partículas em solução. Especificamente, é o raio no qual a massa total da partícula poderia estar incluída, independentemente do formato, de forma que o momento de inércia seja o mesmo da partícula real. (BAPTISTA, 1992).

As medidas de espalhamento de luz foram realizadas no laboratório do prof. Hernan Chaimovich (IQ- USP). A análise dos dados foi feita diretamente num computador PC-AT (IBM) compatível, utilizando-se "software" fornecido pela Brook Haven.

3.0. RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO

3.1. EFEITO DE NUCLEOTÍDEOS DE PURINA EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO E DE BATATA

SILVA (1991), observou que mitocôndrias de batata ligam nucleotídeos de purina em função do pH, mesmo na presença de CAT (inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina). Este comportamento não foi observado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Iniciamos este estudo avaliando-se a ligação destes nucleotídeos (ATP, ADP, GTP) em função do tempo de incubação. Os resultados se encontram representados na Figura 1. Este experimento foi realizado com mitocôndrias isoladas de batata e de fígado de rato, com o objetivo de se fazer um estudo comparativo.

Como podemos observar, mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata mostraram um comportamento diferente em relação às mitocôndrias de fígado. Observamos que em mitocôndrias de fígado houve uma ligação basal de nucleotídeos (ATP e GTP), que foi sempre inferior ao observado com mitocôndrias de batata, e que praticamente não variou no decorrer do tempo de incubação, mantendo-se em torno de 0,35 nmoles/mg proteína. Por outro lado, as mitocôndrias de tubérculos de batata apresentaram valores crescentes de ligação dependentes do tempo de incubação, alcançando 1,1 nmol/mg

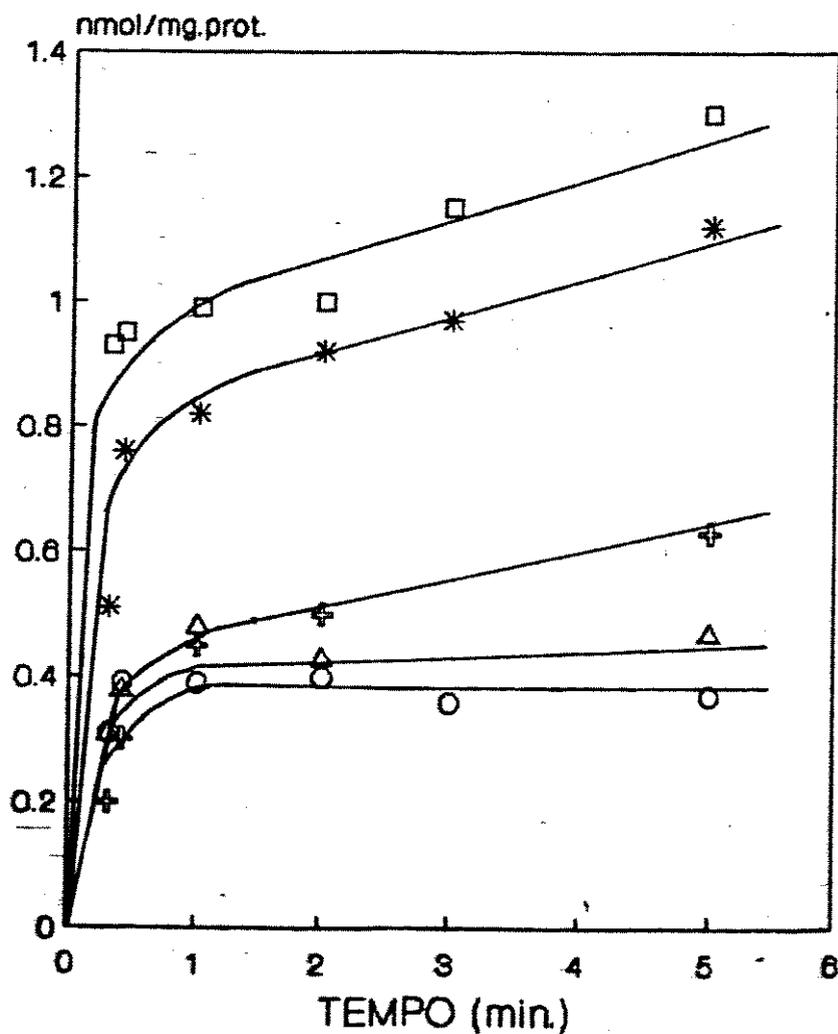


Figura 1- LIGAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DE PURINA À MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO E DE TUBÉRCULOS DE BATATA, EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO

As mitocôndrias foram incubadas em meio de reação, conforme descrito em materiais e métodos. Mitocôndrias de Batata (□,*,+); mitocôndrias de fígado de rato (Δ,O); incubação com ATP (□,Δ); ADP(*); GTP(+,O). Os valores apresentados representam médias (n=9).

com ADP e 1,3nmol/mg com ATP e 0,7 nmol/mg com GTP. Não se esperava ligação alguma dos nucleotídeos em mitocôndrias de fígado, pois o meio de incubação foi acrescido de CAT (para evitar a ligação de nucleotídeos à translocase de nucleotídeos de adenina) e Ap5A (para inibir a atividade da adenilato quinase). Os valores obtidos podem ser devidos à ligações inespecíficas, ou pela retenção de nucleotídeos no espaço intermembranas.

Estes resultados são bastante semelhantes aos obtidos por NICHOLLS, (1976), realizados com mitocôndrias de tecido adiposo marrom. Estas mitocôndrias, porém, apresentaram maior afinidade por nucleotídeos de guanina (GDP e GTP). Os resultados aqui mostrados (Figura 1) indicam maior afinidade das mitocôndrias de batata por nucleotídeos de adenina (ADP e ATP). Para verificar se os nucleotídeos competem pelo mesmo sítio de ligação, foram feitos experimentos de deslocamento destas ligações, que estão apresentados na Tabela I. Mitocôndrias de tubérculos de batata foram incubadas com [³H] ATP ou [³H]GTP (100μM). Após dois minutos, foram adicionados os nucleotídeos competidores (400μM) e foi feita mais uma incubação de um minuto. A ordem decrescente de afinidade observada foi ATP>ADP>AMP>AMP-PNP>GTP>GDP. Pode-se verificar que nucleotídeos de adenina (ATP e ADP) deslocaram praticamente 50 % da ligação de GTP. Neste caso, a afinidade destas mitocôndrias é maior por nucleotídeos de adenina.

nucleotídeos competidores	$[^3\text{H}]\text{ATP}$ ligado		$[^3\text{H}]\text{GTP}$ ligado	
	nmoles/mg	%	nmoles/mg	%
controle	1,65	100	0,90	100
ATP	0,87	52,72	0,54	60,0
ADP	1,01	61,21	0,50	55,5
AMP	1,02	61,82	---	---
AMP-PNP	1,22	73,93	---	---
GTP	1,35	81,81	---	---
GDP	1,64	99,39	---	---

TABELA I - DESLOCAMENTO DA LIGAÇÃO DE $[^3\text{H}]\text{ATP}$ OU $[^3\text{H}]\text{GTP}$ POR OUTROS NUCLEOTÍDEOS. Mitocôndrias de batata (2mg/ml) foram previamente incubadas com CAT (30 μM) e Ap5A (20 μM). Após dois minutos de incubação, foi adicionado 100 μM $[^3\text{H}]\text{ATP}$ ou $[^3\text{H}]\text{GTP}$. Após dois minutos de incubação, foram adicionados os nucleotídeos competidores seguindo-se de uma incubação de um minuto. Os nucleotídeos livres do meio foram removidos por centrifugação e a ligação de $[^3\text{H}]\text{ATP}$ ou $[^3\text{H}]\text{GTP}$ determinadas, conforme descrito em materiais e métodos. Os locais com linhas tracejadas indicam que não foram efetuados os experimentos.

Os resultados destes experimentos de ligação (Figura 1 e Tabela 1) foram bastante semelhantes aos encontrados com mitocôndrias de tecido adiposo marrom de vertebrados (NICHOLLS, 1976) em que o autor observou ligação destes nucleotídeos com mitocôndrias de tecido adiposo marrom, na presença e ausência de CAT. Foi observado maior afinidade de ligação daquelas mitocôndrias por nucleotídeos de guanina (GDP).

NICHOLLS, (1974) observou grande permeabilidade a prótons em mitocôndrias isoladas de tecido adiposo marrom, e verificou que a remoção de ácidos graxos, por BSA e a presença de nucleotídeos atuavam de forma a inibir esta permeabilidade. Os experimentos mostrados a seguir tiveram por objetivo estudar o efeito de nucleotídeos de purina no acoplamento da respiração (Figura 2) e o efeito de BSA e nucleotídeos no aumento do potencial de membrana (Figura 3).

A Figura 2 mostra experimentos de consumo de oxigênio, realizados com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata e fígado. Antes de analisarmos os resultados, é necessário ressaltar que estas mitocôndrias vegetais foram isoladas em meio contendo sacarose como suporte osmótico, ao invés de manitol, até então utilizado por este laboratório. BEAVIS & VERCESI, (1992) demonstraram que mitocôndrias de batata isoladas em meio com manitol se apresentavam bem mais permeáveis em comparação com as isoladas em sacarose, prejudicando assim a qualidade da preparação. Parece que estas mitocôndrias são permeáveis ao manitol, e na presença deste, ocorre aumento do volume da matriz mitocondrial.

A linha a da Figura 2.A mostra consumo de oxigênio obtido por mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata. Observa-se que após cada adição de ADP, a velocidade do consumo de oxigênio pós fosforilativa é diminuída, (estado IV, estado de repouso) (CHANCE &

WILLIAMS, 1956). Parece que o ADP e/ou ATP estão de alguma forma melhorando o acoplamento da respiração. Comparativamente, após as mesmas adições em experimentos com mitocôndrias isoladas de fígado de rato (linha a, Figura 2.B) não ocorre alteração na velocidade de respiração fosforilativa. A adição de ADP ou ATP, na presença de CAT (inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina) diminui a velocidade do consumo de oxigênio em mitocôndrias de batata (linha c, traçado 2.A). A linha tracejada (b, traçado 2A) corresponde a adição somente de CAT, para mostrar que o efeito observado é resultado da adição dos nucleotídeos ATP ou ADP. Os nucleotídeos de guanina (GTP e GDP) também foram testados, porém não tiveram efeito. Diferentemente, em mitocôndrias de fígado, a adição de qualquer um dos nucleotídeos de purina (ATP, ADP, GTP, GDP) na presença de CAT não altera a velocidade do consumo de oxigênio. Como pudemos observar, em mitocôndrias de batata, na presença de CAT, os nucleotídeos de adenina promoveram um melhor acoplamento da mitocôndria, quando comparada com mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Este resultado mostra um comportamento bastante similar destas mitocôndrias com as mitocôndrias isoladas de tecido adiposo marrom (NICHOLLS, 1974 e 1979), o que sugere a presença nestas mitocôndrias de uma proteína desacopladora (SILVA, 1991). Há muito se tenta explicar o efeito destes nucleotídeos em mitocôndrias vegetais, existindo muita discussão a este respeito. (DRY & WISKICH, 1982; 1986; DAY, *et al*, 1987; BRYCE, *et al*, 1990; WHITEHOUSE, *et al*, 1989).

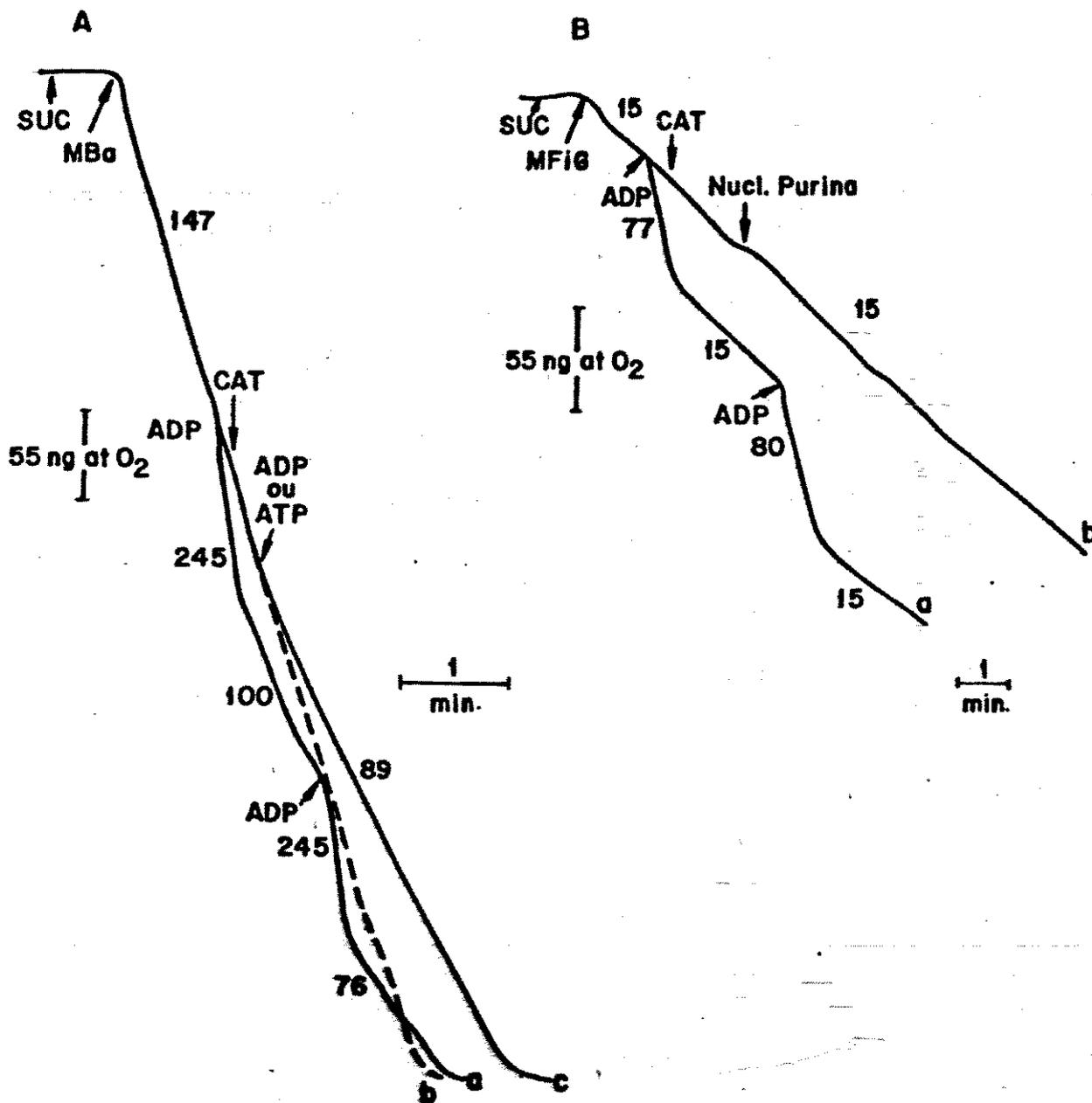


Figura 2- COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO DE NUCLEOTÍDEOS DE PURINA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM MITOCÔNDRIAS DE BATATA (A) E FÍGADO DE RATO (B)

A um ml de meio contendo sacarose 250mM; Hepes 10 Mm, pH 7.2; BSA 0,1% ; EGTA 0,1 Mm; MgCl₂; rotenona 4μM ; fosfato 5mM, foram adicionados onde indicados: succinato 10 mM; 1 mg mitocôndrias de batata (MBo); 1 mg mitocôndrias de figado de rato (MFig); nucleotídeos de purina (200 nmoles); CAT 20 μM. Os números indicam as velocidades de consumo de O₂ em ng átomos de O₂ min⁻¹.mg⁻¹. Estes experimentos são representativos de uma série de 4.

3.2 EFEITO DE BSA E NUCLEOTÍDEOS DE PURINA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\psi$) EM MITOCÔNDRIAS DE DIVERSAS ORIGENS

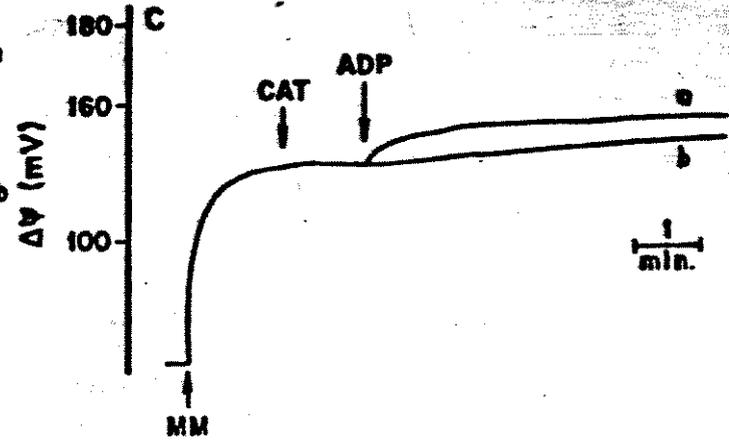
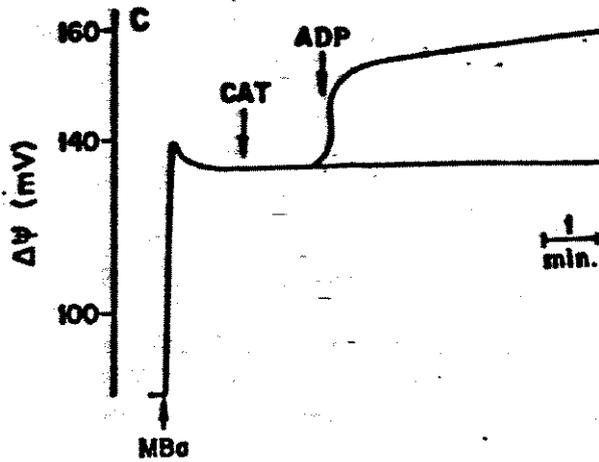
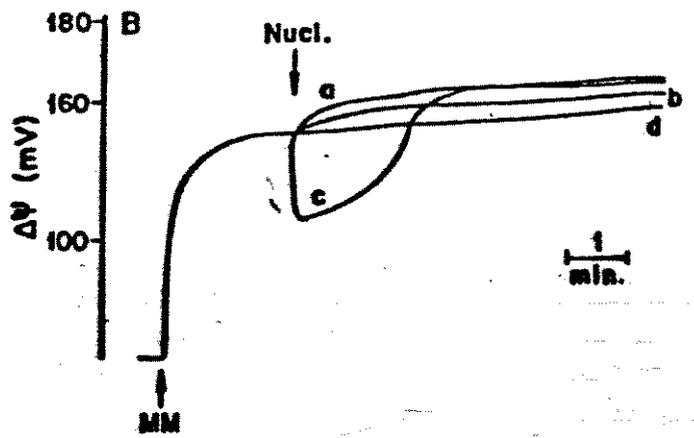
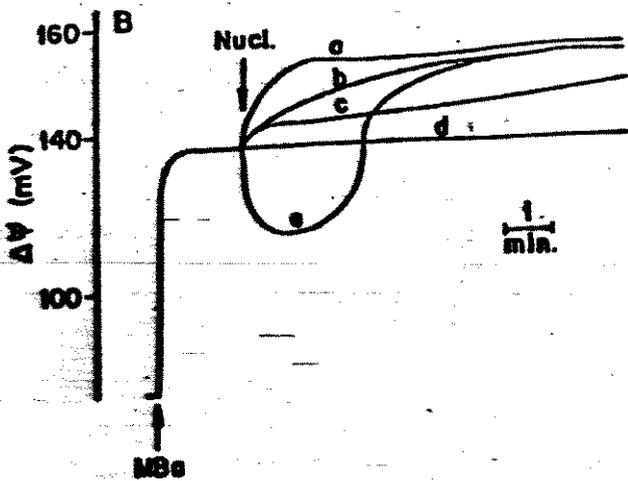
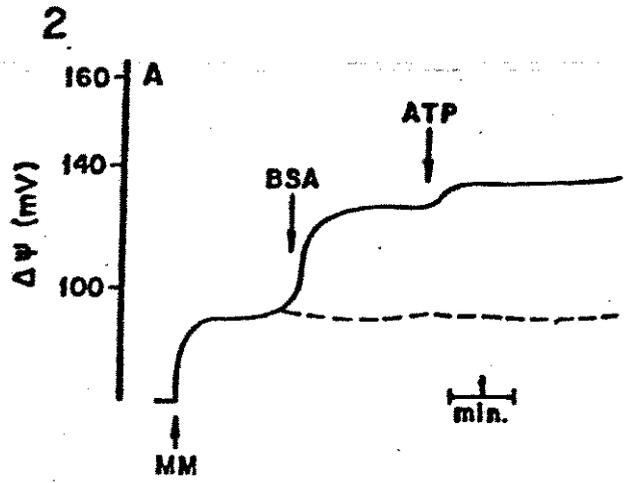
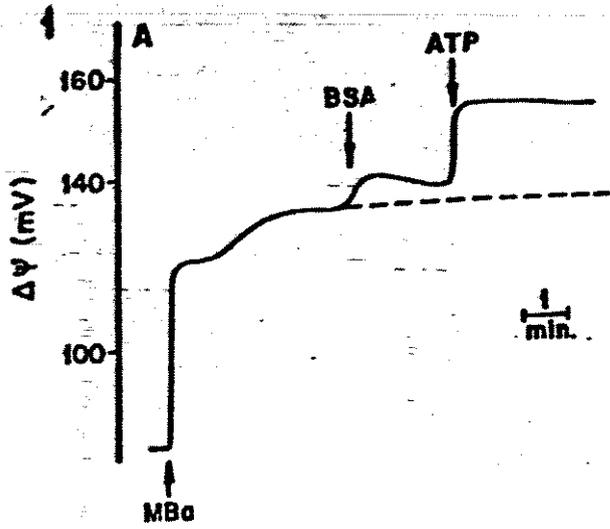
Com o objetivo de verificar se além das mitocôndrias de batata, os nucleotídeos de purina tinham efeito em mitocôndrias vegetais de outras origens, realizamos os experimentos da Figura 3, onde avaliamos o efeito destes nucleotídeos sobre o potencial elétrico de membrana. É necessário ressaltar que o potencial aqui monitorado é o componente elétrico ($\Delta\psi$) do gradiente protônico transmembrana. Este gradiente é formado por um componente químico (ΔpH) e o componente elétrico ($\Delta\psi$), que se relacionam de acordo com a equação $\Delta\mu\text{H}^+ = 60 \Delta\text{pH} + \Delta\psi$. Existe uma relação inversa entre a velocidade de respiração e $\Delta\mu\text{H}^+$ (MITCHELL, 1961 e 1966), ou seja, a velocidade de respiração depende da amplitude do potencial protônico. Quando o potencial de membrana é alto a respiração é lenta e denominada respiração de repouso (estado IV). Nestas condições, a respiração se processa a uma velocidade suficiente para compensar o retorno inespecífico de prótons à matriz mitocondrial (NICHOLLS, 1982).

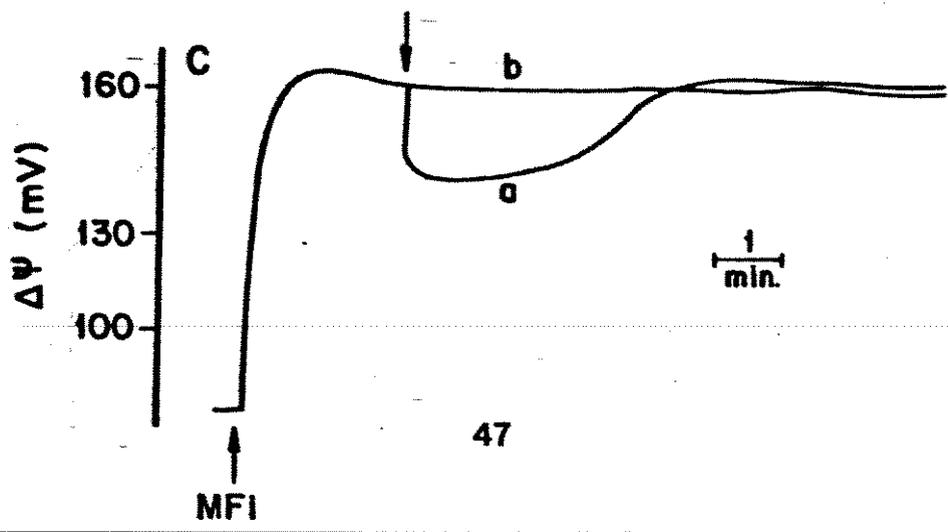
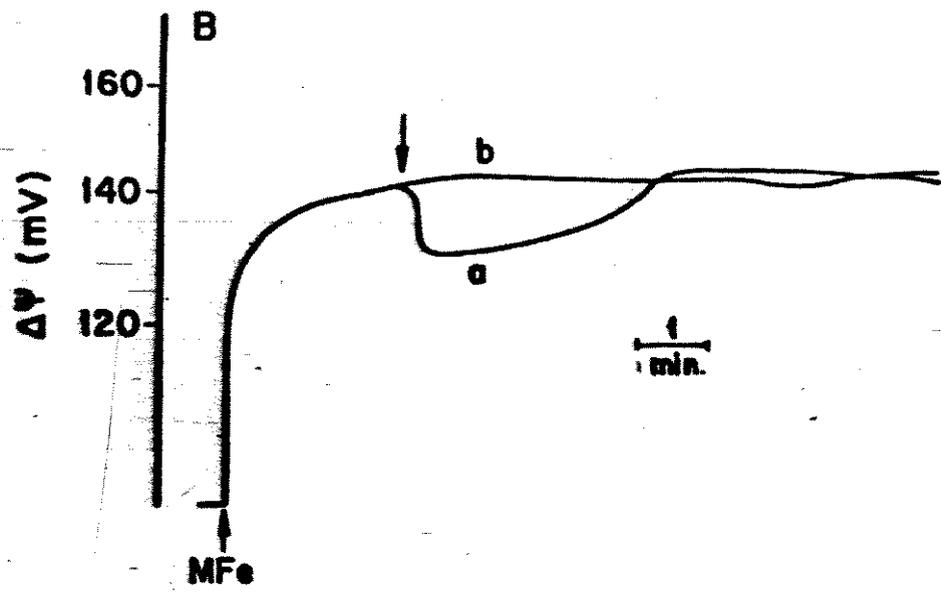
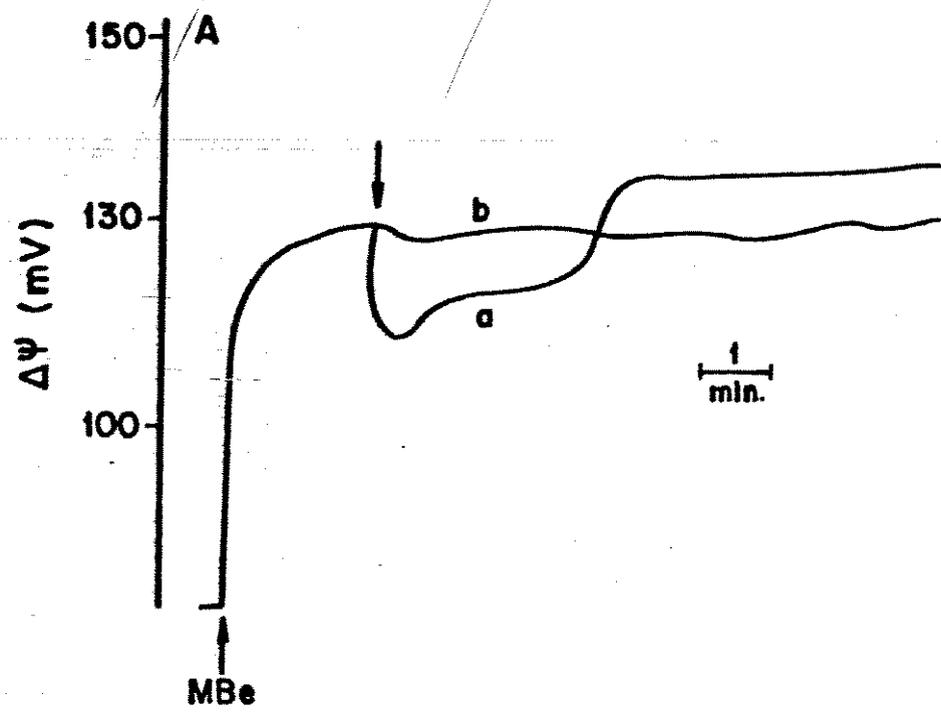
Foi também analisado o efeito de BSA sobre estas mitocôndrias. Há muito tem sido observado que a adição de BSA ao meio de reação, diminui a permeabilidade de mitocôndrias de batata (DIOLEZ & MOREAU, 1983; DUCET, 1979). Porém, a forma como o BSA atua ainda é bastante discutida. DUCET, (1979) sugeriu que a atuação do

mesmo é diretamente ao nível de membrana, sendo incorporado reversivelmente, modificando a estrutura da mesma. WOJTCZAK & WOJTCZAK, (1960) , DALGARNO & BIRT, (1963) e DIOLEZ & MOREAU, (1983) defendem a idéia de que o BSA atua de forma a quelar ácidos graxos livres que promoveriam aumento da permeabilidade da membrana. A forma com que os ácidos graxos agem também é muito discutida atualmente. (WOJTCZAK, 1976; ROTTEMBERG, 1983; LUVISETTO, *et al*, 1987; ANDREYEV, *et al*, 1988; SCHONFELD, 1990). A atuação de BSA em mitocôndrias isoladas de tecido adiposo marrom foi observada por NICHOLLS (1974) onde foi verificado que o mesmo atua de forma a acoplar a respiração, diminuindo a velocidade de consumo de oxigênio e aumentando o potencial de membrana.

A Fig. 3 mostra experimentos realizados com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata e de coleóptiles de milho. Como podemos observar, o potencial gerado por estas mitocôndrias isoladas de batata e milho, na ausência de BSA Figura 3- (1A) e (2A), é da ordem de 130mV e 100mV, respectivamente. Após a adição de BSA é de 140mV e 130mV. As figuras mostram ainda que após o incremento de potencial promovido pela adição de BSA nestas mitocôndrias isoladas na ausência de BSA (Figura 3-1A e 2A), a adição de ATP leva a um aumento adicional do potencial de membrana. Os traçados da Figura 3 (1B) e (2B) mostram o efeito da adição dos nucleotídeos em mitocôndrias de batata e milho, respectivamente, isoladas em meio com BSA. A adição de ADP promoveu uma diminuição no

valor de $\Delta\psi$, que foi seguido pelo aumento do valor de potencial elétrico (linha e, traçado 1B e linha c, traçado 2B). A queda do potencial já era esperada uma vez que a fosforilação do ADP consome potencial elétrico. Os outros nucleotídeos (ATP, GTP, GDP) (Figura 3, traçado 1B e 2B) também aumentaram o potencial de membrana ($\Delta\psi$) destas mitocôndrias. Nos traçados 1C e 2C da Figura 3, foram adicionados CAT (inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina) e ADP posteriormente. Como podemos verificar, a adição de ADP, não induziu diminuição de potencial, como era esperado, uma vez que a translocase estava inibida por CAT, mas como podemos observar a adição de ADP proporcionou um incremento de $\Delta\psi$. Este efeito observado foi interpretado como sendo resultado da atuação deste nucleotídeo do lado externo da membrana interna. Embora o efeito dos nucleotídeos esteja mais evidente em mitocôndrias de batata pode-se estabelecer um paralelo entre o comportamento das mitocôndrias de batata e milho nestas condições, pois elas parecem comportar-se semelhantemente. O efeito de BSA e nucleotídeos foi também testado em mitocôndrias de outros vegetais como beterraba e feijão (Figura 4). Como podemos observar, só se verificou efeito de nucleotídeos (ADP) em mitocôndrias de beterraba. Os outros nucleotídeos (ATP, GTP e GDP) e o BSA não tiveram efeito, nem em mitocôndrias de beterraba nem de feijão (Figura 4A e 4B). O comportamento destas mitocôndrias foi idêntico ao encontrado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Figura 4C), ou seja, os nucleotídeos e o BSA não tiveram efeito.





3.3 ISOLAMENTO DE UMA PROTEÍNA DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA COM POSSÍVEL FUNÇÃO DESACOPLADORA E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS

A proteína desacopladora de tecido adiposo marrom, já bem caracterizada, (NICHOLLS, 1974, 1979; NICHOLLS & RIAL, 1984; GARLID, 1990) foi descoberta a partir do comportamento das mitocôndrias deste tecido. Este comportamento diferenciado (pequeno controle respiratório, acoplamento após adição de ADP, capacidade de ligar nucleotídeos de purina, em especial GTP e GDP além de ATP e ADP mesmo na presença de CAT, uso de BSA no meio de reação para uma melhor preparação, etc.) (NICHOLLS, 1974, 1976, 1979; JEZEK, *et al*, 1978) é bastante semelhante ao descrito até aqui sobre mitocôndrias de batata. Em trabalho recentemente realizado neste laboratório (SILVA, 1991), foi isolada uma proteína de membrana de mitocôndrias de tubérculos de batata a qual acredita-se tenha função de desacoplar a respiração destas mitocôndrias. Algumas das características observadas em mitocôndrias de batata também foram comuns às mitocôndrias de milho (SILVA, 1991). Utilizando a metodologia descrita para o isolamento da UCP, (LIN & KLINGENBERG, 1982) foi obtida uma proteína com peso molecular aproximadamente de 35 KDa, como mostrado na Figura 5.

Obtivemos anticorpos policlonais e específicos contra esta proteína. Isto foi possível conforme descrito em materiais e

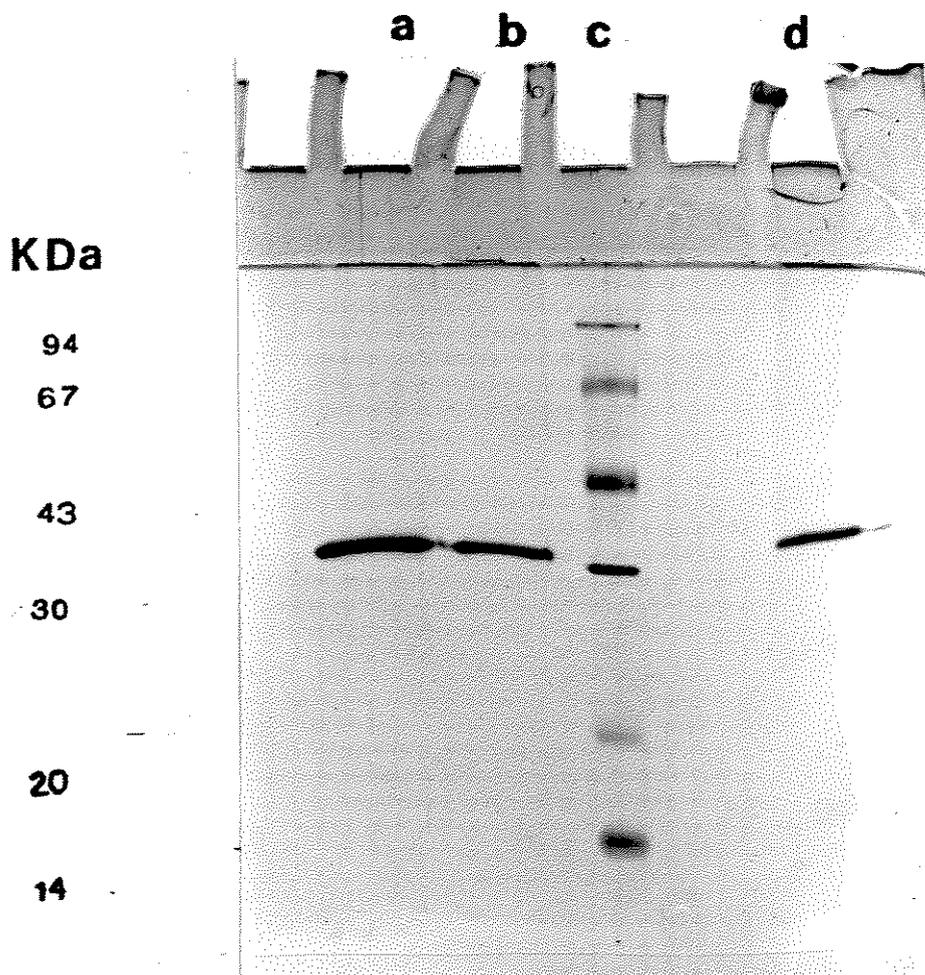


Figura 5- ELETROFORESE EM GEL SDS-POLIACRILAMIDA

Frações contendo uma proteína com possível função desacopladora, purificada de mitocôndrias de tubérculos de batata. Colunas a, b, d frações recolhidas, em sequência, após a passagem do extrato em coluna de hidroxapatita, conforme descrito em materiais e métodos. Coluna c, padrões de peso molecular. Os valores à esquerda correspondem aos pesos moleculares (em kDa) dos padrões utilizados.

métodos. Após o isolamento da proteína, esta foi inoculada em coelhos seguindo-se o esquema de imunização. Os anticorpos (soro total) foram utilizados para tentar detectar a presença desta proteína em outras mitocôndrias animais e vegetais. Utilizando amostras de mitocôndrias de milho, feijão, beterraba, batata, fígado de rato, coração de boi e *T. cruzi*, foram verificadas reações cruzadas com todas as amostras dos vegetais testados, conforme mostra a Figura 6. Deste modo, observa-se bandas em torno de 35 KDa nas amostras da proteína isolada de batata (h), extratos mitocondriais de batata (g), milho (f), feijão (e) e beterraba (d) e ausência da mesma nas amostras de mitocôndrias de fígado de rato (c), *T. cruzi* (a) e de coração de boi (b). Estes resultados de uma certa forma não explicam os efeitos dos nucleotídeos e BSA descritos anteriormente, pois ocorre reação cruzada de anticorpos desta proteína com proteínas mitocondriais de dois vegetais (beterraba e feijão) que não tem o mesmo comportamento que mitocôndrias de batata e milho. O fato de observarmos reação com outros vegetais pode ser interpretado do seguinte modo. As mitocôndrias possuem uma família de proteínas com peso molecular próximos, entre 30.000 a 35.000 (RUNSWIRCH, *et al*, 1987; AQUILA, *et al*, 1987; KLINGENBERG, 1990). A proteína desacopladora de tecido adiposo marrom (32.000) faz parte desta família, assim como o carreador de Pi (33.000), a translocase de nucleotídeos de adenina (30.000). KLINGENBERG, (1990) e AQUILLA, *et al*, (1987) mostraram que esta família de proteínas possuem domínios funcionalmente comuns. O estudo da estrutura primária

destas proteínas mostrou que elas possuem domínios homólogos com 100 resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Se estas sequências fizerem parte dos determinantes antigênicos, mesmo que somente a batata e o milho apresentem a proteína de 35 KDa presença desta proteína, obter-se-ia reações cruzadas com proteínas pertencentes a esta família das outras amostras, como por exemplo a translocase de nucleotídeos de adenina, que tem peso molecular bem próximo. Além disto, algumas vezes, o isolamento da proteína de batata se processava como de costume, mas na eletroforese apareciam duas bandas com pesos moleculares bem próximos, em torno de 30-35KDa, o que era praticamente impossível de separar para seguir o esquema de imunização.

3.4 RECONSTITUIÇÃO DA PROTEÍNA ISOLADA DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA E A UCP ISOLADA DE MITOCÔNDRIAS DE TECIDO ADIPOSEO MARRON EM SISTEMAS ARTIFICIAIS

Sondas sensíveis à mudanças de pH têm sido bastante utilizadas em sistemas artificiais (CLEMENT & GOULD, 1981; KANO & FENDLER, 1978; VAZ, et al, 1978; ELAMRANI & BLUME, 1983). Com o objetivo de testar a atividade da proteína isolada de mitocôndrias de batata (*Solanum tuberosum*), foi feita a tentativa de incorporar esta proteína em um sistema com piranina. Num segundo momento, optou-se por um sistema onde o transporte de prótons através da

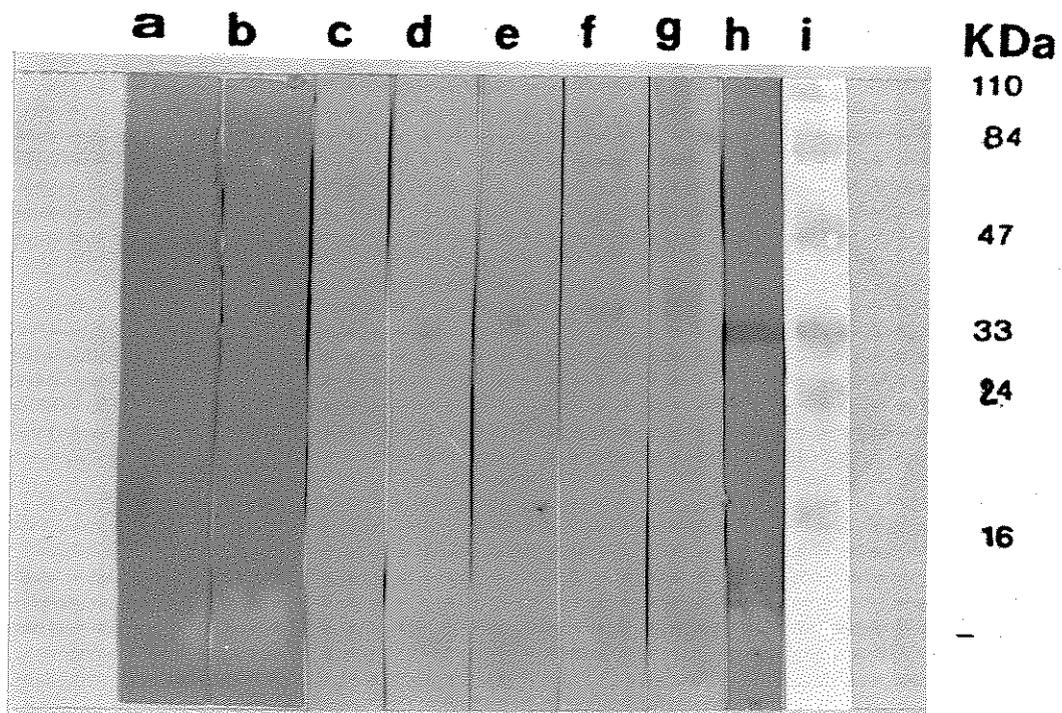


Figura 6- REAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA MITOCÔNDRIAS DE DIFERENTES ORIGENS, ANALISADOS POR WESTERN BLOTTING

a- mitoc. de *T. cruzi*; b- proteína extraída de mitoc. de coração de boi; c- mitoc. fígado de rato; d- mitoc. beterraba; e- mitoc. feijão; f- mitoc. milho; g- mitoc. batata; h- proteína isolada de tubérculos de batata; i- padrão de peso molecular pré corado. Os números ao lado direito correspondem aos pesos moleculares (KDa) dos padrões utilizados. O método de Western blotting está descrito em materiais e métodos.

membrana de vesículas artificiais é impulsionado por uma diferença de potencial elétrico. (Figuras de 8 a 13). O transporte de prótons se dá em resposta ao gradiente elétrico estabelecido pela distribuição de um cátion (neste caso íons K^+) que é adicionado no lado externo das vesículas e sua entrada rápida é possível após adição de valinomicina. Em resposta à esta entrada súbita de potássio, ocorre saída de prótons do interior das vesículas. Este sistema foi bastante utilizado para verificação da atividade translocadora de H^+ da proteína desacopladora isolada de mitocôndrias de tecido adiposo marrom (STRIELEMAN, *et al*, 1985(a); SARVAGYA & SHRAGO, 1989; STRIELEMAN, *et al*, 1985(b); BOUILLAUD, *et al*, 1983; JEZEK, *et al*, 1990; KLINGENBERG & WINKLER, 1986).

Com o objetivo de eliminar um dos problemas de incorporação de proteínas que é a presença de detergentes, tentou-se inicialmente o isolamento da proteína na presença de octil-glicosídeo, ao invés de TX-100 até então utilizado. Porém, como descrito por STRIELEMAN, *et al*, (1985) o octil-glicosídeo interage com a coluna de hidroxiapatita (um dos passos de purificação) e a proteína pode ficar retida na coluna ou sair inativada. A explicação para interação de octil-glicosídeo com a hidroxiapatita segundo KLINGENBERG & LIN, (1982) seria devido ao pequeno tamanho desta molécula. Deste modo, voltamos a isolar a proteína na presença de triton X-100 como de costume. Com o objetivo

de ter um controle positivo, achou-se necessário o isolamento e reconstituição simultânea da proteína desacopladora de tecido adiposo marrom, já bem caracterizada.

O isolamento destas proteínas foi feito simultaneamente e com alto grau de pureza, como mostrado na Figura 7.

A etapa seguinte foi a retirada do detergente (triton-X100) na presença de Bio Beads. Bio Beads é um polímero esférico composto de estireno-divinil benzeno macro reticular, com alta afinidade por detergentes hidrofóbicos. Achou-se necessário a padronização da quantidade de Bio Beads a ser utilizada, pois KATIVAR & SHRAGO, (1989) utilizaram 7 g do mesmo para um volume de 1 a 2 ml de meio. Como observado na Figura 8, com 1 g de Bio Beads praticamente todo o triton (concentração inicial 5%, experimentos controle) é absorvido no máximo em 3 horas, na presença de 5 mg de lecitina e 40mM octil-glicosídeo. Por se tratar de proteínas de membranas e estas serem altamente hidrofóbicas, há a necessidade de trocar o triton por outro detergente, neste caso o octil-glicosídeo. A presença de lecitina facilita ainda mais o processo e diminui a chance de perda de proteína nesta etapa. Deste modo padronizamos nossos experimentos utilizando sempre 1 g de Bio Beads. O tempo de incubação foi de 1 a no máximo 3 horas, o qual foi determinado pelo monitoramento de espectros a 280nm. A queda de absorbância neste comprimento de onda revela a retirada de triton-X100 das amostras de

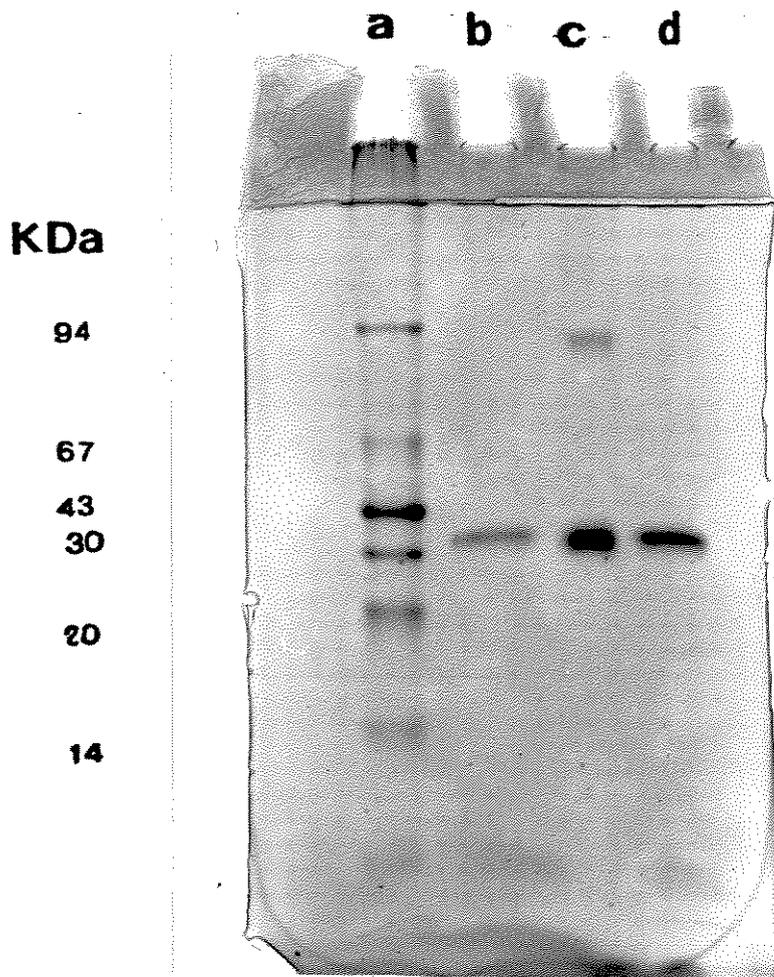


Figura 7- ELETROFORESE EM GEL SDS-POLIACRILAMIDA

Colunas *b* e *d*, frações de proteína purificada de mitocôndrias de batata. Coluna *c* fração da proteína desacopladora isolada de mitocôndrias de tecido adiposo marrom Coluna *a*, padrão de peso molecular.

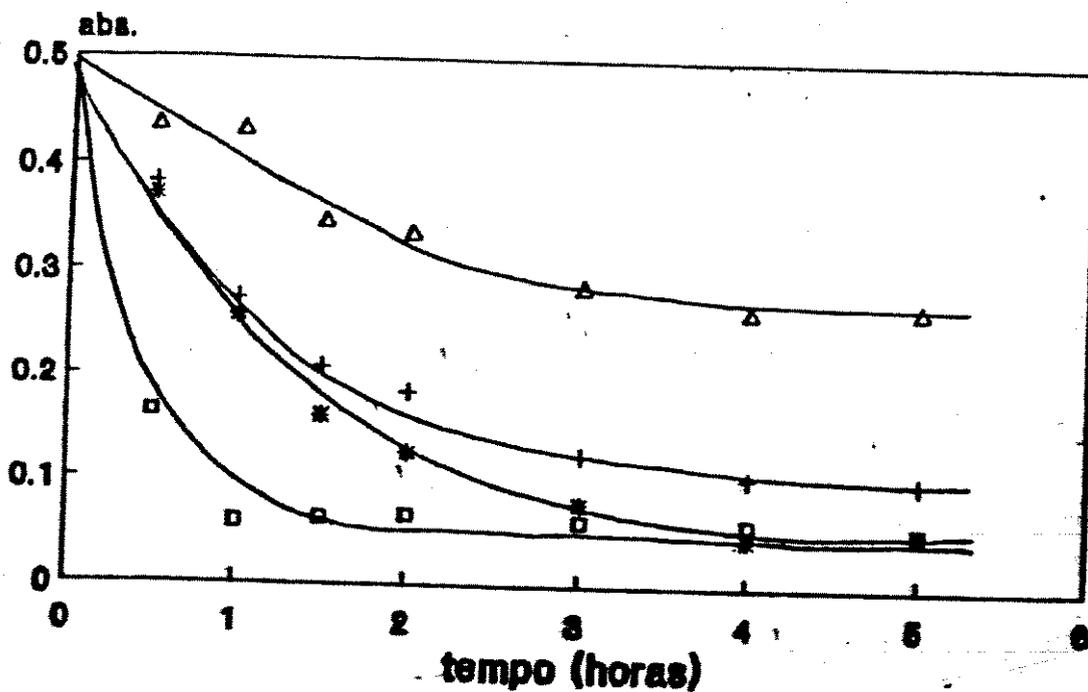


Figura 8- RETIRADA DE TX-100 EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIO BEADS. As amostras (controles) foram tratadas com uma solução de TX-100 5% na presença de 40 mM octyl glucoside e 5 mg de lecitina. Incubação no gelo, sob agitação. Foram acrescentadas diferentes concentrações de Bio Beads ($\Delta\Delta$) 265mg; ($++$) 530mg; ($**$) 1 g; ($\square\square$) 2 g. Aliquotas de 10 μ l foram retiradas nos intervalos de tempo demonstrados.

proteína isolada (Figura 9).

A proteína agora na presença de octil-glicosídeo foi incorporada a membrana de vesículas de lecitina e cardiolipina (82:18), formadas por diálise. O processo de diálise se faz necessário para que ocorra a saída de todo o octil-glicosídeo. Este detergente é bastante usado para extração de proteínas pela sua propriedade de ser facilmente dializável (HELENIUS, et al, 1977). Ele possui alta concentração micelar crítica (CMC), 25mM, enquanto que o triton X-100 possui CMC de 0,2 - 0,3 mM. O octil-glicosídeo foi bastante utilizado para solubilizar diferentes proteínas de membrana e ser eliminado por diálise. (GOULD, et al, 1981; STUBBS, et al, 1976; BARON & THOMPSON, 1975; PETRI & WAGNER, 1979). Para a determinação do tempo necessário de diálise para que todo o detergente seja retirado, foram feitos experimentos controle (Figura 10), onde foram colocadas amostras para dialisar sem nenhuma proteína e na presença de BSA, para verificar se a velocidade de saída de octil-glicosídeo se alterava na presença de proteína. Além disso, foram feitos experimentos de diálise contra 250ml e 500ml de tampão para verificar se a saída de octil-glicosídeo era acelerada. Observou-se a real necessidade de uma diálise prolongada (aproximadamente 40h para eliminarmos todo octil-glicosídeo). Com 25h de diálise praticamente todo o octil-glicosídeo já foi eliminado. Utilizando amostras colhidas neste período, não foi possível verificar cinéticas de transporte de prótons (dados não mostrados). Isto indica que baixas

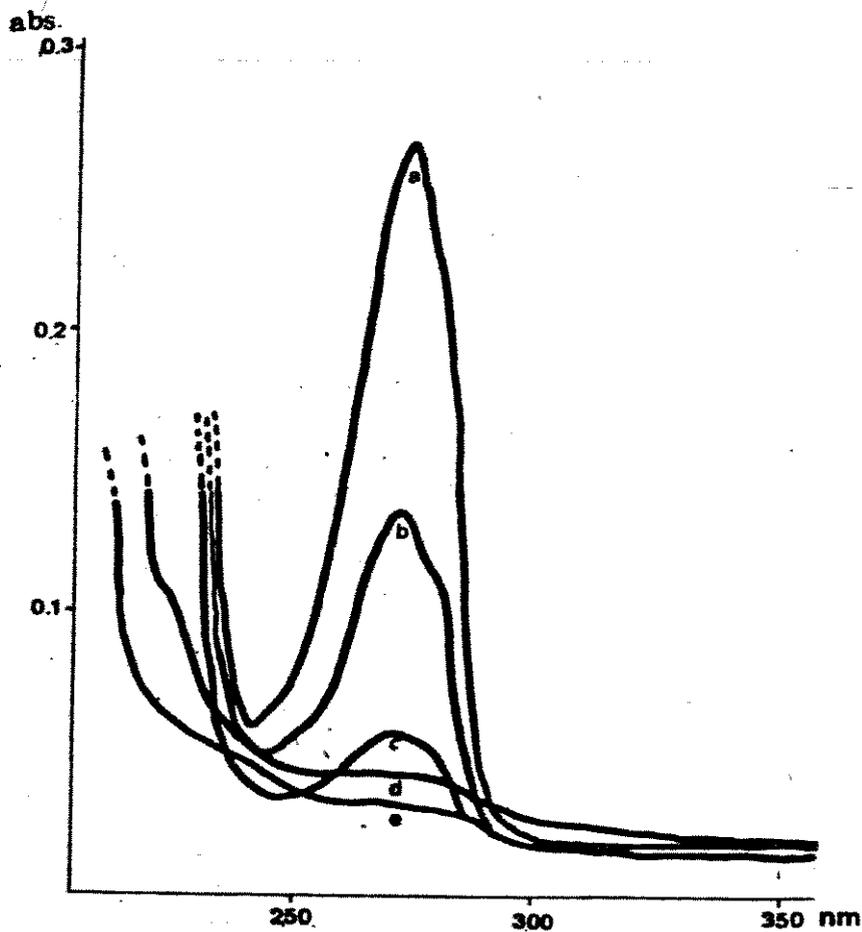


Figura 9- MONITORAMENTO DA RETIRADA DE TX-100 DAS AMOSTRAS DE PROTEÍNA ISOLADA DE MITOCÔNDRIAS DE BATATA e /ou MITOCÔNDRIAS DE TECIDO ADIPOSEO MARROM.

Espectros feitos de 200nm a 350nm com aliquotas de 10 μ l de amostra colhidas de 30' em 30' minutos. Amostras de proteína na presença de 40mM octyl glucoside; 5 mg lecitina ; 1g de Bio Beads. (a) espectro inicial da proteína isolada; (b) após 30min. de incubação; (c) após 1h de incubação; (d) após 1h e 30min. de incubação; (e) após 2 h de incubação e espectro inicial da mistura lecitina-octyl glucoside.

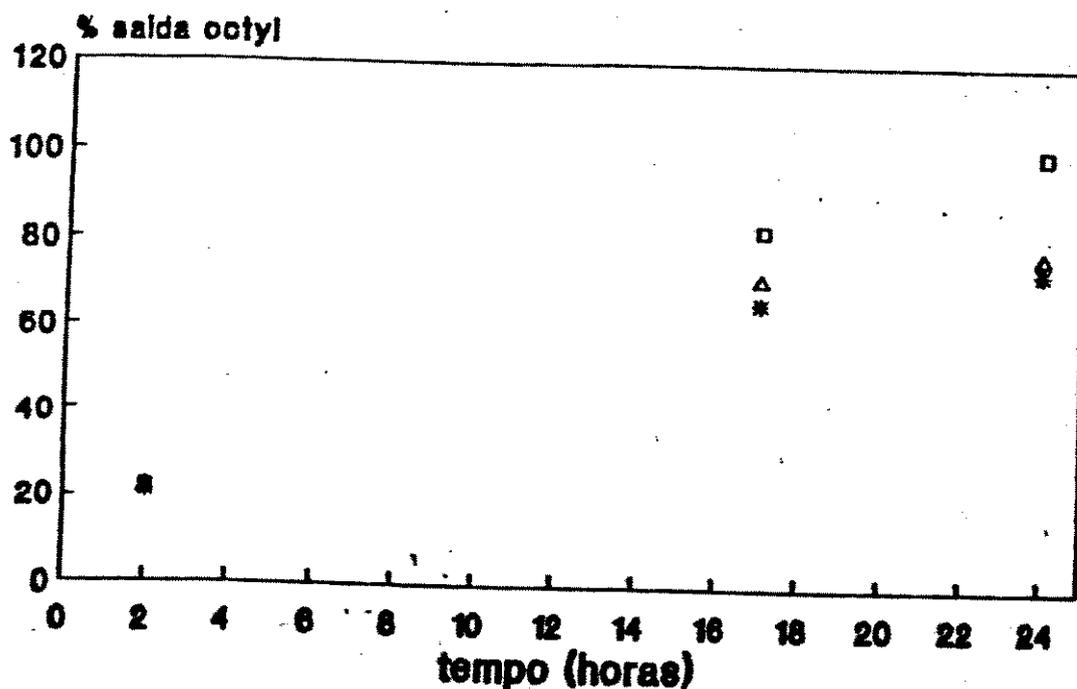


Figura 10- RETIRADA DE OCTIL-GLICOSÍDEO POR DIÁLISE.

Padronização da velocidade de saída de octil-glicosídeo por diálise feita com amostras controle, contra 250ml tampão (□); contra 250ml tampão na presença de BSA (**); contra 500ml tampão na presença de BSA (△). Aliquotas de 700µl do tampão externo foram coletadas nos intervalos de tempo determinados. O tampão foi trocado aproximadamente 4 vezes. Dosagens efetuadas conforme descrito em materiais e métodos.

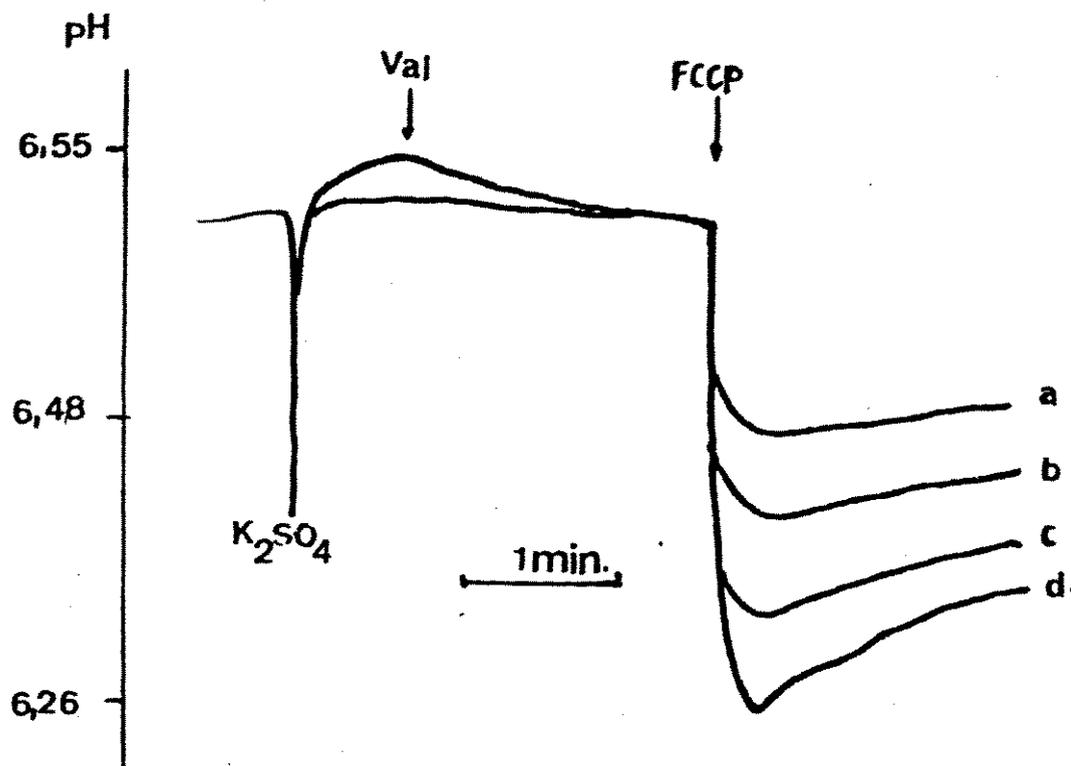


Figura 11- INTERFERÊNCIA DE OCTIL-GLICOSÍDEO TESTADO EM VESÍCULAS PREPARADAS POR FASE REVERSA

0,5ml destas vesículas foram adicionados a 1ml de TES 0,5mM; Na₂SO₄, pH 6,70. Ao meio de incubação foram adicionados (50µg)(a); (25µg)(b); (12µg)(c); (0,0µg)(d) de octyl glucoside. Após incubação com anidrase carbônica (20min.), foi adicionado 5mM K₂SO₄. Adição de valinomicina (1µg/ml) e FCCP (5µM) estão indicadas.

concentrações de detergente interferem drasticamente na permeabilidade das vesículas. Ainda na tentativa de reduzir o tempo de diálise, foram utilizadas amostras de 25h de diálise e estas foram submetidas a uma coluna de Sephadex G-25 pré equilibrada com Mes 20mM; Na₂SO₄ 20mM, pH6,70 . O detergente fica retido na coluna, porém a permeabilidade das vesículas permanece alterada, não podendo ser registrado alterações de pH externo durante as cinéticas. A interferência de octil-glicosídeo também foi comprovada pela adição do mesmo às vesículas preparadas por fase reversa, conforme mostra a Figura 11. O aumento da concentração de octil-glicosídeo, diminui consideravelmente a cinética de saída de prótons, isto é, o delta máximo de prótons obtido após adição de FCCP acaba se dissipando, devido ao aumento da permeabilidade das mesmas.

A Figura 12 mostra que o pool de prótons (delta máximo obtido após adição de FCCP) é proporcional à concentração de vesículas do meio e não à concentração de K⁺ ou de valinomicina nem tampouco de FCCP, que estão presentes em excesso. Estes experimentos foram realizados com vesículas preparadas por fase reversa, onde se manteve as concentrações de K⁺, valinomicina e FCCP e se variou somente as concentrações de vesículas no meio.

A proteína desacopladora de tecido adiposo marrom, bem como a isolada de mitocôndrias de batata foram incorporadas pelo sistema de vesículas formadas por diálise. Para se obter um

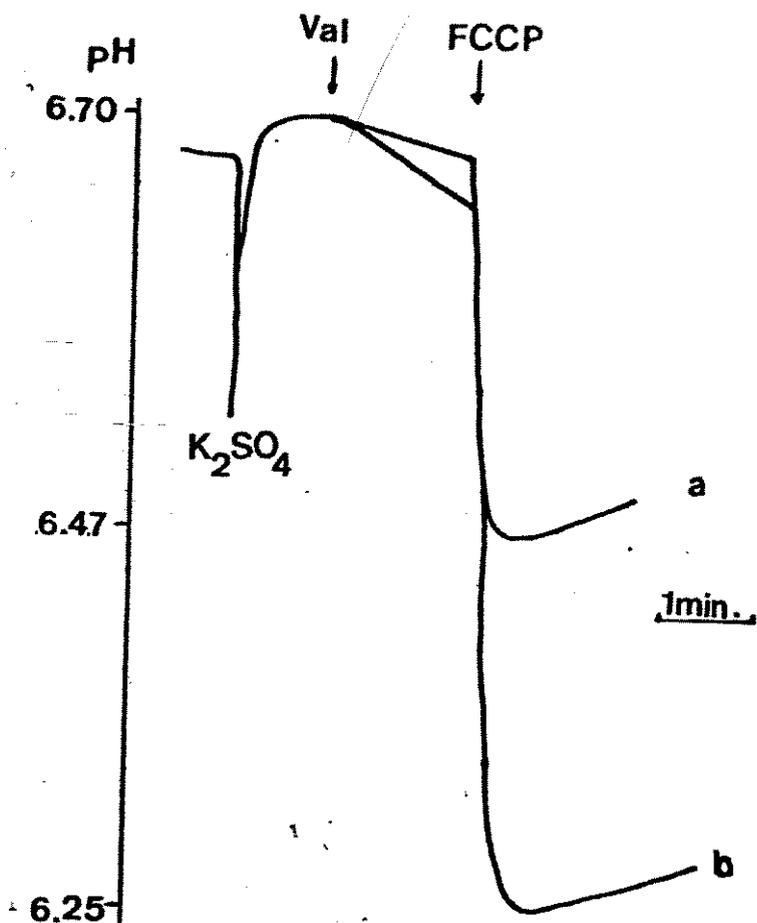


Figura 12- TRANSPORTE DE PRÓTONS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VESÍCULAS.

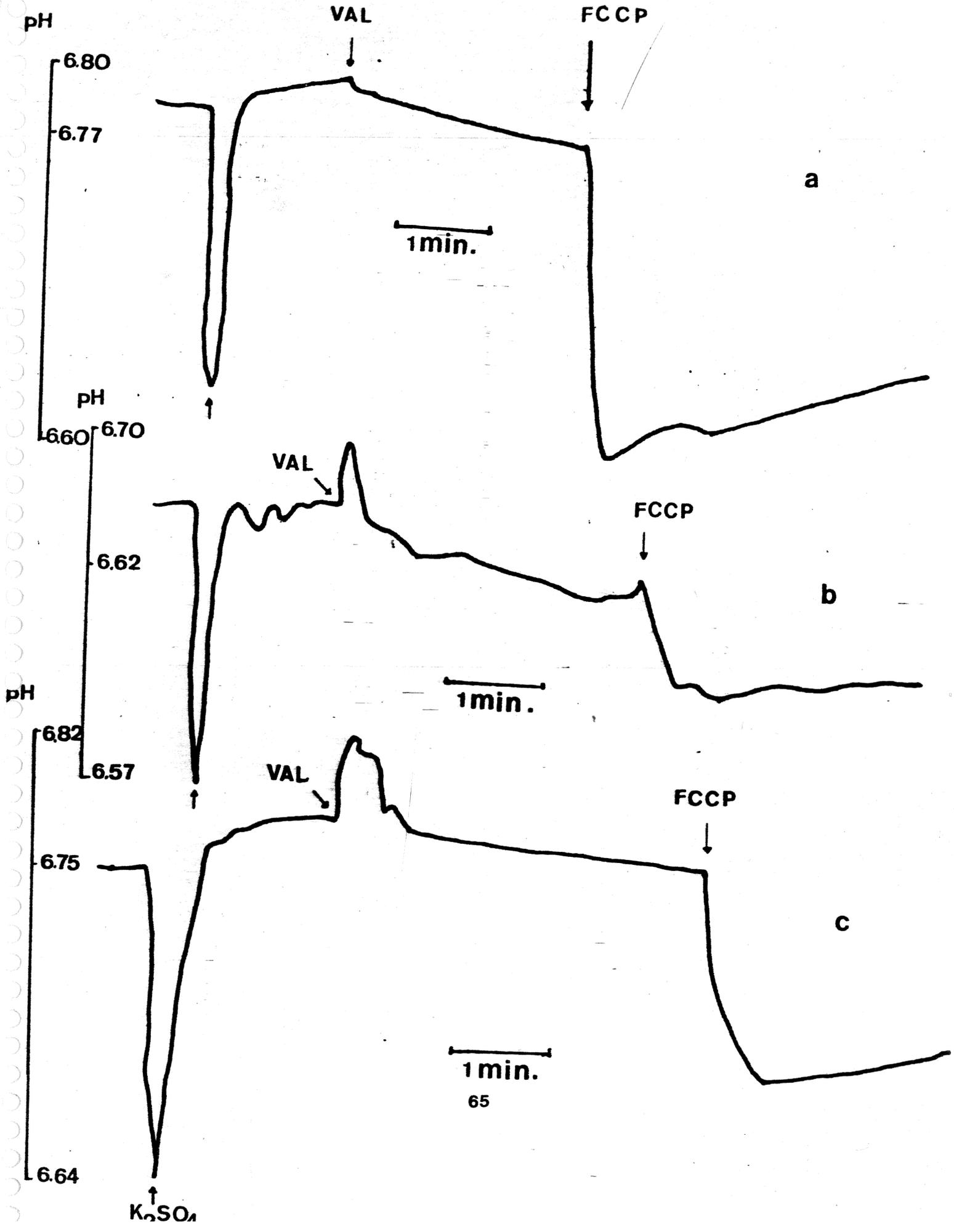
0,5ml (a) ou 1,0ml (b) de vesículas preparadas por fase reversa foram adicionados a 1,0ml ou 0,5ml de meio, respectivamente. As condições experimentais foram as mesmas da figura 11.

resultado razoável, com ambas as proteínas, a concentração inicial de proteína foi mantida em torno de 600 a 1000 μ g. Além disto, os ensaios realizados com amostras purificadas há mais de dois meses, adicionou-se DTT, na tentativa de recuperá-las de possíveis oxidações. A Figura 13 mostra as cinéticas obtidas com vesículas preparadas por diálise na presença da proteína isolada de mitocôndrias de tecido adiposo marrom e de batata e o controle (na ausência de proteína). Cálculos relativos à quantidade de prótons liberados (em nmol H⁺) referentes à velocidade inicial de cada experimento são dadas a seguir: no traçado (a), onde temos o experimento controle, da Figura 13, verifica-se a liberação de 7,129nmol H⁺ por minuto ; no traçado (b) onde observa-se a cinética com vesículas preparadas na presença da proteína isolada de mitocôndrias de tecido adiposo marrom, vê-se uma velocidade inicial de 103,88 nmol H⁺ por minuto, e ainda utilizando-se o valor proteico teórico calculado temos 805,27 nmol H⁺ / min./mg proteína. No traçado (c) da Figura 13 observa-se a cinética realizada com vesículas na presença da proteína isolada de mitocôndrias de batata, onde a velocidade inicial de saída de H⁺ é de 106,62 nmol H⁺ por minuto. O cálculo em função da quantidade de proteína nos mostra um valor de 903,55nmol H⁺/min./mg proteína. Para que estes valores calculados possam ser expressos de maneira comparativa, lançou-se mão de uma unidade equivalente aos três ensaios (nmol H⁺/min./ Δ total) Deste modo, os valores obtidos foram: no traçado (a) 0,097, no traçado (b) 4,37 e no traçado (c) 2,75. Deste modo verificou-se

que a proteína isolada de batata parece se comportar similarmente à UCP, de tecido adiposo marrom. As cinéticas realizadas com vesículas na presença de proteína (isolada de mitocôndrias de batata e de tecido adiposo marrom) após adição de GDP e ATP (150 μ M) e ácido palmítico (10 μ M) não mostraram grandes alterações. Segundo BOUILLAND, *et al*, (1983) nem sempre foi possível a observação do efeito inibidor de GDP quando este é adicionado apenas de um lado da membrana. Ele justifica afirmando que o sítio de ligação de GDP da proteína pode estar localizado em ambas as faces da vesícula, dependendo da forma que a proteína foi incorporada. Além disto, ácidos graxos podem estar ligados à proteína e estarem mascarando o efeito do GDP.

Estes experimentos foram repetidos com proteína recém isolada, tanto a de tecido adiposo marrom, como a de mitocôndrias de batata. Os resultados obtidos foram os mesmos descritos acima e os ensaios foram feitos na ausência de DTT.

Foram tiradas medidas de espalhamento de luz por estas vesículas e das formadas por fase reversa. Os dados obtidos estão na tab. II. As medidas obtidas por vesículas preparadas por fase reversa, as quais foram passadas por filtros de 0,2 μ e 0,4 μ não mostraram praticamente nenhuma alteração no tamanho, revelando se tratar de uma população homogênea. Observa-se que vesículas formadas por diálise apresentaram um tamanho bastante grande, com uma



população bastante heterogênea, em relação ao descrito na literatura (PETRI & WAGNER, 1979). As amostras foram mantidas em geladeira por uma semana. Após este período, foram tiradas novas medidas de espalhamento e verificou-se que o tamanho não se alterou. Optou-se então por ultracentrifugá-las a 150.000xg por 60 min. para separar as possíveis populações de vesículas. As medidas posteriores foram feitas dos sobrenadantes, e obtivemos valores bem menores. Isto nos faz acreditar que inicialmente tínhamos uma população razoavelmente heterogênea, onde parte das vesículas possuía tamanhos pequenos.

vesículas fase reversa	vesículas dialisadas	
	sem centrif.	após centrif.
(filtro 0,2 μ) 1354 A ^o	contr. 1577 A ^o	1034 A ^o
	prot. T.A.M. 2429 A ^o	1205 A ^o
	prot. Batata 2497 A ^o	1451 A ^o
(filtro 0,4 μ) 1468 A ^o	prot. T.A.M. 4169 A ^o	1466 A ^o

Tabela II- *MEDIDAS DE ESPALHAMENTO (light scattering)*. As amostras preparadas por fase reversa e por diálise (0,5ml) foram diluídas com 3,5ml de tampão TES 0,5mM; Na₂SO₄ 20mM, pH6,70. Estas amostras foram passadas por filtro 0,2 μ e 0,4 μ conforme discriminado acima. Os valores obtidos são médias de 4 leituras. As amostras dialisadas foram ultracentrifugadas a 150.000xg por uma hora e leituras do sobrenadante foram feitas.

4.0. DISCUSSÃO

Os resultados descritos inicialmente (Figuras de 1 a 3) só vieram confirmar os já descritos por SILVA (1991). Alguns parâmetros experimentais foram modificados, fato este que justifica a apresentação dos mesmos neste trabalho.

Primeiramente, os experimentos de ligação dos nucleotídeos aqui apresentados foram feitos em função do tempo de incubação, com o pH mantido em 6,7 e não em função do pH como apresentado por SILVA (1991). Os experimentos relativos ao consumo de oxigênio foram realizados com mitocôndrias isoladas em meio com sacarose e não com manitol como suporte osmótico. Os experimentos que avaliaram o potencial de membrana, foram feitos com diversas mitocôndrias vegetais (todas isoladas em meio com sacarose) e mitocôndrias de fígado de rato. A análise da atuação dos quatro nucleotídeos testados (ATP, ADP, GTP, GDP) e BSA foram feitas. Todos os ensaios foram desenvolvidos em meio com sacarose. Os experimentos aqui apresentados e os descritos por SILVA (1991) sugeriram a existência de uma proteína nas mitocôndrias de batata, localizada na membrana interna, com função similar à UCP, encontrada em mitocôndrias de tecido adiposo marrom.

Os resultados descritos por SILVA (1991) mostram o

efeito de BSA e nucleotídeos sobre a permeabilidade de mitocôndrias de batata. A ação de BSA e nucleotídeos foi analisada através de experimentos de inchamento mitocondrial. O aumento do volume da organela é consequência do influxo de água associado com o influxo do suporte osmótico (KCl). SILVA (1991), observou inchamento espontâneo destas mitocôndrias, indicando elevada permeabilidade das mesmas a K^+ e Cl^- . Foi observado que na presença de BSA ou de nucleotídeos ocorre redução deste inchamento, sendo os efeitos independentes e somatórios. Tanto BSA como os nucleotídeos diminuíram a permeabilidade destas mitocôndrias, isto é, atuaram de alguma forma no transporte de Cl^- destas mitocôndrias. SILVA, (1991), propôs, considerando seus resultados que a proteína isolada destas mitocôndrias poderia ser responsável pelo transporte de cloreto. Esta interpretação foi reforçada por experimentos onde a proteína isolada de mitocôndrias de batata foi incorporada em bicamadas e se verificou transporte de Cl^- . Transporte este sensível a presença de ATP (SILVA, 1991).

Com o objetivo de relacionarmos o comportamento diferenciado de mitocôndrias de batata e milho em relação às outras mitocôndrias estudadas neste laboratório, e relacioná-lo à presença da proteína de 35 KDa, foram obtidos anticorpos policlonais contra esta proteína isolada de batata. Surpreendentemente foram obtidos, através da técnica de Western Blotting, resultados positivos, isto é, reações cruzadas com proteínas mitocondriais de todos os vegetais

testados, inclusive proteínas mitocondriais de beterraba e feijão onde nucleotídeos de purina e BSA não mostraram efeito. Deve-se ressaltar alguns fatores, de ordem experimental, para possíveis interpretações destes resultados. O fato de que algumas frações proteicas utilizadas no esquema de imunização (purificadas a partir de mitocôndrias de batata), apresentavam duas bandas, de peso molecular muito próximo, quando visualizadas pela eletroforese, pode ter interferido nos resultados. Fato este também observado por SILVA (1991). Deste modo, foi impossível a separação das mesmas para inoculação nos coelhos. Pode ser que uma destas bandas isoladas venha a ser a translocase de nucleotídeos de adenina (P.M. 30.000), que é comum à todas as mitocôndrias. A metodologia utilizada para o isolamento da proteína de batata foi o mesmo descrito para o isolamento da UCP de tecido adiposo marrom (LIN & KLINGENBERG, 1982). Uma das diferenças deste método para o método de isolamento da translocase de nucleotídeos de adenina é a temperatura em que se processa o experimento (a eluição da coluna de HTP para o isolamento da translocase se processa a 4°C, enquanto que para a UCP se desenvolve à temperatura ambiente). Além disto, quando se deseja o isolamento da translocase, adiciona-se CAT ao processo, pois o complexo CAT-translocase é mais estável.

Foram feitos inclusive, alguns experimentos de isoeletrofocalização com amostras de proteínas isoladas de mitocôndrias de batata à temperatura ambiente e à 4°C (dados não

mostrados). Nestes experimentos observou-se uma ligeira diferença entre o pI de cada uma das amostras testadas.

De posse destes dados, pode-se pensar que, mesmo em pequenas concentrações, anticorpos para mais de uma proteína mitocondrial tenham sido produzidos. Além disto, a técnica utilizada, Western Blotting, é uma técnica de alta sensibilidade, capaz de detectar em casos de soros hiperimunes de 1-2ng de proteínas específicas (BURNETTE, 1980).

Um segundo fator que deve ser levado em conta é o fato da UCP de tecido adiposo marrom pertencer a uma família de carreadores mitocondriais e estes possuem grande homologia sequencial (RUNSWICK, *et al*, 1987; AQUILA, *et al*, 1987; KLINGENBERG, 1990). Deste modo, é possível que tenha ocorrido reação cruzada com proteínas mitocondriais de feijão e beterraba que pertençam a esta família, o que não significa se tratar da mesma proteína. Esta interpretação faz sentido, levando-se em conta que foi usado soro total, sem purificação nestes ensaios.

Os experimentos de reconstituição das proteínas isoladas de batata e de tecido adiposo marrom em vesículas lipídicas foram desenvolvidos no laboratório do Prof. Hernan Chaimovich e da Profa. Iolanda Midea Cuccovia (IQ-USP). Os isolamentos das mitocôndrias de tecido adiposo marrom e da UCP deste tecido foram

realizados no laboratório do Prof. Antônio Carlos Bianco (ICB-USP).

A análise dos resultados apresentados a partir da Figura 8 mostra que houve a necessidade de se padronizar passo a passo o processo de reconstituição. Muitos detalhes experimentais não são obtidos através da literatura (STRIELEMAN, *et al*, 1985(a) e (b); KATIVAR & SHRAGO, 1989; BOUILLAUD, *et al*, 1983; JEZEK, *et al*, 1990; KLINGENBERG & WINKLER, 1986), o que levou-nos a fazer extensivos controles. Numa primeira tentativa, foi usada a sonda fluorescente, piranina, porém não foram obtidos resultados satisfatórios (dados não mostrados). Com o objetivo de utilizar um sistema de reconstituição em que as condições fossem próximas das fisiológicas, o primeiro passo foi a escolha dos componentes lipídicos constituintes das vesículas. Segundo DAUM (1985), a membrana mitocondrial possui 18% de cardiolipina, entre outros lipídios. Optou-se então por se fazer vesículas de fosfatidilcolina (lecitina) e cardiolipina, na proporção de 82:18, respectivamente. Nos trabalhos desenvolvidos por KATIVAR & SHRAGO, 1989; STRIELEMAN, *et al*, 1985 (a) e (b) foram utilizadas as proporções de 49:49:1 para fosfatidilcolina; fosfatidiletanolamina e cardiolipina, respectivamente.

A escolha do detergente a ser utilizado para o isolamento da proteína é um passo crítico para este tipo de experimento. BOUILLAUD, *et al*, 1983 e LIN & KLINGENBERG, 1980

utilizaram TX-100; STRIELEMAN *et al*, 1985 (a) e (b) utilizaram octil-glicosídeo, passando a amostra por uma coluna de ATP-agarose e não de HTP, devido ao fato de octil-glicosídeo interagir com esta última coluna. KATIVAR & SHRAGO, 1989 utilizaram TX-100 e trocaram por octil-glicosídeo na presença de Bio Beads e lecitina. A retirada do octil-glicosídeo, neste caso foi feita por diálise.

De acordo com as possibilidades experimentais, as proteínas tanto a de batata como a de tecido adiposo marrom foram isoladas com TX-100. A retirada deste detergente e a troca simultânea por octil-glicosídeo foram efetuadas, como mostrado nas Figuras 8 e 9. A retirada do octil-glicosídeo se fez por diálise, como mostrado na Figura 10, seguindo a metodologia proposta por KATIVAR & SHRAGO, (1989), com algumas modificações.

Os cálculos de velocidade relativos à Figura 13 foram obtidos considerando a alcalinização que ocorre após adição de valimonicina, observados nos traçados B e C. Embora não possamos explicar o motivo deste aumento de pH, podemos afirmar que estes dados foram repetitivos e que as proteínas incorporadas tiveram comportamento similar. Por outro lado, esta alcalinização nunca foi observada em nenhum dos controles feitos (vesículas preparadas na ausência de proteína).

WINKLER & KLINGENBERG (1992), fizeram uma análise

profunda das condições experimentais utilizadas até então para incorporação da UCP em vesículas lipídicas. Estes autores, primeiramente analisam o uso dos diferentes detergentes para o isolamento da UCP. Afirmam que em TX-100 a UCP é relativamente estável e facilmente purificada, porém, este detergente não pode ser facilmente removido por processos onde vesículas grandes são formadas, devido a sua baixa CMC. Por outro lado, detergentes de alta CMC como octil-glicosídeos, segundo estes autores, inativam a UCP, em contraste com outros autores (STRIELEMAN, *et al*, 1985 (b); JEZEK, *et al*, 1990). Além disto, WINKLER & KLINGENBERG (1992) avaliam que processos longos de diálise podem inativar a proteína, e sugerem que esta etapa seja substituída pelo uso de Amberlite XAD. Estes autores utilizaram detergentes tipo polyoxyethylene. Outro aspecto de reconstituição analisado por estes autores se refere aos componentes lipídicos das vesículas. Os melhores resultados por eles obtidos foram com vesículas constituídas somente de lecitina. Eles verificaram que a presença de asolecitina inativa praticamente 100% da atividade da UCP.

WINKLER & KLINGENBERG (1992), realizaram cinéticas com a UCP e esta foi acompanhada simultaneamente por dois sistemas: alterações de pH interno, usando a sonda piranina e alterações de pH externo, utilizando eletrodo sensível ao pH. Além disto, analisaram quantitativamente a cinética de efluxo de K^+ (já que este foi incorporado no interior das vesículas). Com base nas observações

feitas por estes autores, pode ser que os resultados obtidos por nós não tenham se desenvolvido nas condições ótimas e que os valores obtidos sejam decorrentes da baixa atividade das proteínas, devido a sua parcial sua inativação.

Considerando o comportamento diferenciado de mitocôndrias isoladas de batata em relação à mitocôndrias de fígado nos experimentos de ligação de nucleotídeos e acoplamento da respiração na presença dos mesmos, sugeriu-se a presença de uma proteína nestas mitocôndrias com a propriedade de translocar prótons. O comportamento destas mitocôndrias e das isoladas de coleóptiles de milho, quanto ao incremento de potencial de membrana na presença de nucleotídeos e BSA reforçam esta interpretação. Com o objetivo de relacionarmos o comportamento destas mitocôndrias com a presença de uma proteína específica, foi feito o isolamento da mesma e anticorpos policlonais foram obtidos. Considerando as reações cruzadas destes anticorpos com proteínas mitocondriais de outros vegetais insensíveis aos efeitos dos nucleotídeos e de BSA, achou-se necessário a incorporação da mesma em sistemas artificiais. Esta etapa se fez necessária para podermos verificar, se em membranas artificiais esta proteína possuía a propriedade de translocar prótons, como a UCP, de tecido adiposo marrom, já bem caracterizada. Com esta finalidade, esta última proteína foi isolada e reconstituída simultaneamente com a isolada de mitocôndrias de batata. Embora estes resultados de cinética de translocação de H^+

ainda não sejam definitivos, o comportamento das duas proteínas foram bastante semelhantes. Estes dados vêm reforçar nossa hipótese de que as mitocôndrias de batata e possivelmente de alguns outros vegetais possam possuir uma proteína com função termogênica.

5.0. RESUMO

Estudos recentes deste laboratório indicaram que o baixo grau de acoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata parece estar relacionado à existência de uma proteína de aproximadamente 35 KDa, presente na membrana interna destas mitocôndrias, com a propriedade de transportar H^+ por um mecanismo sensível a nucleotídeos de purina. No presente trabalho, obtivemos mitocôndrias de batata com controle respiratório mais elevado que em estudos anteriores, graças às modificações introduzidas no procedimento de isolamento. Ainda assim, a velocidade de respiração destas mitocôndrias, no estado IV, foi reduzida pela adição de ATP e ADP, mesmo na presença de carboxiatractilato (CAT). Experimentos de ligação de nucleotídeos de purina mostraram que estas mitocôndrias apresentam a habilidade de ligar $1,3 \text{ nmol ATP. mg}^{-1} \text{ proteína}$; $1,1 \text{ nmol ADP. mg}^{-1} \text{ proteína}$; $0,7 \text{ nmol GTP. mg}^{-1} \text{ proteína}$. Experimentos de competição mostraram ainda, a maior afinidade de ligação destas mitocôndrias por nucleotídeos de adenina. A construção de um potencial de membrana mais elevado por mitocôndrias de batata e de coleóptiles de milho é dependente da presença de BSA e nucleotídeos de purina. A presença destes não afeta o potencial construído por mitocôndrias de feijão, beterraba e fígado de rato. Anticorpos contra esta proteína de 35KDa isolada de mitocôndrias de batata

foram obtidos e utilizando a técnica de Western Blotting foi verificado que as outras mitocôndrias vegetais em estudo neste laboratório como as de coleóptiles de milho, feijão e beterraba possuem esta proteína ou similar como mostrado pela reação cruzada com estes anticorpos. Contrariamente, uma série de mitocôndrias não vegetais, tais como as de fígado de rato, coração bovino e *T. cruzi* epimastigotas não mostraram reação com estes anticorpos. Experimentos de reconstituição desta proteína isolada de batata e da UCP isolada de tecido adiposo marrom foram realizados e demonstraram que, no sistema por nós utilizado, elas apresentam comportamento similar, isto é, nas vesículas com proteína incorporada, a velocidade de efluxo de H^+ foi maior que em vesículas controle, preparadas na ausência de proteína.

6.0. SUMMARY

Early studies from this laboratory have indicated that the low degree of coupling between respiration and oxidative phosphorylation in potato mitochondria seems to be related to a 35 KDa protein, present in the inner membrane of those mitochondria, with the ability to translocate H^+ with a mechanism sensitive to purine nucleotides. In this work, we obtained potato mitochondria with better respiratory control, thanks to modifications made in the isolation procedure. In spite of the isolation method, the respiration rate of these mitochondria in state IV decreased after addition of ADP or ATP nucleotides in the presence of carboxyatractylate (CAT). Binding experiments showed that the mitochondria have the ability to bind 1,3 nmol ATP. mg^{-1} protein; 1,1 nmol ADP. mg^{-1} protein; 0,7 nmol GTP. mg^{-1} protein. Competition experiments showed the largest affinity of binding of these mitochondria towards adenine nucleotides. The increase of potato and corn mitochondria membrane potential is dependent on the presence of BSA and purine nucleotides. The presence of BSA and nucleotides did not affect the membrane potential ($\Delta\psi$) of red beet roots (*Beta vulgaris*); bean (*Phaseolus vulgaris*) and rat liver mitochondria. Antibodies against a 35 KDa protein isolated from potato mitochondria were obtained and, using the Western blotting technique, we verified that the other plant mitochondria in studies

in this laboratory, such as corn, red beet roots and bean, have this or a similar protein as shown by cross reactivity with these antibodies. In contrast a series of non-plant mitochondria, also studied in this laboratory, such as those from rat liver, beef heart and *T. cruzi* epimastigotes did not show cross reactivity with these antibodies. Reconstitution experiments of this protein and of UCP isolated from brown adipose tissue were performed and showed that, in the system used, they have similar behavior. In the vesicles with protein incorporated, the rate of H^+ efflux was larger than in control vesicles, prepared without either protein.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. The plasma membrane *Molecular Biology of the cell*. New York & London, pp.255-317, 1983.
- ANDREYEV, A.Y.; BONDAREVA, T. O.; DEDUKOVA, V. I.; MOKHOVA, E. N.; SKULACHEV, V. P.; VOLKOV, N. I. Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids. *FEBS lett.*, 226 (2):265-269, 1988.
- AQUILA, H.; LINK, T. A.; KLINGENBERG, M. The uncoupling protein from bat 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, 1985.
- AQUILA, H.; LINK, T. A.; KLINGENBERG, M. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family *FEBS lett.* 212 (1): 01-09, 1987.
- BAPTISTA, M. S. *Ligação e troca iônica em interfaces zwitteriônicas*. Tese de mestrado, São Paulo, 1992.
- BARON, C. & THOMPSON, T. E. Solubilization of bacterial membrane proteins using alkyl glucosides and dioctanoyl phosphatidylcholine. *Biochem. Biophys. Acta*, 382:276-285, 1985.
- BEAVIS, A. D. N-Ethylmaleimide and mercurials modulate inhibition of mitochondrial inner membrane anion channel by H^+ , Mg^{++} and cationic amphiphiles. *Biochem. Biophys. Acta*, 1063:111-119, 1991.
- BEAVIS, A. D. & GARLID, K. D. Effects of divalent cation (Mg^{++}) depletion and DCCD on cation, anion and proton transport in rat liver mitochondria. *Fed.Proc.* 42 (7):1945, 1983.
- BEAVIS, A. D. & VERCESI, A. E. Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg^{++} -insensitive inner membrane anion channel. *J. Biol. Chem.*, 267 (5):3079-3087, 1992.

- BIANCO, A. C. & SILVA, J. E. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in Brown Adipose Tissue: Receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology* 120(1):55-62 1987(a).
- BIANCO, A. C. & SILVA, J. E. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of Brown Adipose Tissue. *J. Clin. Invest.* 79(1):295-300, 1987(b).
- BIANCO, A. C. & SILVA, J. E. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of Brown Adipose Tissue nuclear T3 receptors. *Am. J. Physiol.* 255(4 part 1): E496-E503, 1988.
- BIANCO, A. C. ; SHENG, X. ; SILVA, E. Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J. Biol. Chem* 263(34):18168-18175, 1988.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99, 1987.
- BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; GULIK-KRZYWICK; GARY-BOBO, C. M. The possible proton translocating activity of the mitochondrial uncoupling protein of brown adipose tissue. *FEBS lett.* 164:272-276, 1983.
- BRYCE, J. H.; AZCON-BIÉTO, J.; WISKICH, J. T.; DAY, D. A. 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, 1990.
- BURNETTE, W. N. "Western Blotting" : Eletrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels to unmodified nitro cellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112:195-203, 1981.
- CANNON, B. & LINDBERG, O. Mitochondria from brown adipose tissue: isolation and properties. *Methods Enzymol.*, 55:65-78, 1979.

- CARVALHO, S. D.; KIMURA, E. T.; BIANCO, A. C.; SILVA, J. E. Central role of Brown Adipose Tissue thyroxine 5'-deiodinase on thyroid hormone-dependent thermogenic response to cold. *Endocrinology* 128 (4):2149-2159, 1991.
- CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.*, 17:65-134, 1956.
- CLEMENT, N. R. & GOULD, J. M. Pyranine (8-hydroxy -1,3,6- as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 20:1534-1538, 1981.
- CUNNINGHAM, S. A.; WIESINGER, H.; NICHOLLS, D. G. Quantification of fatty acid activation of the uncoupling protein in brown adipocytes and mitochondria from the guinea-pig. *Eur. J. Biochem*, 157: 415-420, 1986.
- DALGARNO, L. & BIRT, L. M. Free fatty acid in carrot-tissue preparations and their effect on isolated carrot mitochondria. *Physiol. Veg.*, 10:181-198, 1963.
- DAUM, G. Lipids of mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 822: 1-42, 1985.
- DAY, D. A.; WISKICH, J. T.; BRYCE, J. H.; DRY, I. B. 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, 1987.
- DEAMER, D. W. Proton permeability in biological and model membranes. *Intracellular pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular functions*, Alan R. Liss. pp.173-187, 1982.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F. Effect of bovine serum albumin on membrane potential in plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, 59:177-182, 1983.
- DIOLEZ, P. & MOREAU, F. Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 806:56-63, 1985.

- DOUCE, R. **Mitochondria in higher plants: structure, function, and biogenesis.** Academic, Orlando, 327p., 1985.
- DRY, I. B. & WISKICH, J. T. Role of external adenosine triphosphate/adenosine diphosphate ratio in the control of plant mitochondrial respiration. *Arch. Biochem. Biophys.*, 217 (1):72-79, 1982.
- DUCET, G. Influence of bovine serum albumine on the proton conductance of potato mitochondria membranes. *Planta*, 147:122-126, 1979.
- DUPERON, R.; MEANCE, J.; LARTILLOT, S.; DUPERON, P. Les composés stéroliques des mitochondries végétales recherches préliminaires sur la localisation de ces substances à l'intérieur de ces organites. *Physiol. Veg.*, 13:539-548, 1975.
- ELAMRANI, K. & BLUME, A. Effect of the lipid phase transition on the kinetics of H^+/OH^- diffusion across phosphatidic acid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 727:22-30, 1983.
- GARLID, K. D. New insights into mechanisms of anion uniport through the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1018:151-154, 1990.
- GARLID, K. D. & BEAVIS, A. D. Evidence for the existence of an inner membrane anion channel in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 853:187-204, 1986.
- GORNAL, A. G.; BARDWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751, 1949.
- GOULD, R. J.; GINSBERG, B. H.; SPECTOR, A. A. Effects of octyl β -glucoside on insulin binding to solubilized membrane receptors. *Biochemistry*, 20:6776-6781, 1981.
- HALL, J. L.; FLOWERS, T. J.; ROBERTS, R. M. **Plant cell Structure and metabolism.** Longman, New York, 2nd edition, 543p, 1982.

- HAUSER, H.; OLDANI, D. PHILLIPS, M. C. Mechanism of ion escape from phosphatidylcholine and phosphatidylserine single bilayer vesicles. *Biochemistry*, 12 (22):4507-4516, 1973.
- HELENIUS, A.; FRIES, E.; KARTENBECK, J. Reconstitution of Sem liki forest virus membrane. *J. Cell. Biol.*, 75:866-880, 1977.
- HERVÉ, M.; CYBULSKA, B.; GARY-BOBO, C. M. Cation permeability induced by valinomycin, gramicidin D and amphotericin B in large lipidic unilamellar vesicles studied by ^{31}P -NMR. *Eur. Biophys. J.* 1:121-128, 1985.
- HOCH, F. L. Cardiolipins and biomembrane function *Biochim. Biophys. Acta*, 1113:71-133, 1992.
- HOLLOWAY, P. W. A simple procedure for removal of TX-100 from protein samples. *Analytical Biochemistry*, 53:304-308, 1973.
- HOUSTEK, J.; KOPECKY, J.; BAUDYSOVÁ, M.; JANIKOVÁ, D.; PAVELKA, S.; KLEMENT, P. Differentiation of brown adipose tissue and biogenesis of thermogenic mitochondria in situ and in cell culture. *Biochim. Biophys. Acta*, 1018:243-247, 1990.
- JENSEN, B. D.; GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. 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, 1986.
- JEZEK, P. & DRAHOTA, Z. Sulfhydryl groups of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Distinction between sulfhydryl groups of the H^+ channel and the nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem*, 183:89-95, 1989.
- JEZEK, P. & GARLID, K. D. New substrates and competitive inhibitors of the Cl^- translocating pathway of UCP of brown adipose tissue mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 265:19303-19311, 1990.
- JEZEK, P.; OROSZ, D. E.; GARLID, K. D. Reconstitution of the UCP of brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 31:19296-19302, 1990.

- JUANG, R.; CHANG, Y.; SUNG, H.; SU, J. Over-drying method for polyacrilamide gel slab packed in cellophane sandwich. *Anal. Biochem.*, 141:348-350, 1984.
- KAMO, N.; MURATSUGU, M.; HONGO, R.; KOBATAKE, J. 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, 1979.
- KANO, K. & FENDLER, J. H. Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. *Biochim. Biophys. Acta*, 509:289-299, 1978.
- KAPLAN, R. S. & PEDERSEN, P. L. Characterization of phosphate efflux pathway in rat liver mitochondria. *Biochem. J.*, 212:279-288, 1983.
- KATIVAR, S. S. & SHRAGO, E. 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, 1989.
- KESSLER, R. J. & FANESTH, D. D. Interference by lipids in the determination of protein using Bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 159:138-142, 1986.
- KLINGENBERG, M. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *TIBS*, 15:108-112, 1990.
- KLINGENBERG, M. & LIN, C. S. Isolation and hydrodynamic characterization of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Methods Enzymology*, 126:490-498, 1986.
- KLINGENBERG, M. & WINKLER, E., *EMBO J.*, 4:3087-3092, 1985.
- KLINGENBERG, M. & WINKLER, E. Reconstitution of an H⁺ translocator, the "uncoupling protein" from brown adipose tissue mitochondria, in phospholipid vesicles. *Methods Enzymology*, 127:772-779, 1986.

- KLINGENBERG, M.; HERLT, M.; WINKLER, E. Nucleotide binding assay for uncoupling protein from brown adipose tissue. *Methods Enzymology*, 126:498-504, 1986.
- KONDRITZER, A. A.; ELLIN, R. I.; EDBERG, L. J. Investigation of methyl pyridinium-2-aldoxime salts. *J. Pharmaceutical Sci.*, 50:109-112, 1961.
- LAEMMLI, V.L. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
- LA NOUE, K. F. & SCHOOLWERTH, A. C. Metabolite transport in mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 48:871-922, 1979.
- LEVY, D.; BLUZAT, A.; SEIGNEURET, M.; RIGAUD, J. L. A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated TX-100 removal. *Biochim. Biophys. Acta*, 1025:179-190, 1990.
- LIN, C. S. & KLINGENBERG, M. Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.*, 113 (2):299-303, 1980.
- LIN, C. S. & KLINGENBERG, M. Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown adipose tissue. *Biochemistry*, 21:2950-2956, 1982.
- LUVISETTO, S.; PIETROBON, D.; AZZONE, G. F. Uncoupling of oxidative phosphorylation. I. Protonophoric effects account only partially for uncoupling. *Biochemistry*, 26:7332-7338, 1987.
- MANDOLINO, G.; DE SANTIS, A.; MELANDRI. Localized coupling in oxidative phosphorylation by mitochondria from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Biochim. Biophys. Acta*, 723:428-439, 1983.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 191:144-148, 1961.
- MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling on oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.*, 41:445-502, 1966.

MURATSUGU, M.; KAMO, N.; KURIHARA, K.; KOBATAKE, Y. Selective electrode for Dibenzil Dimethyl Ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 464:613-619, 1977.

NICHOLLS, D. G. *Bionergetics. An introduction to the chemiosmotic theory*- Academic Press, London - New York: 65, 1982.

NICHOLLS, D. G. 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, 1974.

NICHOLLS, D. G. 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, 1974.

NICHOLLS, D. G. 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, 1976.

NICHOLLS, D. G. Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 549:1-29, 1979.

NICHOLLS, D. G. & LINDBERG, O. The influence of albumin and nucleotides on passive ion permeabilities. *Eur. J. Biochem.*, 37:523-530, 1973.

NICHOLLS, D. G. & LOCKE, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* 64:1-64, 1984.

NICHOLLS, D. G. & RIAL, E. Brown fat mitochondria *TIBS*, 9:489-491, 1984.

NICHOLS, J. W.; HILL, M. W.; BANGHAM, A. D.; DEAMER, D. W. Measurement of net proton-hydroxyl permeability of large unilamellar liposomes with the fluorescent pH probe, 9-aminoacridine. *Biochim. Biophys. Acta*, 596:393-403, 1980.

- NOZAKI, Y. & TANFORD, D. C. Proton and hydroxide ion permeability of phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (7):4324-4328, 1981.
- PETRI, W.A. & WAGNER, R.R. Reconstitution into liposomes of the glucoprotein of vesicles stomatitis virus by detergent dialysis. *J. Biol. Chem.*, 254 (11):4313-4316, 1979.
- REDELMEIER, T. E.; MAYER, L. D.; WONG, K. F.; BALLY, M.B.; CULLIS, P. R. Proton flux in large unilamellar vesicles in response to membrane potentials and pH gradients. *Biophys. J. Biophysical Soc.*, 56:385-393, 1989.
- RICQUIER, D.; GERVAIS, C.; KADER, J. C.; HERMON, P. Partial purification by guanosine 5'-diphosphate-agarose affinity chromatography of the 32000 molecular weight polypeptide from mitochondria of brown adipose tissue. *FEBS lett.*, 101 (1):35-38, 1979.
- RICQUIER, D.; BARLET, J. P.; GAREL, J. M.; COMBES-GEORGE, M.; DUBOIS, M. P. An immunological study of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *Biochem. J.* 210:859-866, 1983.
- ROTTENBERG, H. Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria by general anesthetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (11):3313-3317, 1983.
- RUNSWICK, M. J.; POWELL, S. J.; NYREN, P.; WALKER, J. E. Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein. *EMBO J.*, 6 (5):1367-1373, 1987.
- SCHNEIDER, W. C. & HOGEBOM, G. H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 183:123-128, 1950.
- SCHONFELD, P. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend to the type of mitochondria? *FEBS lett.*, 264 (2):266-268, 1990.
- SHEETZ, M. P. & CHAN, S. I. Effect of sonication on the structure of lecithin bilayers. *Biochemistry*, 11 (24):4573-4580, 1972.

- SILVA, M. A. P. Características do transporte de cálcio, fosfato e prótons em mitocôndrias de plantas. Tese de Doutorado, Campinas, SP, 163 p., 1991.
- SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720-731, 1972.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150:76-85, 1985.
- STRIELEMANN, P. J.; SCHALINSKE, K. L.; SHRAGO, E. 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, 1985(a).
- STRIELEMANN, P. J.; SCHALINSKE, K. L.; SHRAGO, E. Fatty acid activation of the reconstituted brown adipose tissue mitochondria uncoupling protein. *J. Biol. Chem.*, 260 (25):13402-13405, 1985 (b).
- STUBBS, G. W.; SMITH, H. G.; LITMAN, B. J. Alkyl glucosides as effective solubilizing agents for bovine rhodopsin. A comparison with several commonly used detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 425:46-56, 1976.
- SZOKA, F. & PAPAHAJIOPOLOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 (9):4194-4198, 1978.
- TOWBIN, H.; STACHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354, 1979.
- UMBRUT, B. & STAUFFER, A. *Monomeric & Biochemical Techniques*, 5th ed., 1972.
- UPRETI, G. C.; RATCLIFF, R. A.; RICHES, P. C. Protein estimation in

- tissues containing high levels of lipid: modifications to Lowry's method of protein determination. *Analytical Biochemistry*, 168:421-427, 1988.
- VAZ, W. L. C.; NICKSCH, A.; JÄHNIG, F. Eletrostatic interactions of charged lipid membranes. *Eur. J. Biochem.* 83:299-305, 1978.
- WANG, C. S. & SMITH, R. L. Lowry determination of protein in the presence of triton X-100. *Analytical Biochemistry*, 63:414-492, 1975.
- WHITEHOUSE, D. G. ; FRICAUD, A. ; MOORE, A. L. Role of nonohmicity in the regulation of electron transport in plant mitochondria. *Plant. Physiol.*,91:487-492, 1989.
- WIESENBERGER, G.; LINK, T. A. MRS3 and MRS4, two suppressors of mt RNA splicing defects in Yeast, are new members of the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* ,217:23-37, 1991.
- WINKLER, E. & KLINGENBERG, M. An improved procedure for reconstitution of the uncoupling protein and in-Dept analysis of H^+ / OH^- transport. *Eur. J. Biochem.*, 207 (1):135-145, 1992.
- WILSON, I. B.; GINSBURG, S.; QUAN, C. Molecular complementariness as basis for reactivation of alkyl phosphate-inhibited enzyme. *Arch. Biochem. Biphys.* 77:286-296, 1958.
- WOJTCZAK, L. Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport and energy-coupling processes. *J. Bionerg. Biomemb.*,8:293-311, 1976.
- WOJTCZAK, L. & WOJTCZAK, A. B. Uncoupling of oxidative phosphorylation and inhibition of ATP-Pi exchange by a substance of insect mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 39:277-286, 1960.