20.148

INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PAULA BRESCIANI MARTINS DE ANDRADE

Tese de Doutorado

**Proteína Desacopladora Mitocondrial de Plantas, PUMP:
Estudos Calorimétricos e Funcionalidade da AtPUMP de
Arabidopsis thaliana expressa em *E. coli***

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Departamento de Bioquímica**

Orientador : Prof. Dr. Hernan Chaimovich

SÃO PAULO

2002

**"Proteína Desacopladora Mitocondrial de Plantas, PUMP:
Estudos Calorimétricos e Funcionalidade da AtPUMP de
Arabidopsis thaliana expressa em *E.coli*"**

**PAULA BRESCIANI
MARTINS DE ANDRADE**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. HERNAN CHAIMOVICH GURALNIK
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. BAYARDÓ BAPTISTA TORRES
IQ – USP

Prof. Dr. RUI CURI
ICB – USP

Prof. Dr. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO
UNICAMP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETTO
ICB – USP

SÃO PAULO
04 DE SETEMBRO 2002.

Ao Guilherme,
por ser uma pessoa maravilhosa, pelo
carinho, pelo respeito e por tornar os meus
dias mais felizes.

Agradeço...

Ao Hernan, por quem tenho grande admiração, pela orientação e por permitir que eu desenvolvesse o meu trabalho com total liberdade. Também pelo incentivo constante, pelo apoio nas horas decisivas, e pelas conversas.

A Iolanda, que é uma pessoa muito especial e verdadeira, pela ajuda no laboratório tanto na prática quanto na resolução de dúvidas cotidianas.

Aos pesquisadores Aníbal E. Vercesi, Paulo Arruda, Petr Jezek, e Maria Lúcia Bianconi pelo privilégio da convivência e colaboração. Em especial, à Alicia Kowaltowski, por me ajudar a vislumbrar novos horizontes.

A todas as pessoas do grupo pela convivência diária, sempre agradável e estimulante. Em especial, ao Pedro, ao Xuds e ao Maurício, pelas valiosas contribuições ao longo de todos os anos de trabalho.

Ao Flávio, Luís Gustavo, David, TC, Fábio F., Guilherme “Peixe”, Marcão, Pi, Joelma, Tereza, Márcia e ao pessoal do bloco 12 (espero ter lembrado de todo mundo) pela amizade e pelos bons momentos compartilhados. Em especial ao Flávio e Luís Gustavo, pelas conversas e a preocupação com a ciência; e à Joelma, pelo humor refinado.

À Tatiana, pela “herança” e pela amizade, que foram muito importantes nos primeiros passos.

A Cleo, pela ajuda com os géis e pelas conversas agradáveis.

A Angélica, pela ajuda na Pró Reitoria de Pesquisa.

Ao brasileiro Jiri, pela amizade inestimável e pela contribuição fundamental à minha formação científica.

A Neusa e a Neide, pelo trabalho de apoio ao laboratório.

A FAPESP, pela concessão da bolsa, que me permitiu desenvolver um trabalho de qualidade.

A Pró Reitoria de Pós Graduação, cujo apoio foi imprescindível para a apresentação do trabalho em congressos no exterior.

Ao Instituto de Química, pela ótima infraestrutura oferecida.

Ao Adalberto e a Izabel, pelo apoio e pela acolhida, em todos os sentidos.

Aos meus pais, pela minha existência e por sempre acreditarem em mim; e às minhas queridas irmãs, com quem compartilho essa conquista.

A Maria Inês, por me ajudar a enxergar a vida, e eu mesma, com novos olhos.

A Vicky e a Didinha, pelo carinho e lealdade eterna.

A todos, um grande abraço.

Paula

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
OBJETIVOS.....	vi
ABREVIACÕES.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Mitocôndria, desacoplamento e termogênese.....	1
1.2 Tecido Adiposo Marrom (BAT).....	3
1.3 Proteínas desacopladoras.....	5
1.3.1 UCP1 (Proteína Desacopladora 1).....	5
1.3.2 UCP2 e UCP3	6
1.3.3 BMCP1 e UCP4	8
1.3.4 PUMP, a proteína mitocondrial desacopladora de plantas.....	8
1.3.5 StUCP	10
1.3.6 AtPUMP1 e AtPUMP2.....	11
1.3.7 SfUCPa e SfUCPb.....	13
1.3.8 UCP em vertebrados ectotérmicos	14
1.3.9 UCP em protozoários.....	14
1.3.10 UCP em fungos.....	15
1.4 Estrutura e função das UCPs.....	16
1.5 Reconstituição das UCPs de mamíferos e de plantas em proteolipossomos e o mecanismo de transporte de prótons pelas UCPs.....	20
1.6 Vias desacopladoras presentes em mitocôndrias de plantas: PUMP, AOx (Oxidase Alternativa) e o canal de K ⁺	26
1.6.1 PUMP e a Oxidase Alternativa (AOx).....	26
1.6.2 Canal de K ⁺	28
1.7 Produção de calor em plantas.....	29
1.8 Membranas Biológicas e sistemas modelo.....	31
1.9 Fluorescência: princípios gerais.....	35
1.10 Microcalorimetria.....	40
2. METODOLOGIA.....	41
2.1 Principais ácidos graxos utilizados.....	41
2.2 Isolamento de mitocôndrias de tubérculos de batatas.....	42
2.2.1 Procedimento.....	43
2.2.2 Dosagem de proteína mitocondrial total.....	43
2.3 Isolamento de PUMP de mitocôndrias de batatas.....	44
2.3.1 Procedimento.....	45

2.3.2	Cromatografia em hidroxiapatita.....	45
2.3.2.1	Colunas de hidroxiapatita.....	46
2.3.2.2	Procedimento.....	46
2.4	Dosagem da PUMP.....	46
2.4.1	Estimativa da quantidade de proteínas isoladas de membrana por Mini-Lowry.....	47
2.4.2	Estimativa da quantidade de proteínas isoladas de membrana por Amido Black.....	48
2.5	Obtenção da PUMP recombinante: AtPUMP1 (Maia <i>et al.</i> , 1998).....	50
2.5.1	Material, crescimento e tratamentos.....	50
2.5.2	Clonagem do cDNA do gene <i>AtPUMP1</i> e obtenção dos corpúsculos de inclusão.....	50
2.5.3	Solubilização dos corpúsculos de inclusão.....	51
2.5.4	Dosagem da concentração de AtPUMP1 – Greenberg.....	52
2.6	Separação eletroforética de proteínas (PUMP e AtPUMP1).....	52
2.6.1	Precipitação das amostras.....	52
2.6.2	SDS-PAGE.....	53
2.7	Reconstituição da PUMP em proteolipossomos.....	54
2.7.1	Formação do filme lipídico.....	54
2.7.2	Remoção do detergente DPE.....	54
2.7.3	Remoção da sonda externa.....	55
2.8	Cinéticas de transporte de H^+	56
2.8.1	Fluorescência com a sonda SPQ.....	57
2.8.2	Curva de calibração.....	59
2.8.3	Determinação da concentração da sonda SPQ interna.....	61
2.8.4	Cinéticas de transporte de H^+	62
2.8.5	Fluorescência com SPQ: Mudança de potencial transmembrânico ($\Delta\psi$) com a variação da concentração de K^+	64
2.9	Ensaio com a sonda ADIFAB.....	66
2.9.1	Solução estoque.....	67
2.9.2	Solução para uso.....	68
2.9.3	Fluorescência.....	68
2.9.4	Medidas de ligação de ácido graxo.....	68
2.9.5	Calibração da sonda.....	69
2.10	Microcalorimetria.....	71
2.10.1	Experimentos com mitocôndrias de batatas.....	74
2.10.2	Experimentos preliminares de ligação.....	75
2.10.2.1	Equações usadas para ajustar os dados de ligação obtidos por ITC.....	76
2.11	Ensaio de consumo de oxigênio com mitocôndrias de batata.....	79

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1	SDS-PAGE : PUMP isolada de mitocôndrias de batata.....	81
3.2	AtPUMP1 expressa em <i>E. coli</i>	82
	a) SDS-PAGE.....	84
	b) Caracterização da proteína recombinante (AtPUMP1) expressa em <i>E. coli</i>	83
	c) Outros géis SDS-PAGE de AtPUMP1.....	84
3.3	Dosagem de proteína.....	87
3.3.1	Dosagem de proteína total de mitocôndrias de batata (Biureto).....	87
3.3.2	Dosagem da PUMP por Amido Black	88
3.3.3	Dosagem da PUMP isolada de mitocôndrias de batata (Mini Lowry).....	89
3.3.4	Dosagem da proteína recombinante AtPUMP1 (Greenberg).....	90
3.4	Espalhamento de luz dinâmico (<i>light scattering</i>) de lipossomos e proteolipossomos (com PUMP e AtPUMP1).....	93
3.5	Cinéticas de transporte de H ⁺ com PUMP reconstituída.....	95
3.6	Proteolipossomos com AtPUMP1 reconstituída.....	110
3.6.1	Espectros de emissão e de excitação da sonda SPQ em proteolipossomos.....	110
3.6.2	Cinéticas com a AtPUMP1 reconstituída.....	111
3.7	Mudança de potencial em proteolipossomos.....	122
3.8	Determinação do coeficiente de partição água / membrana de ácidos graxos.....	132
3.9	Testes preliminares com a coenzima Q10 (Ubiquinona).....	145
3.9.1	Ensaio controle.....	146
3.9.2	Experimentos com a coenzima Q.....	147
3.10	Microcalorimetria com mitocôndrias de batata.....	152
3.10.1	Fluorescência com a sonda Safranina.....	152
3.10.2	Microcalorimetria com mitocôndrias de batata.....	153
3.11	Ensaio preliminares de ligação entre o ácido linoléico e a AtPUMP1 por microcalorimetria	177
4.	CONCLUSÕES.....	180
5.	BIBLIOGRAFIA.....	182
6.	Curriculum Vitae	

ANEXO 1: artigo publicado

Borecky, J., Maia, I.G., Costa, A.D.T., Jezek, P., Chaimovich, H., Andrade, P. B. M., Vercesi, A. E., Arruda, P. (2001) Functional Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** 505, 240 – 244.

RESUMO

A existência de uma proteína mitocondrial desacopladora em plantas, PUMP, foi demonstrada em 1995. A PUMP, como a proteína desacopladora de mitocôndrias de tecido adiposo marrom, UCP1, e outras proteínas homólogas descobertas posteriormente, aumenta a condutividade de membrana a H^+ . Nucleotídeos de purina, PN, inibem a atividade das proteínas desacopladoras e o mecanismo de condução de H^+ depende da presença de ácidos graxos livres, FFA.

A atividade e a expressão da PUMP são estimuladas pela exposição ao frio e mudam durante o amadurecimento de frutos. A expressão do gene da PUMP de *Arabidopsis thaliana* em *E. coli* permite a obtenção de AtPUMP.

Neste trabalho, analisando a funcionalidade da AtPUMP incorporada em proteolipossomos, demonstramos que esta proteína é funcional.

A incorporação de proteínas desacopladoras em proteolipossomos fornece um sistema modelo que permite analisar as suas propriedades funcionais e mecânicas. A condutância a H^+ em proteolipossomos contendo PUMP isolada de batata foi claramente ativada por FFA. Contudo, a inibição por PN não se mostrou reprodutível.

A AtPUMP, reconstituída em proteolipossomos, foi ativada por FFA com K_m 's aparentes de: 42 μM (ácido linoleico, LA), 55 μM (ácido láurico) e 70 μM (ácido palmítico), e inibida por PN com K_i 's aparentes de: 0.8 mM (GDP), 0.85 mM (ATP), 0.98 mM (GTP) e 1.4 mM (ADP).

O efluxo de H^+ ativado por LA mediado por AtPUMP aumentou exponencialmente em função do potencial transmembrânico ($\Delta\psi$).

O coeficiente de partição (K_p) entre a fase aquosa e proteolipossomos contendo AtPUMP para o LA de 64170, foi ~1,6 vezes superior que ao K_p obtido para o LA em lipossomos.

Em ensaios de ligação obtidos usando microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC), determinou-se que a AtPUMP tem, provavelmente, dois sítios de ligação para o LA e que essa interação é exotérmica. Em ensaios de microcalorimetria com suspensão de mitocôndrias de batatas, determinou-se que há uma correlação linear entre o calor produzido e o oxigênio consumido (65,6 kcal/mol O_2) quando a PUMP foi ativada por LA.

Através dos resultados obtidos até então, conclui-se que a PUMP (AtPUMP) é um desacoplador mitocondrial presente em plantas. Os estudos apresentados aqui, de reconstituição em lipossomos, foram essenciais para a compreensão da regulação da atividade dessa proteína. Além disso, foram obtidas as primeiras medidas diretas de liberação de calor pela PUMP por microcalorimetria.

ABSTRACT

In 1995, a plant mitochondrial uncoupling protein, PUMP, was first described. PUMP, like the known uncoupling protein from brown adipose tissue, UCP1, increases the inner mitochondrial membrane permeability to H^+ . H^+ transport is dependent on the presence of free fatty acids, FFA, and it is inhibited by purine nucleotides, PN. PUMP expression and activity are stimulated by cold exposure, which may vary during fruit ripening. By expressing a full length cDNA encoding the *Arabidopsis* UCP in *E. coli*, the recombinant AtPUMP was obtained. In this study, AtPUMP was incorporated in proteoliposomes and the functionality of the protein was demonstrated.

The incorporation of uncoupling proteins in proteoliposomes constitutes a model that allows the functional and the mechanistic analysis of these proteins. The H^+ conductance mediated by reconstituted potato PUMP was, undoubtedly, activated by FFA. However, the inhibition by PN was not reproducible.

Reconstituted AtPUMP was activated by FFA and the apparent K_m 's were determined: 42 μ M (linoleic acid, LA), 55 μ M (lauric acid) and 70 μ M (palmitic acid). Reconstituted AtPUMP was inhibited by PN, and the apparent K_i s were determined: 0.8 mM (GDP), 0.85 mM (ATP), 0.98 mM (GTP) and 1.4 mM (ADP). AtPUMP mediated H^+ efflux rate, activated by LA, was exponentially dependent on membrane potential ($\Delta\psi$).

The partition coefficient (K_p) between the aqueous phase and the membrane phase was determined for LA. The K_p was 1.6 times higher for AtPUMP proteoliposomes than for liposomes.

Using Isothermal Titration Microcalorimetry (ITC), we verified that there is a linear correlation between the heat produced and oxygen depletion (65,2 kcal/mol O_2) in a suspension of potato mitochondria, when PUMP was activated by LA. Using ITC we also determined that LA might bind to two different sites in AtPUMP.

Based on the results obtained, we concluded that PUMP (or AtPUMP) is a plant mitochondrial uncoupler. The reconstitution assays permitted the study of FFA and PN regulation. In addition, our results represent the first direct confirmation that fatty acids regulate heat release in plant mitochondria, a process that may play a role in cold adaptation, fruit ripening and flower blossoming.

OBJETIVOS

Escrever esta secção após terminar de escrever a Tese causa embaraço, pois, dependendo do que se escreve, pode parecer que os Resultados seguem rigorosamente os Objetivos. A proposta inicial foi tentar responder a duas perguntas: qual o mecanismo de ação dos ácidos graxos na PUMP e qual o papel fisiológico desta proteína na planta. Creio que os resultados mostram como é complicado resolver perguntas biológicas aparentemente simples. Por outro lado, o objetivo do trabalho visto hoje, foi contribuir para o conhecimento de uma proteína desacopladora usando-se proteína expressa em sistema heterólogo e técnicas calorimétricas que podem ajudar a desvendar o seu papel fisiológico.

ABREVIACÕES

ADIFAB: “acrylodated intestinal fatty acid binding protein”, proteína conjugada com acrilodan (fluoróforo que liga ácido graxo livre)

ADP: adenosina difosfato

AOx: oxidase alternativa

ATP: adenosina trifosfato

BRIJ 58 : éter de polioxietileno ($C_{16}E_{20}$)

BHAM : ácido benzohidroxâmico

BSA: albumina de soro bovino

DPE: polioxietileno-5-décil-éter ($C_{10}E_5$)

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGTA: ácido etilenobis(oxietilenonitrilo)tetracético

FCCP: dicianocarbonil-1,3,6-trifluorfenil-hidrazona

GDP: guanosina difosfato

GTP: guanosina trifosfato

HPTA: hidroxiapatita ($Ca_5(PO_4)_3OH$)₂

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

IPTG: isopropiltiogalactosídeo

Ng: nigericina

PC: fosfatidilcolina de gema de ovo

Pi : fosfato Inorgânico

PMSF: fenilmetasulfonil fluoreto

SDS: dodecilsulfato de sódio

Safranina: cloreto de 3,7– diamino – 2,8 – dimetil- 5- fenilfenazínio ($C_{20}H_{19}ClN_4$)

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SDSu: undecanossulfonato de sódio ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3\text{Na}$)

SLS: lauroil sarcosinato de sódio

SPQ: 6-metoxi-N-(3-sulfopropil)quinolinio

TEA: tetraetilamônio

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)

TES: ácido N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetanosulfônico

TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mitocôndria, desacoplamento e termogênese

A mitocôndria realiza a maior parte das oxidações celulares e produz a maior parte do ATP das células eucarióticas. Na mitocôndria, o piruvato e os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA, que são oxidados até CO₂ através do ciclo de Krebs. NADH e FADH₂ produzidos por essas reações de oxidação são oxidados pela cadeia respiratória da membrana mitocondrial que transporta elétrons para o oxigênio,ceptor final de elétrons. A cadeia respiratória bombeia prótons (H⁺) para fora da matriz, criando um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana. O gradiente transmembrânico, por sua vez, pode ser utilizado para sintetizar ATP (fosforilação oxidativa) ou para dirigir o transporte ativo de metabólitos específicos através da membrana mitocondrial interna. A combinação dessas reações, e uma eficiente troca ATP-ADP entre a mitocôndria e o citosol, permitem um suprimento de ATP suficiente para prover muitas das reações celulares dependentes de energia.

Em 1961, Peter Mitchell, fundamentado nas observações que mostravam que a redução de O₂ a H₂O pela cadeia respiratória gera um gradiente de H⁺ através da membrana mitocondrial interna, postulou a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa. Segundo Mitchell, a passagem de elétrons através da sequência de intermediários óxido-redutores da cadeia respiratória permite um fluxo de H⁺ da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia. O fluxo de H⁺ ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, através da F₀F₁-ATP sintase, estaria diretamente acoplado à fosforilação do ADP por P_i.

Observação: Esta introdução foi baseada, principalmente, nas referências de ¹Ricquier & Bouillaud, 2000; ²Rial & González-Barroso, 2001 e ³Affourtit *et al.*, 2001, que são revisões atuais e abrangentes sobre as proteínas desacopladoras mitocondriais^{1,2} e o controle respiratório mitocondrial de plantas³. Portanto, optei por citar outras referências quando diretamente pertinentes.

Em uma suspensão de mitocôndrias de fígado, o transporte de elétrons mitocondrial pode ser acompanhado pela taxa de consumo de oxigênio. Essa taxa é rápida quando se adiciona um substrato oxidável (um doador de elétrons), ADP (aceptor de fosfato) e Pi (fosfato inorgânico) (Devlin, 1997). O estado “ativo”, na presença de substrato e ADP foi designado *estado 3*, condição onde ocorre rápida transferência de elétrons, consumo de oxigênio e rápida síntese de ATP. Após a conversão do ADP em ATP, a taxa de transferência de elétrons volta para o nível inicial, antes da adição de ADP (*estado 4*) (Devlin, 1997). Como a respiração é altamente acoplada à síntese de ATP, essa relação foi denominada controle respiratório ou controle do acceptor de fosfato. A razão entre o estado ativo (*estado 3*) e o estado de descanso (*estado 4*) da respiração mitocondrial foi denominada “razão do controle respiratório” e é empregada para medir o nível de acoplamento entre a transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa (Devlin, 1997).

Preparações de mitocôndrias danificadas e preparações onde foram adicionados vários desacopladores exibem uma baixa razão de controle respiratório, indicando que a integridade da membrana mitocondrial é necessária para se obter um alto grau de acoplamento (Devlin, 1997).

A observação de que a mitocôndria ainda consome oxigênio quando a fosforilação de ADP está inibida demonstra que o acoplamento entre a respiração e a síntese de ATP é imperfeita; de fato, a respiração no estado 4 (razão ATP/ADP alta) é mantida devido ao desacoplamento. O conceito de desacoplamento é fundamental para a compreensão do controle da produção de energia. No início dos anos 50, quando a única medida de conservação de energia era a síntese de ATP, o termo desacoplamento indicava a dissociação do transporte de elétrons da fosforilação oxidativa (Canton *et al.*, 1996).

No início dos anos 60, no entanto, foi reconhecido que a energia poderia ser conservada independentemente da síntese de ATP. O termo desacoplamento foi usado para indicar a inibição de reações que monitoravam a conservação de energia. A demonstração de que ácidos fracos lipofílicos (conhecidos como desacopladores) como o 2,4-dinitrofenol (DNP), aumentam a

condutância de prótons da membrana mitocondrial interna e diminuem a força próton-motiva (Canton *et al.*, 1996), favoreceu a aceitação geral do conceito quimiosmótico e a importância da força próton-motiva, bem como a condutância de prótons.

A principal consequência do desacoplamento da respiração é a ativação da oxidação de substratos e da dissipação da energia de oxidação como calor. Em termos fisiológicos, o desacoplamento respiratório e a dissipação da energia oxidativa sob a forma de calor são obviamente importantes para manter o balanço energético e até o controle do peso corpóreo. O estudo destes fenômenos constituem linhas de pesquisa que investigam doenças metabólicas como a obesidade.

Além da contribuição para a manutenção da taxa metabólica basal e termogênese adaptativa, foi proposto também que o desacoplamento respiratório brando poderia evitar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio geradas pela mitocôndria. O desacoplamento parcial também poderia aumentar a sensibilidade e a taxa de resposta da fosforilação oxidativa a moduladores, controlar a razão NAD^+/NADH e, ainda, regular vias metabólicas como a cetogênese, a lipogênese, e a síntese de aminoácidos, que dependem do estado redox dessas coenzimas.

1.2 Tecido Adiposo Marrom (BAT)

A gordura marrom foi reconhecida como um tecido distinto da gordura branca pela primeira vez em 1551, quando foi descrito o tecido interscapular da marmota. O papel fisiológico conferido a este tecido mudou ao longo dos anos e isso se reflete nos diversos nomes dados a ele: glândula hibernante, glândula interscapular, glândula lipóide, órgão gorduroso primitivo, etc; e ainda foi sugerido que o tecido adiposo marrom (BAT) pudesse produzir água durante a hibernação.

O BAT está presente em quase todos os mamíferos, é muito desenvolvido no período de nascimento em grandes mamíferos e presente ao longo da vida em roedores, sendo o principal local de termogênese induzida pelo frio em roedores. O BAT é encontrado em depósitos característicos

espalhados por áreas específicas do corpo, sendo os maiores depósitos: interscapular, axilar, peri-renal, torácico e entre os músculos do pescoço.

O BAT é composto por adipócitos marrons, que são diferentes dos adipócitos brancos. Os adipócitos marrons contêm triacilglicerol, um núcleo central e muitas mitocôndrias. Além disso, essas mitocôndrias são estriadas e exibem numerosas cristas geradas pela membrana interna que é altamente desenvolvida. A análise morfológica dos adipócitos marrons sugere que essas células tenham uma alta capacidade oxidativa, o que foi confirmado por medidas de consumo de oxigênio de adipócitos marrons isolados.

No hipotálamo encontra-se o principal centro de regulação da atividade do BAT, que atua através de centros termorregulatórios e nervos simpáticos. Quando a noradrenalina é liberada na superfície de adipócitos marrons, adrenoreceptores são ativados e o consumo de oxigênio aumenta, induzindo a produção de calor 1 ou 2 minutos após a liberação da adrenalina. Visto que a noradrelanina ativa a lipólise, foi proposto que o aumento da oxidação de ácidos graxos estava relacionada com a elevada produção de calor.

Assim, a produção de calor provocada por desacopladores tem seu correspondente fisiológico no BAT. A membrana da mitocôndria deste tecido contém, além da ATP sintase, uma proteína transportadora de prótons, denominada *termogenina* (Marzzoco & Torres, 1999).

A função termogênica do BAT foi demonstrada ao redor de 1961-1964 por vários grupos de pesquisa. Eles demonstraram que o BAT produz calor, particularmente sob condições onde há demanda extra de produção de calor, como a exposição ao frio, o nascimento ou a hibernação. O descobrimento da primeira proteína desacopladora de BAT, a termogenina, resultou dos estudos sobre os mecanismos de termogênese presentes neste tecido.

Os primeiros estudos sobre a regulação das mitocôndrias de BAT revelaram que a remoção dos ácidos graxos era essencial para o controle respiratório, porém, não era aceito que houvesse uma regulação específica em BAT por ácidos graxos, visto que eles são capazes de desacoplar todos os tipos de mitocôndrias e os seus ânions são transportados por vários carreadores mitocondriais.

Contudo, vários grupos de pesquisa obtiveram resultados que indicavam que os ácidos graxos eram os ativadores da respiração desacoplada do BAT e os nucleotídeos de purina (GTP, GDP, ATP e ADP) os respectivos inibidores. Estes estudos sugeriam ainda a existência de um desacoplador regulável na membrana interna da mitocôndria de BAT. Esse desacoplador era justamente a termogenina, depois chamada de UCP (“Uncoupling Protein”, Nicholls, 1976). Com a descoberta de novas proteínas desacopladoras em mamíferos e plantas, a UCP foi denominada UCP1 (Rodríguez *et al.*, 2002).

O aumento da oxidação de substratos e a produção de calor devida ao desacoplamento são observadas quando a UCP1 está ativa em animais expostos ao frio, em mamíferos recém-nascidos, ou quando animais que hibernam acordam e cessam a hibernação.

1.3 Proteínas desacopladoras

1.3.1 UCP1 (Proteína Desacopladora 1)

Há aproximadamente três décadas atrás, as características bioquímicas das mitocôndrias de BAT começaram a ser largamente estudadas, resultando na identificação da UCP1 como um translocador de prótons especializado (Klaus *et al.*, 1991). A subsequente clonagem e o sequenciamento da UCP1 nos anos 80 permitiram o estudo das propriedades funcionais desta proteína no nível molecular.

Apesar de a UCP1 estar localizada somente no BAT, ela é considerada um membro de uma família de carreadores mitocondriais que inclui o trocador de ATP/ADP, o carreador de fosfato e o carreador de oxoglutarato. Desde então, a UCP1 tem sido usada como modelo para estudos que relacionam estrutura e função nessa classe de carreadores mitocondriais (Klaus *et al.*, 1991).

Aproximadamente 15% das proteínas da membrana mitocondrial interna de BAT são UCP1 (Voet & Voet, 1990). A UCP1 é uma proteína de ~33 kDa descrita como uma banda excessiva em gel de poliacrilamida (Ricquier & Kader, 1976). A UCP1 foi purificada a partir de hamster de rato e

a sua capacidade de translocar prótons foi testada quando a mesma foi reconstituída em lipossomos. A UCP1 humana tem 305 aminoácidos (massa molecular 32,8 kDa) e a UCP1 de rato tem 306 aminoácidos (massa molecular 33,0 kDa) (Jezek & Garlid, 1998). A UCP1 é abundante em membranas mitocondriais de BAT e está ausente em mitocôndrias de fígado, a mesma é induzida em ratos expostos ao frio e a sua síntese diminui depois da readaptação à temperatura ambiente. Uma demonstração importante do papel da UCP1 na termogênese adaptativa foi obtida quando se observou que um rato mutante, sem UCP1, era incapaz de manter a temperatura no frio.

A síntese da UCP1 é fortemente ativada por noradrelanina, AMP cíclico, hormônios da tireóide e retinóides, e há uma correlação estreita entre os níveis de UCP1 e a sensibilidade a ácidos graxos.

Aproximadamente três décadas após a descoberta da UCP1, foram descobertas novas proteínas homólogas à UCP1 em plantas (1995), mamíferos (1997), protozoários (1999), peixes (1999) e fungos (2000).

1.3.2 UCP2 e UCP3

O fato de o vazamento de prótons ser responsável por 20 a 30% do consumo de oxigênio das mitocôndrias de fígado ou de músculo esquelético indicava que certos componentes da membrana mitocondrial interna (não os fosfolipídios) catalisavam tal vazamento. Então, as proteínas da membrana mitocondrial interna provavelmente estariam envolvidas neste processo (*Bouillaud et al.*, 2001).

Em 1997, três grupos descobriram RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam proteínas similares (mas não idênticas) à UCP1 em vários órgãos e células de humanos, cobaia e rato. No genoma humano há um gene que codifica uma proteína desacopladora denominada UCP2, a qual tem 59% de identidade de aminoácidos em relação à proteína desacopladora de tecido adiposo marrom humano (UCP1) (Skulachev, 1998). Tanto a UCP1 quanto a UCP2 têm três motivos (ou assinaturas) de proteínas mitocondriais carreadoras e os sítios de ligação de nucleotídeos. Um gene similar ao da UCP2 (com 95% de identidade) também foi encontrado em rato. A UCP2

mapeia regiões do cromossomo 11 de humanos e cromossomo 7 de rato que estão relacionadas com obesidade e hiperinsulinemia.

Em comparação com a UCP1, foi observado que a UCP2 causa um decréscimo mais pronunciado do potencial de membrana mitocondrial *in vivo* quando expressa em levedura e maior inibição do crescimento da levedura (Skulachev, 1998). Em contraste com a UCP1, o gene de UCP2 é largamente expresso nos tecidos de humanos adultos (músculo esquelético, pulmão, coração, placenta, rins, baço, leucócitos, macrófagos, tutano ósseo e estômago). Em ratos, o gene UCP2 é expresso em tecido adiposo marrom, em gordura branca, e em alto nível no coração e nos rins. Uma baixa expressão foi observada no fígado e no cérebro. A expressão da UCP2 é regulada positivamente em gordura branca quando há ingestão de gordura.

Apesar de a UCP2 ser largamente expressa em diversos tecidos, há uma variação quanto ao nível de mRNA em cada tecido. Por exemplo, a UCP2 é altamente expressa no baço e pouco expressa no fígado (Boss *et al.*, 1997). Órgãos envolvidos na defesa imune ou rico em macrófagos expressam níveis abundantes de mRNA de UCP2, e muitas evidências apontam para o fato de a UCP2 ser especificamente expressa em muitos tipos de células e, em outros, não (Boss *et al.*, 1997).

Após a descoberta da UCP2, foram descobertas mais duas representantes da família da UCP expressas especificamente em tecido adiposo marrom e em músculo esquelético (Skulachev, 1998). Elas foram denominadas UCP3L e UCP3S, onde L e S significam longa e curta, respectivamente. A UCP3S tem sequência idêntica à UCP3 L, mas contém somente 275 aminoácidos ao invés de 312 (os aminoácidos nas posições 276–312 estão ausentes na UCP3S). A UCP3L tem 57% e 73% de identidade com a UCP1 e com a UCP2, respectivamente. A UCP3S não contém sítio de ligação para nucleotídeos de purina, que são inibidores do desacoplamento mediado por ácido graxo em UCP1.

Variações nos níveis de mRNA de UCP2 e UCP3 têm sido relacionadas com diferentes estados fisiológicos, e estudos mostram que a

expressão das UCPs 2 e 3 é estimulada por hormônios da tireóide e também pela presença de altas concentrações de ácidos graxos (Boss *et al.*, 1997).

Quando comparadas a outros membros da família de carreadores mitocondriais, a UCP2 e a UCP3 são as proteínas que têm as maiores homologias quanto à sequência prevista de aminoácidos com a UCP1.

1.3.3 BMCP1 e UCP4

Além das UCPs 2 e 3, há ainda duas proteínas homólogas à UCP1 expressas no sistema nervoso central de humanos, a BMCP1 (Brain Mitochondrial Carrier Protein 1, Sanchis *et al.*, 1998) e a UCP4 (Mao *et al.*, 1999). Curiosamente, apesar de a sequência da BMCP1 ser pouco similar às sequências das UCPs (somente 34 a 39% de identidade), a sua expressão em levedura induziu um desacoplamento expressivo da respiração e o vazamento de prótons. A UCP4 tem somente 30% de identidade com as outras UCPs.

A provável função da UCP4 e da BMCP1 (ou UCP5) seria a produção de calor e participação no metabolismo basal do cérebro (Sanchis *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 1999), mas o papel e a regulação dessas UCPs não estão totalmente elucidados.

1.3.4 PUMP, a proteína mitocondrial desacopladora de plantas

Mitocôndrias de plantas apresentam, como as mitocôndrias de tecido adiposo marrom, uma permeabilidade a prótons relativamente alta, e uma das explicações dadas para esse fato é o vazamento através da membrana associado aos procedimentos de isolamento (Douce *et al.*, 1987). Plantas contêm altas concentrações de lipases e hidrolases que, após a lise celular, produzem grandes quantidades de ácidos graxos, que por sua vez induzem o desacoplamento mitocondrial (Douce *et al.*, 1987). A adição de BSA promove um reacoplamento parcial da mitocôndria devido à sua capacidade de ligar ácidos graxos.

No início dos anos 90, ao se estudar a respiração e a conversão de energia em células vegetais, foram encontradas semelhanças entre as

respirações celulares de batatas e do tecido adiposo marrom. Por exemplo, foi observado que o acoplamento máximo em mitocôndrias de batata só era atingido sob a presença de nucleotídeos de purina, como o ATP, com a simultânea ausência de ácidos graxos livres (Vercesi *et al.*, 1995). Assim, foi proposta a existência de uma proteína desacopladora em vegetais (Vercesi *et al.*, 1995). Sendo a batata originária dos Andes, portanto adaptada ao frio, ela poderia ser considerada como a UCP dos vegetais (Vercesi, A. E., Revista FAPESP 65, 2001). Nos animais, a UCP1 ativada pelo frio torna a respiração celular até 50 vezes mais rápida e promove a queima acelerada de gordura. Já quando as batatas são mantidas sob baixa temperatura, apresentam aumento da respiração celular, sem o aumento significativo da temperatura. Esse fato levanta a hipótese de que a UCP dos vegetais estimula a respiração, diminuindo a concentração de oxigênio e, portanto, promovendo uma defesa contra o stress oxidativo (Vercesi, A. E., Revista FAPESP 65, 2001).

A UCP dos vegetais, descoberta em 1995 por Vercesi e colaboradores (Vercesi *et al.*, 1995) foi denominada **PUMP** (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein). A PUMP tem massa molecular de 32 kDa, foi isolada de mitocôndrias de *tubérculos de batatas e purificada segundo procedimento usado para preparar a UCP1 (Vercesi *et al.*, 1995). Estudos demonstraram que a PUMP aumenta a condutividade da membrana a prótons, tanto em mitocôndrias intactas quanto em sistemas reconstituídos, através de um mecanismo dependente da presença de ácidos graxos livres (Vercesi *et al.*, 1995; Jezek *et al.*, 1996; Jezek *et al.*, 1997). A rápida alcalinização depois da adição de valinomicina indicou o aumento da condutividade de H^+ através dos lipossomos com PUMP incorporada, sendo que esse efeito não foi observado em lipossomos sem a proteína (Vercesi *et al.*, 1995). A PUMP, como a UCP1, é ativada por ácidos graxos e inibida por nucleotídeos de purina (Jezek *et al.*, 1996).

Através do uso de anticorpos policlonais, a PUMP foi detectada em vários frutos como banana, manga, pêra, morango, mamão, maçã, melão, abacaxi, tomate (Jezek *et al.*, 1998). A PUMP foi detectada também em vários

legumes e hortaliças (Jezek *et al.*, 2000). Também foi comparado o desacoplamento entre mitocôndrias de tomates verdes e vermelhos mediado pela PUMP, onde a concentração mais alta de ácidos graxos livres (substrato para a PUMP) em tomates vermelhos podia explicar o menor estado de acoplamento em mitocôndrias isoladas deste tecido (Costa *et al.*, 1999).

A PUMP está presente também em trigo, arroz, milho e cana de açúcar (comunicação pessoal: Jiri Borecky, aluno de Pós Doutorado no CEBMEG, UNICAMP).

***Tubérculos de batata (potato tubers)**

www.botgard.ucla.edu/.../Solanum/a1457tx.html

www.mpb-cologne.com/en/advantages.html

É importante salientar que a PUMP foi descoberta em 1995, praticamente três décadas depois da UCP1 e antes das UCPs 2, 3 e 4 e da BMCP1. O fato de existir uma proteína desacopladora mitocondrial em plantas, provavelmente levantou o interesse de pesquisadores em verificar a existência de proteínas desacopladoras em outros tecidos de mamíferos, além do BAT, e em outros organismos.

1.3.5 StUCP

Em 1997, Laloï *et al.* identificaram um cDNA em batatas (*Solanum tuberosum*) que codificava uma proteína desacopladora de plantas. Este cDNA, denominado StUCP, foi induzido pelo frio e poderia estar envolvido na termorregulação em plantas.

O cDNA foi isolado de uma biblioteca de flor de batata e a sequência prevista para StUCP é 44% e 47% idêntica às UCPs 1 e 2 de humanos, respectivamente (Laloï *et al.*, 1997). StUCP tem massa molecular calculada

em 32 kDa, quase idêntica à massa molecular da PUMP, sugerindo que StUCP pode codificar a PUMP.

O RNA mensageiro da StUCP foi detectado em folhas, raízes, talo e fruto de batata, mas não em tubérculos (Laloi *et al.*, 1997) e ainda não se sabe se a PUMP é idêntica à StUCP (Jezek *et al.*, 1998).

Quando o gene de StUCP foi expresso em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), o desacoplamento mitocondrial foi observado (conforme descrito para as outras UCPs).

Flores de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*)

www.life.uiuc.edu/plantbio/digitalflowers/Solanaceae/11.htm

www.alaskanessences.com/researchbig/potato.jpg

1.3.6 AtPUMP1 e AtPUMP2

Um ano após o isolamento de StUCP, Maia *et al.* isolaram um clone de cDNA que codificava o gene de uma proteína mitocondrial desacopladora em *Arabidopsis thaliana* denominado **AtPUMP** (Maia *et al.*, 1998). O cDNA contém uma janela de leitura (*open reading frame*) de 921 nucleotídeos que codificam 306 aminoácidos (peso molecular previsto de 32,7 kDa). O polipeptídeo previsto é 81% idêntico e 89% similar à StUCP, 40% idêntico e 57% similar à UCP1 de humanos, 45% idêntico e 62% similar à UCP2 de humanos, e inclui uma região comum a transportadores mitocondriais. O transcrito correspondente foi expresso em todos os tecidos e foi fortemente induzido pelo frio.

A descoberta da *AtPUMP* (mais tarde denominada *AtPUMP1*) tornou evidente a presença de um gene da família das UCPs em uma planta não climatérica, sugerindo outros papéis fisiológicos para proteínas desacopladoras em plantas (Maia *et al.*, 1998). A possibilidade de se utilizar a proteína recombinante, *AtPUMP1*, em ensaios de reconstituição seria muito útil para a elucidação de possíveis papéis fisiológicos da PUMP em plantas.

Através da colaboração estabelecida entre o nosso laboratório, o grupo do Prof. Aníbal Vercesi (FCM, Depto. Patologia Clínica, UNICAMP), o grupo do Prof. Paulo Arruda (CEBMEG, UNICAMP) e o Dr. Petr Jezek (Dept. Membrane Transport Biophysics, Inst. Physiol., Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague), foi possível expressar a *AtPUMP1* em *E. coli*, purificar os corpúsculos de inclusão e reconstituí-la em proteolipossomos. Estes dados foram publicados em Borecky *et al.*, 2001 (em anexo), e demonstram que a *AtPUMP1* possui todas as propriedades descritas para a PUMP de batata.

Watanabe *et al.* (1999), identificaram uma segunda isoforma da proteína desacopladora mitocondrial em *Arabidopsis thaliana*, denominada *AtUCP2* (ou *AtPUMP2*). Este fato mostra que existe mais de um gene de UCP no genoma de *Arabidopsis*. Portanto, como em mamíferos, há uma família multigênica para a UCP em plantas também. Através de análise de cDNA desse gene, foi observado que essa nova isoforma possui todas as características típicas conhecidas para as UCPs. No entanto, contrário aos genes de *AtPUMP1* e de PUMP de batata, este novo gene não foi induzido por baixa temperatura (Watanabe *et al.*, 1999).

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis Thaliana

www.cirs.net/.../Biologie/premiersequencage.htm

www.nature.com/genomics/papers/a_thaliana.html

Apesar de batata e *Arabidopsis* não serem plantas termogênicas, o fato de as expressões de *SfUCP* e de *AtPUMP1* serem induzidas pelo frio, levantou suspeitas de que essas proteínas estariam envolvidas com a termogênese dessas plantas (Ito, 1999).

1.3.7 *SfUCPa* e *SfUCPb*

Para investigar a variação da capacidade de produção de calor da planta *Philodendrom selloum* (pertencente à família Araceae), alguns espécimes dessa planta foram colocados em uma sala fechada sob temperaturas variadas e a produção de calor foi monitorada através de medidas da taxa de consumo de oxigênio (Seymour, 1997). Observou-se que a 4 °C o espádice (ou inflorescência) da planta atingiu a temperatura de 38 °C, ou seja, uma diferença de 34 °C entre a temperatura da planta e a temperatura ambiente. A temperatura máxima da inflorescência (46 °C) foi atingida quando a temperatura ambiente foi ajustada para 39 °C e a taxa estimada de produção de calor diminuiu à medida que a temperatura ambiente aumentou. Esses dados mostraram que a planta estava fazendo algo a mais do que produzir calor, ela estava fazendo uma termorregulação: manteve-se aquecida para se proteger sob baixas temperaturas e para evitar o super-aquecimento sob temperaturas elevadas (Seymour, 1997). Além do *Philodendrum selloum*, descobriu-se que espádices da planta conhecida por “skunk cabbage” (*Symplocarpus foetidus*) também mantêm a sua temperatura entre 15 e 22 °C por quase duas semanas durante o inverno, sob temperaturas abaixo de zero °C (Seymour, 1997).

Skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*)

www.virtualinsectary.com/plants/plant_42.htm

www.concordma.com/magazine/maraprmay02/back.html

Foram isolados de espádices de *Symplocarpus foetidus* dois cDNAs distintos e induzidos pelo frio que codificam proteínas desacopladoras (UCPs) (Ito, 1999). Os cDNAs foram denominados SfUCPa (codifica 303 aminoácidos e tem massa molecular prevista de 32,6 kDa) e SfUCPb (codifica 268 aminoácidos e tem massa molecular prevista de 29,0 kDa), e podem ter um papel importante na termogênese de espádices de *Symplocarpus foetidus*. Este foi o primeiro relato da presença de um gene do tipo UCP em plantas termogênicas (Ito, 1999).

1.3.8 UCP em vertebrados ectotérmicos

Um mRNA que codifica uma proteína que possui 82% de identidade da sequência de aminoácidos com a UCP2 de mamíferos foi identificado em carpa (*Cyprinus carpio*) e no peixe-zebra (zebrafish, *Danio rerio*). O curioso é que, apesar de possuírem uma provável proteína desacopladora, nem a carpa nem o peixe-zebra são capazes de se manterem aquecidos (Stuart *et al.*, 2001). Portanto, a identificação de homólogos da UCP1 em outros tecidos não deve ser prontamente considerada como um diagnóstico de função termogênica (Stuart *et al.*, 1999).

1.3.9 UCP em protozoários

Usando anticorpos anti-PUMP, uma proteína desacopladora foi identificada e caracterizada em mitocôndrias de *Acanthamoeba castellanii*, um protozoário amebóide não fotossintético presente no solo que, na filogênese

molecular, aparece em uma ramificação basal, em pontos divergentes entre plantas, animais e fungos (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999).

1.3.10 UCP em fungos

Jarmuszkiewicz *et al.* (2000) identificaram uma UCP em mitocôndrias de *Candida parapsilosis* (CpUCP); uma levedura parasítica não fermentativa. CpUCP foi imunodetectada utilizando-se anticorpos policlonais anti - PUMP. A atividade da CpUCP, investigada em mitocôndrias sem ácidos graxos livres, foi estimulada por ácido linoléico e inibida por GTP. A atividade da CpUCP aumentou a respiração no estado 4, pois diminuiu o potencial transmembrânico e também a razão ADP/O. A descoberta da CpUCP prova que as UCPs estão presentes nos 4 reinos eucarióticos: animais, plantas, fungos e protozoários (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2000).

Segue abaixo a árvore filogenética das UCPs de animais e de plantas sugerida por Raimbault *et al.*, 2001:

Figura 1.3.A: Representação das distâncias entre as UCPs de animais (UCP1, UCP2 e UCP3) e as de plantas. Foram usadas as sequências presentes no GenBank®. A barra indica a mudança de 0,1 resíduo de aminoácido por sítio (Raimbault *et al.*, 2001).

1.4 Estrutura e função das UCPs

A UCP1 da família de genes de carreadores mitocondriais é um dímero de subunidades indênticas de 33 kDa. A UCP1 de humanos tem 305 aminoácidos (32,8 kDa) e a UCP1 de rato tem 306 aminoácidos (33,0 kDa) (Jezek & Garlid, 1998). Todas as UCPs pertencem à família de genes das proteínas mitocondriais carreadores de ânions (MACP), que inclui os carreadores de ADP/ATP, de fosfato, de oxoglutarato e outros (Jezek & Garlid, 1998).

Como outros carreadores mitocondriais, a UCP1 está inserida na membrana mitocondrial interna através de seis domínios hidrofóbicos em forma de α -hélice. As suas cadeias polipeptídicas consistem em três sequências relacionadas, com aproximadamente 100 aminoácidos cada (estrutura tripartida), que correspondem a dois domínios transmembrânicos. Estudos topológicos sugerem que tanto o lado C- terminal quanto o N-terminal da UCP1 estão orientados para o lado citossólico da membrana mitocondrial interna (Boss *et al.*, 1997).

Figura 1.4.1 : Modelo transmembrânico proposto para a UCP1 de mamíferos (rato). As áreas sombreadas são os locais que supostamente interagem com nucleotídeos de purina di e tri fosfato (Jezek & Garlid, 1998).

Conforme ilustrado na figura 1.4.1 para a UCP1, todos os membros da família MACP têm uma estrutura tripartida, com três repetições internas homólogas entre si, e que formam seis domínios transmembrânicos sob a forma de quase- α -hélice (Jezek & Garlid, 1998). Observa-se na figura 1.4.1 que existem quatro segmentos localizados no citossol e três segmentos localizados na matriz, visto que as UCPs têm a porção C- terminal e a N-terminal voltadas para o lado citossólico da membrana mitocondrial interna (Jezek & Garlid, 1998).

Na UCP1 o sítio de ligação para nucleotídeos de purina (PN) é puramente alostérico, fato que foi confirmado ao observar-se uma cinética não competitiva e pelo fato de ácidos graxos não influenciarem o K_i determinado para a inibição por PN (Jezek & Garlid, 1998). Verificou-se que a ligação de PN e a inibição por PN diminuíram com o aumento do pH, e que mudanças conformacionais desencadeadas por interações dos fosfatos de nucleosídeos com as argininas localizadas nas hélices 2, 4 e 6 implicariam a oclusão do sítio de ligação de ácidos graxos, inibindo o transporte (Jezek & Garlid, 1998).

A UCP1 catalisa o transporte eletroforético, sensível à PN, de ânions monovalentes unipolares, incluindo haletos, nitrato, análogos de fosfato monovalentes, piruvato e outros α -cetocarboxilatos, alquilssulfonatos (curtos, médios e longos) e ácidos graxos (Jezek & Garlid, 1998). Foi verificado que quanto maior a hidrofobicidade do ânion transportado, maior a velocidade de transporte e maior a afinidade (menor o K_m). Por exemplo, os K_m s determinados para o transporte de ácidos graxos e de alquilssulfonatos de cadeia longa têm valores de 10 a 15 μM , enquanto que o K_m determinado para o transporte de Cl^- é de ~ 140 mM (Jezek & Garlid, 1998).

O alinhamento das sequências de aminoácidos das UCPs 1, 2 e 3 mostra que essas proteínas são significativamente similares. Como outros carreadores mitocondriais, a UCP2 e a UCP3_L também contêm seis domínios transmembrânicos comuns a carreadores mitocondriais. Os potenciais domínios de ligação de nucleotídeos se estendem entre os resíduos de aminoácidos 276 – 298 na UCP2 e 279 – 301 na UCP3_L (Boss *et al.*, 1997). A

UCP3_s não tem as regiões com os potenciais domínios transmembrânicos e nem o domínio de ligação para nucleotídeo de purina, que está implicado no controle da eficiência de acoplamento da UCP1 (Boss *et al.*, 1997). A ligação de GDP à UCP1 é conhecida por induzir uma mudança conformacional que leva à inibição da permeabilidade a H⁺ e Cl⁻; assim, a UCP3_s exerceria o seu papel biológico sem nenhum controle por GDP (Boss *et al.*, 1997).

Uma estrutura similar à descrita para as UCPs de mamíferos também foi observada nas proteínas desacopladoras mitocondriais de plantas: StUCP (Laloi *et al.*, 1997) e AtPUMP1 (Maia *et al.*, 1998). Foi verificada a existência de seis domínios transmembrânicos, uma assinatura típica de carreadores mitocondriais e uma estrutura tripartida com aproximadamente 100 aminoácidos cada (Laloi *et al.*, 1997; Maia *et al.*, 1998). Portanto, com base nos dados conhecidos na literatura até hoje, pode-se dizer que todas as UCPs devam compartilhar o mesmo tipo de enovelamento na membrana mitocondrial interna.

Chomiki, N. *et al.* (2001) fizeram quimeras de UCP1 e UCP2, onde os últimos domínios foram trocados e a ativação por ácidos graxos ou por ácido retinóico, bem como a inibição por nucleotídeos de purina, foram testadas. A proteína U1U2 é composta por mUCP1 (aminoácidos 1-98) e por hUCP2 (aminoácidos 211-309). Ácidos graxos ativaram o transporte de prótons da U1U2, que foi inibido por GTP. A outra quimera, U2U1, composta por hUCP2 (aminoácidos 1- 210) e mUCP1 (aminoácidos 199- 307), foi ativada por ácido retinóico, sem inibição por GTP. Por medidas de EPR (ressonância paramagnética de elétrons), Chomiki, N. *et al.* (2001) confirmaram que a UCP2 liga nucleotídeos, que há uma grande mudança estrutural na UCP1 e na UCP2 quando as mesmas são expostas a ATP e que as quimeras de UCP1/UCP2 também sofrem mudanças conformacionais quando expostas à nucleotídeos de purina. Estes dados mostram que um sítio de ligação para nucleotídeos está presente no domínio C – terminal da UCP2. Este domínio foi capaz de inibir o fluxo de prótons somente quando unido à parte N-terminal da UCP1 (quimera U1U2). Portanto, os resíduos envolvidos na inibição do transporte de prótons por nucleotídeos estão localizados nos dois primeiros motivos ("motifs") de

carreadores presentes na UCP1. Estes resultados mostram que interações com o domínio N-terminal são necessárias para inibir o transporte de prótons e sugerem que proteínas como a UCP2 podem transportar prótons, mesmo não sendo responsáveis pela termogênese basal ou induzida pelo frio.

Conforme descrito para as outras UCPs, a UCP4 possui seis prováveis domínios transmembrânicos e três assinaturas de proteínas mitocondriais transportadoras, além de um provável sítio de ligação de nucleotídeo (*Mao et al.*, 1999). A sequência da BMCP1 também apresenta três regiões (ou motivos) características da estrutura tripartida presente em carreadores mitocondriais e prevê a existência de seis domínios transmebrânicos (*Sanchis et al.*, 1998).

1.5 Reconstituição das UCPs de mamíferos e de plantas em proteolipossomos e o mecanismo de transporte de prótons pelas UCPs

Locke *et al.* (1982 a, b) descreveram pela primeira vez a ativação do transporte de H^+ por ácidos graxos em mitocôndrias de BAT. Porém, a interferência dos ácidos graxos com outros componentes da mitocôndria e a geração contínua de ácidos graxos endógenos mitocondriais devido à ação de lipase ou fosfolipase (que demanda a adição contínua de BSA ao meio) são dois problemas comumente encontrados em ensaios com mitocôndrias (Winkler & Klingenberg, 1994). Estes problemas foram superados com o isolamento da UCP1 e a sua posterior reconstituição em proteolipossomos (Winkler & Klingenberg, 1994). Nos primeiros ensaios com a UCP1 reconstituída não foi verificada a influência de ácidos graxos no transporte de H^+ , pois havia ácido graxo contaminante presente no meio reacional. Com a remoção inadvertida dos ácidos graxos nos ensaios de reconstituição, foi verificado que o transporte de H^+ em proteolipossomos era dependente da adição externa de ácidos graxos (Winkler & Klingenberg, 1994).

Em 1994, Jezek e col. demonstraram que a UCP1 transportava Cl^- e outros ânions monovalentes, que o transporte mediado pela UCP1 era inibido por nucleotídeos de purina (PN) e que o sítio de ligação de ácidos graxos era distinto do sítio de ligação de PN (Jezek *et al.*, 1994). Além disso, verificaram que o transporte de Cl^- foi inibido por ácidos graxos e estimulado pela remoção de ácidos graxos, refutando a hipótese de que não havia interação entre o transporte de ácidos graxos e de ânions através da UCP1.

Em 1997, a PUMP extraída de tomate e de batata foi reconstituída em lipossomos de fosfatidilcolina, e os fluxos de K^+ e H^+ induzidos por ácidos graxos foram obtidos usando os indicadores fluorescentes PBFI e SPQ (Jezek *et al.*, 1997). Foi observado que o transporte de H^+ pela PUMP depende de ácidos graxos. Verificou-se também que a PUMP não transportou Cl^- , que o transporte de H^+ ativado por ácido linoleico era dependente do potencial transmembrânico ($\Delta\psi$) e que a atividade da PUMP foi inibida por ATP e GDP (Jezek *et al.*, 1997). Portanto, o comportamento da PUMP reconstituída foi similar ao da UCP1 reconstituída.

Em 1999, as UCPs 2 e 3 foram expressas em *E. coli* e reconstituídas em proteolipossomos (Jabureck *et al.*, 1999). Foi observado que, da mesma maneira que a UCP1, as UCPs 2 e 3 catalisam o fluxo eletroforético de prótons e de alquilssulfonatos, e que, para que haja fluxo de prótons, a presença de ácidos graxos é obrigatória. Além disso, o fluxo de prótons foi inibido por PN, mas com uma afinidade muito menor do que a observada com a UCP1 (Jabureck *et al.*, 1999).

Em 2001, a proteína recombinante AtPUMP1 foi expressa em *E. coli* e reconstituída em proteolipossomos (Borecky *et al.*, 2001). Este resultado foi obtido através da colaboração entre o nosso laboratório e outros grupos de pesquisa citados no item 1.3.6 desta introdução. Foram determinados K_m s para diferentes ácidos graxos de cadeia longa (ácidos linoléico, linolênico, láurico, palmítico, oléico e mirístico) e K_s para ATP, ADP, GTP e GDP. Verificamos também que a inibição foi sensível à variação de pH. Este trabalho uniu a aproximação genética com a funcional pela primeira vez, mostrando evidências de que a AtPUMP1 é uma proteína desacopladora.

Apesar da larga aceitação dos ácidos graxos como substratos imprescindíveis para as UCPs, há controvérsias sobre o mecanismo do transporte de prótons ativado por ácidos graxos e mediado por essas proteínas.

Atualmente dois modelos genéricos que versam sobre o mecanismo de regulação da UCP ativado por ácidos graxos estão sendo discutidos. Resumidamente, segundo Garlid *et al.* (1996), Skulachev (1991) e Jezek *et al.* (1994), as UCPs catalisam a transferência do ânion do ácido graxo (figura 1.5.1 B), enquanto que Winkler & Klingenberg (1994) e Klingenberg *et al.* (1990) acreditam que os ácidos graxos ligados a sítios específicos da UCP transportam o H^+ através de seus grupos carboxílicos (figura 1.5.1A).

Figura 1.5.1

Segundo a figura 1.5.1A, o ácido graxo atua como grupo prostético no transporte de H⁺, sugerindo que o grupo carboxila libera o H⁺ para um resíduo de aminoácido dentro da UCP1, onde ocorre a translocação (Winkler & Klingenberg, 1994). Este modelo é designado como "tamponamento local de H⁺". Segundo Winkler & Klingenberg, 1994, se os ácidos graxos participam do transporte de H⁺, o posicionamento preciso do grupo carboxila na UCP1 é importante.

Segundo a figura 1.5.1B, a UCP1 transporta o ânion do ácido graxo, sendo que a forma protonada atravessa rapidamente a bicamada lipídica (Garlid *et. al.*, 1996; Skulachev, 1991). Supõe-se que haja um mecanismo cíclico de H⁺ análogo ao desacoplamento por protonóforos de ácidos fracos. Este modelo sugere a existência de um sítio ligante de baixa afinidade para ácidos graxos na interface lipídio-proteína, e, assim, pelo menos parte do caminho da condutância deve ficar na parte externa da proteína (Garlid *et. al.*, 1996). Os ácidos graxos inibiram o transporte do íon cloreto através da UCP1 por meio de uma cinética competitiva, reafirmando a hipótese de que ânions são transportados através de um domínio que liga ácidos graxos na UCP1 (Garlid, 1990 e 1996).

Alquilssulfonatos são compostos análogos aos ácidos graxos e que não podem ser protonados no pH fisiológico devido ao baixo valor de seus pKas;

mas, são transportados pelas UCPs 1, 2 e 3 (Jaburek *et al.*, 2001). Para distinguir entre os dois mecanismos propostos para o transporte de H^+ ativado por ácidos graxos, foi comparado o transporte do laurato com o do seu análogo, o undecanossulfonato (um alquilssulfonato), medindo-se os fluxos de H^+ , Cl^- e K^+ em proteolipossomos com UCP1 purificada (Garlid *et al.*, 1996). Concluiu-se que o undecanossulfonato compete com o laurato ao ligar-se aos supostos sítios de ligação de ácidos graxos dentro do canal de prótons na UCP1, inibindo o transporte de H^+ induzido por laurato. Por ser um ácido forte, o undecanossulfonato não proporciona o tamponamento do canal de prótons e esta seria uma forte evidência de que as UCPs transportam ânions de ácidos graxos. Contudo, esta inibição do transporte de laurato não foi suficiente para distinguir entre os dois mecanismos, visto que a hipótese de tamponamento local requer o transporte do ácido protonado através da membrana, e a concentração de ácido sulfônico a pH 7 é desprezível.

Segundo Jabureck *et al.* (2001) a UCP1, assim como outros membros da sua família de genes, transloca ânions e não prótons. Para estudar o transporte de ânions via UCP1 foram empregados, novamente, alquilssulfonatos. Como foi dito no parágrafo anterior, os alquilssulfonatos não podem catalisar o transporte eletroneutro de prótons na bicamada e não podem sustentar o desacoplamento pelas UCPs. Para eliminar esta restrição, foi adicionado propanolol para formar pares de íons permeáveis com os alquilssulfonatos :

propanolol

Assim, o próton foi transportado com o par iônico neutro e liberado pelo sulfonato ao cruzar a bicamada, atuando como um ácido graxo. O mecanismo de transporte de H^+ via par iônico está representado na figura 1.5.2. Quando o transporte via par iônico foi combinado com a UCP1, observou-se o transporte eletroforético de prótons e o desacoplamento mitocondrial do tecido adiposo marrom (Jabureck *et al.*, 2001).

Figura 1.5.2

Figura 1.5.2 (extraída de Jaburek *et al.*, 2001): Alquilssulfonato (A^-) forma um par iônico com a amina protonada do propanolol (BH^+), e o complexo eletroneutro difunde-se através da bicamada. Através da dissociação, a amina perde o próton e, a base livre (B^0), atravessa a membrana de volta para o lado do citossol. Esta parte do ciclo ocorre na bicamada e faz com que o alquilssulfonato se distribua e libere prótons como se fosse um ácido graxo. Este passo é eletroneutro e não causa o desacoplamento. Quando o alquilssulfonato é transportado eletroforeticamente via UCP, se estabelece o ciclo protonforético. Assim, se a UCP transporta ânions, os alquilssulfonatos deveriam se comportar como ácidos graxos na presença do par iônico (amina). Isto foi o que ocorreu de fato, tanto em proteolipossomos quanto em mitocôndria de BAT.

Portanto, Jaburek *et al.* (2001) apresentaram uma forte evidência de que a UCP1 não transporta prótons e sim ânions, e que o desacoplamento mediado pela UCP1 ocorre na bicamada lipídica e não na própria UCP1.

O mecanismo geral do transporte de ânions de ácidos graxos pelas UCPs está representado no esquema abaixo (figura 1.5.3):

Figura 1.5.3

Figura 1.5.3 (extraída de Jezek *et al.*, 1998):

O circuito de ácido graxo (FA) através da membrana mitocondrial mediado pela UCP1 consiste nos seguintes passos:

- (1) O ânion de FA se particiona entre as duas camadas da bicamada lipídica (apesar do elevado gradiente elétrico *in vivo*, não há fluxo significativo de ânion de FA porque a barreira energética da bicamada é muito alta).
- (2) O ânion de FA localizado na bicamada no lado da matriz mitocondrial difunde-se lateralmente para alcançar a proteína.
- (3) O ânion de FA interage com o sítio de ligação interno que diminui a barreira de energia e o campo elétrico direciona a cabeça aniônica para um local onde a carga é, provavelmente, positiva.
- (4) A cauda hidrofóbica move-se para o outro lado da membrana, a princípio pelo mesmo mecanismo que ocorre no flip-flop de FA protonados. A "protonação" agora é assegurada pela proteína. A liberação do sítio de ligação interno é o inverso dos processos (1) e (2).
- (5) Como um último passo, a protonação do FA no lado oposto da membrana ocorre e o FA neutro pode fazer rapidamente um flip-flop e voltar, liberando prótons por difusão não iônica (*in vivo* para a matriz mitocondrial). Ocorre um curto-circuito de H^+ na cadeia respiratória, que reduz a eficiência da síntese de ATP pela F_0F_1 -ATPase.

(AOx), que permite que a planta respire na presença de compostos tóxicos, como cianeto e monóxido de carbono e é funcionalmente um ubiquinol: oxigênio redutase e não próton-motiva. As mitocôndrias de plantas podem teoricamente oxidar tanto NAD(P)H quanto succinato, de um modo que não haja conservação de energia, estando, portanto, além do controle da força próton-motriz.

Além da AOx, a PUMP também desacopla a transferência de elétrons na fosforilação oxidativa. A PUMP, como a UCP1, é ativada por ácidos graxos e inibida por nucleotídeos de purina (Jezek *et al.*, 1996). A *AtPUMP1*, originalmente clonada por Maia *et al.* (Maia *et al.*, 1998); foi expressa em *E. coli* e reconstituída em vesículas lipídicas, depois da solubilização dos corpúsculos de inclusão (Borecky *et al.*, 2001). A proteína recombinante possui todas as propriedades descritas para a *PUMP de batata (*Jezek *et al.*, 1997).

Nucleotídeos de purina inibiram o efluxo de prótons induzido por ácido linoléico e mediado por *AtPUMP1* com os seguintes valores de K_i aparente: 0.8 mM (GDP), 0.85 mM (ATP), 0.98 mM (GTP) e 1.4 mM (ADP), e a habilidade inibitória decresceu na presença de pH alcalino (Borecky *et al.*, 2001). Além disso, os seguintes valores de K_{ms} aparentes foram determinados para os ácidos linoléico, láurico, palmítico, oléico, linolênico, araquidônico e mirístico: 42 μ M, 55 μ M, 70 μ M, 43 μ M, 71 μ M, 55 μ M e 190 μ M, respectivamente (Borecky *et al.*, 2001).

A regulação do fluxo de elétrons através da AOx é bastante complexa: a atividade máxima desta via é uma função da quantidade e do estado redox da proteína presente na membrana mitocondrial, sendo que o engajamento desta via é dependente da quantidade de ubiquinona (e do seu estado redox) assim como do estado alostérico da AOx, que é determinado pela concentração de piruvato e da concentração de oxigênio livre presente no meio de reação. A passagem de elétrons através da AOx pode ser especificamente inibida por vários compostos, como o ácido benzohidroxâmico – BHAM, e o ácido salicilhidroxâmico – SHAM (Grover & Laties, 1978). Com a criação de anticorpos monoclonais contra AOx de *Sauromatum guttatum*, a sua identificação foi feita não só em uma grande

variedade de plantas (Day *et al.*, 1995; Siedow & Umbach, 1995), mas também em fungos (Lambowitz *et al.*, 1989; Sakajo *et al.*, 1991), tripanosomatídeos (Clarkson *et al.*, 1989) e ameba (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1997).

A presença de dois mecanismos dissipadores de energia, a AOx e a PUMP, que dissipam energia livre e diminuem a eficiência da fosforilação oxidativa, levanta a seguinte questão: os dois sistemas funcionam simultaneamente ou em uma seqüência temporal de acordo com o estado fisiológico da célula? A diferença fundamental entre os dois sistemas reside no mecanismo pelo qual estas enzimas desacoplam o transporte de elétrons da força próton-motriz: a AOx impede a formação do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu H^+$), enquanto que a PUMP, consome este gradiente construído pela cadeia de citocromos. Além disso, ácidos graxos ativam a PUMP e inibem a AOx.

Estudos revelaram que equivalentes redutores podem ser diretamente desviados da via alternativa para a via do citocromo e vice-versa, sugerindo que nenhuma das vias trabalham na sua capacidade máxima. Foi demonstrado assim que a AOx é capaz de, na presença de piruvato, competir ativamente com a via do citocromo por equivalentes redutores.

Alterações na respiração mitocondrial de plantas e as atividades da PUMP e da AOx têm sido correlacionadas com muitos efeitos fisiológicos. Considera-se que a AOx desempenhe um papel importante durante eventos como o stress oxidativo e o ataque patogênico a plantas, entre outros. Foi relatado que a expressão da PUMP é induzida pelo frio e que, de modo similar à AOx, a PUMP previne a formação de espécies reativas de oxigênio na cadeia respiratória. Além disso, a PUMP é importante durante o amadurecimento de frutos. Essas observações indicam qualitativamente as circunstâncias fisiológicas onde a respiração mitocondrial exerce um certo grau de controle no metabolismo de plantas.

1.6.2 Canal de K^+

Além da translocação de ácidos graxos através da membrana mitocondrial interna, a translocação de K^+ também dissipa o potencial de H^+ em mitocôndrias de plantas (Hensley & Hanson, 1975). K^+ e H^+ são trocados através da membrana interna por uma via específica (o trocador de K^+ / H^+), que está presente em todas as mitocôndrias e é altamente ativo em plantas (Hensley & Hanson, 1975). A translocação de K^+ é mantida pelo influxo de K^+ através de transportadores sensíveis a ATP (Inoue *et al.*, 1991). De modo diferente dos canais de K^+ presentes em mamíferos (Kowaltowski, *et al.*, 2001), os transportadores de K^+ de plantas são altamente ativos e capazes de diminuir significativamente o potencial de H^+ (Pastore *et al.*, 1999).

1.7 Produção de calor em plantas

A produção de calor em plantas pode estar envolvida em processos como a resistência a baixas e altas temperaturas, reprodução, florescência, senescência e amadurecimento de frutos. A atividade da AOX é alterada durante o amadurecimento de frutos (Almeida *et al.*, 1999; Cruz-Hernandez & Gomez-Lim, 1995), exposição ao frio (Weger & Guy 1991; Vanlerberghe & McIntosh 1997) e florescência (Skubatz *et al.*, 1990). Em tecidos vegetais com altos níveis do caminho alternativo (AOX), sua significância funcional foi melhor entendida e está relacionada à produção de calor. Na família Aracea, por exemplo, sabe-se que, no dia do florescimento, o caminho alternativo torna-se operacional, ocorre aumento brusco nas taxas de respiração e um aumento de temperatura de até 15°C em relação ao ambiente (Meeuse *et al.*, 1976).

A atividade e a expressão da PUMP também são alteradas durante o amadurecimento de frutos (Almeida *et al.* 1999; Costa *et al.* 1999) e são fortemente estimuladas pela exposição ao frio (Laloi 1999; Nantes *et al.* 1999). Curiosamente, apesar de o aumento da respiração mitocondrial mediada pela PUMP e pela AOX ter sido extensivamente correlacionado com condições que demandam a produção de calor, em poucos estudos mediu-se diretamente a atividade termogênica da AOX (Chauveau & Lance 1982; Ordentlich *et al.*, 1991; Kapulnik, 1992) e nenhuma determinação de geração

de calor mediada pela PUMP nativa de batatas foi feita até o presente momento.

A atividade do recém-descoberto canal de K^+ em plantas (Pastore *et al.*, 1999) não foi associada à produção de calor, apesar do seu efeito notório sobre o gradiente mitocondrial de H^+ .

1.8 Membranas Biológicas e sistemas modelo

Membranas biológicas formam compartimentos de tamanho e forma definida nas células. Elas organizam os componentes celulares, criam uma matriz bidimensional fluida e permitem o transporte controlado de solutos. Várias funções celulares são processos mediados por membranas: reconhecimento celular, fusão, endocitose, exocitose, interação intercelular, excitabilidade, translocação, transporte e osmose (Fendler, 1982).

A composição geral das membranas de células animais e de plantas é de 40 a 50% de lipídios e 50 a 60% de proteínas. Há variações nos tipos de lipídios e proteínas, bem como a proporção entre eles. Geralmente, usa-se o modelo do “mosaico-fluido” para descrever o arranjo de proteínas e lipídios nas membranas.

Figura 1.8.1*

*www.bioviestinta.com/images/lipid%20bilayer2.jpg

Neste modelo, a matriz da membrana, que é uma bicamada lipídica composta por fosfolipídios e glicolipídios, incorpora as proteínas tanto na superfície quanto no seu interior, atuando como uma barreira de permeabilidade (Figura 1.8.1). As moléculas podem se difundir lateralmente através do plano da membrana, levando à formação de domínios seletivos (Fendler, 1982).

Os lipídios (do grego *lipos* = gordura) são substâncias de origem biológica solúveis em solventes orgânicos como o clorofórmio, mas pouco solúveis em água (Voet & Voet, 1990). O armazenamento energético celular, a sinalização celular e a composição de membranas são algumas das funções biológicas dos lipídios. Os três principais tipos de lipídios são: os fosfolipídios, os glicolipídios e o colesterol (Stryer, 2000). Muitos dos lipídios são compostos

anfipáticos (ou anfifílicos), ou seja, apresentam uma porção polar e uma porção apolar (hidrofóbica).

Quando os lipídios anfipáticos são adicionados a um meio aquoso, tendem a agregar-se, organizando-se espontaneamente em estruturas plurimoleculares. Estas estruturas permitem maximizar as interações hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas, isolando-as da água, enquanto os grupos polares interagem com o meio aquoso. Em tais arranjos moleculares, os lipídios tem o menor estado de energia livre em água, formando duas regiões com solubilidades diferentes na mesma molécula (Marzzoco & Torres, 1999).

Lipídios com uma única cadeia carbônica, como sabões e detergentes, formam preferencialmente, micelas (figura 1.8.2). A formação de micelas é importante na digestão dos lipídios da dieta. Contudo, a maioria dos fosfo e glicolipídios, que tem duas cadeias apolares, formam bicamadas lipídicas (figura 1.8.2) e vesículas (figura 1.8.2). A fosfatidilcolina, também chamada de lecitina, é um exemplo de fosfolipídio com duas cadeias apolares (figura 1.8.2). A fosfatidilcolina é o fosfolipídio mais abundante em membranas celulares de organismos superiores (Marzzoco & Torres, 1999).

Muito do nosso conhecimento sobre a estrutura de membranas foi obtido através da investigação de modelos como monocamadas de surfactantes, bicamadas e vesículas fosfolipídicas. No entanto, nenhum modelo é capaz de mimetizar, com perfeição, todos os fenômenos envolvidos em uma membrana complexa (Fendler, 1982).

Figura 1.8.2

Lipossomos : conceitos gerais

Uma suspensão de fosfolipídios em água forma vesículas multilamelares (MLV), ou seja, vesículas formadas por mais de uma bicamada. Após sonicação (agitação por vibrações de ultrassom) ocorre uma reestruturação e são formadas as vesículas unilamelares, também chamadas de lipossomos (Voet & Voet, 1990). Os lipossomos podem ser formados de moléculas de um único tipo ou de diferentes tipos de lipídios anfipáticos (Marzzoco & Torres, 1999).

As vesículas unilamelares são fechadas e unidas por uma única bicamada, delimitando um espaço aquoso. Elas também podem ser formadas por outros processos, como extrusão, injeção de etanol, formação espontânea, e remoção de detergente, entre outros (Woodle & Papahadjopoulos *in* Packer & Fleischer, 1997).

As vesículas unilamelares são classificadas, quanto ao tamanho, em pequenas (SUVs) e grandes (LUVs). As SUVs tem até 100 nm de diâmetro e as LUVs tem diâmetro superior a 100 nm. Existem ainda as vesículas unilamelares gigantes (GUVs), que são vesículas com diâmetro de até 10 μ M.

Neste trabalho foram utilizadas LUVs com 170 a 180 nm de diâmetro, preparadas por remoção de detergente. Este método foi desenvolvido originalmente para purificar ou reconstituir proteínas de membrana, produzindo partículas ou vesículas que foram eventualmente descritas como lipossomos. Neste procedimento, tanto misturas de lipídios secos ou lipossomos pré-formados são solubilizados com a fase aquosa contendo detergente. Em qualquer caso, a remoção do detergente é a etapa crucial do processo. Através do controle da taxa de remoção do detergente, o tamanho e a estrutura dos lipossomos resultantes podem ser regulados (Woodle & Papahadjopoulos *in* Packer & Fleischer, 1997).

Além do uso de lipossomos como modelos de membranas biológicas, os mesmos são utilizados como transportadores de drogas na indústria farmacêutica, melhorando a atividade terapêutica de vários compostos (Woodle & Papahadjopoulos *in* Packer & Fleischer, 1997).

Neste trabalho, os lipossomos foram empregado como sistema modelo para o estudo do transporte de prótons mediado pela PUMP.

1.9 Fluorescência: princípios gerais: (Wayne & Wayne, 1996)

A fluorescência é um fenômeno que descreve a interação da luz com a matéria. Nestas interações, moléculas ou átomos absorvem e emitem energia luminosa. Este processo pode ser representado através do diagrama abaixo (Figura 1.9.1):

Figura 1.9.1: **A** é a espécie que absorve energia na forma de luz ($h\nu$) quando está no estado fundamental, o estado em que sua distribuição eletrônica possui menor energia.

Ao receber energia na forma de luz, **A** sofre uma transição do estado fundamental para um estado de alta energia **A*** (estado excitado), o que é denominado **absorção**. No estado excitado, a distribuição eletrônica em **A*** possui energia total maior do que em **A**. Ao retornar ao estado fundamental, **A*** perde a energia adquirida, e este processo chama-se **emissão**. Tanto a absorção quanto emissão de energia obedecem às regras da mecânica quântica, ou seja, ocorrem mediante quantidades discretas de energia luminosa, quantificadas como múltiplos de um fóton. A diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental (ΔE), e a luz emitida, podem ser racionalizados em função da sua frequência (ν) e da constante de Planck (h), segundo a expressão: $\Delta E = h\nu$.

Denomina-se **luminescência** a emissão espontânea, na forma de luz, da energia do estado excitado, pela qual a intensidade de energia emitida depende exclusivamente do número de espécies no estado excitado e da velocidade com que retornam ao estado fundamental. Uma vez interrompida a fonte de energia para absorção, a intensidade da emissão decai com o tempo.

O decaimento da luminescência é caracterizado pelo tempo de vida (τ), definido como o intervalo de tempo no qual a intensidade da emissão decai em

relação à sua intensidade após a interrupção da fonte de energia para excitação.

A **fluorescência** é um tipo de luminescência no qual τ vale cerca de 1 nanosegundo, envolvendo transições eletrônicas entre estado eletrônico singlete do estado fundamental e o estado eletrônico singlete no estado excitado (transição $S_0 \Rightarrow S_1$). Estas transições eletrônicas podem ser visualizadas na figura 1.9.3.

Características das Espécies Fluorescentes (Fluoróforos)

Para que haja fluorescência, um átomo eletronicamente excitado deve perder sua energia por emissão, caso contrário, a energia de excitação será perdida de outras formas, como por quimiluminescência. Há três princípios gerais que indicam se uma molécula poliatômica será fluorescente ou não (i.e., fluoróforo ou não):

- a) a energia da radiação de excitação não deve exceder a energia de ligação da ligação química mais instável,
- b) a velocidade de transferência de energia intramolecular deve ser mais lenta do que o mecanismo de decaimento,
- c) fatores relacionados à geometria molecular, como a planaridade, também interferem na fluorescência.

Utilização analítica da fluorescência: espectrofluorimetria

Há dois tipos de espectros associados ao fenômeno da fluorescência:

- a) *espectro de excitação*, obtido pela medida da intensidade de emissão à medida que o comprimento de onda de excitação é alterado (figura 1.9.2),
- b) *espectro de emissão*: obtido pela medida da intensidade de emissão em função do comprimento de onda, num dado comprimento de onda de excitação fixo (figura 1.9.2).

Figura 1.9.2 (fonte: <http://www.probes.com/handbook/figures/0665.html>): A excitação de um fluoróforo em três comprimentos de onda diferentes (EX 1, EX 2, EX 3) não muda o tipo do espectro de emissão, mas produz variações na intensidade de emissão de fluorescência (EM 1, EM 2, EM 3), que correspondem à amplitude do espectro de excitação.

Em sistemas líquidos, devido à alta probabilidade de colisões intermoleculares, nem o espectro de fluorescência, nem a velocidade de decaimento, dependem do comprimento de onda de excitação, desde que este esteja compreendido no intervalo das bandas de absorção. Ou seja, em moléculas poliatômicas em solução, a energia envolvida na absorção é muito próxima a energia envolvida na emissão. Por este motivo, os espectros de emissão e absorção de moléculas orgânicas em solução freqüentemente são a imagem especular uma do outro, o que facilita sua interpretação.

Visto que a emissão fluorescente em compostos orgânicos vem, predominantemente, do menor nível vibracional do mais baixo estado de excitação singlete da molécula, pode-se dizer que o rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) não depende do comprimento de onda de excitação.

A relação entre a fração da intensidade de luz absorvida (I_{abs}) que é efetivamente emitida como fluorescência (I_f), pode ser escrita como:

$$I_{abs} = I_f \cdot \Phi_f$$

De acordo com a Lei de Beer-Lambert (onde ε é coeficiente de extinção molar, b o caminho óptico e C a concentração):

$$I_{abs} = -\log(I_f/I_o) = \varepsilon bC$$

Pode-se escrever:

$$I_f = I_0 \Phi_f (1 - e^{-\epsilon b C})$$

Em baixas concentrações de fluoróforo, $\epsilon b C \ll 1$, então:

$$I_f = I_0 \Phi_f \epsilon b C$$

Como Φ_f pouco varia com o comprimento de onda, em soluções diluídas (10^{-9} mol/L), tanto I_f como I_{abs} são proporcionais a ϵ , do que emergem dois preceitos fundamentais da *espectrofluorimetria*:

- a) o espectro de excitação de fluorescência é o mesmo que o espectro de absorção em soluções suficientemente diluídas,
- b) é possível obter-se o espectro de absorção de um soluto em concentrações muito baixas (10^{-9} mol/L), mostrando que a espectrofluorimetria é uma técnica analítica muito útil.

Supressão de Fluorescência (“Quenching”)

A supressão de fluorescência ocorre quando a energia do estado excitado é transferida para outra molécula ao invés de resultar em emissão. A supressão é particularmente importante em líquidos, onde há grande probabilidade de colisão molecular. De maneira geral, podemos representar o processo de supressão da seguinte forma:

Excitação: $A + h\nu \rightarrow A^*$

Supressão: $A^* + M \rightarrow A + M$

O supressor (M) absorve a energia de A^* , que é convertida em movimento vibracional, translacional ou rotacional, ao passo que A retorna ao estado fundamental. A supressão depende diretamente da cinética de colisão molecular, o que é controlado basicamente por fenômenos difusionais. O processo de supressão compete com o processo de emissão, e será favorecido com o aumento da concentração de supressor.

Figura 1.9.3: Diagrama de Jablonski

Figura 1.9.3: (fonte: <http://www.probes.com/handbook/figures/0664.html>)

- (1) **Excitação:** um fóton de energia $h\nu_{EX}$ é fornecido por uma fonte externa, como uma lâmpada incandescente ou um laser, e é absorvido por um fluoróforo, criando um estado eletrônico excitado singlete (S_1'). Este processo distingue fluorescência de quimiluminescência, onde o estado excitado é populado através de uma reação química.
- (2) O estado excitado existe por um tempo finito (tipicamente 1 a 10 nanossegundos). Durante este período, o fluoróforo sofre mudanças conformacionais e é submetido a múltiplas interações possíveis com o ambiente molecular. Estes processos tem duas consequências importantes. A primeira é que, a energia do estado S_1' é parcialmente dissipada, gerando o estado singlete excitado relaxado (S_1), de onde a emissão de fluorescência se origina. A segunda é que, nem todas as moléculas inicialmente excitadas por absorção (estágio 1) retornam ao estado fundamental (S_0) por emissão de fluorescência. Outros processos, como a supressão de fluorescência por colisão ("collisional quenching"), transferência de energia fluorescente ressonante (FRET) e o cruzamento intersistemas (intersystem crossing", ISC), também podem "despopular" S_1 . O rendimento quântico de fluorescência, que é a razão entre o número de fótons fluorescentes emitidos (3) e o número de fótons absorvidos (1), é uma medida da extensão relativa de como esses processos ocorrem.
- (3) **Emissão de fluorescência:** um fóton de energia $h\nu_{EM}$ é emitido, e o fluoróforo retorna ao estado fundamental (S_0). Devido à dissipação de energia durante o tempo de vida do estado excitado, a energia deste fóton é menor e, portanto, com comprimento de onda maior que o do fóton excitado $h\nu_{EX}$. A diferença de energia ou de comprimento de onda representada por " $h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$ " é chamada de "deslocamento" de Stokes (Stokes shift), e é fundamental para a sensibilidade da técnica de fluorescência, pois permite que os fótons da emissão sejam detectados isoladamente dos fótons de excitação.

1.10 Microcalorimetria

Praticamente todos os processos físicos e químicos produzem ou consomem calor. Os processos que produzem calor são chamados exotérmicos e os que consomem calor, endotérmicos. Os aparelhos que medem calor são chamados de calorímetros (Wadso, L. *et al.*, 2001).

O método de microcalorimetria de titulação é o único que mede diretamente o calor resultante (absorvido ou liberado) de uma interação, permitindo o cálculo de ΔH , ΔS , da constante de ligação (K_a) e da estequiometria num único experimento*. Atualmente, sistemas microcalorimétricos de reações de sistemas biológicos têm uma sensibilidade na ordem de 25 ncal/seg e a grande vantagem de não serem invasivos e nem destrutivos quando se analisa uma biomolécula.

Em nosso laboratório foi utilizada a técnica de ITC: calorimetria de titulação isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry).

ITC é uma técnica que permite o estudo do calor de interação entre duas moléculas a uma dada temperatura. A grande vantagem do ITC é que é um método verdadeiro de medida “em solução”, pois não requer a imobilização dos componentes da ligação, ou marcadores químicos, como na fluorescência.

Os gráficos obtidos de velocidade de fluxo de calor em função do tempo podem ser analisados de tal forma a se obter, no mesmo experimento, valores de constantes de associação (K_a) e variação de entalpia envolvida na reação (ΔH), permitindo o cálculo dos valores de ΔG e ΔS . Pode-se determinar também a estequiometria da reação entre duas moléculas, bem como calcular o valor da capacidade calorífica (ΔC_p) a partir da variação de ΔH com a temperatura.

As aplicações típicas de ITC são: interação antígeno-anticorpo, interação proteína-ligante, interação proteína-DNA, interação droga-DNA, interação lipídio-proteína, cinética de reações, determinação de coeficiente de partição e determinação de concentração micelar crítica (cmc).

Fonte: http://www.microcalorimetry.com/ITC_DSC/Default.htm

2. METODOLOGIA

2.1 Principais ácidos graxos utilizados

láurico
$C_{12}H_{24}O_2$	
palmítico
$C_{16}H_{32}O_2$	
linoléico
$C_{18}H_{32}O_2$	
mirístico
$C_{14}H_{28}O_2$	
linolênico
$C_{18}H_{30}O_2$	
oléico
$C_{18}H_{34}O_2$	

*as estruturas dos ácidos graxos acima foram obtidas do site: http://www.signet-uk.com/acids_2.htm

Procedência dos reagentes:

As sondas **SPQ** e **ADIFAB** são da Molecular Probes, a **Hidroxiapatita** e **Biobeads SM2** são da Biorad e a **PC** foi purificada como descrito (Rhodes & Lea, 1957). Os demais reagentes foram obtidos da Sigma e têm grau analítico.

2.2 Isolamento de mitocôndrias de tubérculos de batatas

As mitocôndrias de batatas brancas (*Solanum tuberosum*) foram obtidas a partir de uma fração subcelular após a homogeneização do tecido usando o procedimento descrito por Beavis & Vercesi (1992). Alguns cuidados devem ser tomados na preparação de mitocôndrias de tecido vegetal devido à presença de um vacúolo central que pode ser rompido durante a homogeneização, liberando vários produtos secundários, como por exemplo compostos fenólicos e hidrolases lipolíticas, com efeitos deletérios para a mitocôndria. A adição nos meios de isolamento de BSA, que liga ácidos graxos e aparentemente complexa fenóis e quinóis; cisteína, um agente redutor brando que minimiza a concentração de compostos oxidantes e evita a oxidação de grupos SH; e EGTA, que inibe a atividade da fosfolipase D dependente de Ca^{2+} e de acil hidrolases lipolíticas ligadas à membrana, minimiza o dano à mitocôndria. A osmolaridade foi mantida com sacarose.

No caso de isolamento posterior da PUMP, utilizou-se tubérculos de batata do tipo binge (colhidas há poucos dias). Os tubérculos de batata foram mantidos sob refrigeração em câmara fria ou geladeira ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) por 72 horas para estimular a expressão da PUMP (Nantes *et al.*, 1999).

Meio de isolamento I (preparado na hora) :

Sacarose	0,4 M
Hepes	10 mM, pH 7.6
EGTA	1 mM
Cisteína	0,5 mg/mL
BSA FAF (Fatty Acid Free)	1,5 mg/mL

Meio de isolamento II :

- Sacarose	0,25 M
- Hepes	10 mM, pH 7.2
- EGTA	1 mM
- BSA (FAF)	0,1% ou *0,5%
	* no caso do preparo da PUMP

2.2.1 Procedimento (vide esquema 2.2.1.1)

Aproximadamente 2 kg de batatas foram descascadas, cortadas e processadas (centrífuga Walita) para o rompimento do tecido. O homogenato foi misturado à 500 mL de meio I gelado. Todas as etapas foram conduzidas à 4°C.

Essa suspensão foi filtrada através de duas camadas de tecido (failete) para remoção parcial do amido. O pH da suspensão filtrada (cerca de 1,2 L) foi ajustado para 7,2 com NaOH 5 M. Este homogenato foi centrifugado (1.500 x g) por 1 minuto. O precipitado, contendo organelas celulares pesadas, como núcleos e plastídios preenchidos com grãos de amido, células intactas e outros fragmentos celulares pesados, foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado (12.000 x g / 15 minutos). O sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi ressuspenso com a ajuda de um pincel macio em 16 mL de meio II e centrifugado (1.500 x g) por 1 minuto para remover as organelas pesadas ainda presentes. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado (12.000 x g / 15 minutos). O precipitado dessa centrifugação foi ressuspenso e diluído em 4 mL de meio II sem BSA e novamente centrifugado a 12.000 x g como anteriormente. Esse passo foi importante para remover parcialmente o BSA e evitar interferência na dosagem de proteínas. O precipitado de mitocôndrias foi ressuspenso cuidadosamente e utilizado para a dosagem e para o isolamento de PUMP.

2.2.2 Dosagem de proteína mitocondrial total

A dosagem consiste na ligação, em condições alcalinas, de íons cobre (II) ao nitrogênio peptídico das proteínas para produzir uma cor arroxeada com um máximo de absorção em 540-560 nm. A sensibilidade do método (no intervalo de 1-6 mg proteína/ml) é ideal para suspensões mitocondriais (Kingsley G. R., 1972).

Solução de Biureto:

A solução de biureto foi preparada dissolvendo 8 g de NaOH em cerca de 500 mL de água destilada fervida e adicionando a essa solução na ordem e

sob agitação: 14 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 3 g de sulfato de cobre pentahidratado dissolvido em cerca de 100 mL de água destilada fervida, 5 g de iodeto de potássio dissolvido em cerca de 100 mL de água destilada fervida; o volume foi completado para 1 L e então 1 mL de 30% Brij35 foi adicionado. O reativo é estável por vários meses após o preparo.

Procedimento:

1) 50 e 100 µl de suspensão de mitocôndrias foram diluídos para um volume final de 1 ml. Com um mesmo volume final, diluições de uma solução 10 mg/ml de BSA em 0,9% NaCl resultaram em amostras contendo 1, 2, 4 e 6 mg totais de proteína.

2) 3 ml de reagente de biureto foram adicionados a cada amostra e os tubos agitados. Após incubação a 37°C por 15 minutos, as absorbâncias foram lidas a 540 nm.

A concentração de proteínas totais na suspensão mitocondrial, calculada a partir da curva padrão de BSA, variou em torno de 40 mg/ml.

2.3 Isolamento de PUMP de mitocôndrias de batatas

O isolamento de proteínas transportadoras mitocondriais funcionais geralmente envolve a solubilização com detergentes não iônicos e cromatografia em hidroxapatita, recuperando o transportador no eluato, que pode então ser repurificado por outros métodos cromatográficos.

PUMP foi isolada de mitocôndrias de tubérculos de batata seguindo o procedimento usado por Winkler & Klingenberg (1992) para obter UCP1 de tecido adiposo marrom, modificado como descrito por Jezek & Freisleben (1994). O isolamento de PUMP consistiu de três etapas:

1) remoção de proteínas solúveis e associadas à membrana com Brij 58, a partir de um volume de suspensão mitocondrial correspondente a 120 mg de proteína;

2) solubilização da PUMP e de outras várias proteínas de membrana mitocondrial interna com o detergente DPE;

3) cromatografia em colunas de hidroxapatita, possibilitando a separação por ligação superficial diferencial.

Todos os passos foram realizados a 4°C, quando não especificado diferentemente.

2.3.1 Procedimento (vide esquema 2.3.1.1)

Um volume de suspensão mitocondrial correspondente a 120 mg de proteína foi diluído com 30 ml de **meio A**: 20 mM TEA-TES, 50 mM TEA₂-SO₄, 1 mM PMSF, 0,2 mM TEA-EDTA, pH 7,2. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos. Esse passo foi importante para trocar o meio em que as mitocôndrias foram isoladas, contendo 0,25 M de sacarose, pelo meio que foi usado para a extração das proteínas mitocondriais. O precipitado dessa centrifugação foi ressuspenso em 5 ml de **meio A** contendo 3,2% de Brij58 e a solução agitada por 30 minutos.

O extrato foi centrifugado a 100.000 x g (20 min). O precipitado foi ressuspenso em cerca de 8 ml de **meio A** com um homogeneizador de pistão e novamente ultracentrifugado como anteriormente. Esse passo de lavagem com **meio A** foi repetido mais 4 vezes, e foi importante para garantir que as proteínas solúveis e as extraídas com Brij58, assim como o detergente, fossem removidos.

O precipitado resultante da extração com Brij58 foi homogeneizado com 5 ml de **meio A** contendo 4,5% de DPE, agitado por 30 minutos e centrifugado a 100.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante, contendo PUMP solubilizada, foi então submetido à cromatografia em hidroxiapatita.

2.3.2 Cromatografia em hidroxiapatita

Hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)₂ é uma forma cristalina do fosfato de cálcio e possibilita a separação de macromoléculas por ligação superficial diferencial a sítios de cálcio e fosfato na matriz. Essa ligação é de natureza iônica, com a resina funcionando como um trocador de íons misto, mas também pode ter propriedades de afinidade específica.

Em geral, as proteínas transportadoras mitocondriais não se ligam à hidroxiapatita, provavelmente porque os aminoácidos carregados desses transportadores, normalmente expostos para o lado externo ou interno da

Esquema 2.2.1.1:

Esquema 2.3.1.1:

membrana, são protegidos da ligação pelos detergentes associados à parte hidrofóbica da proteína.

2.3.2.1 Colunas de hidroxiapatita

As colunas foram feitas de seringas plásticas de 10 ml e preenchidas com 3 g da resina seca. Cada coluna foi equilibrada com 30 ml de **meio B** : 5 mM TEA-TES , 30 mM TEA₂-SO₄, 0,2 mM TEA-EDTA, pH 7,2. As colunas foram centrifugadas por 2 min. a 2.000 RPM para remover o volume excedente de tampão imediatamente antes da aplicação da amostra.

2.3.2.2 Procedimento

O sobrenadante obtido após a solubilização com DPE foi colocado num banho à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos e o volume total foi dividido entre 4 colunas de HPTA.

As colunas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, por 30 minutos a 4°C e centrifugadas a 2.000 rpm por 2 minutos. Essa primeira centrifugação forneceu a fração 1 (F1) de PUMP, reunida dos eluídos de todas as colunas. Outras quatro centrifugações do mesmo tipo foram feitas após a adição de 0,5 ml de meio B a cada coluna em cada passo, e outras quatro frações (F2, F3, F4 e F5) foram obtidas da mistura dos eluídos das 4 colunas em cada etapa. A concentração de PUMP esperada nessas frações era de aproximadamente 0,1 mg/mL.

2.4 Dosagem da PUMP

As frações foram dosadas pelo método de **Mini-Lowry** (baseado no método de Peterson G., 1977), após a precipitação com acetona, resultando em aproximadamente 0,1 mg de proteína/mL de fração de PUMP.

Depois optou-se pelo método de **Amido Black** (Kaplan & Pedersen, 1985), que é utilizado para detecção de proteína na presença de grande excesso de lipídios (foi testada uma razão proteína-lipídio de até 10.000/1 (w/w)).

2.4.1 Estimativa da quantidade de proteínas isoladas de membrana por Mini-Lowry

(protocolo do Prof. Petr Jezek , baseado no método de Lowry modificado de Peterson, 1977)

Este método é largamente utilizado para dosar proteínas de membrana, onde o SDS é adicionado para reduzir a interferência de detergentes catiônicos, não iônicos e de lipídios, e para proporcionar a desnaturação rápida e suave de proteínas de membrana (Peterson, 1977).

Soluções A, B e C:

A) 2% Na_2CO_3 em 0.1 N NaOH

B) 1% Cu_2SO_4

C) 2% tartarato de Na-K

Amostras de proteína: geralmente : 50 μl de amostra + 40 μl H_2O

Padrões (em duplicata): 0, 2, 4, 6, 10, 15 e 18 μg de BSA.

1) Misturar imediatamente antes de usar:

14.4 ml de A

0.3 ml de B

0.3 ml C

3 ml SDS 10 %

0.3 ml Triton X100 5%

2) Adicionar 610 μl da solução acima a cada amostra e deixar por 15 minutos à temperatura ambiente.

3) Preparar uma diluição 1:2 de "Reagente *Folin - Ciocalteau" (reagente da Fischer Scientific) : H_2O .

4) Adicionar 50 μl de solução Folin a cada amostra e aguardar 30 minutos.

5) Ler a absorbância a 750 nm.

*Folin: tungstato de sódio (100 mg/mL), molibdato de sódio (25 mg/mL), ácido fosfórico (5%), ácido clorídrico (10%), sulfato de lítio monohidratado (175 mg/mL), bromo (1%).

2.4.2 Estimativa da quantidade de proteínas isoladas de membrana por Amido Black

Este método detecta com precisão concentrações baixas de proteína (2 a 24 μg) na presença de lipídios (20 a 40 mg). Altas concentrações de vários tampões, sais e detergentes não iônicos não interferem no ensaio na presença de proteína (20 μg) e lipídio (20 mg) (Kaplan & Pedersen, 1985). Segundo Kaplan & Pedersen (1985), este procedimento é muito útil para determinar a concentração de proteínas em sistemas reconstituídos como proteolipossomos, onde pequenas quantidades de proteína são incorporadas em lipossomos na presença de detergentes com altas relações lipídio/proteína.

A desvantagem dos métodos de dosagem derivados do método original de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) é que lipídios oxidados reagem e produzem interferência. Como a maioria das amostras lipídicas é parcialmente oxidada, os métodos derivados de Lowry não são tão adequados quanto o método de Amido Black para dosar proteínas na presença de altas concentrações de lipídios.

Soluções:

1) 10 % SDS (w/v) – 50 mL

2) TRIS 1M pH 7,5 com HCl – 50mL SDS 1% (1 M Tris /1% (w/v) SDS)

3) TCA 100 g/L

4) TCA 6 g/L

5) Solução de coloração:

Amido Black 0.1%

Metanol 45%

Ácido Acético 10%

Água Milli Q - até completar o volume : 200 mL

6) Solução descolorante

Metanol 90%

Ácido Acético 2%

Água Milli Q - até completar o volume : 500 mL

7) NaOH 25 mM

EDTA 0.05 mM

Etanol 50% - até 50 mL

Sensibilidade: **2.0 a 24.0** µg – solução padrão de BSA 1.0 mg/mL

Procedimento:

Amostras proteolípídicas (2-24 µg de proteína) foram diluídas até 2 mL com água deionizada e, então, foram sequencialmente adicionados: 0,2 mL de SDS 10 % (w/w), 0,3 mL de TRIS 1 M /1% SDS (w/v) - pH 7,5 e 0,6 mL de TCA 100 g/L. Depois de cada adição as misturas reacionais foram vigorosamente “vortexadas”. Todos os passos foram realizados à temperatura ambiente.

Após a adição de TCA, as amostras foram incubadas por pelo menos 3 minutos. Cada amostra foi subsequencialmente transferida para um filtro Millipore (HAWP02400, poro = 0.24 µm) com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os filtros foram previamente identificados a lápis nas extremidades. Cada amostra foi filtrada a vácuo e o filtro foi imediatamente lavado com 2 mL de TCA 6 g/L. Após o processamento das amostras, os filtros foram removidos e colocados em um béquer com aproximadamente 200 mL de solução corante (Amido Black 10B - Bio Rad - 0,1% w/v) dissolvido em metanol/ácido glacial/água deionizada, 45/10/45, v/v/v.

Os filtros foram corados por 3 minutos sob agitação suave, a solução corante foi decantada, os filtros foram lavados uma vez com 200 mL de água deionizada e depois lavados com três porções sucessivas de 200 mL de solução descolorante durante 1 minuto (por lavagem), sob agitação suave. Os filtros foram subsequentemente lavados com 200 mL de água deionizada por 2 minutos (sob agitação suave) e então colocados sobre um papel toalha. Os filtros foram pressionados contra um lenço de papel para remover o excesso de água. Recortou-se a área correspondente à mancha azul em cada filtro e cortou-se esta área em pedaços menores, que foram inseridos em tubos de ensaio com 0,7 mL de NaOH 25 mM, EDTA 0,05 mM e etanol 50%. A solução

colorida foi então eluída dos filtros durante uma incubação de 20 minutos, sob vórtex ocasional.

A absorvância do eluato foi lida a 630 nm. O valor da absorvância do branco (solução sem pedaços de filtro) foi subtraído dos valores das amostras. Os valores de absorvância permaneceram estáveis (dentro de um intervalo aproximado de 5%) por várias horas.

Determinou-se a concentração de proteína a partir da curva padrão de BSA (2-24 μ g). Como uma curva padrão linear de BSA pode ser obtida com reprodutibilidade na presença e na ausência de lipídios (Kaplan & Pedersen, 1985), optou-se pela curva padrão sem lipídios. A curva padrão foi feita com amostras contendo 180 μ L de tampão Hepes 120 mM, KCl 50 mM e EDTA 1 mM (pH 7,4) e diferentes concentrações de BSA.

2.5 Obtenção da PUMP recombinante: AtPUMP1 (Maia *et al.*, 1998)

2.5.1 Material, crescimento e tratamentos

A *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem, ecotipo Columbia (Col-0), foi utilizada em todos os experimentos. As sementes foram crescidas em placas de Petri contendo o meio denominado MS e transferida para o meio MS fresco a cada semana. As sementes foram mantidas em uma sala de crescimento a 22 °C sob um fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas escuro. No tratamento de indução ao frio, sementes com 21 dias foram incubadas ora à 4 °C ora à temperatura ambiente por 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Maia *et al.*, 1998).

2.5.2 Clonagem do cDNA do gene *AtPUMP1* e obtenção dos corpúsculos de inclusão

O procedimento consistiu em extrair o RNA mensageiro de células de *Arabidopsis thaliana*, identificar o DNA complementar na biblioteca de cDNA de flores de *Arabidopsis thaliana* (λ ZAP II, doada por California Institute of Tech., Pasadena, CA) com a utilização de uma sonda (EST clone 304III2T7, doada pelo Arabidopsis Biol. Research Center, Columbus, OH) e finalmente obter o

clone de cDNA de *Arabidopsis thaliana* (AtPUMP1). Os clones positivos foram excisados como plasmídeo, a *AtPUMP1* foi expressa em *E. coli* e os corpúsculos de inclusão (IB, inclusion bodies) contendo *AtPUMP1* foram formados. Este procedimento foi realizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CEBMEG) UNICAMP (Maia *et al.*, 1998).

A análise do DNA genômico foi feita por Southern blot e a análise do RNA (extraído de vários tecidos de *Arabidopsis*) foi feita por Northern blot (Maia, I. *et al.*, 1998).

2.5.3 Solubilização dos corpúsculos de inclusão

este procedimento foi feito em nosso laboratório, após a obtenção dos IB da UNICAMP

- 1) Pesou-se 4 a 5 mg de IB para preparar 1 mL de AtPUMP1.
- 2) *Lavagem*: Os IB foram ressuspensos em 0,5 mL de meio interno* com o auxílio de um micro-homogeneizador, adicionou-se mais 0,5 mL de meio interno e homogeneizou-se com auxílio de vórtex. A suspensão foi centrifugada (14.000 x g, 10 min, 4°C) e este passo foi repetido mais uma vez.

* *meio interno*: 15 ml de TEA-TES “272 mosm”, [TES] = 28.845 mM

0,6 mL de TEA-EGTA 100 mM , [EGTA] = 0.6 mM

84,4 mL de TEA₂SO₄ 100 mM , [SO₄] = 84.4 mM

pH final: 7,2

3 – *Solubilização*: o precipitado foi ressuspenso em 975 µL de meio interno com o auxílio de um homogeneizador, adicionou-se 15 µL de solução de SLS 20% em meio interno (concentração final = 0,3%), homogeneizou-se rapidamente (vórtex) e centrifugou-se (14.000 x g, 10 min, 4°C). O sobrenadante deste passo foi guardado para posterior dosagem e SDS-PAGE.

O precipitado foi ressuspenso em 907 µL de meio interno com o auxílio de um homogeneizador, adicionou-se 83 µL de solução de SLS 20% em meio interno (concentração final = 1,67%) mais 10 µL de DPE (concentração final = 1%). Essa solução foi mantida a 4°C de 30 a 60 minutos e foi feita uma

homogeneização ocasional para verificar se ainda havia precipitado. A AtPUMP1 solubilizada foi mantida a -80 °C e incorporada nos lipossomos após SDS-PAGE e dosagem.

2.5.4 Dosagem da concentração de AtPUMP1 – Greenberg

A proteína recombinante foi dosada pelo método de Greenberg (Greenberg & Craddock, 1982). A maior vantagem deste método é que não há interferência pela presença de DNA, lipídios, açúcares, sais e detergentes (comunicação pessoal: Jiri Borecky, pós doutorando do CEBMEG, UNICAMP).

Outras vantagens são a velocidade de processamento (não é necessário solubilizar ou lavar a amostra previamente) e a produção de um complexo proteína-corante estável (Greenberg & Craddock, 1982).

Reagente de Greenberg:

volume (ml)	Composto
5 mg	azul de bromofenol
3,8	Etanol absoluto
0,6	ácido acético glacial
1,0	Triton X-100
44,6	H ₂ O bidestilada
55,0	Volume total

Curva padrão: 20, 40, 60, 80, e 100 µg de BSA em 100 µl de água + 900µL de reagente de Greenberg em cada amostra. Foram adicionados 100 µL de amostra (AtPUMP1) em 900 µL de reagente de Greenberg. A absorbância foi lida a 610 nm após espera de 15 minutos.

2.6 Separação eletroforética de proteínas (PUMP e AtPUMP1)

2.6.1 Precipitação das amostras

Foram adicionados 10 volumes de acetona gelada às amostras distribuídas em tubos 'eppendorf'. Os tubos foram mantidos à -20 °C durante a noite e depois centrifugados (10.000 rpm/ 10 min), então a acetona foi

descartada cuidadosamente. As amostras foram ressuspensas em 15 μ l de tampão de amostra contendo 0,125 M Tris-Cl (pH 6,8), SDS 5%, 2-mercaptoetanol 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,002%. Depois, as amostras foram aquecidas a 55°C por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel SDS-PAGE.

2.6.2 SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE foi feita em placas de poliacrilamida e corrida em um sistema de mini-géis SE 250 da Hoefer (dimensões: 8 cm x 10 cm x 0,75 mm) na presença de 0,1 % de SDS, de acordo com Laemmli (1970). Segue abaixo a composição do gel de resolução e do gel de empilhamento:

	Gel de resolução 17.3 %		Gel de empilhamento 5%
volume	amostra	Volume	amostra
1,6 mL	H ₂ O milliQ	2.8 mL	H ₂ O milliQ
5,8 mL	acrilamida/bisacrilam. 30%	0.84 mL	30% acrilamida/bis
2,5 mL	1,5 M Tris/Cl, pH 8.8	1.3 mL	0.5 M Tris/Cl, pH 6.8
100 μ l	SDS 10%	50 μ l	10% SDS
5 μ l	TEMED	2 μ l	TEMED
50 μ l	persulfato de amônio 10%	25 μ l	10% persulfato de amônio

Amostra por poço de gel (geralmente):

Proteína: 7,5 μ L de AfPUMP1 + 7,5 μ L tampão de amostra

Padrão: 7,5 μ L de Padrão Sigma Low Coomassie + 7,5 μ L tampão de amostra

A corrida foi feita a 25 °C e a 25 mA.

2.7 Reconstituição da PUMP em proteolipossomos

A preparação de proteolipossomos baseou-se na metodologia descrita por Klingenberg *et al.* (1995) com modificações.

2.7.1 Formação do filme lipídico

O filme lipídico consiste em uma mistura de ácido fosfatídico ou dicetil fosfato (1,6% em peso), fosfatidilcolina (94,2% em peso) e cardiolipina (4,2% em peso), totalizando 41,2 mg de lipídios. A mistura foi adicionada a um tubo de ensaio, solubilizada em ~1ml de clorofórmio e seca sob atmosfera de nitrogênio ou argônio. Formou-se então um filme fino de lipídios ao redor da parede interna do tubo de ensaio. O filme foi mantido em dessecador a -80°C (até 1 dia) ou foi hidratado imediatamente. Os filmes hidratados foram usados no mesmo dia.

O filme foi hidratado com 60 μL (ou 120 μL) de DPE (razão detergente/lipídio = 1,4 ou 2,8 em massa) e meio interno (vide 2.5.3) até completar 1 mL. A mistura reacional foi brevemente aquecida em um banho a 50°C e vortexada sob atmosfera de N_2 . As micelas formadas foram resfriadas e colocadas no gelo. Adicionou-se 25 μL da sonda SPQ 80 mM (concentração final = 2 mM) e depois a PUMP ou AtpPUMP1 isolada (30 μg a 50 μg de proteína).

2.7.2 Remoção do detergente DPE

A remoção do detergente e formação dos proteolipossomos foi feita com a resina Bio-Beads SM-2 (20-50 mesh) conforme descrito a seguir (todas as centrifugações foram feitas à $800 \times g$, durante 2 minutos e à 4°C):

- 1) Adicionou-se Bio-Beads a duas seringas de 5 mL vedadas, sendo o volume de Bio-Beads em cada seringa igual a 3 e 2,5 mL respectivamente.
- 2) As colunas de Bio-Beads foram lavadas com 2 mL de metanol cada uma e centrifugadas.
- 3) As colunas de Bio-Beads foram lavadas com 2 mL de água milli Q cada uma e centrifugadas.

- 4) As seringas com Bio-Beads foram vedadas com Parafilm™ e equilibradas com 2 mL de meio interno cada uma. O meio interno foi removido pouco antes do uso por centrifugação.
- 5) Após a remoção do meio interno de uma das seringas, vedou-se sua saída com Parafilm™ e adicionou-se a mistura final de lipídios / proteína/ detergente (~1000 µL), enquanto a outra continuou equilibrando em meio interno.
- 6) A mistura solubilizada em Bio-Beads foi incubada a 4°C por pelo menos 2,5 horas.
- 7) Após a incubação os proteolipossomos foram removidos por centrifugação.
- 8) Adicionaram-se os proteolipossomos eluídos da primeira coluna na segunda coluna com Bio-Beads (após a remoção do seu meio interno) e manteve-se por 30 min (4°C).
- 9) Os proteolipossomos foram novamente removidos por centrifugação.

2.7.3 Remoção da sonda externa

6,66 g de Sephadex G-25 Médio foram equilibrados com 35 mL de meio interno durante várias horas e a resina foi dividida igualmente em 4 seringas de 5 mL cada (volume final de Sephadex em cada seringa ~ 5 mL). O meio interno foi removido pouco antes do uso por centrifugação (800 x g / 2 min).

Os proteolipossomos eluídos das colunas de Bio-Beads, e que contêm SPQ externa, foram divididos em 4 partes iguais de volume e cada parte (cerca de 0,25 mL) foi adicionada a uma coluna de Sephadex. A sonda externa ficou retida no Sephadex e os proteolipossomos foram eluídos por centrifugação (800 x g / 2 min). Os proteolipossomos eluídos foram transferidos para um tubo tipo 'eppendorf' e permaneceram no gelo durante as cinéticas de transporte de H⁺ nas quais foram utilizados.

Esquema da preparação dos proteolipossomos:

4: Proteolipossomos formados

2.8 Cinéticas de transporte de H⁺

O fluxo de H⁺ em vesículas (proteolipossomos) foi monitorado através da fluorescência da sonda SPQ, que é suprimida pela forma aniônica do tampão TES (Orosz & Garlid, 1993). Assim, quando há efluxo de prótons das vesículas contendo SPQ no interior, o pH no interior e a concentração da forma aniônica do tampão TES dentro das vesículas aumentam, e há uma queda da fluorescência. Este processo tem início quando, após a adição de ácido graxo no sistema (aumento da fluorescência devido à acidificação interna), adiciona-se o ionóforo valinomicina.

Na presença de valinomicina, um canal artificial de K⁺ é formado e a saída de H⁺ é eletricamente compensada pela entrada de K⁺.

A fluorescência foi registrada em fluorímetros Hitachi modelos F-2000 e F-4500, utilizando um comprimento de emissão de 440 nm e um comprimento de excitação de 340 nm. Todos os ensaios foram feitos com agitação contínua, onde 35 µl de proteolipossomos foram adicionados com uma microseringa a 1,5 ml de volume final de tampão (meio externo*) na cubeta dentro do fluorímetro. Todas as outras adições (ácido linoléico, valinomicina) também foram feitas com microseringas.

As soluções estoque de valinomicina e de ácidos graxos foram preparadas em etanol, a solução estoque de SPQ foi preparada em água, e todas as soluções estoque foram mantidas sob refrigeração a -20 °C.

* *meio externo*: 15 ml de TEA-TES “272 mosm”, [TES] = 28.845 mM

0,6 mL de TEA-EDTA 100 mM , [EDTA] = 0.6 mM

84,4 mL de K₂SO₄ 100 mM , [K⁺] = 168.8 mM

pH final: 7.2

2.8.1 Fluorescência com a sonda SPQ

Como a fluorescência da sonda SPQ é suprimida apenas pela forma aniônica do tampão, observamos aumento da fluorescência total quando ocorre acidificação intralipossomal ([TES]_{interna} diminui) e decréscimo da fluorescência total quando ocorre alcalinização intralipossomoal ([TES]_{interna} aumenta).

Na concentração de tampão e pH utilizados, a capacidade do sistema é maior para as alcalinizações intralipossomais (aumento na [TES⁻]). Em pH 7.2, as concentrações de TESH e TES⁻ calculadas a partir da equação de Henderson-Hasselbach para TES (pKa = 7,50) são respectivamente 19.2 mM e 9.6 mM. Essa formulação é interessante quando se trabalha com proteolipossomos com PUMP, já que o que se observa é um aumento na [TES⁻] após a adição de ácidos graxos + valinomicina. A fluorescência da sonda SPQ pode ser descrita pela seguinte equação :

$$F_0 / F = 1 + K_q \cdot [Q]$$

F_0 : Intensidade da fluorescência na ausência de supressor

F : Intensidade da fluorescência na presença de supressor

K_q : Constante de Stern-Volmer

Q : Supressor

A fluorescência de SPQ na presença de múltiplas espécies supressoras pode ser escrita como:

$$F_0 / F = 1 + \sum \{ K_{qi} \cdot [Q_i] \}$$

A importância de utilizar uma equação que inclua a supressão por outras espécies é considerar a influência dos outros íons presentes no ensaio. A obtenção das constantes de Stern-Volmer para alguns íons individualmente mostrou que K^+ e SO_4^{2-} não suprimem a fluorescência da sonda, enquanto que TEA^+ causa supressão pequena mas significativa na concentração usada; isso não causa nenhum empecilho ao ensaio, já que sua contribuição é constante.

Considerando Q_x a espécie de concentração variante (no nosso caso, TES⁻), a concentração dos outros supressores sendo inalterada, a constante de Stern-Volmer pode ser obtida por:

$$F_0 / F = 1 + \sum \{ K_{qi} \cdot [Q_i] \} + K_{qx} [Q_x]$$

Para aplicar a equação acima seria necessário conhecer F_0 , a fluorescência na ausência de qualquer supressão. Essa é uma condição experimental complexa de ser obtida na presença de lipossomos e outros íons que podem provocar supressão, mesmo que com constantes de supressão menores que a do ânion do tampão TES. Assim, prefere-se usar :

$$1 / F = 1 / F_A + m_{qTES} [TES^-]$$

onde: $F_A = F_0 / \{ 1 + \sum (K_{qi} \cdot [Q_i]) \}$ e $m_{qTES} = K_{qTES} / F_0$ é o coeficiente empírico de supressão.

No caso de termos uma quantidade desconhecida de TES^- , sua concentração pode ser substituída por $\delta[\text{TES}]$, ficando a supressão inicial por esse ânion embutida na expressão para F_A .

Assim, a equação

$$1/F = 1/F_A + m_{\text{qTES}} \delta[\text{TES}^-]$$

permite calibração rigorosa, de modo que m_{qTES} obtido por uma curva de calibração pode ser usado para converter qualquer variação de fluorescência inversa a $\delta[\text{TES}]$, quantidade que pode ser diretamente relacionada com $\delta[\text{H}^+]$.

2.8.2 Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida adicionando-se concentrações conhecidas de KOH à solução contendo meio interno e vesículas. As vesículas (35 μL) são adicionadas aos 5 segundos, a nigericina (0.58 μM) aos 20 segundos e a solução de KOH é adicionada várias vezes sucessivamente (média de 10 adições de 2 μM cada) (figura 2.8.2.1).

Figura 2.8.2.1

A partir dos valores de fluorescência obtidos, foi construído o gráfico $1/F$ versus concentração de KOH adicionada (figura 2.8.2.2) e obteve-se F_0 (ausência de supressão) e K_q (constante de supressão):

$F_0 = 1 / \text{intercepto}$, $K_q = F_0 \cdot \text{inclinação}$

A nigericina perde um próton quando se liga a um cátion, formando um complexo neutro que pode difundir-se através da membrana como um carreador móvel. A nigericina também é móvel na forma protonada não complexada, e portanto pode catalisar a troca eletroneutra de K^+ por H^+ . Nigericina é usualmente empregada para modificar o gradiente de pH em membranas bioenergéticas, visto que ela iguala os gradientes de K^+ e H^+ .

Conhecendo F_0 , pode-se calcular L (espalhamento) e K_q (com maior precisão), plotando-se F (fluorescência em presença de supressor) versus $F_0 - F / [KOH]$ (Figura 2.8.2.3):

Figura 2.8.2.3

2.8.3 Determinação da concentração da sonda SPQ interna

Os lipossomos foram adicionados (35 μL , 5s) em tampão interno e, quando o sinal de fluorescência se estabilizou, foi adicionado o detergente DPE (10 μL , 10 s), e os lipossomos liberaram a sonda SPQ presente no seu interior. A partir daí, foi adicionada uma concentração conhecida da sonda SPQ (5 nmol cada adição), e foi feita uma estimativa da concentração de SPQ interna a partir da adição de uma concentração de SPQ conhecida. O gráfico “fluorescência versus tempo” foi construído e os valores de fluorescência correspondentes aos nmoles de SPQ adicionados foram obtidos (figura 2.8.3.1):

Figura 2.8.3.1

ácido oleico : $V = 1.57 \mu\text{L}$ ou $1.12 \mu\text{L}$ por mg de lipídio

Obteve-se o valor da concentração de SPQ por regressão linear do gráfico **nmol de SPQ adicionada versus fluorescência obtida**. A relação intercepto/inclinação da reta forneceu o valor de SPQ em nmol, que dividido pelo volume adicionado resulta em valor de concentração de SPQ.

2.8.4 Cinéticas de transporte de H^+ :

Os dados iniciais (fluorescência vs. tempo, figura 2.8.4.1) podem ser convertidos, após a aplicação da equação de Stern-Volmer, em taxas de fluxo de H^+ : nmol de H^+ vs tempo (s) (figura 2.8.4.2).

Exemplo:

- 1 - Adição de ácido oléico (~15s, concentração variando de 0 a 200 μM)
- 2 - Escala de tempo : 0 a 120 segundos
- 3 - [valinomicina] adicionada = 2.66 μM (~ 20 s)

Figura 2.8.4.1

Figura 2.8.4.2

Sabendo K_q , L e a concentração de SPQ nas vesículas, pode-se calcular a velocidade para cada concentração de ácido adicionado a partir dos dados acima. Escolhe-se o intervalo de valores de fluorescência (ΔF) correspondentes à velocidade inicial, onde a fluorescência aumenta (ou diminui) linearmente com o tempo, geralmente 20 segundos após a adição de valinomicina até, aproximadamente, 40 segundos. A regressão linear dos valores nesse intervalo fornece a velocidade em $\Delta F/s$. Multiplicando-se a velocidade $\Delta F/s$ por nmol (do gráfico nmol SPQ versus F), obtém-se velocidade em $\text{nmol H}^+ \cdot \text{s}^{-1}$.

Exemplo: ácido oléico

[ácido oleico adicionada] μM	velocidade ($\Delta F \cdot \text{s}^{-1}$)	velocidade (n mols $\text{H}^+ \text{s}^{-1}$)
3.33	0.062	0.07
6.66	0.09	0.10
13.33	0.17	0.19
20	0.21	0.23
26.66	0.27	0.30
33.3	0.31	0.35
40	0.38	0.43
50	0.52	0.58
67	0.60	0.68
100	0.70	0.78
133	0.79	0.88
167	0.81	0.91
200	1.10	1.23
267	0.87	0.97

A partir da tabela de velocidade ($\text{nmols H}^+ \cdot \text{s}^{-1}$), pode-se relacionar a dependência da concentração de ácido graxo com a velocidade. Um exemplo, apresentado na figura 2.8.4.3, é um gráfico direto de velocidade versus concentração de ácido oléico (dados da tabela da página anterior):

Figura 2.8.4.3

A variação da velocidade com a concentração de ácido graxo adicionada pode ser usada para determinar $K_{m,app}$ (constante de afinidade aparente) e $V_{máx,app}$ (velocidade máxima aparente), usando as análises de Lineweaver & Burk (Lineweaver & Burk, 1934) ou de Eadie-Hofstee (Eadie, 1942; Hofstee, 1952; Hofstee, 1959). Além disso, pode-se construir o plote de Hill usado, por exemplo, para analisar as cinéticas realizadas na presença de inibidores (ATP, GTP, ADP e GDP).

2.8.5 Fluorescência com SPQ

Mudança de potencial transmembrânico ($\Delta\psi$) com a variação da concentração de K^+

O objetivo deste experimento foi verificar se o efluxo de prótons mediado pela *AtPUMP1* reconstituída era ou não dependente da variação do potencial transmembrânico ($\Delta\psi$). O efluxo de H^+ foi ativado pela adição de ácido linoléico ($67 \mu\text{M}$), seguida da adição de valinomicina ($2,7 \mu\text{M}$) ao meio reacional contendo *AtPUMP1* incorporada em proteolipossomos.

O potencial de difusão de K^+ foi variado, aplicando-se a equação de Nernst adaptada, misturando-se os meios externo e interno:

$$\Delta\psi = -59 \cdot \log [K^+] / [(V_{\text{total}} - V_{\text{meio int.}}) \cdot (K^+ / V_{\text{total}}) + V_{\text{meio ext.}} \cdot (K^+ / V_{\text{total}})] \quad \text{Equação 2.8.5 a}$$

$$\text{ou } \Delta\psi = -59 \cdot \log 0,1688 / [(1500 - V_{\text{meio int.}}) \cdot (0,1688/1500) + V_{\text{meio ext.}} \cdot (168,8/1500)]$$

$V_{\text{meio int.}}$ = volume de meio interno (μL) e $V_{\text{meio ext.}}$ = volume de meio externo (μL)

$[K^+]$ = concentração de K^+ no meio externo (168,8 mM), V_{total} = volume total na cubeta

O movimento de um íon através de uma única barreira de energia depende exponencialmente da voltagem aplicada (Jezek *et al.*, 1997). Garlid *et al.* (1989) desenvolveram uma descrição simplificada das características fluxo-voltagem, que é válida sob potenciais altos ($> 100 \text{ mV}$), e relaciona o fluxo líquido de íons (J) com a voltagem reduzida (u) (Jezek *et al.*, 1997):

$$J = P \cdot C_1 \cdot e^{\beta u} \quad \text{Equação 2.8.5 b}$$

onde:

$$u = -z \cdot F \cdot \Delta\psi / RT \quad \text{Equação 2.8.5 c}$$

P = coeficiente de permeabilidade (cm/s)

C_1 = concentração das espécies na interface membrana/água (μM)

β = parâmetro que descreve o grau de não linearidade e o seu valor reflete o modelo de barreira energética.

A linearização da equação 2.8.5 b resulta na expressão simples para um ânion com $z = -1$:

$$\ln J = \ln P \cdot C_1 + \beta \cdot u$$

$$\ln J = \ln P \cdot C_1 + \beta \cdot F \cdot \Delta\psi / RT \quad \text{Equação 2.8.5 d}$$

Assim, a construção do gráfico J vs. $\Delta\psi$ a partir dos dados obtidos dos fluxos de H^+ em proteolipossomos sob potenciais diferentes, permite observar

se há ou não uma dependência linear do fluxo iônico com a variação de potencial. A variação linear é denominada ôhmica.

Utilizando-se a equação 2.8.5 d, é possível fazer a linearização do gráfico J vs. $\Delta\psi$ e obter o valor do parâmetro β . O valor de β igual a 0,5 pode ser relacionado com um transporte associado a um vazamento de íons não específico na bicamada (Garlid *et al.*, 1989), o valor de β menor que 0,5 pode ser relacionado com um transporte associado a um canal presente na bicamada (Garlid, 1990) e, valores de β maiores que 0,5, podem ser relacionados com a presença de um poço de íons que se estende na bicamada (Garlid *et al.*, 1989). Além disso, pode-se calcular J_0 (fluxo de íons na ausência de potencial) e o coeficiente de permeabilidade P , por extrapolação dos dados de fluxo versus voltagem para o valor de voltagem zero.

A criação de um único potencial de difusão de K^+ em lipossomos é problemático devido ao efeito sobre a capacitância causado por um influxo indesejado de K^+ sob uma grande concentração externa de K^+ , e limita o fluxo em uma baixa concentração externa de K^+ . Porém, visto que as mesmas interferências são esperadas em cada caso, uma análise fluxo-voltagem obtida a partir dos dados é útil para comparar diferentes íons translocados.

2.9 Ensaios com a sonda ADIFAB

Com a finalidade de determinar o coeficiente de partição de ácidos graxos de cadeia longa entre a fase aquosa e a bicamada, foi empregada a sonda fluorescente ADIFAB (Acrylodated Intestinal Fatty Acid Binding Protein).

ADIFAB é um indicador fluorescente utilizado para medir concentrações de ácidos graxos livres (FFA) entre 1 nM a $>20 \mu\text{M}$ (Richieri *et al.*, 1992). Este indicador é um conjugado da sonda fluorescente sensível à polaridade do meio, Acrylodan (figura 2.9.1) (Prendergast *et al.*, 1983) e de uma proteína ligante de ácido graxo intestinal (I-FABP). A I-FABP é uma proteína de baixo peso molecular (15 kDa) com alta afinidade para FFA (Sacchettini *et al.*, 1989). A estequiometria do conjugado é de aproximadamente 1 mol : 1 mol (fluoróforo : proteína).

acrylodan, Figura 2.9.1

A detecção de FFA por ADIFAB é baseada na mudança da posição do fluoróforo Acrylodan relativa ao sítio de ligação não polar da proteína quando a mesma fica ocupada por um ácido graxo. Ao se titular ADIFAB com ácido oléico, ocorre uma mudança no espectro de fluorescência. A mudança espectral permite determinar concentrações de FFA a partir da razão entre as intensidades de fluorescência de indicador ligado e não ligado, medidas em ~ 505 nm e 432 nm respectivamente (Richieri *et al.*, 1992; Anel *et al.*, 1993).

A sonda é um pó liofilizado que foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser solubilizado. Ao preparar as soluções (estoque e de uso) da sonda, foram seguidas as recomendações do fabricante:

- usar sempre material de vidro (frascos, seringas, etc.) e preferencialmente cubetas de quartzo, visto que a sonda pode se adsorver em alguns tipos de plástico.
- lavar toda a vidraria com metanol e secar em seguida antes de usar, para garantir a ausência de detergente.

Preparo de soluções:

2.9.1 Solução estoque

Foi feita a diluição de 1 frasco de ADIFAB (200 μg) em 1 mL de tampão “adifab 1” (Tris, 50 mM ; EGTA, 1 mM; NaN_3 , 0,05% ; pH 8,0). A solução foi armazenada em frasco de vidro em geladeira por até 3 meses. A concentração nominal desta solução estoque é de ~13 μM , baseando-se no peso molecular estimado em 15 kDa.

2.9.2 Solução para uso

Para medir as concentrações de FFA são utilizadas soluções 0,2 μM de ADIFAB, obtidas a partir da adição de 38 μL da solução estoque a 2,5 mL de tampão “adifab 1”. A solução para uso foi usada imediatamente após o preparo e mantida no gelo durante os experimentos.

O comprimento de onda de absorção máximo da sonda (considerando somente o fluoróforo) em tampão aquoso (pH 7 - 8) é de aproximadamente 365 nm ($\epsilon_{365 \text{ nm}} = 10.600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

2.9.3 Fluorescência

Recomenda-se o comprimento de onda de excitação em torno de 390 nm para obter um sinal mais preciso do indicador ligado (que tem fluorescência substancialmente mais fraca do que a da forma livre).

O sinal de fundo, espalhamento Raman da água (que aparece em ~ 449 nm) e o sinal do tampão, deve ser subtraído devido à baixa concentração na qual a sonda é tipicamente usada (0,2 μM).

A fluorescência foi registrada inicialmente no fluorímetro "SPEX 1681" e depois no fluorímetro Hitachi modelo F-2000.

2.9.4 Medidas de ligação de ácido graxo

A concentração de FFA é obtida a partir da aplicação da expressão seguinte: (Richieri *et al.*, 1992)

$$[\text{FFA}] = K_d \cdot Q \cdot \frac{R - R_o}{R - R_{\text{máx}}} \quad \text{Equação 2.9.4 a}$$

onde:

$$Q = \frac{I_f (432)}{I_b (432)}$$

$I_f (432)$ = intensidade de ADIFAB com $[\text{FFA}] = \text{zero}$

$I_{b(432)}$ = intensidade de ADIFAB com [FFA] saturante (não pode ser medido experimentalmente)

I_f = intensidade de fluorescência

*Q = 19,5

$R_0 = \frac{I_{f(505)}}{I_{f(432)}}$, na ausência de FFA

$R = \frac{I_{f(505)}}{I_{f(432)}}$, (subtraindo-se o sinal de fundo)

$R_{m\acute{a}x} = \frac{I_{f(505)}}{I_{f(432)}}$, ADIFAB saturada com FFA (não pode ser medido experimentalmente)

$R_{m\acute{a}x} = 11,5$

Os valores de $R_{m\acute{a}x}$ e de Q são constantes, podem ser usados em todas as análises que utilizam ADIFAB e são os mesmos para todos os ácidos graxos (Molecular Probes Product Information, em anexo).

Os ácidos graxos foram adicionados a partir de soluções 1 mM dos seus respectivos sais de sódio à solução de vesículas fosfolipídicas (50 a 100 μ M) no tampão “adifab 2” (Tris/HCl, 10mM ; EGTA, 1 mM, NaCl, 0,15 M; pH 8,0), sendo imediatamente misturados na solução (Anel *et al.*, 1993).

Incuba-se a mistura por 10 minutos na temperatura desejada e mede-se a razão entre as intensidades de emissão de fluorescência a 505 e 432 nm. (Kleinfeld *et al.*, 1997).

2.9.5 Calibração da sonda

A calibração de ADIFAB sob condições específicas deve ser feita através da titulação do indicador com quantidades conhecidas de FFA.

Para determinar o K_d (constante de dissociação) do ácido graxo é necessário determinar a concentração de ácido graxo livre em cada etapa da titulação, onde foram aplicadas as equações:

$$[FFA] = [FA_T] - [ADIFAB]_T (Q_{fh}) / 1 + Q_{fh} \quad \text{Equação 2.9.5 a}$$

$$fh = (R - R_0) / (R_{\text{máx}} - R)$$

T = concentração total das espécies envolvidas

$$K_d = \text{intercepto do gráfico : } \log Q \cdot \frac{R - R_0}{R - R_{\text{máx}}} \text{ vs. } \log [FFA] \text{ (M)} \quad \text{Equação 2.9.5 b}$$

Foram empregadas as seguintes equações para calcular K_p (coeficiente de partição):

$$K_p = \frac{[FA]_m}{[FFA]} \quad \text{Equação 2.9.5 c}$$

$$K_p = \frac{([FA_{\text{total}}] - FFA)}{[FFA]} \cdot \frac{V_a}{V_m} \quad \text{Equação 2.9.5 d (Anel et al., 1993)}$$

onde:

V_a = volume da fase aquosa, V_m = volume da fase de membrana

Foi usada a seguinte relação nos cálculos:

$$\frac{V_m}{V_a} = \frac{0,001}{\text{mMfosfolipídio}} \quad (\text{Anel et al., 1993})$$

Nos ensaios com os ácidos linoléico e láurico, a concentração total de fosfolipídios nas vesículas era de 5,41 mM e de 1,26 mM na cubeta, assim:

$$\frac{V_a}{V_m} = 1,26 / 0,001 = 1,26 \times 10^3$$

2.10 Microcalorimetria

Foi usado o microcalorímetro de titulação constante (VP-ITC da Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, USA), que faz uma titulação isotérmica de alta sensibilidade.

O VP-ITC mede diretamente o calor absorvido ou liberado em amostras líquidas como um resultado da injeção automática de reagentes. A velocidade de injeção é constante e pode ser variada. O calorímetro opera entre 2 e 80 °C.

As celas de amostra e de referência são acessíveis para limpeza e adição de amostra pelo topo do aparelho. A cela de amostra fica à direita das duas celas e a cela de referência fica à esquerda (ver figura 2.10.1). O par de celas idênticas com o formato de “moeda” fica localizado dentro de um compartimento adiabático que, por sua vez, situa-se dentro de outro compartimento adiabático.

Figura 2.10.1

As diferenças de temperatura entre a cela de referência e a de amostra são medidas, calibradas e os dados ficam disponíveis para o usuário, podendo

ser gravados no computador. Os dados disponíveis são designados como sinal “DP” (“diferencial power”), ou seja, a diferença de energia entre a cela de amostra e a de referência. A calibração deste sinal é obtida eletricamente, administrando-se uma quantidade conhecida de energia através de uma resistência que aquece e está localizada ao lado das celas.

Uma injeção que resulta na evolução química de calor (reação exotérmica) dentro da cela de amostra causa uma mudança negativa no valor de DP, de modo a manter a variação de temperatura entre as celas igual a zero ($\Delta t = 0$). O oposto é verdadeiro para reações endotérmicas.

Visto que a unidade de DP é $\mu\text{cal/s}$, e DP é medido em função do tempo (segundos), a integral do pico obtido é uma medida da quantidade de calor envolvido na reação (Q). A partir disso, calcula-se o valor de ΔH .

O microcalorímetro tem uma cela (cela de amostra) onde se adiciona a amostra a ser “titulada” (volume de amostra = 1.45 mL) e uma seringa que injeta o “titulante” (ligante) na solução contida na cela. Antes de ser colocada na cela do microcalorímetro, a solução pode ser submetida ao vácuo, sob agitação constante, com a finalidade de retirar o ar dissolvido. Isto evita a formação de bolhas durante o experimento, que podem causar ruídos nos termogramas e dificultar a sua análise. Denomina-se termograma o gráfico “ $\mu\text{cal/seg}$ ” em função do tempo.

O compartimento seringa-agitador de 250 μl consiste em uma agulha que tem uma pá agitadora na sua ponta. Esse sistema é acoplado magneticamente a um motor de alta precisão, que gira continuamente a uma velocidade constante durante o experimento, dispensando a correção para o calor de fricção da seringa. A cela de referência atua somente como um “simulador” de temperatura e não tem agitação. Uma vez que o experimento começa, o computador “envia” os parâmetros que foram previamente inseridos pelo operador para o dispositivo que movimenta a seringa, como o número de injeções, o volume total da injeção, o tempo de duração e o tempo entre uma injeção e outra, dando início ao experimento. Os pontos experimentais são coletados a uma frequência selecionável e armazenados no computador.

O tratamento dos dados envolve a determinação automática da linha base, a integração e a obtenção da área sob todos os picos de injeção (simultaneamente ou individualmente), ajustando a área da curva a uma equação de ligação paramétrica apropriada. Os valores dos parâmetros de ligação, como a estequiometria (n), a constante de associação (K_a), a entalpia (ΔH) e a entropia (ΔS) de ligação são mostrados após o ajuste ("fit") e os respectivos erros de cada parâmetro ficam disponíveis. A partir desses dados calcula-se o energia livre (ΔG) da associação. O programa utilizado no tratamento dos dados é o Microcal Origin TM.

Quando se plota a área obtida dos picos em função da razão molar ligante/ macromolécula na cela, uma isoterma de ligação completa para a interação é obtida (figura 2.10.2*, painel inferior) :

Figura 2.10.2: O painel superior mostra um termograma relativo a um ensaio de ligação ("binding"). O painel inferior mostra uma isoterma de ligação para um único sítio de ligação.

*A figura foi extraída do site http://www.microcalorimetry.com/ITC_DSC/Default.htm

2.10.1 Experimentos com mitocôndrias de batatas

Após equilibrar a temperatura da cela a 30 °C, a reação foi iniciada pela injeção de 9 µL de mitocôndrias de batatas recém-isoladas na cela de amostra de 1.45 mL contendo o meio reacional: 250 mM de sacarose, 10 mM de HEPES-Na, 2 mM de fosfato inorgânico, 1.5 µM de rotenona, 1.5 µM de oligomicina e 5 mM de succinato-Na, pH 7.2.

Nas condições estabelecidas para o estudo da ativação das diferentes vias (PUMP, AOX e canal de K⁺), foram adicionados ao meio reacional:

- a) PUMP ativada : BHAM 2 mM e ácido linoléico em concentrações variáveis.
- b) AOX ativada : BSA 1%, DTT 1mM, piruvato 0,2 mM (com ou sem ATP 2 mM).
- c) canal de K⁺ ativado : BSA 1%, BHAM 2 mM e concentrações variáveis de KCl.
- d) todos os canais ativados: ácido linoléico, KCl, DTT e piruvato

As demais condições estabelecidas estão descritas em “Resultados”.

O calor total gerado (QT) na reação foi calculado pela integração da área total sob o pico de cada termograma calorimétrico (fluxo de calor em função do tempo) durante os primeiros 6 minutos após a injeção de mitocôndria (tempo máximo antes de as amostras estudadas atingirem anoxia).

Análise de dados : Ajustes de regressão linear e erros foram calculados usando o software OriginTM.

2.10.2 Experimentos preliminares de ligação

Os experimentos de ligação utilizaram *AtPUMP1* isolada dos corpúsculos de inclusão (IB) e solubilizada em tampão interno (TEA-EGTA, TEA-TES, TEA_2SO_4), DPE 1% e SLS 1,7%. A proteína foi dosada e caracterizada por SDS-PAGE.

O tampão de ensaio utilizado foi o mesmo na qual a *AtPUMP1* estava solubilizada (tampão interno contendo a mistura de detergentes DPE 1% e SLS 1,7%). Optou-se pelo uso dessa solução tampão para evitar diferença entre o meio que a proteína estava solubilizada quando extraída dos IB e o tampão de amostra.

A solução contendo *AtPUMP1* (1,6 a 5 μM) foi adicionada à cela de amostra (volume da cela = 1.45 mL) pouco antes de conectar a seringa de injeção. Na seringa de injeção havia a solução de sal de ácido linoléico 4 mM (solubilizado em NaOH 1 mM) que foi adicionada à solução da cela de amostra através de várias adições de 2,5 até 10 μL .

Optou-se pelo uso do sal do ácido linoléico (Na^+) ao invés do ácido solubilizado em etanol porque a liberação de calor resultante da diluição do etanol é maior do que o da ligação entre a proteína e o ácido graxo. Esta observação reafirma a absoluta necessidade de levar em consideração todos os componentes em um experimento de microcalorimetria.

Foram feitas 20 adições de ácido linoléico na solução contendo proteína e também na solução controle (só tampão interno, sem *AtPUMP1*). Foram 4 injeções de 2.5 μL , 8 injeções de 5 μL e 12 injeções de 10 μL . Cada 10 μL de ácido linoléico adicionado à solução correspondia a uma adição de 31 μM . No final das injeções, o sistema já estava completamente saturado com ácido linoléico, com uma concentração final igual a 469 μM . Todos os ensaios foram realizados a 25 °C.

A análise dos dados foi feita usando o software OriginTM.

2.10.2.1 Equações usadas para ajustar os dados de ligação obtidos por ITC

Assume-se que a macromolécula (M) está na cela em uma concentração inicial M_i^0 (mol/L), antes da primeira injeção, e o ligante (X) a ser injetado tem concentração nula na cela. O *volume de trabalho* da cela é V_0 , o volume da injeção “i” é ΔV_i e, o líquido total que foi injetado em um ponto durante o experimento, ΔV , é a soma dos ΔV_i s individuais de todas as injeções.

No início de um experimento, tanto a cela quanto o canal de comunicação por onde entra a seringa (figura 2.10.1) estão preenchidos com a solução da macromolécula. Mas, o sensor calorimétrico detecta somente V_0 (dentro da cela). Após várias injeções, a concentração inicial da macromolécula ($M_i^0 \cdot V_0$) varia, pois o volume torna-se maior ($V_0 + \Delta V$). Portanto, a concentração média da macromolécula (M_t) deve ser a média entre a concentração inicial (M_i^0) e a concentração atual (M_t) incluindo a variação de volume. Assim, de acordo com o princípio de conservação de massa:

$$M_i^0 V_0 = M_t V_0 + \frac{1}{2} (M_t + M_i^0) \cdot \Delta V \quad \text{equação 2.10.2.1.a}$$

Assim,

$$M_t = M_i^0 \left[\left(1 - \Delta V / 2V_0 \right) / \left(1 + \Delta V / 2\Delta V_0 \right) \right] \quad \text{equação 2.10.2.1.b}$$

De modo análogo, a concentração de ligante após várias injeções (X_t) pode ser representada pela equação:

$$X_i^0 V_0 = X_t V_0 + \frac{1}{2} X_i^0 \Delta V \quad \text{equação 2.10.2.1.c}$$

ou

$$X_t = X_i^0 (1 - \Delta V / 2V_0) \quad \text{equação 2.10.2.1.d}$$

A equação acima (2.10.2.1.d) é utilizada pelo programa Origin™ para corrigir o efeito de deslocamento do volume que ocorre após cada injeção.

Ajuste para um sítio de ligação (sítios com o mesmo K e ΔH)

Nas próximas equações, seis parâmetros serão empregados:

K = constante de ligação

n = número de sítios

V_0 = volume ativo da cela

M_t e $[M]$ = concentração total e livre da macromolécula em V_0

X_t e $[X]$ = concentração total e livre do ligante

Θ = fração de sítios ocupados pelo ligante X

$$K = \Theta / (1-\Theta) [X] \quad \text{equação 2.10.2.1.e}$$

$$X_t = [X] + n \Theta M_t \quad \text{equação 2.10.2.1.f}$$

Portanto:

$$\Theta^2 - \Theta [1 + X_t/nM_t + 1/nKM_t] + X_t/nM_t = 0 \quad \text{equação 2.10.2.1.g}$$

O calor total da solução em V_0 , que é considerado igual a zero para espécies não-ligantes, sob uma saturação fracional Θ é representado por:

$$Q = n \Theta M_t \Delta H V_0 \quad \text{equação 2.10.2.1.h}$$

onde ΔH é o calor molar de ligação.

Resolvendo-se a equação quadrática (equação 2.10.2.1.g) para Θ e substituindo-a na equação 2.10.2.1.h, obtém-se:

$$Q = n M_t \Delta H V_0 / 2 \cdot [1 + X_t/nM_t + 1/nKM_t - A] \quad \text{equação 2.10.2.1.i}$$

$$\text{Onde: } A = \sqrt{(1 + X_t / nM_t + 1 / nKM_t)^2 - 4X_t / nM_t}$$

O valor Q acima pode ser calculado (para quaisquer valores de n , K e ΔH) no final da injeção “i” e ser designado $Q(i)$. Contudo, o parâmetro de interesse é a mudança de calor entre as injeções “i” e “i-1”. A equação 2.10.2.1.i só pode ser aplicada ao líquido contido em V_0 . Assim, depois de uma injeção, uma correção deve ser feita devido ao deslocamento de volume (ΔV_i = volume injetado). O líquido no volume deslocado contribui cerca de 50% para o calor produzido quando comparado ao volume remanescente em V_0 . A expressão correta para a produção de calor, $\Delta Q(i)$, para a injeção “i” é:

$$\Delta Q(i) = Q_i + dV_i/V_0 \{ [Q(i) + Q(i-1)]/2 \} - Q(i-1) \quad \text{equação 2.10.2.1.j}$$

O processo de ajuste dos dados envolve:

- sugestões iniciais para n , K e ΔH (que o Origin faz com precisão, na maioria dos casos)
- o cálculo de $\Delta Q(i)$ para cada injeção e comparação desses valores com o calor medido para a correspondente injeção experimental
- o aprimoramento dos valores iniciais de n , K e ΔH por métodos de ajuste não lineares
- os passos a, b e c são repetidos até que não haja mais mudança significativa no ajuste.

Ajuste para dois sítios de ligação independentes

De modo análogo às equações para um sítio de ligação:

$$K_1 = \Theta_1 / (1 - \Theta_1) [X], \quad K_2 = \Theta_2 / (1 - \Theta_2) [X] \quad \text{equação 2.10.2.1.k}$$

$$X_t = [X] + M_t (n_1 \Theta_1 + n_2 \Theta_2) \quad \text{equação 2.10.2.1.l}$$

Resolvendo-se a equação 2.10.2.1.k para Θ_1 e Θ_2 , e substituindo-a na equação 2.10.2.1.l, obtém-se:

$$X_t = [X] + n_1 M_t [X] K_1 / (1 + [X] K_1 + n_2 M_t [X] K_2 / (1 + [X] K_2)) \quad \text{equação 2.10.2.1.m}$$

Rearranjando-se a equação 2.10.2.1.m, obtém-se:

$$[X]^3 + p[X]^2 + q[X] + r = 0 \quad \text{equação 2.10.2.1.n}$$

onde:

$$p = 1/K_1 + 1/K_2 + (n_1 + n_2) M_t - X_t$$

$$q = (n_1/K_2 + n_2/K_1) M_t - (1/K_1 + 1/K_2) X_t + 1/K_1 K_2$$

$$r = -X_t/K_1 K_2 \quad \text{equação 2.10.2.1.o}$$

As equações 2.10.2.1.n e 2.10.2.1.p podem ser resolvidas numericamente, empregando-se um método de ajuste não linear, se os parâmetros n_1 , n_2 , K_1 e K_2 são dados. Tanto Θ_1 como Θ_2 devem ser obtidos a partir da equação 2.10.2.1.k.

Sendo o calor contido em cada injeção igual a:

$$Q = M_t V_o (n_1 \Theta_1 \Delta H_1 + n_2 \Theta_2 \Delta H_2) \quad \text{equação 2.10.2.1.p}$$

E após a correção feita para o deslocamento do volume, o calor produzido para a injeção "i" pode ser calculado por:

$$\Delta Q(i) = Q_i + dV_i/V_o \{ [Q(i) + Q(i-1)]/2 \} - Q(i-1) \quad \text{equação 2.10.2.1.q}$$

A equação acima pode ser usada para obter os melhores valores para os seis parâmetros.

2.11 Ensaios de consumo de oxigênio com mitocôndrias de batata

Foram feitas medidas de consumo de oxigênio em paralelo aos ensaios de microcalorimetria no laboratório da Profa. Dra. Alícia Kowaltowski (IQ - USP). Foi empregado um eletrodo de Clark (Hansatech Instruments) inserido em uma cela de temperatura controlada (30°C) e equipada com agitador magnético. O eletrodo era interfaciado a um computador.

O consumo total de oxigênio foi determinado pela integração dos dados coletados (durante o mesmo intervalo de tempo da microcalorimetria) após a adição da mitocôndria e assumindo que a solubilidade do oxigênio a 30°C é de 230 nmol/ml.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na apresentação dos dados de cinéticas e microcalorimetria, optamos por mostrar traçados originais, tal qual são obtidos no aparelho. Acreditamos que é necessário, em alguma parte da tese, mostrar dados não analisados. Contudo, a fim de limitar o tamanho da Tese, se fez necessário escolher alguns. Todos os dados estão disponíveis nos cadernos de laboratório ou em registros de computador.

3.1 SDS-PAGE : PUMP isolada de mitocôndrias de batata

Gel 3.1.1 :

Gel corado com prata

*Frações F1, F2, F3, F4 e F5

*são as frações eluídas sucessivamente das colunas de HPTA.

P: padrões de massa molecular

Gel 3.1.2 :

Gel 3.1.2: Metade de um gel foi corado com prata e a outra metade com Coomassie Blue. A banda dupla de PUMP (fração F1) localiza-se na região de 32 kDa. As colunas I são amostras de fração impura da PUMP.

Observou-se que a quantidade de proteína isolada era suficiente para ser corada com Coomassie Blue, então optou-se por esse corante nos demais géis.

Para obter-se a proteína para sequenciamento diretamente de géis de acrilamida após SDS-PAGE, seria necessária, além de uma quantidade mínima de proteína, uma boa separação eletroforética da banda de interesse de outras bandas próximas.

3.2 AtPUMP1 expressa em *E. coli*

a) SDS-PAGE (figura extraída de Borecky *et al*, 2001)

Gel 3.2.1

Gel 3.2.1: SDS-PAGE corado com Coomassie blue. As fileiras correspondem aos padrões de massa molecular (primeira fileira, os números à esquerda indicam a massa molecular em kDa); extratos de bactéria não induzida expressando a AtPUMP1 (fileira **Bn**) ou induzida por IPTG (fileira **Bi**); corpúsculos de inclusão solubilizados em SDS (fileira **IB**); corpúsculos de inclusão solubilizados em SLS 0,3% (fileira **S**) e a AtPUMP1 usada na reconstituição solubilizada em SLS 1,67% e DPE 1% (fileira **PUMP**).

b) Caracterização da proteína recombinante (AtPUMP1) expressa em *E. coli* :

(figura extraída de Borecky *et al*, 2001)

Gel 3.2.2: (B) Western blots mostrando a reação positiva de anticorpos policlonais anti-AtPUMP1, fileiras 1-6 como no Gel 3.2.1; (C) anticorpos policlonais anti-PUMP de batata com corpúsculos de inclusão pré-solubilizados em SLS 0,3%. Os números à esquerda indicam as posições dos marcadores de massa molecular pré-corados (Gibco-BRL) em kDa.

A expressão do gene *AtPUMP1* em *E. coli* produziu um polipeptídeo adicional com massa molecular aparente de 30 kDa em extratos de células de bactérias induzidas por IPTG (Gel 3.2.1, fileira Bi vs. Bn). Esta banda também estava presente na fração de corpúsculos de inclusão (Gel 3.2.1, fileira IB). Esta banda apareceu após a pré-solubilização dos corpúsculos de inclusão com SLS 0,3% (Gel 3.2.1, fileira S). A adição subsequente do detergente DPE, acompanhada pelo processo de re-enovelamento da proteína, levou à formação de uma banda de proteína de ~32 kDa (Gel 3.2.1, fileira PUMP), correspondente à massa molecular esperada para a PUMP (32,5 kDa) estimada a partir da sequência do cDNA.

A análise por "imunoblot" indicou que tanto o anticorpo *anti-AtPUMP1* quanto o anticorpo *anti-PUMP de batatas* (Jezek *et al.*, 1998; Nantes *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 1999) reconheceram a proteína expressa de 32 kDa (Géis 3.2.2 B e C, respectivamente), confirmando a identificação da proteína recombinante como *AtPUMP1*.

c) Outros géis SDS-PAGE de AtPUMP1 : padrão Sigma Low Coomassie

Nos géis 3.2.3 e 3.2.4, foram aplicadas amostras de AtPUMP1 solubilizadas dos corpúsculos de inclusão de dois experimentos diferentes. As amostras “precipitado” (pptdo) tinham a AtPUMP1 solubilizada em DPE + SLS (~ 32 kDa), que foram usadas em reconstituições posteriores.

No gel 3.2.4, a fração “pptdo várias” representa a mistura de várias frações de AtPUMP1 para reconstituição. Foi feito um teste com essa mistura aplicando-se 3 ml da mesma por uma coluna de 3g de hidroxiapatita duas vezes, para tentar purificá-la (a PUMP nativa de batata não tem afinidade pela HPTA). As frações HPTA 1 e HPTA2 representam a primeira e a segunda fração de AtPUMP1 eluídas com tampão interno da coluna de hidroxiapatita e são praticamente invisíveis. Talvez a AtPUMP1 tenha mais afinidade pela HPTA do que a PUMP.

Gel 3.2.5 : As bandas correspondentes à AtPUMP1 ("pellet" e sobrenadante) são duplas e localizam-se na região entre 31 e 32 kDa. A banda que representa a fração que foi usada nos ensaios de incorporação (pellet) é a mais intensa (0.664 mg/ml). A concentração de proteína no sobrenadante era de 0.263 mg/ml.

Gel 3.2.6: As bandas correspondentes à AtPUMP1 (pellet) são duplas e localizam-se na região de ~ 32 kDa.

As colunas de hidroxiapatita foram eficazes para purificar a PUMP de batata. No entanto, a banda de PUMP (ou de *AtPUMP1*) presente no gel de poliacrilamida é sempre dupla, e não foi possível separá-la para posterior sequenciamento.

O fato de haver uma banda dupla pode ser atribuído à existência de uma segunda forma da PUMP de peso molecular próximo, resultante do processo de isolamento.

3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNA

3.3.1 Dosagem de proteína total de mitocôndrias de batata (Biureto)

Abaixo seguem duas curvas padrão feitas com BSA (figura 3.3.1.1). Foram usadas 2 amostras de mitocôndria, uma de 50 μL e uma de 100 μL . A absorbância das amostras foi lida a 540 nm.

Figura 3.3.1.1

A tabela abaixo mostra exemplos de concentração de proteína total obtida após o isolamento de mitocôndrias de batatas. Foram necessárias 120 mg de proteínas totais para isolar a PUMP, em geral obteve-se 40 mg/mL por isolamento.

amostra	[mitocôndria] mg/mL
01	43
02	46
03	47
04	39
05	32
06	41
07	31
08	38
	valor médio: 39,6

3.3.2 Dosagem da PUMP por Amido Black

Exemplos:

Amostra 1: cinco frações de PUMP foram eluídas das colunas de HPTA (F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5) e dosadas.

Amostra 2 (novo isolamento de PUMP, concentrada): F_1 , F_2 , F_3 e F_4 . As amostras eluídas das colunas de HPTA foram concentradas para 10 μL no microconcentrador (Amicon) por centrifugação a 11.500 rpm (4°C) e dosadas.

Curvas padrão de BSA :

Figura 3.3.2.1

Resultados obtidos:

Fração de PUMP	[PUMP] (10^{-3} mg/mL) amostra normal média de 2 dosagens	*[PUMP] (10^{-3} mg/mL) amostra concentrada média de 2 dosagens
F_1	3	1
F_2	5	4
F_3	5	2
F_4	6.3	4
F_5	6.3	-

A concentração máxima de PUMP dosada foi de 0.006 mg/mL.

3.3.3 Dosagem da PUMP isolada de mitocôndrias de batata (Mini Lowry)

A amostra 2, dosada por Amido Black, foi dosada por Mini-Lowry. Segue abaixo a curva padrão de BSA (duplicata):

Figura 3.3.3.1

Resultados:

Fração de PUMP	Mini-Lowry [PUMP] 10^{-3} mg/mL	Amido Black [PUMP] 10^{-3} mg/mL
F1	30	1
F2	48	4
F3	43	2
F4	27	4
Impura (FI)	1050	-

A concentração máxima de PUMP dosada foi de 0.048 mg/mL.

3.3.4 Dosagem da proteína recombinante AtPUMP1 (Greenberg)

dosagem 1:

curva padrão de BSA

mg/ml de pellet (esquerda)

Figura 3.3.4.1

Greenberg							
610 nm		arquivo	green1701.xls				Reconstituição
					fator de diluição	1	µg
					amostra. (µl)	100	50
curva padrão BSA		amostras					
µg	ABS		Nome	ABS	µg proteína	[proteína] mg/ml	µl
0	0,000	1	IB5 pellet 17/01	0,579	66,395	0,664	75,31
20	0,175	2	IB5 sobren. 17/01	0,234	26,279	0,263	190,27
40	0,369						
60	0,531						
80	0,679						

A tabela acima mostra os valores de absorbância por µg de BSA referentes à curva padrão de BSA (em vermelho).

Em azul, estão os valores de absorbância, µg de proteína e mg/mL de proteína na amostra dosada. Na última coluna (reconstituição), está indicado o

volume de amostra de *AtPUMP1* (pellet solubilizado) que deveria ser adicionado ao filme lipídico para formar os proteolipossomos, que continham aproximadamente 50 µg de *AtPUMP1*. No caso, foram adicionados 75,3 µL da amostra. Foi usada a concentração de 50 µg de *AtPUMP1*/ mL em todos os ensaios de reconstituição, quando não especificada uma concentração diferente.

Em preto, aparecem os mesmos valores referentes à amostra pré-solubilizada, que não foi utilizada na incorporação.

Foi feita também a dosagem de amostras de proteolipossomos utilizados em cinéticas anteriores pelo método de Greenberg. A concentração obtida de *AtPUMP1* foi igual **0.105 mg/mL**.

A detecção de uma concentração baixa da amostra concentrada de PUMP pelo método de Amido Black (concentração esperada = 0.1 mg/mL) provavelmente deve-se à não recuperação total da proteína durante a concentração. A partir desse e de outros resultados negativos, foi descartada a possibilidade de concentrar a PUMP para posterior reconstituição.

No método Amido Black, os valores de absorbância das amostras de PUMP foram muito baixos, próximos aos valores mais baixos de absorbância da curva padrão. No método Mini-Lowry, os valores de absorbância das amostras ficaram dentro do intervalo de absorbância das amostras de BSA da curva padrão. No entanto, o método Mini-Lowry é limitado, visto que também detecta lipídios presentes no meio e a proteína foi isolada em meio contendo detergente (DPE), superestimando a concentração de proteína.

Deve-se levar em consideração que foi utilizada uma concentração de PUMP muito inferior a 0,1mg/mL na incorporação em proteolipossomos, podendo ser essa a causa da baixa reprodutibilidade nos ensaios de inibição da PUMP por ATP.

A dosagem da *AtPUMP1* pelo método de Greenberg foi adequada, pois o método pode ser empregado para dosar proteína sob uma elevada concentração de detergente, e a *AtPUMP1* foi isolada em uma solução

contendo dois detergentes (SLS e DPE). Porém, é aconselhável que se faça a dosagem da *AfPUMP1* e dos proteolipossomos também pelo método de Amido Black, para comparar os resultados obtidos entre duas metodologias diferentes.

3.4 Espalhamento de luz dinâmico (*light scattering*) de lipossomos e proteolipossomos (com PUMP e AtPUMP1)

Foram realizados em nosso laboratório ensaios de espalhamento de luz com a finalidade de verificar se os lipossomos e os proteolipossomos eram homogêneos quanto ao tamanho (polidispersividade) e quais os respectivos diâmetros efetivos.

PUMP:

Foi necessário fazer uma diluição dos lipossomos e dos proteolipossomos em meio interno na proporção de **1 : 250** (vesículas : meio int.) para minimizar a turbidez da amostra. Na tabela abaixo estão os resultados obtidos a partir de duas medidas feitas com lipossomos e proteolipossomos:

PUMP		diâmetro efetivo (nm)	polidispersividade
Lipossomos	(medida 1)	167,9 / 173,5	0,33 / 0,31
	(medida 2)	170,7	0,32
Proteolipossomos	(medida 1)	172,6 / 177,6	0,18 / 0,25
	(medida 2)	175,1	0,22

AtPUMP1:

Foi realizado um experimento com vesículas constituídas por um lipídio diferente (DMPC, dimiristoilfosfatidilcolina). A fosfatidilcolina foi trocada por DMPC, a cardiolipina e o dicetilfosfato foram mantidos. A carga líquida da bicamada não foi alterada (carga líquida: -3).

Os lipossomos e os proteolipossomos com AtPUMP1 foram formados do modo usual (remoção de detergente por colunas de Bio-Beads), diluídos em meio interno e filtrados (poro 0,45 μm). Na tabela abaixo estão os resultados obtidos:

AβPUMP1	diâmetro efetivo (nm)	polidispersividade
Lipossomos	168,5	0,1
Proteolipossomos	179,6	0,1

O método de ELD (ou espectrometria de fotocorrelação ou espalhamento de luz quase-elástico) tem sido usado largamente para caracterizar a distribuição do tamanho dos lipossomos em amostras homogêneas. Este método é útil para caracterizar amostras de lipossomos, especialmente SUVs (lipossomos unilamelares pequenos com diâmetro entre 200 e 250 Å) e LUVs (lipossomos unilamelares grandes com diâmetro ≥ 100 nm), gerando parâmetros como o diâmetro médio (DM) dos lipossomos e a polidispersidade (Packer & Fleischer, 1997).

Segundo os resultados obtidos, verificou-se que os lipossomos e os proteolipossomos têm tamanho regular (polidispersidade baixa). Houve uma variação no DM de ~171 nm (lipossomos) para ~175 nm (proteolipossomos com PUMP) e de ~169 nm (lipossomos) para ~180 nm (proteolipossomos com A β PUMP1). Portanto, os proteolipossomos têm um DM 4 a 11 nm maior que o DM dos lipossomos.

Os valores de polidispersidade e de DM obtidos indicam que o método utilizado para formar os lipossomos/proteolipossomos, que consistiu na remoção de detergente, é muito eficaz para formar LUVs de tamanho homogêneo. O tamanho homogêneo sugere que a distribuição de volume interno entre os lipossomos é regular.

3.5 Cinéticas de transporte de H^+ com PUMP reconstituída

Figuras 3.5.1 e 3.5.2

As figuras abaixo mostram os espectros de emissão e de excitação da sonda SPQ após a eluição dos proteolipossomos por colunas de Sephadex de 5 ml (P5) e de 10 ml (P10). Os comprimentos de excitação e de emissão da sonda SPQ foram 340 nm e 440 nm. Houve uma redução da intensidade de fluorescência dos proteolipossomos P10, devido à sua maior diluição.

As figuras 3.5.3, 3.5.4 e 3.5.5 e o tópico “Normalização dos gráficos de fluorescência*” foram extraídas do “Relatório FAPESP de Mestrado”, págs. 17, 18, 33, 36 e 37, escrito pela aluna Tatiana Grohmann Ortolan , em Junho de 1998.

*Normalização dos gráficos de fluorescência:

A fluorescência de SPQ interna na presença de múltiplas espécies supressoras pode ser escrita como:

$$F_0 / F = 1 + K \cdot Q + \sum \{ K_i \cdot Q_i \}$$

Equação A

onde: F_0 = fluorescência da SPQ na ausência de supressão

F = fluorescência da SPQ medida

K = constante de Stern – Volmer para TES^-

Q = $[TES^-]$

K_i = constante de Stern-Volmer para outras espécies supressoras

Q_i = concentração de outras espécies supressoras

Considerando-se as concentrações das formas supressoras diferentes de TES^- constantes, pode-se reescrever a equação como:

$$F_0 / F = 1 + K \cdot Q + c$$

Equação B

A fluorescência F_a medida após a adição de vesículas pode ser expressa como: $F_0 / F_a = 1 + K \cdot Q_0 + c$ ($Q_0 = [TES^-]$ inicial)

Equação C

Subtraindo-se a equação 3 da 2 temos:

$$1 - (F_a / F) = K \cdot (F_a / F_0) \cdot (-\delta \cdot Q)$$

$$1 - (F_a / F) = \alpha \cdot \delta H^+ , \text{ onde } \alpha = K \cdot (F_a / F_0)$$

O fator F_a / F é idêntico para as cinéticas obtidas a partir da mesma preparação, já que as concentrações internas são iguais. Dessa forma, a normalização das fluorescências medidas como $(1 - F_a / F)$ torna os fluxos de H^+ obtidos quantitativamente comparáveis. Além disso, a preparação de vesículas pelo mesmo protocolo e nas mesmas condições também implica que esse fator α tenha valores muito próximos, tornando os fluxos obtidos em diferentes experimentos comparáveis.

Transporte de H^+ mediado pela PUMP ativada por ácido graxo

Figura 3.5.3: Ativação da PUMP por ácido láurico (0 a 60 μ M)

Figura 3.5.3

O transporte de H^+ mediado pela PUMP foi ativado por ácido láurico e esta ativação foi proporcional ao aumento da concentração do ácido graxo adicionado (FIG. 3.5.3). Após a adição dos proteolipossomos aos 5 segundos, o ácido láurico foi adicionado ao redor de 30 segundos em todos os traçados e a valinomicina foi adicionada ao redor de 45 segundos. O aumento de

fluorescência ($1-F_a/F$) aos 30 segundos ocorreu devido à distribuição do ácido láurico na bicamada lipídica. Ao redor de 45 segundos houve o decréscimo da fluorescência após a adição da valinomicina, indicando a entrada de K^+ e a saída de prótons, que causa a diminuição da fluorescência da SPQ por supressão (ver “Materiais e Métodos”).

Figura 3.5.4: Influxo de H^+ ativado por ácido linoléico (0 a 51 μM) em proteolipossomos, *gráfico normalizado. A velocidade máxima de transporte de H^+ foi atingida quando a concentração de ácido linoléico era 31 μM .

Figura 3.5.4

Figura 3.5.5: Influxo de H^+ em lipossomos na presença de diferentes concentrações de ácido linoléico (0 A 69 μM). *Gráfico normalizado.

Figura 3.5.5

A partir dos experimentos acima (figuras 3.5.4 e 3.5.5), pode-se concluir que o fluxo inicial de H^+ em proteolipossomos foi significativamente maior do que o medido em lipossomos. Este comportamento evidencia a presença de um transportador, no caso a PUMP. Na mesma concentração de ácido graxo, a taxa de transporte de H^+ mediada pela PUMP reconstituída (fig. 3.5.4) foi praticamente o dobro da taxa de transporte de H^+ em lipossomos (fig. 3.5.5).

Proteolipossomos: ativação da PUMP por ácido linoléico 67 μM

Na figura 3.5.6, os proteolipossomos foram adicionados ao redor de 5s e, após a estabilização do sinal de fluorescência, o ácido graxo foi adicionado ($t \sim 15$ s).

A redistribuição dos ácidos graxos nos lipossomos gerou a acidificação do compartimento aquoso interno que, nestas condições experimentais, foi instantânea. Esta acidificação causou o discreto aumento da fluorescência mostrado na figura 3.5.3 logo após a adição do ácido láurico. A fluorescência estabilizou-se e, após a adição de valinomicina (~ 22 s), a fluorescência decaiu com o tempo. Esta diminuição de fluorescência pode (ver Métodos) ser relacionada com uma alcalinização do compartimento interno dos proteolipossomos devido ao efluxo de H^+ mediado pela PUMP.

A taxa de transporte de H^+ foi medida pelo $\Delta F/\Delta t$ no intervalo de 5 segundos aproximadamente após a adição de valinomicina, onde ΔF é a variação da intensidade de fluorescência no intervalo de tempo Δt .

Nos próximos gráficos, a fluorescência foi normalizada da seguinte maneira: **fluorescência = fluorescência lida/ valor de fluorescência lida aos 60s.**

Figura 3.5.6

Na seqüência, apresento uma série representativa de experimentos obtidos com PUMP isolada de mitocôndrias de batatas que mostram, sobretudo, a falta de reprodutibilidade na inibição por nucleotídeos. Contudo, a ativação por ácidos graxos é clara.

Figura 3.5.7: Proteolipossomos

Ativação por ácido linoléico 45.2 μM , não houve inibição por ATP.

Figura 3.5.8: Proteolipossomos contendo ATP interno (P2), sem ATP (P1)

Ativação por ácido linoléico 40.8 μM , não se observou a inibição por ATP.

Figura 3.5.9: Proteolipossomos contendo ATP interno (P2) e sem ATP (P1).
 Ativação por ácido linoléico 30.6 μM , não foi observada a inibição por ATP.

Figura 3.5.10: Proteolipossomos

Ativação por ácido linoléico 67 μM , não foi observada a inibição por ATP.

Fig 3.5.11: Proteolipossomos 50 μ L (sem ATP) , Proteolipossomos 40 μ L (+ ATP). Ativação por ácido linoléico 66 μ M, foi observada a inibição por ATP.

Figura 3.5.12: Proteolipossomos

Ativação por ácido linoléico 66 μ M, foi observada a inibição por ATP 4.9 mM.

Figura 3.5.13: Proteolipossomos

Comparação entre a ativação por ácido linoléico 67 μM e por ácido láurico 67 μM :

Figuras 3.5.14 e 3.5.15: Proteolipossomos

Ativação por ácido láurico 31.5 μM e 61 μM , não houve inibição por ATP.

Figura 3.5.14

Figura 3.5.15

Figuras 3.5.16: Proteolipossomos

Ativação por ácido láurico 82 μ M, não houve inibição por ATP.

Foi sempre observado nas cinéticas onde a PUMP foi ativada por ácido linoléico (ou láurico) o aumento da fluorescência ao se adicionar o ácido graxo (acidificação interna) e posterior decaimento da fluorescência ao se adicionar valinomicina. No entanto, contrário à UCP1, não houve reprodutibilidade quanto à inibição por ATP.

Nas cinéticas ilustradas nas figuras 3.5.7 e 3.5.10, não foi observada inibição por ATP-TRIS 4mM e 3 mM, respectivamente, adicionado ao meio reacional. A taxa de efluxo de prótons permaneceu praticamente inalterada na presença e na ausência de ATP, mas a ativação por ácido linoléico foi evidente nos dois casos.

Nas cinéticas ilustradas nas figuras 3.5.8 e 3.5.9, também não foi observada a inibição por ATP-TRIS 4 mM, presente no compartimento interno dos proteolipossomos. A taxa de efluxo de H^+ pareceu maior quando o ATP estava presente do que ausente, provavelmente por causa de algum efeito inespecífico na bicamada.

A inibição do transporte de H^+ ativado por ácido linoléico pode ser vista nas cinéticas representadas nas figuras 3.5.11 e 3.5.12. Nas figuras 3.5.11 e 3.5.12 observou-se também redução do aumento da fluorescência quando o ácido linoléico foi adicionado, quando se comparam as curvas com e sem ATP.

Nas cinéticas onde o ácido láurico foi o substrato (figuras 3.5.14, 3.5.15, 3.5.16), não foi observada a inibição por ATP 3,9 e 5,7 mM.

Foram feitos alguns ensaios com o ácido palmítico, o qual também ativa o transporte de próton mediado pela PUMP com taxa similar à do ácido láurico (não mostrado).

Em outros ensaios a temperatura foi reduzida para 15 °C, mas não houve alteração significativa da taxa de efluxo de H^+ e nem da inibição por ATP sob esta condição.

Os tempos de adição de ácido graxo e valinomicina foram mudados, posteriormente, para 15 segundos e 20 segundos, respectivamente (anteriormente 30 s e 45 s). Optou-se por diminuir o intervalo entre essas adições para evitar efeitos não específicos após a acidificação interna que possam levar à diminuição da fluorescência da sonda SPQ, como um vazamento, por exemplo.

A maioria dos experimentos com a PUMP foi realizada com o ácido linoléico, aparentemente o ácido graxo que leva a PUMP a transportar H^+ com a maior velocidade (comparando com a mesma concentração de ácido láurico). Além disso, o ácido linoléico também foi escolhido pelo fato de o mesmo ser abundantemente encontrado em plantas (Dey & Harborne, 1997) e estar disponível em nosso laboratório.

A partir das cinéticas com o ácido linoléico, pretendia-se testar outros ácidos graxos de cadeia longa, comparar as constantes de afinidade entre eles e também determinar as constantes de inibição para nucleotídeos de purina. Esses ensaios foram realizados com a proteína recombinante: AtPUMP1.

Portanto, concluímos que a PUMP reconstituída em proteolipossomos foi claramente ativada por ácidos graxos, porém, a inibição por nucleotídeos de purina (em especial ATP-TRIS) não foi reprodutível. A ativação da PUMP foi

proporcional à concentração de ácido graxo presente no meio, até que a saturação da proteína pelo substrato fosse atingida (figura 3.5.4).

Provavelmente, a PUMP tem menor afinidade por nucleotídeos de purina do que a UCP1. Além disso, a baixa concentração de PUMP reconstituída em proteolipossomos ($[PUMP] \ll 0,1 \text{ mg/ml}$) implicou a falta de reprodutibilidade da inibição por ATP.

PUMP: Março de 1998 a Outubro de 1999

AfPUMP1: Outubro de 1999 até hoje

3.6 Proteolipossomos com AtPUMP1 reconstituída

3.6.1 Espectro de emissão e de excitação da sonda SPQ em proteolipossomos

figura 3.6.1.1: espectro de emissão

figura 3.6.1.2: espectro de absorção

3.6.2 Cinéticas com a *AtPUMP1* reconstituíd

A *AtPUMP1* foi ativada por diferentes concentrações de ácido linoléico:

figura 3.6.2.1

A *AtPUMP1* foi inibida por ATP-TRIS 2.66 mM na presença de ácido linoléico 26.6 μM .

figura 3.6.2.2

Efluxo de H^+ induzido por ácido linoléico e inibido por ATP ou GTP em proteolipossomos com AtPUMP1

Figura 3.6.2.3

Figura 3.6.2.3: Os traçados acima mostram os efluxos típicos de H^+ (ver métodos) em proteolipossomos contendo a AtPUMP1. O efluxo foi induzido por ácido linoléico $26.6 \mu M$ na presença de $1.3 \mu M$ de valinomicina a aproximadamente $179.5 mV$ ($165 mM [K^+]$ dentro, $0.168 mM [K^+]$ fora), na ausência e na presença de ATP $4 mM$ (esquerda) ou GTP (experimento separado à direita) (Borecky *et al.*, 2001).

A figura 3.6.2.3 ilustra efluxos de H^+ em proteolipossomos contendo a AtPUMP1. A acidificação das vesículas ocorreu após a adição do ácido linoléico ($26.6 \mu M$). Estes dados sugerem a redistribuição das moléculas de ácido graxo nos dois lados da bicamada lipídica, levando à acidificação interna devido à entrada de H^+ (Garlid *et al.*, 1996; Jezek *et al.*, 1997a, 1997b, 1997c; Jezek *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 1999; Jaburek *et al.*, 1999).

A adição de $1,3 \mu M$ de valinomicina induziu o efluxo de prótons, provavelmente por reciclagem dos ácidos graxos (esquema da Introdução) (Garlid *et al.*, 1996; Jezek *et al.*, 1997a, 1997c; Costa *et al.*, 1999; Jaburek *et al.*, 1999).

A aproximadamente 180 mV de potencial calculado (vide a seção “Material e Métodos”), a taxa de efluxo de prótons induzida por ácido linoléico 26.6 μM foi ca. 0,16 $\text{nmol H}^+ \cdot \text{s}^{-1}$ por mg de lipídio. Essa taxa foi igual a 0,13 $\text{nmol H}^+ \cdot \text{s}^{-1}$ por mg de lipídio quando a taxa de efluxo basal (sem adição de ácido linoleico) foi subtraída.

Isto corresponde a 8.1 $\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{min}^{-1}$ (mg total de proteína) $^{-1}$ e um número de renovação mínimo de 8.75 s^{-1} para o dímero da PUMP. Esse valor é comparável ao obtido para a PUMP isolada de mitocôndria de batata em condições comparáveis (Jezek *et al.*, 1997a).

Cinéticas de efluxo de H^+ mediado pela AtPUMP1 e induzido por diferentes ácidos graxos

Variando-se a concentração total de ácido graxo, foi possível analisar a cinética de reciclagem de ácido graxos mediada pela AtPUMP1, mesmo superposta ao fluxo basal de H^+ não dependente da proteína. O fluxo basal de H^+ pode ser simulado em lipossomos sem proteína, usando as mesmas concentrações de ácido graxo e de valinomicina, sob o mesmo potencial de membrana. Esses valores podem ser utilizados para estimar o fluxo basal de H^+ em proteolipossomos, levando em consideração o respectivo volume. Desse modo foram determinadas as permeabilidades aparentes de H^+ e a densidade de fluxo de H^+ em vesículas (sem proteína) na presença de valinomicina 1.3 μM , adicionando-se concentrações crescentes de ácido palmítico, linoléico e láurico (figura 3.6.2.4 A), mirístico, oléico e linolênico (figura 3.6.2.4 C) (Borecky *et al.*, 2001).

Figura 3.6.2.4

Figura 3.6.2.4 Cinéticas de fluxo de H^+ induzido por ácidos graxos em lipossomos e proteolipossomos com AtPUMP1. Os Painéis A e C mostram J_H^+ em lipossomos sem proteína (x e símbolos abertos) e proteolipossomos (símbolos fechados/sólidos). Os J_H^+ em lipossomos foram induzidos por ácidos palmítico (x), linoleico ($\square$) e láurico (Δ) (A); mirístico ($\diamond$), oleico ($\square$) e linolenico (∇) (C). Os J_H^+ em proteolipossomos com AtPUMP1 induzido por ácidos linoleico ($\blacksquare$), palmítico ($\bullet$) e láurico ($\blacktriangle$) (A), e mirístico ($\blacklozenge$), oleico ($\blacksquare$) e linolenico ($\blacktriangledown$) (C). Os controles (sem adição de ácidos graxos) (A) representam as densidades de fluxo basal de H^+ em lipossomos ($\diamond$) e em proteolipossomos (O). As medidas foram realizadas na presença de valinomicina 1.3 μM e concentrações variáveis de ácidos graxos, e os fluxos foram calculados por μM^2 de membrana da vesícula. Os painéis B e D mostram os plots de Eadie-Hofstee das cinéticas de transporte de ácidos graxos feitos com os dados das cinéticas de fluxo de H^+ induzidas pelos ácidos linoleico ($\blacksquare$), palmítico ($\bullet$) e láurico ($\blacktriangle$) (B), e mirístico ($\blacklozenge$), oleico ($\blacksquare$) e linolenico ($\blacktriangledown$) (D) em proteolipossomos contendo a proteína recombinante AtPUMP1. Com exceção do ácido linoleico, os fluxos basais de H^+ (J_B) não foram subtraídos dos fluxos induzidos por outros ácidos graxos. O fluxo basal J_B foi subtraído do fluxo do ácido linoleico pelo procedimento iterativo através da linearização do gráfico a baixas concentrações. O J_B tem valor um pouco menor do que o J_B medido, cf. Fig. 3.6.2.4 A.

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ (em parênteses) foram 43 μM (0.32 $nmol\ H^+.s^{-1}.(mg\ lip\acute{d}io)^{-1}$) para o ácido linoleico, 129 μM (0.42 $nmol\ H^+.s^{-1}.(mg\ lip\acute{d}io)^{-1}$) para o ácido palmítico, 55 μM (0.22 $nmol\ H^+.s^{-1}.(mg\ lip\acute{d}io)^{-1}$) para o ácido láurico, 44 μM (0.24 $nmol\ H^+.s^{-1}.(mg\ lip\acute{d}io)^{-1}$) para o ácido mirístico, 92 μM (0.73 $nmol\ H^+.s^{-1}.(mg\ lip\acute{d}io)^{-1}$) para o ácido oleico e 130 μM (0.84 $nmol\ H^+.s^{-1}.(mg\ lip\acute{d}io)^{-1}$) para o ácido linolenico.

O efluxo basal de H^+ cresceu linearmente com o aumento da concentração de ácidos graxos e não excedeu 0.2 , 0.28 ou 0.32 $nmol\ H^+.s^{-1}.(mg\ lipid)^{-1}$ (Fig. 3.6.2.4 A) ou 0.03, 0.28, e 0.44 $nmol\ H^+.s^{-1}.(mg\ lipid)^{-1}$ (Fig. 3.6.2.4 C), respectivamente, correspondendo a densidades de efluxo de H^+ de 27×10^{-6} , 38×10^{-6} and 43×10^{-6} $nmol\ H^+.s^{-1}.\mu m^{-2}$ (Fig. 3.7.6 A) e de 41, 60, e 92 $amol\ H^+.s^{-1}.\mu m^{-2}$ (Fig. 3.6.2.4 C), respectivamente. Os ácidos graxos com os maiores coeficientes de partição (3.75×10^5 , 3.6×10^5 , 10^5 , 5×10^4 e 5×10^3 para os ácidos palmítico, oleico, linoleico, linolenico e láurico, respectivamente) (Richieri *et al.*, 1995; Garlid *et al.*, 1998) induziram os menores fluxos basais. Usando 33 μM de ácidos palmítico, linoleico e láurico, os fluxos foram próximos

à permeabilidade da membrana à H^+ sem indução por ácidos graxos : 0.046, 0,056 e 0,04 $\text{nmol } H^+.s^{-1}.(mg \text{ lipídio})^{-1}$ respectivamente. Esses fluxos correspondem à 6, 7,7, e 5,5 $\text{amol } H^+.s^{-1}.\mu\text{M}^{-2}$, respectivamente. Usando 33 μM de ácido mirístico, oléico e linolênico, foram obtidas velocidades similares : 0,008, 0,044, e 0,051 $\text{nmol } H^+.s^{-1}.(mg \text{ lipídio})^{-1}$, respectivamente (11, 9, e 11 $\text{amol } H^+.s^{-1}.\mu\text{M}^{-2}$, respectivamente). A densidade de fluxo de H^+ proteolipossomal medida sem ácido graxo foi ligeiramente maior (7 a 11 $\text{amol } H^+.s^{-1}.\mu\text{M}^{-2}$).

As cinéticas de transporte de ácido linoléico mediado pela *AtPUMP1* em proteolipossomos forneceram uma curva de dose-resposta típica que excedeu os fluxos de H^+ em lipossomos (Fig 3.6.2.4 A). O K_m de 43 μM e a $V_{\text{máx}}$ de 0.32 $\text{nmol } H^+.s^{-1}.(mg \text{ lipídio})^{-1}$ para o ácido linoleico foram derivados do plote de Eadie-Hofstee correspondente (Fig. 3.6.2.4 B). Os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ calculados a partir dos plotes de Eadie-Hofstee para os ácidos linoléico, láurico, palmítico (Fig. 3.6.2.4 B), mirístico, oléico e linolênico (Fig. 3.6.2.4 D) estão na Tabela 3.6.2.5.

Tabela 3.6.2.5: K_m e $V_{\text{máx}}$ para fluxos de prótons ácido graxo -dependentes mediados por *AtPUMP1* em proteolipossomos (Borecky *et al.*, 2001):

	Ácido graxo					
	Linoléico	Láurico	Palmítico	Mirístico	Oléico	Linolênico
$K_m (\mu\text{M})$	43	55	129	44	92	130
$V_{\text{máx}}$ { $\text{nmol } H^+.s^{-1}.(mg \text{ lipídio})^{-1}$ }	0,32	0,22	0,43	0,24	0,73	0,84

Inibição do efluxo de H⁺ induzido por ácidos graxos e mediado pela AtPUMP1 por nucleotídeos de purina (Borecky et al., 2001):

Nucleotídeos de purina inibiram até 50% do efluxo de H⁺ observado induzido por ácido linoléico em proteolipossomos contendo AtPUMP1 (Fig. 3.6.2.3). A inibição parcial resulta, provavelmente, da orientação randômica das moléculas de AtPUMP1 ao redor do sítio de ligação, i.e. a proteína pode estar orientada na direção correta ou inversa (Garlid *et al.*, 1996; Jezek *et al.*, 1997a, 1997c; Costa *et al.*, 1999). Considerando-se este fato, foi possível construir curvas de dose-resposta (Figs. 3.6.2.6 A, 3.6.2.6 B) para o efeito inibitório do GDP (K_i de 0,8 mM a pH 7.1), GTP (K_i de 0,98 mM a pH 7.1), ATP (K_i de 0,85 mM a pH 7.1) e ADP (K_i de 1,41 mM a pH 7.1). O pH externo alcalino diminuiu o efeito inibitório do ATP, portanto a inibição não excedeu 20% na faixa de pH 8,0 a 8,5 (Fig. 3.6.2.6 B). Em contraste, a inibição por ATP foi maior a pH 6,3, com um K_i de 0,54 mM (Fig. 3.6.2.6 B).

Figura 3.6.2.6

Figura 3.6.2.6: Curvas dose-resposta para a inibição dos fluxos de H^+ mediados pela AtpPUMP1 e induzidos por ácidos graxos por GDP ($\blacktriangle$) e GTP ($\square$) a pH 7.1 (A), ou por ADP ($\blacklozenge$), e ATP a pH 6.3 (O), 7.1 ($\bullet$) e pH 7.8 - 8 ($\blacksquare$) (B). As curvas dose-resposta e os respectivos ajustes teóricos (equação de Hill) (linhas sólidas), representam a inibição resultante da ocupação do sítio de ligação de nucleotídeos de purina orientado para fora (aproximadamente 50%). Os K_s derivados foram 0.8 mM para GDP (dois experimentos independentes), 0.98 mM para GTP, 1.41mM para ADP, 0.85 mM para ATP a pH 7.1, e 0.54 para ATP a pH 6.3, com os coeficientes de Hill iguais a 1 (exceto para GTP e ATP a pH 6.3, onde os valores são iguais a 1.7 e 1.4, respectivamente). O meio externo usado para pH 8 (reduzido para 7.8 à altas concentrações de ATP) contém Tris-TES ao invés de TEA-TES, e para pH 6.3 contém 14.4 mM TES, 14.4 mM MES (ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico) e TEA^+ 9.2 mM.

A reconstituição funcional de proteínas carreadoras mitocondriais recombinantes é uma ferramenta útil para atribuir propriedades funcionais a um gene e a única maneira de se estudar a relação estrutura-função em proteínas por mutação sítio-dirigida. Esta aproximação tem sido utilizada no caso das proteínas desacopladoras mitocondriais como a UCP2 e a UCP3, ainda não isoladas de tecidos nativos (Jaburek *et al.*, 1999).

Utilizando a proteína *AtPUMP1* recombinante expressa em *E. coli*, provamos definitivamente que a *AtPUMP1* é uma proteína desacopladora. Apesar de ser expressa em um sistema procarioto artificial, *AtPUMP1* exhibe características funcionais similares à UCP2 e à UCP3. Níveis milimolares de ATP, ADP, GDP ou GTP bloquearam a função protonofórica da *AtPUMP1* mediada por ácidos graxos que levaram ao desacoplamento e os valores de K_i para essa inibição são muito próximos dos determinados previamente para a PUMP isolada de mitocôndrias de tomates (Costa *et al.*, 1999).

Além disso, esses resultados são os primeiros a mostrar que o pH alcalino reduz o efeito inibitório de nucleotídeos de purina sobre a PUMP, sendo que a inibição por ATP aumentou ligeiramente no pH 6,3. Baseando-nos nesses resultados, podemos prever que o sítio de ligação para nucleotídeos de purina na *AtPUMP1* tem propriedades similares ao das UCPs mas com menor afinidade, conforme observado para as proteínas de mamíferos UCP2 e UCP3 (Jaburek *et al.*, 1999). Em contraste, a UCP1 tem uma afinidade muito maior para nucleotídeos de purina. A provável baixa sensibilidade da UCP2 e da UCP3 a GDP foi verificada em estudos fisiológicos do vazamento residual de prótons em preparações mitocondriais de tecido adiposo marrom de ratos que não continham a UCP1. No entanto, todos os experimentos foram feitos na presença de BSA 0,5%, ou seja, na ausência de ácidos graxos livres que são normalmente essenciais para a atividade máxima das UCPs. Segundo Jaburek *et al.* (1999), a inibição por GDP 1mM é total no caso da UCP1 ($K_i \sim 20$ mM) mas não para a UCP2 e a UCP3 ($K_i \sim 1$ mM e ~ 1.2 mM, respectivamente). Portanto, não se pode afirmar com base nesses experimentos que a UCP2 e a UCP3 são insensíveis a GDP.

A substituição de **Phe-267** por **Tyr** no suposto sítio de ligação de nucleotídeos na UCP1 levou ao decréscimo da atividade da proteína por GDP. Entretanto, as UCPs 2, 3 e 4 e as AtPUMP 1 e 2 têm uma tirosina nessa posição. De qualquer modo, todas as UCPs possuem os resíduos que foram previamente indicados como essenciais para a ligação de nucleotídeos de purina à UCP1 (Borecky *et al.*, 2001).

A densidade de efluxo de prótons, induzida por vários ácidos graxos em proteolipossomos contendo AtPUMP1, excedeu a densidade de efluxo basal de H^+ na presença de ácidos graxos em lipossomos; portanto, o fluxo em excesso está correlacionado à função da AtPUMP1. As velocidades máximas para proteolipossomos contendo AtPUMP1 na presença de ácido linoleico foram similares às aquelas medidas com a PUMP nativa de batata isolada (Jezek *et al.*, 1997a).

É importante salientar que a AtPUMP1 não discriminou significativamente entre os ácidos graxos, visto que os ácidos graxos estudados interagiram com a AtPUMP1 em uma extensão similar, isto é, exibiram K_m s na faixa de 40 a 130 μM e $V_{máx}$ s entre 0.2 e 0.84 $\mu mol H^+ s^{-1} (mg \text{ lipídio})^{-1}$. Para os ácidos linoléico, mirístico e láurico, os K_{mapp} obtidos foram muito similares (43 μM , 44 μM e 55 μM), apesar dos valores dos coeficientes de partição (10^5 , 10^5 e 5×10^3 , respectivamente). O ácido palmítico, que tem o maior coeficiente de partição ($3,75 \times 10^5$) e o ácido linolênico, que tem um baixo coeficiente de partição (5×10^4), apresentam um alto K_m de 129 (ou 130 μM). Finalmente, o ácido oléico tem um K_m intermediário de 92 μM . Os valores de $V_{máx}$ derivados das diferentes velocidades de efluxo são elevados tanto para ácidos graxo com maiores coeficientes de partição (ácido palmítico, oléico e linoléico), quanto para ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido linolênico.

Os resultados apresentados sobre a caracterização funcional da proteína recombinante AtPUMP1 têm implicações significantes para a elucidação do possível papel fisiológico da PUMP. Apesar de não haver dados que versem sobre as concentrações fisiológicas de nucleotídeos de purina em Arabidopsis, a concentração de nucleotídeos é provavelmente

suficiente para bloquear a atividade da *AtPUMP1* *in vivo*, a não ser que um mecanismo regulatório (ex: pH elevado no espaço intermembrana) não permita os nucleotídeos de purina sejam liberados do sítio de ligação.

A disponibilidade de ácidos graxos livres, nucleotídeos e os níveis de pH no citossol são os únicos fatores reconhecidos atualmente como reguladores da atividade da função da *AtPUMP1* *in vivo*. O papel fisiológico preciso da *AtPUMP1* em tecidos verdes ainda não é conhecido. Papéis fisiológicos básicos em tecidos verdes devem envolver a regulação inibitória da *AtPUMP1*, de modo que haja somente um desacoplamento suave e benéfico para o metabolismo. O desacoplamento brando é benéfico porque gera uma pequena aceleração da respiração com o concomitante aumento da taxas metabólicas, especialmente quando a síntese de ATP é mínima. Além disso, há evidências de que um desacoplamento brando possa reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias de batatas (Kowaltowski *et al.*, 1998). Essa última função mencionada seria especialmente importante nos tecidos fotosintéticos. Como em outras plantas, a *AtPUMP1* pode ter um papel no desenvolvimento da senescência da planta, na facilitação do seu crescimento a baixas temperaturas (Nantes *et al.*, 1999) e na germinação de sementes.

3.7 Mudança de potencial em proteolipossomos

Os gráficos de fluorescência e de efluxo de H^+ em função do tempo para proteolipossomos contendo AtPUMP1 ativada por ácido linoléico (LA) $67 \mu M$ sob potenciais diferentes (mV), estão representados nas figuras 3.7.1 e 3.7.2. Após a adição de LA ($t \sim 20s$) foi adicionada valinomicina $2.7 \mu M$ ($t \sim 25s$).

Figura 3.7.1

Os potenciais gerados por um gradiente de concentração de K^+ resultaram na variação da taxa de efluxo de prótons. A partir dos valores de K_q , L e de $[SPQ]$ interna determinados, foi calculada a taxa de efluxo de H^+ ($nmol H^+ \cdot s^{-1}$) em cada condição.

Figura 3.7.2

Foram feitos ensaios sob a presença de ATP-Tris (pH 7) sob condições onde a taxa de efluxo de H^+ era significativa (potencial > 150 mV). Os gráficos abaixo (figuras 3.7.3 e 3.7.4) representam a velocidade de efluxo de H^+ (nmol H^+ / s) versus o potencial aplicado (mV) com e sem ATP 4 mM adicionado. Não foi observada a inibição sob 160, 170 e 176 mV.

Figura 3.7.3

Figura 3.7.4

A taxa de transporte de H^+ mediado pela *AtPUMP1* incorporada em proteolipossomos e ativada por LA aumentou exponencialmente com o potencial (figura 3.7.4) e a velocidade de transporte de H^+ foi significativa somente a partir de 140 mV. Neste experimento, o ATP não

inibiu o transporte de prótons através da *AtPUMP1*. Foi realizado outro experimento com ATP-Tris (figuras 3.7.6, 3.7.7, 3.7.8 e 3.7.9).

Comparação : lipossomos vs. Proteolipossomos

As taxas de efluxo de H^+ também foram medidas em lipossomos sob as mesmas condições usadas para os proteolipossomos, com exceção da concentração de LA, que foi igual a $133 \mu M$ nos ensaios com lipossomos. A adição do dobro da concentração de LA aos lipossomos garantiu que a taxa de transporte de H^+ seja comparável à taxa de transporte de H^+ em proteolipossomos ativados por LA $67 \mu M$.

Observa-se que a *AtPUMP1* foi responsável pelo aumento da velocidade de transporte de H^+ (fig 3.7.5), visto que, sob potenciais acima de 140 mV, é evidente que a velocidade de transporte de H^+ em proteolipossomos é significativamente maior.

Figura 3.7.5

Fluxo de H^+ em Lipossomos ou proteolipossomos vs. variação de potencial

Os gráficos abaixo (figuras 3.7.6, 3.7.7, 3.7.8) mostram outro experimento feito com ATP-Tris. A concentração de LA utilizada foi de $67 \mu\text{M}$ e a de valinomicina de $2.7 \mu\text{M}$. A figura 3.7.6 apresenta os traçados obtidos em diferentes potenciais (150, 160 e 176 mV), e as figuras 3.7.7 e 3.7.8 representam a adição ou não de ATP à solução de proteolipossomos.

figura 3.7.6

Fluorescência vs. tempo

Ativação por LA $67 \mu\text{M}$

figura 3.7.7

Fluorescência vs. tempo (176 mV)

Inibição por ATP 4 mM

figura 3.7.8

Fluorescência vs. tempo (160 mV)

Inibição por ATP 4 mM

Novamente, segundo os gráfico abaixo (figura 3.7.9, 3.7.10), observou-se que a taxa de transporte de H^+ mediado pela AtPUMP1 aumentou exponencialmente em função do potencial estabelecido. Neste experimento, o ATP-Tris (solução recém preparada) inibiu o transporte de prótons através da AtPUMP1 acima de 160 mV (figura 3.7.9).

Figura 3.7.9

Figura 3.7.10: Taxa de efluxo de prótons em $\text{mM } H^+/s$ (J)

A figura 3.7.11* mostra o gráfico de variação do fluxo de H^+ (J , $mM.s^{-1}$) versus o potencial aplicado ($\Delta\psi$, mV) para PUMP de batata (publicado por Jezek *et al.*, 1997). O "inset" representa o gráfico linearizado " $\ln J$ " versus " $\Delta\psi$ ". O valor de β obtido para a PUMP foi de 0,75 com a sonda SPQ ($\circ$) (Jezek *et al.*, 1997a).

Figura 3.7.11

Determinação do parâmetro β em dois experimentos diferentes com proteolipossomos:

As figuras 3.7.12 A e B mostram os gráficos linearizados " $\ln J$ " versus " $\Delta\psi$ " para a AtPUMP1, a partir dos dados de fluxo de prótons obtidos das figuras 3.7.4 e 3.7.10, respectivamente. Os valores de β obtidos para o transporte de H^+ ativado por LA via AtPUMP1 foram ~ 1 e 1,4 (figuras 3.7.4 e 3.7.10).

Figura 3.7.12

O gráfico abaixo (figura 3.7.13) mostra a linearização da velocidade resultante (J , proteolipossomos – lipossomos) versus o potencial, referente ao experimento ilustrado na figura 3.7.5. O valor de β foi reduzido de ~ 1 para $\sim 0,8$.

Figura 3.7.13

A tabela abaixo resume os valores de β e de J_0 (fluxo na ausência de $\Delta\psi$) obtidos:

figura	proteína	β	J_0 (mM H^+ s^{-1})	substrato
3.7.12 A	AtpPUMP1	1	0,0003	ác. linoleico
3.7.12 B	AtpPUMP1	1,4	0,00001	ác. linoleico
3.7.13	AtpPUMP1	0,8	0,003	ác. linoleico
Jezek <i>et al.</i> (1997) Figura 6A	PUMP	0,75	0,0059	ác. linoleico
Jezek <i>et al.</i> (1997) Figura 6B	PUMP	0,35	0,037	undecanossulfonato
Jezek <i>et al.</i> (1997) Figura 6B	PUMP	0,36	0,036	hexanossulfonato
Garlid (1990) Figura 2	UCP1	0,25	-	cloreto

Segundo Garlid *et al.* (1989), para se entender o transporte de íons em bioenergética deve-se reconhecer que o comportamento ôhmico é bizarro e que o comportamento não ôhmico é esperado. Entende-se por comportamento ôhmico a variação linear do fluxo de íons com a variação do potencial ($\Delta\psi$). Por exemplo, no mesmo intervalo de potencial transmembrânico, o transporte de cálcio pelo seu transportador mitocondrial aumenta linearmente com $\Delta\psi$ (comportamento ôhmico), o que não ocorre com o transporte de outros íons (ex. transporte mitocondrial de tetraetilamônio, que é não ôhmico).

Foi observado que o transporte de cloreto pela UCP1 reconstituída tem comportamento não ôhmico e o respectivo valor do parâmetro β obtido foi de $\sim 0,25$, ou seja, característico de um transporte de íon mediado por um canal (Garlid *et al.*, 1990). A definição do parâmetro β está em “Materiais e Métodos”, tópico 2.8.5.

Jezek *et al.* (1997a) verificaram que o transporte de undecanossulfonato e o transporte de H^+ (ativado por ácido linoléico) pela PUMP reconstituída também tem comportamento não ôhmico. Os valores de β para o transporte de undecanossulfonato e de H^+ foram, respectivamente, iguais a 0,35 e 0,75.

Segundo os dados obtidos em nosso laboratório, o transporte de H^+ pela *AtPUMP1* reconstituída ativada por ácido linoléico foi não ôhmico, com valores de β próximos de 1 e 1,4. O valor de β reduziu-se para $\sim 0,8$ quando o fluxo em lipossomos foi subtraído. Portanto, o transporte de íons pela UCP1, pela PUMP e pela *AtPUMP1* reconstituídas tem comportamento não ôhmico. No entanto, os valores de β para o transporte de H^+ mediado pela PUMP ou pela *AtPUMP1* ativadas por ácido linoléico são elevados ($> 0,5$).

Jezek *et al.* (1997a) observaram, que quando a UCP1 foi ativada por ácido linoléico, os valores obtidos para β também foram mais elevados, sugerindo que efeitos como o da distribuição dos ácidos graxos na bicamada poderiam interferir na determinação de β , aumentando o seu valor. Essa hipótese poderia explicar o elevado valor de β obtido para o transporte de H^+ mediado pelas proteínas desacopladoras de plantas (PUMP e *AtPUMP1*), quando comparados aos valores de β obtidos para o transporte de Cl^- pela UCP1 reconstituída e para o transporte de undecanossulfonato pela PUMP reconstituída. Talvez, esse efeito da distribuição do ácido linoléico na bicamada tenha sido excluído ao subtrair-se o fluxo de H^+ em lipossomos (figura 3.7.13), porém o valor de β não diminuiu significativamente.

Segundo Garlid *et al.* (1989), valores de β superiores a 0,5 indicam a presença de um poço de íons se estendendo na bicamada. Mas seria precipitado afirmar que as proteínas desacopladoras de plantas são ou não canais iônicos, baseando-se somente nos valores obtidos do parâmetro β .

Alquilsulfonatos são inibidores competitivos do ácido linoléico e também são inibidos por ATP (Jezek *et al.*, 1997a), sugerindo que são transportados pela mesma via através das proteínas desacopladoras. No entanto, foram obtidos valores diferentes de β para o transporte de ácido linoleico e de undecanossulfonato.

É evidente que o transporte de H^+ ativado por ácido linoléico e mediado pela PUMP e pela *AtPUMP1* aumentou exponencialmente com a variação de potencial.

A maior ativação do transporte de H^+ pela *AtPUMP1* sob potenciais de membrana elevados vai de encontro a um possível papel fisiológico proposto para a PUMP (Kowaltowski *et al.*, 1998) que é o de evitar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da manutenção do potencial de membrana. Com a elevação do potencial de membrana, a PUMP seria ativada, dando início ao desacoplamento entre a fosforilação oxidativa e a cadeia de transporte de elétrons e diminuindo a formação das ROS deletérias à mitocôndria.

Consequentemente, o ATP fisiológico inibiria a ativação da PUMP a potenciais de membrana elevados (> 160 mV) para evitar que o nível de desacoplamento mitocondrial fosse prejudicial à mitocôndria (figura 3.7.9).

Além de Kowaltowski *et al.* (1998), Echtay *et al.* (2002) afirmam que as proteínas desacopladoras são ativadas por superóxidos, sugerindo uma função anti-oxidante para as UCPs.

Os dados obtidos em nosso laboratório demonstraram que é necessário um potencial transmembrânico superior a 100 mV para que haja transporte de H^+ pela *AtPUMP1* ativada por ácido linoleico e sustentam a hipótese de que a PUMP possa estar envolvida na prevenção da formação de ROS.

3.8 Determinação do coeficiente de partição água / membrana de ácidos graxos

Tampão de ensaio: Tris/HCl 10mM , EGTA 1 mM, NaCl 0,15 M, pH = 8,0.

Espectro de absorção da sonda:

Abs = $\epsilon \times C \times I$, onde **C** é concentração da sonda, **$\epsilon_{ADIFAB\ 365\ nm}$** = 10.600 cm⁻¹M⁻¹ e **I** é o caminho ótico (1 cm). Obteve-se um pico de absorbância a 365 nm de 0,046 para ADIFAB 4 μ M em tampão. O valor calculado da concentração da sonda foi de 4 μ M (igual ao experimental).

Curvas de calibração com ácido linoléico:

Na curva 3.8.1, o comprimento de onda de excitação foi de 370 nm, a temperatura 25 °C e a concentração da sonda 0,2 μ M.

Cada curva do gráfico abaixo representa uma concentração de ácido linoléico adicionado (0 a 2,88 μ M); à medida que o ácido graxo livre se ligava à sonda, o máximo de fluorescência mudava de 432 para 505 nm (shift).

Figura 3.8.1

Foi feita outra curva de calibração da sonda a 20 °C e EX = 370 nm (figura 3.8.2). A concentração total de ácido linoléico adicionado variou de 0 (curva preta) a 6 μ M:

figura 3.8.2

A partir dos valores obtidos da figura 3.8.2 (FFA, R e R_0), foi feito o gráfico para a obtenção do valor de K_d (constante de dissociação) para o ácido linoléico a 20 °C (figura 3.8.3) :

figura 3.8.3

O K_d determinado para o ácido linoléico a 20 °C foi de 1,5 μM . O valor obtido por (Richieri *et al.*, 1992) para o K_d do ácido linoleico a 37 °C é de 0,97 μM .

Ensaio com lipossomos e proteolipossomos:

Após a preparação e hidratação do filme lipídico, o mesmo foi dividido em duas partes: em uma parte a PUMP foi incorporada (proteolipossomos) e na outra não (lipossomos). Nestes ensaios, a contribuição da intensidade de fluorescência do tampão foi descontada de todas as medidas.

Foi realizado um ensaio (EX = 370 nm) onde a concentração de lipossomos e de proteolipossomos era de 100 μM e a temperatura de 15 °C, conforme condição publicada por Anel *et al.* (1993). Abaixo (figura 3.8.4) está a curva de calibração utilizada para o cálculo do K_d do ácido linoleico a 15 °C.

figura 3.8.4

O valor do K_d obtido para o ácido linoleico foi igual a 1,7 μM .

Figura 3.8.5 : titulação dos lipossomos com ácido linoleico

figura 3.8.5

Figura 3.8.6: titulação dos proteolipossomos com ácido linoleico

figura 3.8.6

A partir dos dados obtidos das titulações de lipossomos e proteolipossomos com ácido linoléico (figuras 3.8.5 e 3.8.6) e usando o K_d igual a $1,7 \mu\text{M}$, determinou-se que havia **28,5% de ácido linoléico livre (FFA) em solução de lipossomos e 14,8% de FFA em solução de proteolipossomos**, após todas as adições de ácido linoléico.

Portanto, uma alta porcentagem de ácido linoléico foi incorporado em lipossomos e em proteolipossomos, sendo que os proteolipossomos incorporaram 1,2 vezes mais ácido linoléico do que os lipossomos.

Foi feita outra curva de calibração com ácido linoléico 4 mM e ADIFAB $0.2 \mu\text{M}$ em tampão (figura 3.8.7, $T = 30^\circ\text{C}$).

figura 3.8.7

O espectro com o maior pico de intensidade de fluorescência (cor preta) representa a fluorescência da amostra sem ácido graxo presente. Os outros picos, com fluorescência decrescente, representam as sucessivas adições de ácido láurico 4 mM ao sistema reacional. O tempo de incubação foi de 10 minutos entre uma adição e outra, ou seja, adicionou-se o ácido graxo e esperou-se por 10 minutos antes de iniciar-se a aquisição do espectro de emissão.

A partir da relação entre os valores de intensidade de fluorescência a 432 nm e 505 nm obtidos nos espectros acima (figura 3.8.7), foi determinado o valor de K_D para o ácido linoléico de 3.3 μM (30 °C, pH 8,0). O K_D obtido para o ácido linoléico a 37 °C, pH 7.4, é igual a 0.97 μM (Molecular Probes Product Information).

As figuras abaixo (3.8.8 e 3.8.9) mostram a titulação de soluções de lipossomos e proteolipossomos com ácido linoleico a 30 °C.

figura 3.8.8, lipossomos

figura 3.8.9, proteolipossomos

A partir dos dados extraídos dos gráficos anteriores (3.8.8 e 3.8.9), foram traçados os gráficos da figura 3.8.10: “ácido linoléico livre resultante (FFA, μM)” vs. “concentração de ácido graxo total adicionada (FA, μM)” :

LIPO: lipossomos, AtPUMP lipo: proteolipossomos

figura 3.8.10

Foi calculado o coeficiente de partição para o ácido linoléico a 30 °C em proteolipossomos e lipossomos, empregando-se o K_D obtido de 3,3 μM :

Proteolipossomos:

$$K_p = \frac{([FA_{total}] - FFA)}{[FFA]} \cdot \frac{V_a}{V_m} \quad (\text{Anel et al., 1993})$$

$$K_p = \frac{(37,3 - 0,7)}{0,7} \cdot (1263) = 64170$$

Lipossomos:

$$K_p = \frac{([FA_{total}] - FFA)}{[FFA]} \cdot \frac{V_a}{V_m} \quad (\text{Anel et al., 1993})$$

$$K_p = \frac{(64,0 - 1,9)}{1,9} \cdot (1263) = 41060$$

A razão entre os K_p 's de proteolipossomos e lipossomos foi igual a ~ 1,6 (64170 / 41060), ou seja, o ácido linoléico permeia 1,6 vezes mais a bicamada quando a *AtPUMP1* está reconstituída (menor concentração de ácido graxo livre em solução). Além do movimento de flip-flop convencional, a *AtPUMP1* reconstituída permite que os ácidos graxos atravessassem a bicamada por uma via adicional, fazendo com que a distribuição desses ácidos graxos na bicamada aumente.

Os coeficientes de partição calculados para os ácidos oléico, mirístico e láurico foram, respectivamente, 51000, 81000 e 220000 (Jezek *et al.*, 1997). Esses resultados foram obtidos em um sistema similar utilizado em nosso laboratório : 40 mg de lipídios totais, mesmo tampão interno e lipossomos formados por remoção de detergente com Bio-Beads (Jezek *et al.*, 1997).

ADIFAB: curva de calibração com ácido láurico

Foi feita a titulação da solução contendo 0.2 μ M de ADIFAB em tampão com ácido láurico 4 mM. A concentração final de ácido láurico adicionada foi de 20 μ M.

figura 3.8.11

O espectro com o maior pico de intensidade de fluorescência IF (cor preta) representa a fluorescência da amostra sem ácido graxo presente. Os picos com intensidade de fluorescência decrescente representam as sucessivas adições de ácido láurico ao sistema. Foram adições com um tempo de incubação de 10 minutos entre uma adição e outra.

Determinação de K_D a 25 °C:

A partir dos valores de intensidade de fluorescência a 432 nm e 505 nm obtidos dos espectros acima (figura 3.8.11), calculou-se o valor de K_D para o ácido láurico a 25 °C : **12 μ M**. Na literatura, foram obtidos K_D s para o ácido láurico de **14 μ M** (Mol. Cell Bioch 9, 192 87-94) e de **4,5 μ M** (Jezek et al., 1997).

Titulação de lipossomos e proteolipossomos com ácido láurico:

A figura 3.8.12 mostra os espectros de fluorescência quando se adiciona ácido láurico à solução de lipossomos.

figura 3.8.12

A figura 3.8.13 mostra os espectros de fluorescência quando se adiciona ácido láurico à solução de proteolipossomos.

figura. 3.8.13

Os espectros com o maior pico de intensidade de fluorescência IF (cor preta) representam a fluorescência das amostras sem ácido graxo presente.

Foi construído o gráfico da concentração de ácido láurico livre resultante (FFA) versus a concentração de ácido graxo adicionado aos dois sistemas (3.8.14).

figura 3.8.14

O ácido láurico se distribuiu mais na bicamada de lipossomos do que na de proteolipossomos.

A partir dos dados obtidos, foi calculado o coeficiente de partição para o ácido linoleico a 25 °C em proteolipossomos e lipossomos, empregando-se o K_D obtido de 12 μM .

Proteolipossomos:

$$K_p = \frac{([FA_{total}] - FFA)}{[FFA]} \cdot \frac{V_a}{V_m} \quad (\text{Anel et al., 1993})$$

$$K_p = \frac{(41,2 - 6)}{6} \cdot (1263) = 7410$$

Lipossomos:

$$K_p = \frac{([FA_{total}] - FFA)}{[FFA]} \cdot \frac{V_a}{V_m} \quad (\text{Anel et al., 1993})$$

$$K_p = \frac{(37,2 - 4,6)}{4,6} \cdot (1263) = 8951$$

Os K_p s foram novamente calculados usando o valor de K_D para o ácido láurico igual a 4,5 μM (Jezek et al., 1997), e obteve-se:

$$K_p \text{ (proteolipossomos)} = 22500 \text{ e } K_p \text{ (lipossomos)} = 26870.$$

A razão entre os K_p 's de lipossomos/ proteolipossomos foi de $\sim 1,2$, ou seja, quanto mais ácido láurico se adicionou à solução, menos ele se ligou à bicamada quando a *AtpPUMP1* estava presente.

Foi verificado que a sonda ADIFAB é muito apropriada para a detecção de ácidos graxos livres em solução na presença de vesículas, tornando possível a determinação do coeficiente de partição entre as fases aquosa e hidrofóbica com precisão, sem perturbar a bicamada.

Os dados obtidos aqui para a distribuição de ácido láurico em proteolipossomos e lipossomos são preliminares e novos ensaios devem ser repetidos posteriormente. Será necessário determinar a distribuição de outros ácidos graxos (palmítico, oléico, araquidônico, linolênico, etc.) nesse sistema de lipossomos vs proteolipossomos para chegar a uma conclusão sobre o efeito da *AtPUMP1* na distribuição de diferentes ácidos graxos na bicamada. Um objetivo a longo prazo seria correlacionar o tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos e os respectivos particionamentos na bicamada com e sem *AtPUMP1*.

Se os ensaios com a sonda ADIFAB ainda não forem satisfatórios, o uso de EPR (ressonância paramagnética eletrônica) será muito útil para determinar a distribuição dos ácidos graxos na membrana, na proteína e na fase aquosa.

Já foi determinado em nosso laboratório o K_p para o ácido linoléico em proteolipossomos, que foi ~1,6 superior ao determinado em lipossomos. Assim, a *AtPUMP1* foi responsável pela maior inserção do ácido linoléico na bicamada.

3.9 Testes preliminares com a coenzima Q10 (Ubiquinona)

Segundo Klingenberg *et al.* (2001), a coenzima Q é um cofator necessário para a ativação da UCP1 reconstituída proveniente de corpúsculos de inclusão de *E. coli*, visto que o transporte de H^+ mediado pela UCP1 nestas condições foi reestabelecido somente com a adição dessa coenzima. Além disso, Klingenberg *et al.* (2001) afirmam que a UCP1 isolada de mitocôndrias com o detergente Triton já estaria contaminada com a coenzima Q. Assim, o transporte de H^+ ocorre normalmente sem a adição da coenzima quando a UCP1 isolada com Triton é reconstituída em lipossomos.

Echtay *et al.* (2000) sugerem que a adição da coenzima Q (29 nmol/mg de proteína) às mitocôndrias isoladas de rins (e não de fígado) aumenta a condutância de prótons, e que essa estimulação pela coenzima Q foi inibida pela superóxido dismutase (SOD). Além disso, ácidos graxos estimularam essa atividade desacopladora, que foi completamente inibida por GDP. Echtay *et al.* (2000) suspeitam que a coenzima Q atua na mitocôndria através da produção de superóxido, que faz a mediação do desacoplamento, provavelmente atuando na proteína desacopladora 2 (UCP2).

Segundo Jaburek, M. *et al.* (2002), a coenzima Q não é um cofator obrigatório para o transporte de H^+ mediado pelas UCP2 e UCP3 expressas em bactéria e reconstituídas em lipossomos. Na ausência da coenzima Q, obteve-se um K_m de ~40 nmol/mg de lipídio para fluxo de H^+ induzido por laurato e, na presença da coenzima Q (5 nmol/mg de lipídio), o K_m decresceu ~2 vezes (o decréscimo do K_m para o laurato deve-se provavelmente a um efeito físico-químico na bicamada) (Jaburek, M. *et al.* , 2002). Porém, a velocidade máxima permaneceu inalterada (Jaburek, M. *et al.* , 2002).

Para verificar se a CoQ10 é realmente um cofator necessário para a ativação da *AtPUMP1*, alguns ensaios foram realizados empregando esta coenzima.

Nos experimentos descritos a seguir, a ordem de adição dos reagentes foi: CoQ, lipossomos (~5 s), ácido linoléico (LA) (~15 s), valinomicina (~20 s). A concentração da solução estoque da CoQ usada foi de $1\mu\text{M}$ da coenzima solubilizada em etanol.

3.9.1 Ensaios controle: para testar se a *AtPUMP1* estava ativa foram feitos alguns ensaios sem a coenzima (Figuras 3.9.1.1 e 3.9.1.2).

Figura 3.9.1.1

curva **controle**: proteolipossomos + LA $40\mu\text{M}$ + valinomicina $1.3\mu\text{M}$

curva **ATP 3mM** : proteolip. + LA $40\mu\text{M}$ + valinomicina $1.3\mu\text{M}$ + ATP 3mM

curva **sem valinomicina** : proteolipossomos + LA $40\mu\text{M}$

A *AtPUMP1* estava ativa, pois foi ativada por ácido graxo e inibida por um nucleotídeo de purina (ATP-TRIS). Foi observado que, na ausência de valinomicina, o efluxo de H^+ induzido por LA foi drasticamente reduzido.

Figura 3.9.1.2: comparação entre uma cinética onde há adição de LA 40 μM e de valinomicina 1.3 μM e outra, onde não há nenhuma adição além dos proteolipossomos.

Figura 3.9.1.2

Observou-se na curva sem adição de LA a fluorescência atribuída à solubilização dos proteolipossomos no tampão de ensaio. Na curva onde o ácido graxo foi adicionado, observa-se uma cinética típica de transporte de H^+ mediado pela *AtPUMP1*.

3.9.2 Experimentos com a coenzima Q

Figura 3.9.2.1: adição de diferentes concentrações de CoQ, LA 40 μM , val 1.3 μM

Figura 3.9.2.1

Nos gráficos abaixo (**Figura 3.9.2.2 e Figura 3.9.2.3**), as curvas "controle" representam cinéticas feitas onde não havia CoQ presente. Nas demais curvas havia concentrações de coenzima variando de 1 a 6 nM. a concentração de valinomicina era igual a 1.3 μM .

Figura 3.9.2.2 : [LA] = 120 μM

Figura 3.9.2.3 : [LA] = 20 μM

Figura 3.9.2.4: adição de diferentes concentrações de CoQ, LA 33 μM , val 1.3 μM

Figura 3.9.2.4

Figura 3.9.2.5: adição de diferentes concentrações de CoQ, LA 66 μM , val 1.3 μM

Figura 3.9.2.5

Ao observar as figuras 3.9.2.2, 3.9.2.3 e 3.9.2.4, conclui-se que a coenzima Q não aumentou a taxa de transporte de prótons mediada pela *AtPUMP1* e ativada por ácido linoléico (20, 33 e 120 μM); pelo contrário, parecia que a coenzima se comportava como um inibidor (com exceção das curvas: 6nM, figura 3.9.2.2 e CoQ 2nm, figura 3.9.2.4).

Na figura 3.9.2.1, observou-se que houve um pequeno aumento da taxa de transporte de H^+ ativada por ácido linoléico 40 μM na presença da coenzima Q (2 e 4 nM), porém, no mesmo experimento, a taxa de transporte também foi reduzida por concentrações diferentes da mesma coenzima (1 e 6 nM). A inibição do transporte de prótons, quando a coenzima Q10 6nM foi adicionada, descarta a possibilidade de, nesta concentração (curva 6nM, figura 3.9.2.2), a coenzima ser um cofator necessário para a ativação da *AtPUMP1*. Na figura 3.9.2.5, também houve um pequeno aumento da taxa de transporte de H^+ ativada por ácido linoléico 66 μM na presença da coenzima Q (1,3 e 2 nM), o que não ocorreu quando a concentração da enzima era de 0,66 nM. Esse aumento da taxa de transporte de H^+ deve ter ocorrido devido a um efeito não específico. Na figura 3.9.2.4, não se observa aumento da taxa de transporte de H^+ ativada por ácido linoléico 33 μM na presença da coenzima Q 2nM (a taxa de transporte foi praticamente igual na ausência e na presença da coenzima) e, quando as concentrações da coenzima eram iguais a 0,66 e 1,3 nM, essa taxa foi reduzida.

Na maioria dos experimentos de reconstituição feitos em nosso laboratório (mostrados nesta Tese ou não) a taxa de transporte de H^+ por *AtPUMP1* não sofreu aumento significativo com a adição da coenzima Q.

Segundo os resultados obtidos, pode-se concluir que a coenzima Q não é um cofator necessário para a ativação da *AtPUMP1*, assim como não é um cofator necessário para a ativação das UCPs 2 e 3 (Jaburek, M. *et al.*, 2002). Houve ativação da *AtPUMP1* reconstituída por ácido linoléico em todas as curvas onde não havia coenzima Q presente (curvas controle), contrário aos resultados obtidos por

Klingenberg *et al.* (2001), onde não foi observado o transporte de H^+ pela UCP1 reconstituída na ausência de coenzima Q. Além disso, não existe coenzima Q contaminante na preparação da proteína recombinante AtPUMP1.

Estes ensaios foram realizados em colaboração com Jiri Borecky, aluno de Pós Doutorado no CEBMEG, UNICAMP.

3.10 Microcalorimetria com mitocôndrias de batata

3.10.1 Fluorescência com a sonda Safranina

Paralelamente a ensaios de microcalorimetria, com a finalidade de verificar se a mitocôndria estava íntegra e respondendo aos ativadores e aos inibidores de todos os canais estudados, foi empregada a sonda como indicador fluorescente. A supressão da fluorescência da safranina, quando se adicionou succinato à suspensão de mitocôndrias com os canais desativados, indicou que houve a formação de um gradiente eletroquímico, que foi desfeito após a adição de FCCP.

No experimento ilustrado na figura 3.10.1.1, adicionou-se succinato e depois o desacoplador FCCP à solução de mitocôndrias em tampão. As condições experimentais estudadas foram:

- 1) mitocôndria acoplada, com todos os canais desativados (curva rosa).
- 2) mitocôndria desacoplada, canais ativados (curva preta).

Figura 3.10.1.1

Figura 3.10.1.1:

Tampão de ensaio : sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, Pi 2 mM, rotenona 2 μ M, oligomicina 2 μ M

+ 12 μ L mitocôndria de batata, 8 μ L safranina, 8 μ L succinato, 5 μ L FCCP.

canais ativados: ácido linoleico, DTT, piruvato e KCl.

canais desativados: BSA, BHAM.

3.10.2 Microcalorimetria com mitocôndrias de batata

tampão de ensaio usado em todos os experimentos: sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, Pi 2 mM, rotenona 2 μ M, oligomicina 2 μ M e succinato 5 mM.

O termograma abaixo (Figura 3.10.2.1) representa um dos primeiros ensaios microcalorimétricos com mitocôndrias de batatas feitos em nosso laboratório. O succinato foi adicionado pela seringa e a mitocôndria estava na cela de reação nas condições descritas na legenda:

Figura 3.10.2.1

- a) **mitocôndria acoplada:** tampão + BSA 1% + BHAM 2mM + ATP 2mM
- b) **AOx ativada:** tampão+ BSA 1% + ATP 2mM + DTT 1 mM + Piruvato 0.2 mM
- c) **PUMP ativada:** tampão + BHAM 2mM + ác. linoleico 16 μ M
- d) **canal de K⁺ ativado:** tampão + BSA 1%+ BHAM 2mM + KCl 30mM
- e) **PUMP + AOx + canal de K⁺ ativados (desacoplada):** tampão + ác. linoleico 16 μ M + KCl 30mM + DTT 1 mM + Piruvato 0.2 mM

Foi observado que houve liberação de calor quando o succinato foi adicionado à suspensão de mitocôndrias aos 2 minutos aproximadamente (figura 3.10.2.1). No intervalo entre 2 e 4 minutos, o calor gerado foi atribuído à diluição do succinato somado ao calor produzido associado a cada canal. Depois deste período, a produção de calor foi atribuída somente à contribuição da atividade dos canais mitocondriais ao funcionamento global do sistema.

Nos experimentos controle, feitos nas mesmas condições sem adição de mitocôndrias, o calor resultante foi proveniente da diluição do succinato no meio reacional. As curvas do termograma do controle foram subtraídas do termograma obtido com mitocôndrias e obteve-se um termograma final (figura 3.10.2.1), a partir do qual se calculou-se a área ($\mu\text{cal/s}$ versus s) e obteve-se o valor do calor total produzido em cada condição experimental (em μcal).

Na figura 3.10.2.1 o intervalo escolhido para o cálculo das áreas foi de 2 a 12 minutos e os valores de calor liberado (em módulo) estão na tabela abaixo. Cada canal foi ativado independentemente. Quando a mitocôndria estava acoplada (adição de BSA, ATP e BHAM), o calor liberado foi de 2267 μcal , e esse valor foi subtraído de todos os outros casos.

Comparando-se as quantidades de calor liberadas, ressalta-se que tanto a soma dos calores atribuídos ao funcionamento individual da AOx e da PUMP (A+B), quanto na soma dos calores atribuídos ao funcionamento individual da AOx e do canal de K^+ (A+C), quanto no calor atribuído ao funcionamento ao sistema com todos ativados (D), obtemos valores muito próximos de 5000 kcal (tabela abaixo).

linha	situação	calor liberado	calor liberado (- 2267 μcal)
acoplada	mitocôndria acoplada	2267 μcal	-
AOx	somente AOx ativada	3235 μcal	968 μcal (A)
PUMP	somente PUMP ativada	6800 μcal	4533 μcal (B)
K_{ATP}	somente canal K^+ ativado	6510 μcal	4243 μcal (C)
desacoplada	PUMP + AOx + canal K^+	7458 μcal	5191 μcal (D)

Portanto, os estudos calorimétricos realizados indicaram a existência de duas vias de desacoplamento, com mecanismos distintos, para controlar o gradiente de transmembrânico de prótons, a saber:

- i) a via alternativa mitocondrial (AOx), que evita que o gradiente se forme
- ii) a via do citocromo, da qual fazem parte a PUMP e o canal de K^+ , que efetivamente dissipa o gradiente transmembrânico de prótons.

Teste com mitocôndrias de fígado de rato

Com a finalidade de comparar os tipos de curvas obtidas nas cinéticas feitas com mitocôndria vegetal e com mitocôndria animal, foi feito um experimento de calorimetria com mitocôndrias de fígado de rato (figura 3.10.2.2). A respiração mitocondrial, medida num oxígrafo, revelou que a preparação consumia oxigênio em velocidade compatível com a da literatura.

As mitocôndrias de fígado de rato foram adicionadas na mesma concentração usada para os experimentos com mitocôndrias de batata e as seguintes condições foram testadas (figura 3.10.2.2) :

- 1 - mitocôndria acoplada (canais inibidos)
- 2 - mitocôndria desacoplada (canais ativados: ácido linoleico + KCl + DTT)
- 3 - mitocôndria desacoplada por FCCP

Figura 3.10.2.2

O comportamento das curvas do termograma anterior (figura 3.10.2.2) foi semelhante ao das curvas com mitocôndrias de batata. Deve-se lembrar que as mitocôndrias de fígado de rato não possuem PUMP e nem AOx.

Tabela comparativa do calor liberado:

	mitocôndria rato figura 3.10.2.2	mitocôndria batata figura 3.10.2.1
Condição	calor liberado (μcal)	calor liberado (μcal)
Acoplada	-2892	-2267
Desacoplada (sem FCCP)	-12031	-7458
Desacoplada por FCCP	-3473	-

Utilizando-se mitocôndrias de batata novamente, foi testada a ação de Antimicina A (inibidor da transferência de elétrons no citocromo b) e de FCCP (Figura 3.10.2.3). O FCCP foi adicionado em conjunto com DTT e piruvato, de modo a ativar as duas vias respiratórias (via alternativa e via dos citocromos) e atingir o desacoplamento máximo mitocondrial. No experimento controle, contendo BSA 1%, não foram adicionados FCCP e Antimicina A.

Figura 3.10.2.3

Áreas calculadas para a figura 3.10.2.3 no intervalo de 2 a 12 minutos (módulo):

Antimicina A:	A = 124 μcal
Controle (BSA 1%) :	A = 1554 μcal
FCCP + DTT + piruvato :	A = 6165 μcal

Verificou-se que a Antimicina A inibiu eficazmente a respiração mitocondrial, e isso se refletiu na quantidade de calor liberada (curva “Antimicina A”, fig. 3.10.2.3). Observou-se também a maior liberação de calor ao desacoplar a mitocôndria por FCCP (desacoplador da via dos citocromos) e DTT + piruvato (ativadores da AOX).

Outro controle foi feito inativando a mitocôndria por aquecimento (água quase em ebulição) Nestas condições, o calor liberado após a adição de succinato foi desprezível (Figura 3.10.2.4).

Os experimentos foram realizados nas seguintes condições:

- 1 – adição de antimicina A
- 2 – mitocôndria aquecida + FCCP + piruvato
- 3 – mitocôndria aquecida (sem FCCP/piruvato)
- 4 – adição de BSA 1% ,que remove o ácido graxo basal
- 5 – basal (sem BSA), onde os ácidos graxos livres presentes após o isolamento da mitocôndria com BSA são responsáveis por parte da liberação de calor
- 6 – FCCP + DTT + piruvato (desacoplamento da via respiratória alternativa e da via citocromo).

Figura 3.10.2.4

Uma vez caracterizada a geração de calor da mitocôndria desacoplada, acoplada e inativa, foram feitos ensaios ativando e/ou inibindo os canais mitocondriais individualmente.

PUMP: ativação por ácido linoléico (LA) e inibição por BSA (ou ATP)

O meio reacional consistiu em: tampão (sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, Pi 2 mM, succinato 5 mM), mitocôndria, BHAM, oligomicina, rotenona, e ácido linoléico.

Os ensaios não continham KCl e foi adicionado o inibidor da AOX (BHAM 2mM). Optou-se pela adição do sal sódico de ácido linoléico pelo fato de a solução de ácido linoléico em *etanol* (não mostrado) liberar uma elevada quantidade de calor ao ser diluída no tampão, impedindo a detecção precisa do calor liberado pelo efeito do ácido linoléico como um substrato para a PUMP.

A PUMP foi ativada com LA (1.33 μ M, 2 μ M, 3 μ M e 4 μ M) e inibida por BSA (1%) ou ATP. Adicionou-se 2mM de succinato à cela de amostra aos 2 minutos.

Foram feitos ensaios, nas mesmas condições descritas, sem mitocôndria (curvas “controle”). As curvas “controle” foram subtraídas daquelas feitas com mitocôndria e a área da curva resultante foi calculada.

Termogramas :

curvas controle

Figura 3.10.2.5

Curvas resultantes:

Figura 3.10.2.6

valores obtidos em módulo: (µcal)	
BSA 1%	839
ácido graxo basal	7405
LA 1.33 µM	9285
LA 2 µM	8763
LA 3 µM	8332
LA 4 µM	9529

A magnitude do calor produzido em cada condição indicou que a concentração de ácido graxo basal mitocondrial é próxima à concentração de LA adicionada nos ensaios. Verificou-se também que a diferença entre o calor liberado quando o BSA foi adicionado (removendo o ácido graxo basal) e o calor liberado nas outras condições foi considerável, ou seja, foi produzida uma

quantidade de calor praticamente 10 vezes maior na ausência de BSA. Não foi possível medir o calor envolvido na inibição por ATP.

A PUMP foi ativada com concentrações de LA variando entre 4 e 16 μM (figura 3.10.2.7), para verificar se havia saturação da proteína pelo ácido graxo nessa faixa de concentração ou se a liberação de calor continuaria proporcional à concentração da LA adicionado. Este experimento (e outros não mostrados) nos levou a usar sempre concentrações de LA menores que 4 μM , visto que o sistema já estava certamente saturado com esta concentração de ácido linoléico.

Figura 3.10.2.7

A concentração saturante de ácido linoleico foi de 4 μM (curva em vermelho).

O próximo termograma (figura 3.10.2.8) mostra 4 adições de LA ao sistema reacional. Após a adição do LA, o pH do meio reacional foi medido e permaneceu igual a 7.2. A adição de BSA 1% (curva vermelha) mostrou claramente que a remoção do LA causou uma drástica redução do calor liberado. Na curva “rosa” observou-se que, mesmo sem adicionar LA, o calor

gerado foi intermediário ao calor gerado por 1 e 2 μM de LA adicionado, sugerindo que essa deve ser a concentração de ácidos graxos livres basal presente na suspensão mitocondrial recém-isolada.

Termograma:

Figura 3.10.2.8

As respectivas áreas (módulo) foram calculadas no intervalo de 1 a 11 min :

BSA : 1134 μcal
basal : 5711 μcal
LA 1 μM : 5764
LA 2 μM : 6157
LA 3 μM : 7486 μcal
LA 4 μM : 7264 μcal .

Verificou-se que a ativação da PUMP por LA é uma reação exotérmica e que 3 a 4 μM é realmente a faixa de concentração saturante de LA na solução de meio reacional + mitocôndria, visto que não houve aumento de liberação de calor após 3 μM .

Na figura abaixo (figura 3.10.2.9) estão dois dos termogramas que deram origem às curvas mostradas anteriormente na figura 3.10.2.8:

Figura 3.10.2.9

Figura 3.10.2.9: curvas controle, sem mitocôndria (coloridas) e curvas onde há mitocôndria (em preto).

Outra opção possível para regular o calor produzido pela ativação da PUMP seria a mudança da concentração de BSA adicionado ao meio (figura 3.10.2.10). Mas, o resultado obtido não foi satisfatório, pois o calor liberado não foi proporcional às adições:

Figura 3.10.2.10

Na curva 5 da figura 3.10.2.4, foi observado que a mitocôndria ficou anóxica aos 9 minutos aproximadamente, então optou-se por adicionar a mitocôndria na própria seringa de injeção (ao invés de adicionar a mitocôndria na cela de amostra) e adicionar o succinato ao meio reacional, que foi inserido na cela de amostra. Isso tornou possível carregar a seringa de injeção com a suspensão mitocondrial, mantida no gelo, somente alguns segundos antes do ensaio.

Assim, nos próximos experimentos descritos, a mitocôndria foi mantida no gelo durante todo o experimento e era adicionada na seringa em menos de 1 minuto antes do encaixe da seringa na cela de amostra. Após um pré-equilíbrio de aproximadamente 10 minutos, que tem início quando a seringa está acoplada à cela de amostra e começa a girar, é que a amostra (mitocôndria) é injetada na cela dando início à reação. Durante o pré-equilíbrio há troca de calor entre a amostra adicionada à cela de amostra e a própria cela, até que não haja mais troca de calor e o equilíbrio térmico seja estabelecido.

Nos experimentos a seguir foi feita a correlação entre o calor produzido e a respiração mitocondrial, obtidos sob as mesmas condições anteriores.

Na figura 3.10.2.11, segue o termograma **A** onde são mostrados os dados de calor liberado versus tempo e o gráfico **B**, que corresponde à integração do calor liberado em **A** versus o tempo de liberação do calor após a injeção da mitocôndria.

Onde está indicado pela seta ($t = 2\text{min}$), a mitocôndria de batata ($\approx 0.2\text{ mg/mL}$) foi adicionada ao meio reacional contendo succinato sob as seguintes condições (gráficos **A** e **B**) :

Curva(s) a : *mitocôndria aquecida*, BSA 1%, BHAM 2mM e FCCP $7\mu\text{M}$

Curva(s) b : BSA 1%, BHAM 2mM e Antimicina A $1\mu\text{M}$

Curva(s) c : BSA 1%, BHAM 2mM

Curva(s) d : BSA 1%, BHAM 2mM e FCCP $7\mu\text{M}$

Figura 3.10.2.11

Figura 3.10.2.11: Os gráficos acima ilustram as curvas do calor liberado por mitocôndrias de batata. Todas as reações são exotérmicas e o calor liberado foi proporcional ao nível de desacoplamento mitocondrial. O gráfico B representa a liberação do calor ao longo do tempo.

Uma vez caracterizada a geração de calor da mitocôndria desacoplada, acoplada e inativa, foram feitas ensaios microcalorimétricos ativando e inibindo os canais mitocondriais (PUMP, AOx e o canal de K^+) individualmente.

PUMP:

Seguem abaixo (figura 3.10.2.12) o termograma da PUMP (A) e o gráfico do calor integrado versus tempo (B) para cada situação estudada em A. O local indicado pela seta indica a adição da mitocôndria ao meio reacional (t ~2min).

Em todas as condições estudadas havia BHAM 2Mm para bloquear a via alternativa (AOx). Nas curvas "a" dos gráficos havia BSA 1% adicionado ao meio, nas curvas "b" não havia BSA nem LA na solução (ácido graxo basal) e, nas curvas "c", havia LA 3 μ M :

Figura 3.10.2.12

Para verificar qual a relação entre o calor produzido e o consumo de oxigênio mitocondrial quando a PUMP foi ativada, o consumo de oxigênio (nmol) foi medido nas mesmas condições das curvas da figura 3.10.2.12 (curvas a, b, c). O gráfico da integração do consumo de O_2 versus o tempo de duração do experimento está ilustrado na Figura 3.10.2.13 C.

O gráfico D da figura 3.10.2.13 representa dados de Q_T/O_2 (calor gerado versus consumo de O_2) coletados de vários experimentos como os representados pelas curvas a, b, c dos gráficos A, B e C na presença ou

ausência de BSA 1% e variando-se a concentração de LA de 0 a 4 μM . Portanto, o gráfico **D** correlaciona o consumo de oxigênio mitocondrial e a liberação de calor.

Figura 3.10.2.13

Houve uma correlação linear entre calor produzido e o oxigênio consumido quando a PUMP foi ativada por LA e inibida (ou não) por BSA. Este efeito foi constatado com a via respiratória alternativa inativa. De acordo com a regressão linear do traçado de **D** (figura 3.11.2.13) a relação Q_T/O_2 foi igual a 65.6 kcal/mol O_2 .

Essa foi a primeira correlação feita entre o calor produzido e o oxigênio consumido quando a PUMP foi ativada em uma suspensão mitocondrial.

Canal de K^+ :

A caracterização calorimétrica foi feita também para o canal transportador de K^+ . Foram adicionados BSA 1% e BHAM ao meio reacional (sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, Pi 2 mM, rotenona 2 μM , oligomicina 2 μM e succinato 5 mM) em todos os ensaios. Onde indicado pela seta (figura 3.10.2.14 **A** e **B**) a suspensão de mitocôndrias foi adicionada sob as seguintes condições experimentais:

curvas a : BHAM 2 mM + BSA 1%

curvas b : BHAM 2 mM + BSA 1% + KCl 5 mM

curvas c : BHAM 2 mM + BSA 1% + KCl 20 mM

Figura 3.10.2.14

A ativação do canal de K^+ também liberou calor (reação exotérmica) como a PUMP, mas as cinéticas dos dois canais é diferente se comparados os gráficos A das figuras 3.10.2.12 e 3.10.2.14, bem como a quantidade de calor gerado por cada canal. Assim como a PUMP, o calor integrado gerado pelo canal de K^+ teve comportamento linear ao longo do tempo (figura 3.10.2.14 B). É importante salientar que o canal de K^+ parece ser o canal mais sensível à mudança de temperatura da mitocôndria adicionada, ou seja, se o tempo entre a retirada da mitocôndria do tubo tipo "eppendorf" e a sua adição ao meio reacional variasse de um ensaio para outro (sob a mesma condição experimental) a quantidade liberada de calor variava.

Novamente fez-se em paralelo o experimento com as mesmas condições experimentais descritas acima (curvas a, b, c) no oxígrafo, obtendo-se os dados plotados na figura 3.10.2.15 (C e D):

Figura 3.10.2.15

Os pontos do gráfico da figura 3.10.2.15 **D** (Q_T/O_2) foram coletados de múltiplos experimentos feitos nas mesmas condições experimentais de A-C (figuras 3.10.2.14 e 3.10.2.15) na ausência ou na presença de ATP 200 μM e variando-se a concentração de KCl de 0 a 40 mM. O ATP não se mostrou um inibidor eficiente para o canal de K^+ e a sua regulação ainda não é totalmente conhecida.

A relação Q_T/O_2 obtida a partir da figura 3.10.2.15 **D** para o canal de K^+ ($Q_T/O_2 = 65.2 \text{ kcal/mol O}_2$) foi praticamente igual àquela obtida para a PUMP, podendo ser consideradas idênticas dentro do erro experimental. Nos dois casos, o succinato foi utilizado como substrato para a respiração mitocondrial.

AOx (via respiratória alternativa):

A caracterização calorimétrica da via respiratória resistente à cianeto foi feita empregando-se o piruvato, que é um efetor alostérico da AOx. Foi adicionado BSA 1% ao meio reacional (sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, Pi 2 mM, rotenona 2 μ M, oligomicina 2 μ M e succinato 5 mM) em todos os ensaios e não houve adição de KCl em nenhum ensaio. Onde indicado pela seta (figura 3.10.2.16 A e B) a mitocôndria foi adicionada sob as seguintes condições experimentais:

curvas *a* : BSA 1%, ATP 200 μ M, Antimicina A 200 nM e BHAM 2 mM

curvas *b* : BSA 1%, ATP 200 μ M, Antimic. A 200nM, BHAM 2mM, DTT 1mM, piruvato 150 μ M

curvas *c* : BSA 1%, ATP 200 μ M, Antimicina A 200 nM

curvas *d* : BSA 1%, ATP 200 μ M, Antimicina A 200 nM, DTT1 mM e piruvato 150 μ M

Figura 3.10.2.16

Nas curvas *a* e *b*, onde havia BHAM (inibidor da AOx), foi observado que o calor resultante foi muito menor que o calor resultante das curvas *c* e *d*. As curvas *c* representam a liberação de calor com somente **succinato** como substrato e, nas curvas *d*, houve um acréscimo de calor liberado devido à adição de **piruvato** 150 μ M. O piruvato é um efetor alostérico da AOx.

O gráfico B (figura 3.10.2.16) mostra as curvas integradas do calor liberado em A (figura 3.10.2.16) versus o tempo de reação. Diferente da PUMP e do canal de K^+ , o comportamento das curvas integradas da via alternativa (figura 3.10.2.16 B) não foi linear ao longo do tempo.

A figura 3.10.2.17 representa o consumo de oxigênio sob as mesmas condições experimentais descritas para a figura 3.10.2.16 (gráfico C: curvas a, b, c, d) e a correlação entre oxigênio consumido e calor liberado no gráfico D. No gráfico D, foram feitas duas correlações entre o O_2 consumido e calor produzido: succinato como substrato (■) e piruvato como substrato (▲):

Figura 3.10.2.17

Foi observada uma correlação não-linear de Q_T/O_2 (fig. 3.10.2.17 D) quando o piruvato estava participando da reação, ao contrário da relação Q_T/O_2 quando havia somente succinato. O valor de Q_T/O_2 (com succinato ■) determinado foi igual a 64 kcal/mol O_2 , similar aos valores de Q_T/O_2 para a PUMP (65.6 kcal/mol O_2) e para o canal de K^+ (65.2 kcal/mol O_2). Além disso, a razão Q_T/O_2 determinada em nossos experimentos foi muito similar à razão medida por Laakso & Arrabaça (Geraldes-Laakso & Arrabaça, 1997), que quantificou o efeito da AOx na geração de calor mitocondrial de soja, e obteve 256 kJ/mol de O_2 (61.2 kcal/mol O_2) na presença de succinato e KCN.

Através da microcalorimetria foi possível medir o calor liberado em mitocôndrias intactas de batatas sob várias condições experimentais, onde foram estudados especificamente os canais mitocondriais: PUMP, AOx e o

canal de K^+ . Os dados desses experimentos contribuem muito para quantificação da termogênese mitocondrial, visto que há poucos relatos sobre medidas diretas de liberação de calor mitocondrial.

Os mamíferos possuem a termogênese resultante do seu “tremor” quando submetidos a baixas temperaturas, denominada “shivering thermogenesis”. Como as plantas não possuem esse tipo de termogênese, o calor produzido pelas vias respiratórias deve ser muito importante para o seu crescimento, desenvolvimento de frutos e amadurecimento.

Já foi documentada a liberação de calor em plantas atribuída à AOx (Geraldes-Laakso & Arrabaça, 1997; Chauveau & Lance, 1982; Ordentlich *et al.*, 1991; Kapulnik *et al.*, 1992); no entanto, não há relatos sobre o efeito da ativação da via do citocromo por ácidos graxos e por K^+ , que estimulam o ciclo fútil de H^+ em plantas (Vercesi *et al.*, 1995; Pastore *et al.*, 1999).

Foi tomado o cuidado de medir o calor liberado atribuído ao funcionamento da PUMP na presença de excesso de carboxiatractilosídeo, que é um inibidor do trocador de ATP/ADP. O trocador de ATP/ADP também pode transportar ânions de ácidos graxos e competir com a PUMP. Contudo, houve uma inibição de somente 5% do calor total liberado quando o carboxiatractilosídeo foi adicionado ao meio com linoleato de Na^+ , excluindo a possibilidade de o trocador de ATP/ADP ser o responsável pelo calor produzido e atribuindo esse calor à atividade da PUMP (Almeida *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 1999; Nantes *et al.*, 1999).

Foi verificado nestes experimentos que ácido graxo, K^+ e a ativação da AOx causam um elevado acréscimo na produção de calor mitocondrial. Além disso, independentemente da via respiratória estudada, nota-se que a geração de calor foi linearmente proporcional ao consumo de oxigênio na suspensão e teve um valor de ~ 65 kcal/mol de O_2 . A razão Q_T/O_2 não foi linear na presença de piruvato.

O que diferencia cada canal é a variação da quantidade de calor máximo total liberada por cada um deles na presença de substratos em concentração saturante. No caso da ativação da PUMP por LA, o calor máximo liberado foi de ~ 12 mcal, o canal de K^+ ativado liberou ~ 9.5 mcal e a AOx ativada liberou

5 mcal (sem piruvato) e 6 mcal (com piruvato). Esses valores de calor máximo liberado estão provavelmente relacionados ao funcionamento das duas vias respiratórias (citocromo e alternativa), pois a AOx reduz oxigênio de modo mais limitado do que ocorre na via do citocromo, o que provavelmente produz menos calor e desacopla menos.

A PUMP foi o canal mitocondrial responsável pela maior quantidade de calor produzida.

Segundo os dados aqui mostrados, concluiu-se que a ativação da AOx, os ácidos graxos e o K^+ aumentaram significativamente a produção do calor mitocondrial em plantas. Sob as condições estudadas, o efeito atribuído à ácido graxo foi minimamente inibido ($< 5\%$) por carboxiatractilosídeo e deve, portanto, ser associado à atividade da PUMP (Almeida *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 1999; Nantes *et al.*, 1999).

Estudos prévios mostraram que a PUMP promove o transporte de ânions de ácidos graxos da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, onde esses ácidos graxos são protonados e fazem espontaneamente um movimento de flip-flop através da membrana, retornando à matriz (Jezek *et al.*, 1998). O efeito do K^+ é certamente atribuído à contribuição do canal de K^+ (Pastore *et al.*, 1999) e do trocador de K^+/H^+ (Hensley & Hanson, 1975) à passagem de H^+ através da membrana interna. O calor liberado induzido pela ativação da AOx envolve um caminho respiratório separado, que não promove o bombeamento de prótons (Affourtit *et al.*, 2001).

Independentemente da via respiratória estudada, a produção de calor foi linearmente proporcional ao consumo de oxigênio na suspensão, e resultou na liberação de aproximadamente 65 kcal/mol O_2 .

A razão Q_T/O_2 foi alterada somente quando foi adicionado piruvato como substrato (figura 3.10.2.7), que pode gerar NADH. Portanto, se o substrato respiratório (succinato) for mantido, a liberação de calor é a mesma independentemente da ativação (por ácido graxo, AOx, ou K^+).

A razão Q_T/O_2 observada nos experimentos é muito similar à razão medida por Laakso & Arrabaça (Geraldes-Laakso & Arrabaça, 1997), que quantificaram o efeito da AOx na geração de calor em mitocôndrias de soja e obtiveram uma razão de 61,2 kcal/mol O_2 na presença de succinato e KCN. Essa razão calor/mol de O_2 foi reduzida sob condições onde a fosforilação oxidativa foi mantida (Geraldes-Laakso & Arrabaça, 1997).

Visto que todas as vias alternativas presentes em mitocôndrias de batatas produzem quantidades similares de calor por oxigênio consumido, surge a questão: por quê mitocôndrias de plantas apresentam três vias diferentes que dissipam calor? Uma resposta plausível seria a distinção entre a quantidade de calor máxima liberada por cada via. A ativação da PUMP e do canal de K^+ , que utilizam o gradiente de H^+ gerado pela via respiratória do citocromo para produzir calor, gera, respectivamente, ~12 mcal e ~ 9,5 mcal . No entanto, a AOx, que reduz oxigênio de modo mais limitado que a via do citocromo, levou a uma produção de calor de ~5 mcal na ausência de piruvato e de ~ 6 mcal na presença de piruvato.

Assim, a dissipação limitada de energia promovida pela atividade da AOx deve ser atribuída a uma via que produz um aumento moderado de temperatura e não reduz drasticamente a eficiência da fosforilação oxidativa. Em tomates, a ativação da AOx por DTT e piruvato diminuiu a razão ADP/O (uma medida da eficiência da síntese de ATP) de $1,43 \pm 0,03$ para $1,29 \pm 0,10$ (Sluse & Jarmuszkiewicz, 1998), enquanto a ativação da PUMP por ácido linoléico reduziu a razão ADP/O para 1.01 ± 0.03 .

Este grande decréscimo na eficiência da fosforilação oxidativa promovido pela PUMP, que vem acompanhado da liberação de calor, deve ser necessário quando há uma demanda de aquecimento. A liberação de calor pode ser também um efeito secundário do desacoplamento mitocondrial promovido pela PUMP, necessário para manter a oxidação de substratos na presença de uma alta relação ATP/ADP, prevenindo a formação excessiva do gradiente de H^+ . O aquecimento não deve ser entendido como “pontual”, ou seja, o aquecimento de um tecido não deve ser atribuído somente ao calor promovido pela ativação da PUMP

isoladamente, e sim à somatória do calor liberado ou absorvido em todas as reações que ocorrem simultaneamente no sistema em questão.

A razão para a existência de um mecanismo regulado por K^+ (além de ácidos graxos) para dissipar o gradiente de H^+ não é simples de se explicar, pois a atividade e a regulação do canal de K^+ em plantas são ainda pouco compreendidas. É possível que a atividade do canal de K^+ responda de modo diferente a estímulos que regulam a produção de calor. Assim, espécies diferentes podem fazer uso de ácidos graxos ou do canal de K^+ para induzir a dissipação do gradiente de prótons para regular a oxidação de substratos e produzir calor.

Os resultados de microcalorimetria aqui relatados poderão ser úteis para estimar a produção de calor em condições experimentais nas quais mudanças da atividade respiratória promovidas pela PUMP ou pela AOX já foram estudadas (Almeida *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 1999). A correlação linear não variável entre a liberação de calor e o consumo de oxigênio, e a alta similaridade entre as determinações de calor/ consumo de oxigênio aqui descritas e aquelas determinadas para mitocôndrias de soja (Gerald-Lakso & Arrabaça, 1997) e de tecido adiposo marrom (Ricquier *et al.*, 1979), sugerem que as razões aqui determinadas podem ser aplicadas para mitocôndrias de organismos distintos.

Finalmente, espera-se que esses dados de microcalorimetria obtidos para mitocôndrias de tubérculos de batatas estimulem estudos calorimétricos futuros em mitocôndrias de plantas. A determinação do calor produzido e das taxas respiratórias sob condições onde a fosforilação oxidativa, a AOX, a PUMP e o canal de K^+ estejam operando simultaneamente, e progressivamente regulados, aumentaria significativamente o nosso conhecimento sobre o papel dessas vias dissipativas.

3.11 Ensaios preliminares de ligação entre o ácido linoléico e a AtPUMP1 por microcalorimetria

A concentração de AtPUMP1 utilizada neste ensaio foi de 3 μM . O procedimento dos ensaios de ligação está descrito em “Materiais e Métodos”.

termograma com AtPUMP1 (azul)

termograma controle (preto)

termograma final = termograma com AtPUMP1 – termograma controle

A partir do termograma final foi construída a isoterma de ligação. Nesta curva, plota-se o calor gerado por cada injeção de ácido linoleico contra a razão molar de ligante (ácido linoleico) / macromolécula (AtPUMP1) na cela.

A isoterma de ligação foi ajustada conforme as equações descritas em “Materiais e Métodos”, para dois sítios de ligação. O ajuste não linear foi feito com o uso do programa Origin 5.0™. Esse ajuste forneceu os valores de constante de associação (K_a), variações de entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS) da ligação. Com esses valores foi calculada a variação de energia livre (ΔG).

Os valores das constantes de associação determinadas para os dois sítios foram: $K_{a1} = 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $K_{a2} = 6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Portanto, a AtPUMP1 possui, provavelmente, dois sítios de ligação para o ácido linoleico.

4. Conclusões

A única proteína mitocondrial desacopladora que tem papel fisiológico estabelecido - regular a termogênese no tecido adiposo marrom - é a UCP1. Para as outras UCPs, em mamíferos e plantas, as funções fisiológicas, não foram totalmente elucidadas.

Uma propriedade comum à todas as proteínas desacopladoras mitocondriais é a ativação por ácidos graxos livres (FFA). Quanto à inibição por nucleotídeos de purina (PN), as diferenças nos valores de K_i mostram que as concentrações inibitórias, e portanto a importância fisiológica desta inibição, pode variar entre as UCPs.

O uso de modelos para o estudo funcional das UCPs foi muito adequado. Com exceção da UCP4 e da BMCP1, todas as UCPs de mamíferos foram isoladas de mitocôndrias e reconstituídas em proteolipossomos, assim como a PUMP e a *At*PUMP1 presentes em plantas. Através dos ensaios com proteolipossomos foi possível medir a ativação dessas UCPs por FFA e a inibição por PN sem a interferência de outros componentes mitocondriais.

Demonstraram que a PUMP é um desacoplador presente em mitocôndrias de plantas. Observamos que a PUMP foi claramente ativada por FFAs, porém, a inibição por nucleotídeos de purina não foi reprodutível. Além disso, a baixa concentração de PUMP usada nos ensaios de reconstituição foi um passo limitante para obter reprodutibilidade nas cinéticas de fluorescência com a sonda SPQ, principalmente nos ensaios de inibição empregando PN.

Após a obtenção da proteína recombinante *At*PUMP1, a mesma foi escolhida para substituir a PUMP nos ensaios de reconstituição, principalmente por causa da maior concentração de proteína disponível. Foi feita a caracterização funcional da *At*PUMP1 através de sua ativação por uma série de FFA e inibição por PN. Foram determinados os K_m s dependentes da estrutura para os FFA empregados, e os K_i s referentes aos PN. Foi observado também que a inibição por PN era sensível à variação de pH.

A partir da caracterização funcional da *AtPUMP1*, obtivemos fortes evidências para afirmar que a PUMP é uma proteína desacopladora mitocondrial em plantas.

A sonda ADIFAB, apropriada para a determinação precisa da distribuição de ácidos graxos de cadeia longa entre a fase aquosa e a bicamada permitiu determinar o coeficiente de partição do ácido linoleico.

A velocidade do efluxo de H^+ mediado pela *AtPUMP1* e ativado por ácido linoleico foi exponencialmente proporcional ao potencial transmembrânico, de acordo com os resultados publicados para a PUMP de batata (Jezek *et al.*, 1997) e para a UCP1 (Garli *et al.*, 1990).

A coenzima Q não é um cofator obrigatório para a ativação da *AtPUMP1*, visto que a *AtPUMP1* reconstituída foi claramente ativada por diversas concentrações de ácido linoleico na ausência da coenzima.

Foram obtidas as primeiras medidas diretas de liberação de calor em mitocôndrias quando a PUMP foi ativada por ácido linoleico. Foi demonstrado que há uma relação linear entre o oxigênio consumido e o calor produzido nas condições estudadas (ativação da PUMP, da AOX e do canal de K^+), usando-se succinato como substrato. É importante salientar que a PUMP não é responsável pela produção de calor mitocondrial total, ela contribui na somatória de todos os fenômenos que geram calor na mitocôndria.

A presença de mais de uma via dissipativa de prótons em plantas indica que a regulação da fosforilação oxidativa é complexa. A compreensão da termogênese nesses tecidos requer esclarecer os papéis da PUMP e da AOX nos vários estágios de desenvolvimento das plantas.

O papel fisiológico da PUMP não precisa ser, obrigatoriamente e unicamente, o de produzir calor em tecidos vegetais. A PUMP pode também estar envolvida na modulação da fosforilação oxidativa, desacoplando-a da cadeia de transporte de elétrons quando a demanda de síntese de ATP é baixa (estado 4). Além disso, o desacoplamento mediado pela PUMP poderia evitar a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), como consequência da diminuição do potencial transmembrânico.

5. BIBLIOGRAFIA

- Affourtit C., Krab, K., Moore, A. L. (2001) Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**: 58 –69.
- Almeida, A. M., Jarmuszkiewicz, W., Khomsi, H., *et al.* (1999) Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Plant Physiol.*, **119** (4):1323-1330.
- Anel, G., Richieri, G. V., Kleinfeld, A. M. (1993) Membrane partition of fatty acids and inhibition of T cell function. *Biochemistry*, **32**: 530 – 536.
- Aquila, H., Link, T. A., Klingenberg, M. (1985) The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.*, **4** (9): 2369-2376.
- Beavis, A. D., Vercesi, A. E. (1992) Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg⁽²⁺⁾-insensitive inner membrane anion channel. *J. Biol Chem.*, **267** (5): 3079-3087.
- Borecky, J., Maia, I. G., Costa, A. D. T., *et al.* (2001) Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* Plant Uncoupling Mitochondrial Protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **505**: 240-244.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., *et al.* (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, **408**: 39-42.
- Boullaud, F., Couplan, E., Pecqueur, C., *et al.* (2001) Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**: 107-119.
- Canton, M., Gennari, F., Luvisetto, S., *et al.* (1996) The nature of uncoupling by n-hexane, 1-hexanethiol and 1-hexanol in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1274** (1-2): 39 - 47.
- Chauveau, M., Lance, C. (1982) Respiration and thermogenesis in Araceae. *B. Soc. Bot. Fr.*, **129**: 123-134.

- Chomiki, N., Voss, J. C., Warden, C. H. (2001) Structure-function relationships in UCP1, UCP2 and chimeras – EPR analysis and retinoic acid activation of UCP2. ***Eur. J. Biochem.***, **268**: 903 – 913.
- Clarkson, A. B. Jr., Bienen, E. J., Pollakis, G., *et al.* (1989) Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. ***J. Biol Chem.***, **264** (30):17770-17776.
- Costa, A. D., Nantes, I. L., Jezek, P., *et al.* (1999) Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. ***J. Bioenerg Biomembr.***, **31** (5):527-33.
- Cruz-Hernandez, A., Gomez-Lim, M. A. (1995) Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica*, L.) is diferentially regulated during fruit ripening. ***Planta***, **197** (4): 569-576.
- Day, D. A., Whelan, J., Millar, A. H., *et al.* (1995) Regulation of the the Alternative Oxidase in plants and fungi. ***Aust. J. Plant Physiol.***, **22** (3): 497-509.
- Devlin, T. M. (1997) "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations". ***Wiley-Liss***, Inc.
- Dey, P. M., Harborne, J. B. (1997) "Plant Biochemistry". ***Academic Press, Inc.***
- Douce, R. D., Bourguignon, J., Brouquisse, R., *et al.* (1987). Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. ***Meth. Enzymol.***, **148**: 403-409.
- Dulley, J. R., Grieve, P. A. (1975) A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. ***Anal. Biochem.***, **64**: 136-141.
- Eadie, G. S. (1952) ***J. Biol. Chem.***, **146**: 85-93.
- Ecthay, K. S., Winkler, E., Klingenberg, M. (2000) Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. ***Nature***, **408**: 609-613.
- Ecthay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, M. B. J., *et al.* (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. ***Nature***, **415**: 96 - 99.

- Fendler, J. H. (1982) "Membrane Mimetic Chemistry", *John Wiley & Sons Inc.*
- Frey, T.G., Manella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *TIBS*, **25**: 319-324.
- Garlid, K. D., Beavis, A. D., Ratkje, S. K. (1989) On the nature of ion leaks in energy-transducing membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, **976**: 109-120.
- Garlid, K. D. (1990) New insights into mechanisms of anion uniport through the uncoupling protein of brown adipose-tissue mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, **1018** (2-3): 151-154.
- Garlid, K. D., Orosz, D. E., Modrianský, M., *et al.* (1996) On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling proteins. *J. Biol. Chem.*, **270**: 2615-2620.
- Garlid, K. D., Jaburek, M., Jezek, P. (1998) The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.*, **438**: 10-14.
- Garlid, K. D., Jaburek, M., Jezek, P., *et al.* (2000) How do uncoupling proteins uncouple?. *Biochem. Biophys. Acta*, **1459**: 383-389.
- Geraldes-Laakso, S., Arrabaça, J. D. (1997) Respiration and heat production by soybean hypocotyl and cotyledon mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.*, **35**: 897-903.
- Gimeno, R., Dembski, M., Weng, X. *et al.* (1997) Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes*, **46** (5) 900-906.
- Greenberg, C. S., Craddock, P. R. (1982) Rapid single-step membrane protein assay. *Clinical Biochem.*, **28** (7): 1725-1726.
- Grover, S. D., Laties, G. G. (1978) Separate loci of inhibition of cyanide resistant respiration by disulfiram and SHAM. *Plant Physiol.*, **61** (4): 84.
- Heaton, G. M., Nicholls, D. G. (1977) The structural specificity of the nucleotide-binding site and the reversible nature of the inhibition of proton conductance induced by bound nucleotides in brown-adipose-tissue mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.*, **5** (1): 210-212.

- Hensley, J. R., Hanson, J. B. (1975) Action of valinomycin in uncoupling corn mitochondria. ***Plant Physiol.***, **56** (1): 13-18.
- Hofstee, B.H.J. (1952) On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions. ***Science***, **116**: 329-331.
- Hofstee, B. H. J. (1959) ***Nature***, **184**: 1296-1298.
- Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K., *et al.* (1991) ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. ***Nature***, **352**: 244-247.
- Ito, K. (1999) Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). ***Plant Sci.***, **149** (2): 167-173.
- Jaburek, M. Varecha, M., Gimeno, R. E., *et al.* (1999) Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. ***J. Biol Chem.***, **274**: 26003-26007.
- Jaburek, M. Varecha, M., Jezek, P., *et al.* (2001) Alkylsulfonates as probes of uncoupling protein transport mechanism. ***J. Biol Chem.***, **276**: 31897-31905.
- Jaburek, M., Jezek, P., Garid, K. D. (2002) Coenzyme Q is not an obligatory cofactor of UCP2- and UCP3- catalysed proton transport. ***Biophys. J. (Annual Meeting Abstracts)***: 109a.
- Jarmuszkiewicz, W., Wagner, A. M., Wagner, M. J., *et al.* (1997) Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. ***FEBS Lett.***, **411** (1): 110-114.
- Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C. M., Hryniewiecka, L., *et al.* (1999) Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. ***J. Biol. Chem.***, **274** : 23198-23202.
- Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., *et al.* (2000) First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. ***FEBS Lett.***, **467**: 145-149.

- Jezek, P., Freisleben, H. J. (1994) Fatty acid binding site of the mitochondrial uncoupling protein. Demonstration of its existence by EPR spectroscopy of 5-Doxyl-stearic acid. *FEBS Lett.*, **343** (1): 22-26.
- Jezek, P., Orosz, D. E., Modrianský, M., *et al.* (1994) Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **269**: 26184-26190.
- Jezek, P., Costa, A. D.T., Vercesi, A. E. (1996) Evidence for anion-translocating Plant Uncoupling Mitochondrial Protein in potato mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **271**: 32743-32748.
- Jezek, P., Costa, A. D. T., Vercesi, A. E. (1997) Reconstituted Plant Uncoupling Mitochondrial Protein allows for proton translocation via fatty acid cycling Mechanism. *J. Biol. Chem.*, **272** (39) 24272-24278.
- Jezek, P., Modrianský, M., Garlid, K. D. (1997) Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer. *FEBS Lett.*, **408**: 161-165.
- Jezek, P., Modrianský, M., Garlid, K. D. (1997) A structure-activity study of fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling protein. *FEBS Lett.*, **408**: 166-170.
- Jezek, P., Engstová, H., Zacková, M., *et al.* (1998) Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**: 319-327.
- Jezek, P., Garlid, K. D. (1998) Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**: 1163 – 1168.
- Jezek, P., Zácková, M., Kosarova, J., *et al.* (2000) Occurrence of Plant-Uncoupling Mitochondrial Protein (PUMP) in diverse organs and tissues of several plants. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **32**: 549-561.
- Kaplan, R.S., Pedersen, P.L. (1985) Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B. *Anal. Biochem.*, **150** (1): 97 – 104.
- Kapulnik, Y., Yalpani, N., Raskin, I. (1992) Salicylic acid induces cyanide-resistant respiration in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, **100**: 1921-1926.

- Kingsley, G.R. (1972) Procedure for serum protein determinations. In: **Standard Methods of Clinical Chemistry**, vol. 7, p.199. Ed. G.R. Cooper. Academic Press, New York.
- Klaus, S., Casteilla, L., Bouillaud, F., *et al.* (1991) The Uncoupling Protein UCP: A membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. **Int. J. Biochem.**, **23** (9) 791-801.
- Kleinfeld, A. M., Chu, P., Romero, C. (1997) Transport of long chain native fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting. **Biochemistry**, **36** (46): 14146-14158.
- Klingenberg, M. (1990) Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. **Trends Bioch. Sci.**, **15**: 108-112.
- Klingenberg, M., Winkler, E., Huang, S. (1995) ADP/ATP carrier and uncoupling protein. **Methods Enzimol.**, **260**: 369-389.
- Klingenberg, M., Winkler, E., Echtay, K. (2001) Uncoupling protein, H⁺ transport and regulation. **Biochem. Soc. Trans.**, **29** (6): 806 – 811.
- Kowaltowski, A. J., Costa, A. D. T., Vercesi, A. E., (1998) Activation of the potato uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. **FEBS Lett.**, **425**: 213-216.
- Kowaltowski, A. J., Seetharaman, S., Paucek, P., *et al.* (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. **Am. J. Physiol.**, **80**: H649-H657.
- Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J. W., *et al.* (1997) A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**, **389**: 135-136.
- Laloi, M. (1999) Plant mitochondrial carriers: an overview. **Cell Mol Life Sci.**, **56** (11-12): 918-944.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227** (259): 680-685.

- Lambowitz, A. M., Sabourin, J. R., Bertrand, H. *et al.* (1989) Immunological identification of the Alternative Oxidase of *Neurospora-Crassa* mitochondria. ***Mol. Cell Biol.*, 9** (3): 1362-1364.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. ***J. Am. Chem. Soc.*, 56**: 658-666.
- Locke, R. M., Rial, E., Nicholls, D. G. (1982) The acute regulation of mitochondrial proton conductance in cells and mitochondria from the brown fat of cold-adapted and warm-adapted guinea pigs. ***Eur. J. Biochem.*, 129**: 381 – 387.
- Locke, R. M., Rial, E., Scott, I. D., *et al.* (1982) Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown-fat mitochondria. ***Eur. J. Biochem.*, 207**: 135-145.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. R., *et al.* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. ***J. Biol. Chem.*, 193** :265-275.
- Maia, I. G., Benedetti, C. E., Leite, A., *et al.* (1998) *AtPUMP*: an Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. ***FEBS Lett.*, 429**: 403-406.
- Mao, W., Xian, X. Y., Zhong, A., *et al.* (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. ***FEBS Lett.*, 443**: 326-330.
- Marzzoco, A., Torres, B. B. (1999) Bioquímica Básica, Segunda Edição. ***Editora Guanabara Koogan S.A.***
- Meeuse, B. J. D. (1975) Thermogenic Respiration in Aroids. ***Annu. Rev. Plant Phys.*, 26**: 117-126.
- Monemdjou, S., Kozak, L. P., Harper, M. (1999) Mitochondrial proton leak in brown adipose tissue mitochondria of Ucp1-deficient mice is GDP insensitive. ***Amer. J. Physiol.*, 276**: E1073-E1082.
- Nantes, I. L., Fagian, M. M., Catisti, R., *et al.* (1999) Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria. ***FEBS Lett.*, 457**: 103-106.

- Nicholls, D. G. (1976) The bioenergetics of brown adipose tissue. *FEBS Lett.*, **61**: 103-110.
- Ordentlich, A., Linzer, R. A., Raskin, I. (1991) Alternative Respiration and Heat Evolution in Plants. *Plant Physiol.*, **97**: 1545-1550.
- Orosz, D. E., Garlid, K. D. (1993) A sensitive new fluorescence assay for measuring proton transport across liposomal membranes. *Anal. Biochem.*, **210** (1): 7-15.
- Ortolan, T. G. (1998) Proteína Mitochondrial Desacopladora de Plantas: Purificação e estudo do mecanismo de transporte de H⁺. *Relatório FAPESP/Mestrado*.
- Packer, L., Fleischer, S. (1997) "Biomembranes", *Academic Press*.
- Pastore, D., Stoppelli, M. C., Di Fonzo, N., *et al.* (1999) The existence of a K⁺ Channel in Plant Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **274**: 26683-26690.
- Peterson, G.L. (1977) A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry *et al.* Which is More Generally Applicable. *Anal. Biochem.*, **83**: 346-356.
- Prendergast, F., Meyer, M., Carlson, G. L., *et al.* (1983) Synthesis, spectral properties, and use of 6-Acryloyl-2-dimetilaminonaphthalene (Acrylodan) – A THIOL-SELECTIVE, POLARITY-SENSITIVE FLUORESCENT PROBE. *J. Biol. Chem.* **258**: 7541-7544.
- Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F. *et al.* (2001) An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem. J.*, **353**: 441- 444.
- Rial, E., González-Barroso, M. M. (2001) Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**: 70-81.
- Richieri, G. V., Ogata, R. T., Kleinfeld, A. M. (1995) Thermodynamics of fatty acid binding to proteins and fatty acid partition between water and membranes measured using the fluorescent probe ADIFAB. *J. Biol. Chem.*, **270** (25): 15076-15084.

- Richieri, G. V., Ogata, R. T., Kleinfeld, A. M. (1992) A fluorescent labeled Intestinal Fatty Acid Binding Protein – INTERACTIONS WITH FATTY ACIDS AND ITS USE IN MONITORING FREE FATTY ACIDS. *J. Biol. Chem.*, **33**: 23495 -23501.
- Ricquier, D., Kader, J. C. (1976) Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73** (3): 577-583.
- Ricquier, D., Gaillard, J. L., Turc, J. M. (1979) Microcalorimetry of isolated mitochondria from brown adipose tissue. Effect of guanosine-diphosphate. *FEBS Lett.*, **99** (1): 203-206.
- Ricquier, D., Bouillaud, F. (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.*, **345**: 161-179.
- Rhodes, D. N., LEA, C. H. (1957) Phospholipids Composition .4. of Hen Egg Phospholipids. *Biochem. J.*, **65** (3): 526-533.
- Rodríguez, V. M., Macarulla, M. T., Chávarri, M. et al. (2002) Papel de las proteínas desacoplates en la obesidad. *ANALES Sis San Navarra* **2002**, **25** (Supl. 1): 65-77.
- Sacchettini, J., Gordon, J. I., Banaszak, L. J. (1989) Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. *J. Mol. Biol.*, **208**: 327-339.
- Sakajo, S., Minagawa, N., Komiyama, T. et al. (1991) Molecular-cloning of cDNA for Antimycin A-inducible messenger-RNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula-Anomala*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1090** (1): 102-108.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N. et al. (1998) BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.*, **273**: 34611-34615.
- Seymour, R. S. (1997) Plants that warm themselves. *Sci. Am.*, **276**: 90-95.
- Siedow, J. N., Umbach, A. L. (1995) Plant mitochondrial electron-transfer and molecular-biology. *Plant Cell*, **7** (7): 821-831.

- Skubatz, H., Williamson, P. S., Schneider, E. L., *et al.* (1990) Cyanide-insensitive respiration in thermogenic flowers of *Victoria* and *Nelumbo*. *J. Exp. Bot.*, **41** (231): 1335-1339.
- Skulachev, V. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.*, **294**: 158-162.
- Skulachev, V. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1363** (2): 100 -124.
- Sluse, F. E., Jarmuszkiewicz, W. (1998) Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz. J. Med. and Biol. Res.*, **31**: 733 – 747.
- Stryer, L. (2000) "Biochemistry". *W. H. Freeman and Company, New York*.
- Stuart, J. A., Harper, J. A., Brindle, K. M. *et al.* (1999) Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **1413**: 50 - 54.
- Stuart, J. A., Cadenas, S., Jekabsons, M. B. *et al.* (2001) Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**: 144 - 158.
- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L. (1997) Alternative oxidase: From gene to function. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **48**: 703-734.
- Vercesi, A. E., Martins, I. S., Silva, M. A., *et al.* (1995) PUMPing plants. *Nature*, **375**: 24.
- Vercesi, A. E. (2001) A proteína da hibernação – Plantas e animais têm mecanismos semelhantes de resistência ao frio. *Revista Pesquisa Fapesp*, Edição **65**, 06/2001.
- Voet, D., Voet, J. G. (1990) "Biochemistry", *John Wiley & Sons Inc.*
- Wadsö, L., Smith., A.L., Shirazi, H., *et al.* (2001) The isothermal heat conduction calorimeter: A versatile instrument for studying processes in physics, chemistry, and biology. *J. Chem. Educ.*, **78** (8): 1080 -1086.

- Watanabe, A., Nakazono, M., Tsutsumi, N. et al. (1999) AtUCP2: A novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **40**: 1160-1166.
- Wayne, C. E., Wayne, R. P. (1996) "Photochemistry". *Oxford University Press*.
- Weger, H. G., Guy, R. D. (1991) Cytochrome and alternative pathway respiration in white Spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) Roots. Effects of growth and measurement temperature. *Physiologia Plantarum*, **83**: 675-681.
- Winkler, E., Klingenberg, M. (1992) An improved procedure for reconstitution of the uncoupling protein and in-depth analysis of H^+/OH^- transport. *Eur. J. Biochem.*, **207**: 135-145.
- Winkler, E., Klingenberg, M. (1994) Effect of fatty acids on H^+ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *Eur. J. Biochem.*, **269**: 2508-2515.
- Wojtczak, L., Wieckowski, M. R., Schonfeld, P. (1998) Protonophoric activity of fatty acid analogues and derivatives in the inner mitochondrial membrane: a further argument for the fatty acid cycling model. *Arch. Biochem. Biophys.*, **357** (1): 76 – 84.