

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA DA PROTEÍNA
DESACOPLADORA DE PLANTAS (pUCP) E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Vigna*
unguiculata (L.) WALP

FRANCISCO EDSON ALVES GARANTIZADO

FORTALEZA – CE

2012

**CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA DA PROTEÍNA
DESACOPLADORA DE PLANTAS (pUCP) E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSES ABIÓTICOS EM
Vigna unguiculata (L.) WALP**

FRANCISCO EDSON ALVES GARANTIZADO

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM BIOQUÍMICA.

ORIENTADORA: Prof^{ta}. Dra. Dirce Fernandes de Melo

FORTALEZA – CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- G193c Garantizado, Francisco Edson Alves.
 Caracterização da família multigênica da proteína desacopladora de plantas (pUCP) e regulação da expressão gênica sob diferentes condições de estresses abióticos em *vigna unguiculata* (L.) walp / Francisco Edson Alves Garantizado. – 2012.
 152 f. : il. color. enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
 Área de concentração: Bioquímica Vegetal.
 Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.
 Coorientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.
1. *Vigna unguiculata*. 2. Proteínas de Plantas. I. Título.

CDD 574.192

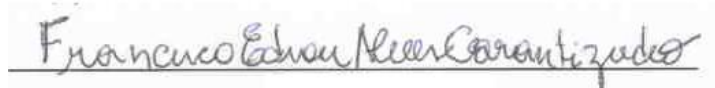
AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, pelo apoio e suporte na realização dos experimentos deste trabalho.

Esta tese foi feita e apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, encontrando-se a disposição dos interessados na Coordenação do curso.

A transcrição de qualquer trecho desta tese será permitida desde que seja feita de acordo com as normas de ética científica.



Francisco Edson Alves Garantizado

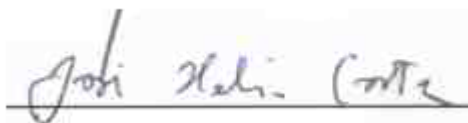
Defesa formal de tese aprovada em 29 de maio de 2012 pela banca Examinadora constituída por:



Prof^ª. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFC

Orientadora



Prof. Dr. José Hélio Costa

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular/UFC

Co-Orientador/Examinador



Examinador(a)

Prof^º. Dr. Ivan de Godoy Maia

Depto Genética/Unesp- São Paulo

Conselheiro



Dra. Maria Lúcia Torres - Franklin

Depto. Bioquímica /UECE

Conselheiro



Profa Dra. Elena Graciela Orellano

Universidade nacional Rosário - Argentina

Conselheiro

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO.....	01
Relações filogenéticas e estrutura dos genes da família de pUCPs/UCPs	15
AS pUCPs E ESTRESSES	18
OBJETIVOS.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Identificação <i>in silico</i> dos genes/cDNAs de pUCPs em <i>Vigna unguiculata</i>	36
Identificação <i>in silico</i> dos genes de pUCPs das fabales [<i>Cajanus cajan</i> (Cc), <i>Glycine max</i> (Gm), <i>Medicago truncatula</i> (Mt) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (Pv)]	36
Alinhamento de sequências e análise filogenética	37
MATERIAL VEGETAL	37
Obtenção e Germinação das sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	37
Desenho de primers para estudo da expressão gênica das pUCPs de <i>Vigna unguiculata</i>	38
Extração de RNA total.....	42
Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total.....	43
Ensaio de expressão dos genes da Pucp.....	44

Transcrição reversa (RT)	44
Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) Semi-quantitativa	46
Eletroforese do cDNA amplificado	46
Reação em Cadeia da DNA Polimerase por qPCR (PCR em Tempo Real)	49
RESULTADOS	50
Identificação in silico dos genes/cDNAs de pUCPs em <i>Vigna unguiculata</i>	50
Identificação in silico dos genes de pUCPs em plantas da ordem das fabales	50
Expressão de gene(s) da pUCP em <i>Vigna unguiculata</i> por RT-PCR semi-quantitativa	74
Expressão de gene(s) da pUCP em <i>Vigna unguiculata</i> por RT-PCR Quantitativa (qPCR).....	78
DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial de plantas	02
Figura 2 – Características estruturais dos membros da Família Carreadora de Ânions Mitocondriais (FCAM).....	08
Figura 3 – Relações filogenéticas da família das proteínas desacopladoras (UCPs) e carreadores mitocondriais pertencentes a FCAM com alta homologia.....	09
Figura 4 - Modelo estrutural da proteína AtPUMP1 mantendo regiões conservadas	10
Figura 5 - Modelos hipotéticos propostos para os mecanismos de passagem de prótons H ⁺ do espaço intermembrana para a matriz.....	14
Figura 6 - Árvore filogenética não enraizada de 5 subfamílias de UCPs.....	16
Figura 7 - Estrutura gênica das pUCPs de arroz e Arabidopsis.....	17
Figura 8 - Modelo de ativação dos carreadores mitocondriais (UCPs e ANT) pelo superóxido através da peroxidação lipídica.....	25
Figura 9 - Modelo de ativação das UCPs por ROS como uma função ancestral das UCPs	26
Figura 10 - Sequência de nucleotídeos do cDNA e de aminoácidos deduzidos da UCP1a de <i>Vigna unguiculata</i>	51
Figura 11 - Sequência genômica parcial do gene UCP1b de <i>Vigna unguiculata</i>	52
Figura 12 - Sequência de nucleotídeos 5' parcial do cDNA e de aminoácidos deduzidos da UCP2 de <i>Vigna unguiculata</i>	53
Figura 13 - Sequência de nucleotídeos do cDNA e de aminoácidos deduzidos da UCP3 de <i>Vigna unguiculata</i>	54

Figura 14 - Sequência de nucleotídeos do cDNA e de aminoácidos deduzidos da UCP4 de <i>Vigna unguiculata</i>	55
Figura 15 - Sequência de nucleotídeos do cDNA e de aminoácidos deduzidos da UCP5 de <i>Vigna unguiculata</i>	56
Figura 16 - Estrutura gênica (exons / introns) de pUCP1 (A) e pUCP2 (B) das plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) [ordem Brassicales] e <i>Cajanus cajan</i> (Cc), <i>Glycine max</i> (Gm), <i>Medicago truncatula</i> (Mt) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (Pv) [ordem Fabales]	59
Figura 17 - Estrutura gênica (exons / introns) das pUCPs 3 (A), 4 (B), 5 (C) e 6 (D) das plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) [ordem Brassicales] e <i>Cajanus cajan</i> (Cc), <i>Glycine max</i> (Gm), <i>Medicago truncatula</i> (Mt) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (Pv) [ordem Fabales]	60
Figura 18 - Alinhamento de pUCPs dos tipos 1 e 2 de <i>Vigna unguiculata</i> e demais representantes da ordem Fabales	63
Figura 19 - Alinhamento de pUCPs do tipo 3 de <i>Vigna unguiculata</i> e demais representantes da ordem Fabales	65
Figura 20 - Alinhamento de pUCPs dos tipos 4 e 5 de <i>Vigna unguiculata</i> e demais representantes da ordem Fabales	67
Figura 21 - Árvore filogenética das UCPs de plantas da ordem Fabales (<i>Cajanus cajan</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Medicago truncatula</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i>) e <i>Arabidopsis thaliana</i> (ordem Brassicales).....	73
Figura 22 - Expressão diferencial dos genes <i>VuUCP1a</i> e <i>VuUCP1b</i> em folhas de <i>Vigna unguiculata</i> nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas de estresse com NaCl 100 mM, PEG 200,67 g/L, H ₂ O ₂ 10 mM, Cisteína 1 mM, ácido salicílico 0,5 Mm.....	76
Figura 23 - Expressão diferencial dos genes <i>VuUCP1a</i> , <i>VuUCP1b</i> , <i>VuUCP2</i> , <i>VuUCP3</i> , <i>VuUCP4</i> e <i>VuUCP5</i> em folhas de <i>Vigna unguiculata</i> nos tempos de 0, 3, 6, 12 e 24 horas de estresse pelo frio a 4° C.....	77

Figura 24 - Nível de expressão dos transcritos do gene <i>VuUCP1a</i> normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo <i>Eflα</i> em raízes (a) e folhas (b) de <i>Vigna unguiculata</i> com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H ₂ O ₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR.....	80
Figura 25 - Nível de expressão dos transcritos do gene <i>VuUCP1b</i> normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo <i>Eflα</i> em raízes (a) e folhas (b) de <i>Vigna unguiculata</i> com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H ₂ O ₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR.....	81
Figura 26 - Nível de expressão dos transcritos do gene <i>VuUCP2</i> normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo <i>Eflα</i> em raízes (a) e folhas (b) de <i>Vigna unguiculata</i> com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H ₂ O ₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR.....	82
Figura 27 - Nível de expressão dos transcritos do gene <i>VuUCP3</i> normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo <i>Eflα</i> em raízes (a) e folhas (b) de <i>Vigna unguiculata</i> com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H ₂ O ₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR.....	83
Figura 28 - Nível de expressão dos transcritos do gene <i>VuUCP4</i> normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo <i>Eflα</i> em raízes (a) e folhas (b) de <i>Vigna unguiculata</i> com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H ₂ O ₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR.....	84

Figura 29 - Nível de expressão dos transcritos do gene *VuUCP5* normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo *Efl α* em raízes (a) e folhas (b) de *Vigna unguiculata* com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H₂O₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers específicos usados em ensaios de PCR semi-quantitativa	40
Tabela 2 – Primers específicos usados em ensaios de PCR quantitativa (qPCR)	41
Tabela 3 - Mistura de reação da transcrição reversa usando RNA total de <i>Vigna unguiculata</i>	45
Tabela 4 - Mistura da reação de PCR para amplificação do(s) gene(s) da pUCP de <i>Vigna unguiculata</i>	47
Tabela 5 - Programa de PCR utilizado para amplificação do(s) gene(s) da pUCP em <i>Vigna unguiculata</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS

FCAM – Família Carreadora de ânions Mitocondriais

AOX – Oxidase Alternativa

pUCP – Proteína desacopladora de planta

SPTe – Sinal Protéico de Transferência de Energia

TAM – Tecido Adiposo Marrom

PUMP – Plant Uncoupling Mitochondrial Protein – “Proteínas Mitocondriais Desacopladoras de Plantas”

EROs – Espécies Reativas do Oxigênio

PNBD – Putative Nucleotide Binding Domain – “Domínio de Ligação aos Nucleotídeos Purínicos”

RESUMO

As proteínas desacopladoras de planta (pUCP) estão localizadas na membrana mitocondrial interna e facilitam o transporte de prótons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial, desviando a passagem de H⁺ através da F1-ATPase, afetando assim a eficiência da fosforilação oxidativa, isto é, diminuindo a síntese de ATP acoplada ao funcionamento da cadeia transportadora de elétrons. Portanto, essas proteínas são responsáveis pela dissipação do gradiente eletroquímico de H⁺, gerado pela respiração, liberando calor para o ambiente. Tais proteínas pertencem a Família de Carreadores de Ânions Mitocondriais (FCAM) e são codificadas por famílias multigênicas. Sua função ainda não está completamente elucidada, mas a literatura sugere participação na adaptação a situações de estresses bióticos e abióticos e na proteção da célula evitando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). Sua participação na termogênese adaptativa é questionável. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a família multigênica da pUCP em *Vigna unguiculata* (L.) Walp bem como sua regulação através da expressão gênica em resposta a diferentes estresses abióticos. Sementes de *Vigna unguiculata* foram germinadas em papel umedecido com água, no escuro e após 3 dias as plântulas foram transferidas para solução de Hoagland durante 3 dias antes da aplicação dos estresses. As raízes e as folhas foram coletadas com 0, 6, 12 e 24 horas, após respectivas adições de NaCl 100 mM, PEG 200,67 g/L, H₂O₂ 10 mM e ácido salicílico 5 mM, para caracterizar a família multigênica e o perfil de expressão dos genes da pUCP por RT-PCR semiquantitativa e por PCR em tempo real (qPCR). Primers específicos foram desenhados com base nas sequências de cDNAs/genes de pUCPs identificadas em *Vigna unguiculata* usando a ferramenta PerlPrimer. A amplificação do cDNA da actina foi usada para a normalização dos dados de RT-PCR semi-quantitativa e três genes constitutivos foram usados na normalização dos dados da qPCR: 2 genes para actina (actinas 4 e 5) e 1 gene para o fator de alojamento 1- α (EF1 α). Análise in silico revelou que a pUCP na ordem Fabales é codificada por pelo menos seis genes com duplicação do gene pUCP do tipo 1 (1a e 1b) e deleção do gene pUCP6. A família multigênica da pUCP, constituída de 6 genes, então foi identificada em *Vigna unguiculata* (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5*). O alinhamento de sequências nucleotídicas e de aminoácidos das

espécies da ordem Fabales incluindo as de *Vigna unguiculata*, revelou 3 sequências conservadas denominadas Sinal Protéico de Transferência de Energia (SPTe), além de 4 domínios específicos que caracterizam existência de pUCPs verdadeiras em *Vigna unguiculata*. O gene *VuUCP1a* foi expresso constitutivamente em folhas e raízes, contrastando com *VuUCP1b*, cuja expressão foi modulada em função dos estresses e de tecidos. Em raízes a expressão do *VuUCP1b* aumentou em resposta a todos os tratamentos (PEG, NaCl, H₂O₂ e ácido salicílico) enquanto que em folhas a expressão não aumentou em resposta ao NaCl. *VuUCP2* teve a expressão inibida em resposta ao PEG em folhas. *VuUCP4* apresentou expressão constitutiva em resposta aos estresses em ambos os tecidos, enquanto que *VuUCP3* e *VuUCP5* apresentaram indução de expressão por vários estresses dependente do tecido. A identificação da família multigênica das pUCPs em *Vigna unguiculata* e seu perfil de expressão gênica diferencial, em função do estresse aplicado e do tecido estudado, põe em evidência um possível papel dessa proteína nos mecanismos de ajustamento das plantas aos estresses ambientais.

Palavras-chave: Proteínas desacopladoras de planta (pUCP); *Vigna unguiculata*; Estresses abióticos.

ABSTRACT

The plant uncoupling proteins (pUCP) are located in the inner mitochondrial membrane and facilitate the proton translocation across the intermembrane space into the mitochondrial matrix, deflecting the passage of H⁺ by F1-ATPase activity, thus affecting the efficiency of oxidative phosphorylation, i.e decreasing the synthesis of ATP coupled to the operation of the electron transport chain. Therefore, these proteins are responsible for dissipating the electrochemical gradient of H⁺, generated by respiration, releasing heat to the environment. These proteins belong to family of carriers Mitochondrial Anion (FCAM) and are encoded by multigene families. Their function is not yet fully elucidated, but the literature suggests involvement in adapting to biotic and abiotic stresses and cell protection by avoiding the production of reactive oxygen species (ROS). Their participation in adaptive thermogenesis is unclear. The aim of this work was to characterize the multigene family of pUCP in *Vigna unguiculata* (L.) Walp and their regulation through gene expression in response to different abiotic stresses. *Vigna unguiculata* seeds were germinated on paper imbibed water in the dark. Three days after germination the seedlings were transferred to Hoagland solution for 3 days before application of stress. Roots and leaves were collected at 0, 6, 12 and 24 hours after addition of the respective 100 mM NaCl, 200.67 g / L PEG, 10 mM H₂O₂ and 5 mM salicylic acid to characterize the profile of multigene family expression of genes for pUCP by semiquantitative RT-PCR and real-time PCR (qPCR). Specific primers were designed based on the sequences of cDNA / gene identified in pUCPs *Vigna unguiculata* using the PerlPrimer tool. Amplification of cDNA of *actin* was used to normalize the data for RT-PCR semi-quantitative and three constitutive genes were used to normalize the data of qPCR: 2 to actin gene (actin 4 and 5) and a gene for factor elongation 1- α (EF1 α). *In silico* analysis revealed that in Fabales order pUCP is encoded by at least six pUCPs genes presenting a duplication of the gene type 1 (1a, 1b) and a pUCP6 gene deletion. The multigene family of pUCP, consisting of six genes was then identified in *Vigna unguiculata* (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* and *VuUCP5*). The alignment of amino acid and nucleotide sequences of the species of Fabales order including *Vigna unguiculata*, revealed three

conserved sequences called signal Energy Transfer Protein (SPTE), and four domains (or regions or sites) existence of specific true pUCPs in *Vigna unguiculata*. *VuUCP1a* gene was constitutively expressed in leaves and roots, contrasting with *VuUCP1b*, whose expression was modulated in a stress and tissue-dependent manner. The *VuUCP1b* expression increased in response to all treatments (PEG, NaCl, H₂O₂ and salicylic acid) in roots, whereas the expression in leaves did not increase in response to NaCl. *VuUCP2* expression was inhibited in response to PEG in leaves. *VuUCP4* showed constitutive expression in response to stresses in both tissues, while *VuUCP3* and *VuUCP5* showed induction of expression by various stresses depending on the tissue type. The identification of the multigene family of pUCPs in *Vigna unguiculata* and its gene expression profile in different tissues and stress conditions highlights a possible role of this protein in the adjustment of plants to environmental stresses.

Key-words: Plant uncoupling protein (pUCP); *Vigna unguiculata*; Abiotic stress

INTRODUÇÃO

A mitocôndria é a principal fonte de produção de energia intracelular e é a resposta evolucionária para o principal desafio que os organismos vivos enfrentam no tocante a obtenção de energia do meio ambiente para suprir suas funções biológicas (HUGHES; CRISCUOLO, 2008). Essa produção de energia está associada à oxidação dos compostos orgânicos, como lipídeos e carboidratos com liberação de CO₂ e redução de O₂ a água, através do funcionamento de uma cadeia transportadora de elétrons (CTE), localizada na membrana mitocondrial interna. Tal transporte está acoplado ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranar gerando um gradiente eletroquímico ($\Delta\mu H^+$), utilizado pela ATP Sintase para produzir ATP, composto rico em energia, a partir de ADP e Pi (AZZU *et al.*, 2010; DIETRICH; HORVATH, 2010; MAILLOUX; HARPER, 2011). Este processo, denominado fosforilação oxidativa, tem como pressuposto a impermeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons (MITCHELL, 1961). Contudo, o processo da fosforilação oxidativa não é perfeito, pois os prótons podem retornar à matriz mitocondrial através de outras proteínas, denominadas desacopladoras, também presentes na membrana mitocondrial interna (HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004; DIVAKARUNI; BRAND, 2011). Particularmente, as proteínas desacopladoras (UCPs - Uncoupling proteins) catalisam o desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons da síntese de ATP e dessa forma estão envolvidas na regulação da fosforilação oxidativa (VERCESI *et al.*, 2006). Como consequência, o potencial de membrana é reduzido e a energia derivada da oxidação dos substratos é perdida na forma de calor. Assim, as UCPs desempenham papel fundamental em processos termogênicos, tais como manutenção da temperatura corporal em pequenos mamíferos, recém-nascidos, aclimatados ao frio e em mamíferos hibernantes (NICHOLLS; RIAL, 1999; HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004; BORECKÝ; VERCESI, 2005; VERCESI *et al.*, 2006; ITO-INABA *et al.*, 2009; CHIEN *et al.*, 2011) (Figura 1). A termogênese foi objeto de estudo no final dos anos 50 e início dos anos 60 quando se demonstrou que não somente a respiração fosforilante, mas também uma via desacopladora poderia ter importância fisiológica (SKULACHEV, 1958; SKULACHEV; MASLOV, 1960; SKULACHEV, 1963). Na década de 1970, identificou-se uma proteína de 32KDa, em tecido adiposo marrom

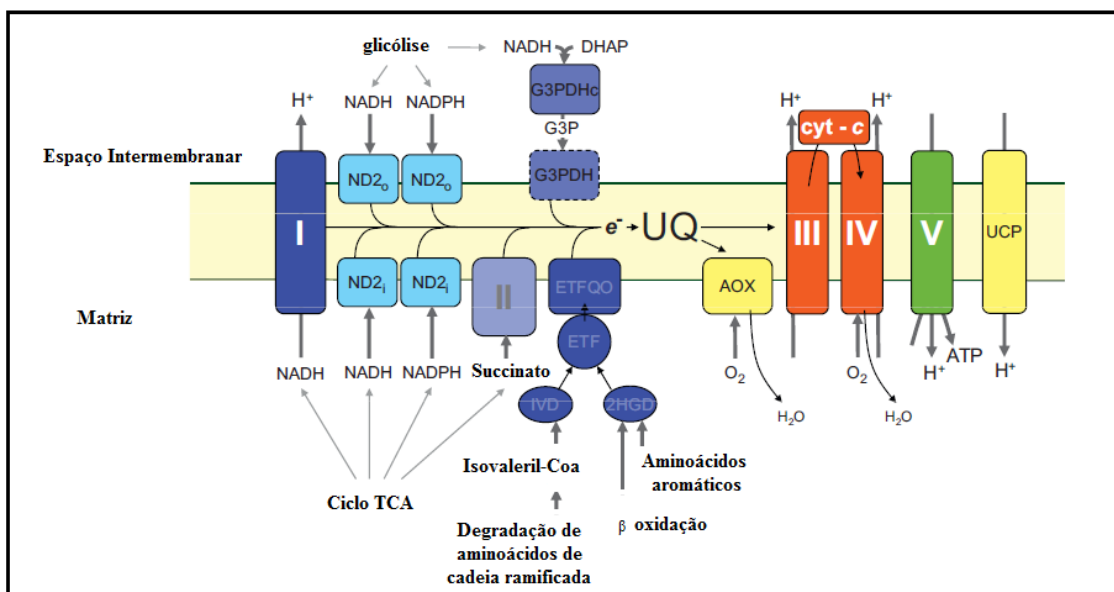


Figura 1- Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial de plantas. Complexos I-V: NADH desidrogenase, succinato desidrogenase, citocromo c redutase, citocromo c oxidase e ATP sintase, respectivamente. **2HGD**: Desidrogenase hidroxiglutarato; **AOX**: Oxidase alternativa; **cyt c**: citocromo c; **UCP**: proteína desacopladora. **ND2_o**: NADP (H) desidrogenase tipo II, localizado no exterior da membrana mitocondrial interna; **ND2_i**: NADP (H) desidrogenase tipo II, localizado no lado da matriz da membrana mitocondrial interna; **G3P**: glicerol-3-fosfatase; **G3PDH**: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; **IVD**: isovenil desidrogenase; **UQ**: ubiquinona (DONGEN *et al.*, 2011).

(TAM), envolvida no processo de termogênese, denominada termogenina, em decorrência de sua função (RICKIER; KADER, 1976). Por décadas, acreditou-se na existência dessa enzima exclusivamente no tecido adiposo marrom de mamíferos, sendo considerada marcadora de mitocôndria de origem animal, como resultado de uma aquisição evolucionária tardia (KLINGENBERG, 1990; NICHOLLS; RIAL, 1999; VERCESI *et al.*, 2006). Posteriormente, foram encontradas isoformas da termogenina em outros tecidos de origem animal, que foram nomeadas numericamente em função de sua descoberta, tendo como referência a termogenina que passou a ser chamada de UCP1. Foram identificadas UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5 ou BMCP (Proteína mitocondrial cerebral) (BOSS *et al.*, 1997; FLEURY *et al.*, 1997; SANCHIS *et al.*, 1998; MAO *et al.*, 1999; STUART *et al.*, 1999; VIANNA *et al.*, 2001; TALBOT *et al.*, 2003; HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004; SLUSE *et al.*, 2006).

Em 1995, Vercesi *et al.* identificaram uma enzima em mitocôndrias de tubérculo de batata com propriedades bioquímicas semelhantes à UCP1 encontrada em tecido adiposo marrom de animal e a nomearam PUMP (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein). A nomenclatura PUMP para proteína desacopladora de planta vem sendo substituída por pUCP (Proteína desacopladora de planta) para evitar equívocos com o termo PUMP (bomba de prótons), usado para transportadores envolvidos em processo de transporte ativo (BORECKÝ *et al.*, 2001a). A descoberta dessa enzima no Reino *Plantae* impulsionou a busca por novas UCPs homólogas em plantas, animais e demais eucariontes (FLEURY *et al.*, 1997; BOSS *et al.*, 1997; BOUILLAUD *et al.*, 2001; BORECKÝ *et al.*, 2001a; JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 1999, 2002; CAVALHEIRO *et al.*, 2004).

Em 2005, Sokolova & Sokolov hipotetizaram a existência da UCP6 em invertebrados, podendo esta representar um ancestral das UCPs dos tipos 1, 2 e 3 de vertebrados.

Em 1997, isto é, dois anos após a descoberta da pUCP, Laloi e colaboradores clonaram o primeiro cDNA codificando uma UCP homóloga de planta denominado *StUCP* em flores de batata. Seu perfil de expressão indicou a presença de RNAm em caules, raízes, flores e frutos (LALOI *et al.*, 1997). Desde então, numerosas UCPs homólogas foram identificadas em outras plantas, sendo essas descobertas responsáveis

pela intensificação do estudo dessa família de proteínas (JEŽEK, 2002; HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004; BORECKÝ; VERCESI, 2005).

Maia *et al.* (1998) identificaram em *Arabidopsis thaliana* o gene *AtUCP1*, inicialmente denominado *AtPUMP1*, apresentando alta similaridade com o gene *StUCP*. A identificação desses dois genes serviu como prova irrefutável da existência das UCPs em plantas (VERCESI *et al.*, 2006). O alinhamento das sequências de aminoácidos das pUCPs de *Solanum tuberosum* (StPUMP) e *Arabidopsis thaliana* (AtPUMP1) com sequências de UCPs de mamíferos notoriamente mostrou 41% de identidade das UCPs de plantas com a UCP1 de animais, bem como 43 e 46% de identidade para StPUMP e AtPUMP1 respectivamente em comparação à UCP2 (LALOI, 1999; RICQUIER; BOUILLAUD, 2000; JEŽEK; URBÁNKOVÁ, 2000).

Watanabe *et al.* (1999) identificaram o segundo cDNA em *Arabidopsis*, sendo nomeado *AtUCP2*, mesmo período em que outros dois genes foram identificados em espádice de repolho do tipo skunk *Symplocarpus foetidus* e nomeados *SfUCPa* e *SfUCPb* (ITO, 1999).

Entre 1999 e 2005, diferentes sequências pUCPs foram subsequentemente identificadas em várias espécies de mono e dicotiledôneas (VERCESI *et al.*, 2006; BORECKÝ *et al.*, 2006). Entre as dicotiledôneas foram identificados os genes *SfUCPa* e *SfUCPb* em repolho (ITO, 1999), *HmUCPa* em *Helicodicerus muscivorus* (ITO *et al.*, 2003), *MnUCP* em manga (CONSIDINE *et al.*, 2001) e tomate (HOLTZAPFFEL *et al.*, 2002). Já entre as monocotiledôneas, foram identificadas os genes *WhUCP* em trigo (MURAYAMA; HANDA, 2000), *OsUCP* em arroz (WATANABE; HIRAI, 2002) e *ZmUCP* em milho (BRANDALISE *et al.*, 2003; HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004).

Em arroz dois genes pUCPs foram identificados e denominados *OsUCP1* e *OsUCP2*. Tais genes possuem uma exibição anormal de splicing de RNAm resultando num processamento defeituoso do preRNAm, restando, claramente, a ausência de qualquer pUCP funcional (WATANABE; HIRAI, 2002).

Estudos de immunoblotting com anticorpos produzidos contra pUCP de batata ou contra pUCP recombinante isolada a partir de um sistema de expressão em *E. coli* (BORECKÝ *et al.*, 2001a) detectaram esta proteína em muitas espécies de plantas,

incluindo tomate, espinafre, cenoura, couve-flor, brócolis e nabo (JEŽEK *et al.*, 2000) ou frutas tais como banana, manga, maçã, morango, mamão, melão, laranja, abacaxi, pêra e pêssego (JEŽEK *et al.*, 2001).

No lírio, *Helicodiceros muscivorus*, uma espécie de planta termogênica, Ito *et al.* (2003) isolaram um gene que codifica uma proteína desacopladora putativa (*HmUCPa*). Análises de perfil de expressão revelaram que esta *HmUCPa* foi ubiqüamente expressa em floretos e apêndices termogênicos machos, não-termogênicos fêmea, bem como em órgãos em formato de espádice (ITO *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que este gene não está primariamente envolvido na produção de calor específica de tecido. Além disso, estes resultados, juntamente com a análise do perfil de expressão específico observado em *AtPUMPs* e genes correspondentes indicam que as pUCPs estão envolvidas em funções mais sutis no metabolismo celular durante o ciclo de vida da planta (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Além disso, várias pUCPs são expressas em espécies de plantas não-termogênicas e formam uma subfamília distinta (HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004).

Em 2006, Borecký e colaboradores realizaram um estudo detalhado no genoma de *Arabidopsis thaliana* com a consequente identificação de uma família multigênica de pUCPs composta por seis membros, sendo nomeados de *AtPUMPI-6*. Similarmente ao padrão de expressão das UCPs de mamíferos, os padrões espaço-temporais das pUCPs são amplamente expressas em vários tecidos ou órgãos (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Por exemplo, o gene *AtPUMPI* é ubiqüamente expresso em vários órgãos da planta (MAIA *et al.*, 1998), enquanto *AtPUMP2* é expresso exclusivamente em sílicas verdes e *AtPUMP3* é específico da raiz (BORECKÝ *et al.*, 2006). Já os genes *AtPUMP4* e *AtPUMP5*, da mesma forma que *AtPUMPI*, são ubiqüamente expressos em vários órgãos, entretanto, com concentrações maiores do que as demais isoformas. Curiosamente, Borecký *et al.* (2006) não detectaram nenhum transcrito *AtPUMP6* em tecidos/órgãos usando abordagens *in silico* ou experimentais, sugerindo ser um pseudogene.

Além de *Arabidopsis*, Borecký *et al.* (2006) identificaram uma família gênica em cana-de-açúcar contendo cinco membros, denominados *SsPUMPI-5*. O seu padrão de distribuição em tecidos/órgãos mostrou que os transcritos dos genes que codificam

SsUCPs são encontrados em gemas laterais e flores imaturas, sugerindo a importância funcional das *pUCPs* nessa espécie.

Apesar do genoma de *Arabidopsis* e cana-de-açúcar ter consolidado a existência de famílias multigênicas das UCPs em plantas, aumentando o número de estudos dedicados a esta família de proteínas, a função e a especificidade de cada isoforma ainda não foi totalmente elucidada.

Desse modo, as proteínas desacopladoras foram identificadas em plantas (VERCESI *et al.*, 2005), em pássaros (VIANNA *et al.*, 2001; TALBOT *et al.*, 2004; HIRABAYASGI *et al.*, 2005), em vertebrados ectotérmicos, tais como sapos da espécie *Xenopus octopus* (KLEIN *et al.*, 2002), no marsupial carnívoro *Sarcophilus harrisi* (KABAT *et al.*, 2004) em carpas (*Ciprinus carpio*) e peixe-zebra (*Danio rerio*) (STUART *et al.*, 1999), em insetos, como na mosca *Drosophila melanogaster* (FRIDELL *et al.*, 2004) e no organismo eucariótico primitivo *Caenorhabditis elegans* (*CeUCP*) (JARMUSZKIEWICZ, 2000). A UCP foi também identificada em mitocôndrias de *Acanthamoeba castellani* (JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 1999), *Dictyostelium discoideum* (JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 2002), *Candida parapsilosis* (*CpUCP*) (JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 2000), *Candida albicans* (CAVALHEIRO *et al.*, 2004) e em trofozoítos do parasita da malária *Plasmodium berghei* (UEMURA *et al.*, 2000).

A existência das UCPs em protozoários, fungos, plantas, insetos e peixes sugere que estas proteínas desacopladoras emergiram cedo durante a evolução como um membro distinto da Família de Carreadores de Ânions Mitocondriais - FCAM, provavelmente antes da divergência entre os diferentes reinos eucariontes. (BORECKÝ *et al.*, 2001a; CAVALHEIRO *et al.*, 2004). Portanto, as UCPs pertencem a um grupo de proteínas carreadoras integrais de membrana denominado Família Carreadora de Ânions Mitocondriais – FCAM, a qual transporta vários metabólitos aniônicos através da membrana mitocondrial interna, como ácidos graxos, ADP, ATP, fosfato, oxoglutarato, malato, aspartato, glutamato, citrato ou piruvato ou ainda substratos na forma zwitteriônica, como ornitina, carnitina ou glutamina (BORECKÝ *et al.*, 2001a; PICAUT *et al.*, 2004; RIAL; ZARDOYA, 2009). (Figura 2). Uma nomenclatura mais recente denomina este grupo de Família Mitocondrial de Proteínas Carreadora de

Solutos - CLC25 (PFEIFFER *et al.*, 2011). Todas essas proteínas carreadoras tem massa molecular na faixa de 28-34 KDa (LALOI, 1999; HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004) (Figura 2). De acordo com Millar & Heazlewood (2003), esses transportadores são nomeados de acordo com o metabólito transportado; assim, transportadores de adenina são denominados Transportador de Nucleotídeo Adenina (TNA) e transportadores de malato-oxoglutarato e fosfato inorgânico, denominados de TMO e TF, respectivamente. Entretanto, esses carreadores não são exclusivos do compartimento mitocondrial, uma vez que membros da FCAM já foram identificados em peroxissomos (PALMIERI *et al.*, 2001; VISSER *et al.*, 2002) e hidrogenossomos (ARCO; SASTRÚSTEGUI, 2005).

As UCPs são consideradas membros dessa superfamília gênica carreadora de ânions por possuírem alta homologia de sequência com outros carreadores e transportarem formas aniônicas de ácidos graxos ou outros ânions (BORECKÝ *et al.*, 2001). Tais transportadores foram distribuídos numa árvore filogenética, com destaque para as UCPs (NICHOLLS; LOCKE, 1984; LALOI, 1999; LEDESMA *et al.*, 2002; MILLAR; HEAZLEWOOD, 2003; RIAL *et al.*, 2010; DONGEN *et al.*, 2010) (Figura 3). A UCP1 e sua homóloga em plantas (pUCP), assim como todos os representantes da FCAM, consistem de uma estrutura monomérica funcional contendo de 295 a 320 resíduos de aminoácidos, correspondendo a seis α -hélices (I-VI) transmembranares e cinco segmentos hidrofílicos, que podem ser divididos em três domínios de 100 aminoácidos homólogos, formando uma estrutura tripartida. As pequenas alças hidrofílicas (a e b) estão localizadas no lado do espaço intermembranar, enquanto os longos giros hidrofílicos estão localizados no lado da matriz (A, B e C) contendo o *Sinal Protéico de Transferência de Energia Mitocondrial* (SPTE): P-x-(DE)-x-(LIVAT)-(RK)-x-(LRH)-(LIVMFY)-(QGAIVM) (LALOI, 1999; BORECKÝ *et al.*, 2001a; PICAUT *et al.*, 2004). (Figuras 4). Todas as proteínas desacopladoras, exceto UCP4 e SfUCP, possuem três Sinais Protéicos de Transferência de Energia (SPTE), um em cada repetição da proteína, enquanto os outros membros FCAM possuem somente uma ou duas cópias deste sinal (BORECKÝ *et al.*, 2001a; 2006). Estes sinais diferem moderadamente, mantendo variantes que estabelecem especificidade entre UCPs de plantas e animais (BORECKÝ *et al.* 2001a; VERCESI *et al.*, 2006). Jezek & Urbánková (2000) mencionam a presença de quatro domínios α -helicoidais específicos para as UCPs, localizados na primeira, segunda, quarta e sexta α -hélice, denominando essas

sequências de sinais ou assinaturas das UCPs. Vale ressaltar, que a sexta α -hélice é parcialmente específica para as UCPs, vez que contém resíduos de aminoácidos pertencentes ao domínio de ligação para nucleotídeos purínicos (PNBD) (Figura 4).

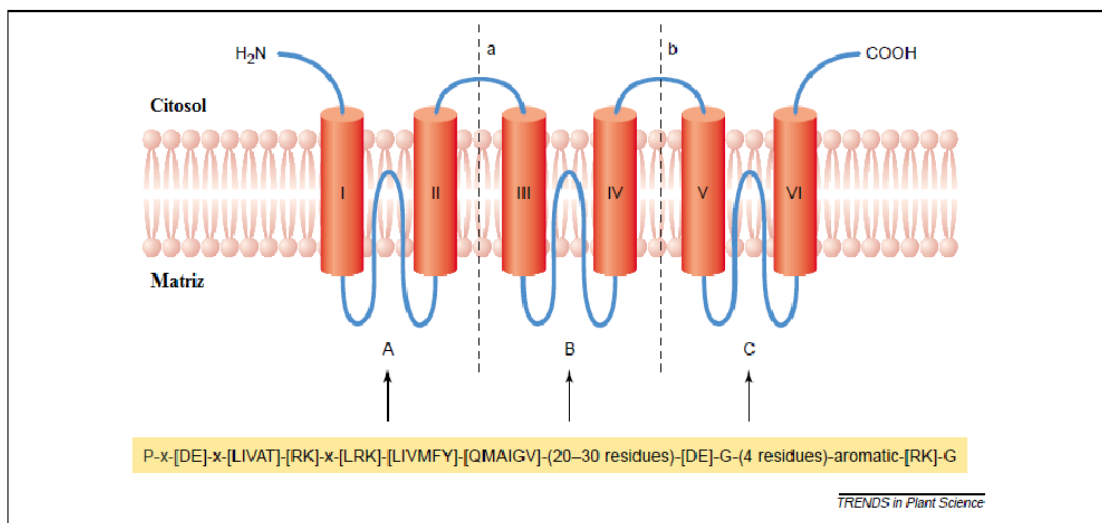


Figura 2 – Características estruturais dos membros da Família Carreadora de Ânions Mitocondriais (FCAM). Cada domínio consiste de duas α -hélices transmembranares separados por um extensivo giro hidrofílico (A, B e C). Os três domínios estão ligados por pequenos segmentos hidrofílicos (a e b). Ambos C e N terminal estão localizados no lado citosólico da membrana mitocondrial interna, dentro do espaço intermembranar. A sequência motivo característica, presente em cada giro da matriz, está mostrada no quadro amarelo; x representa um aminoácido variável (PICAUT *et al.*, 2004).

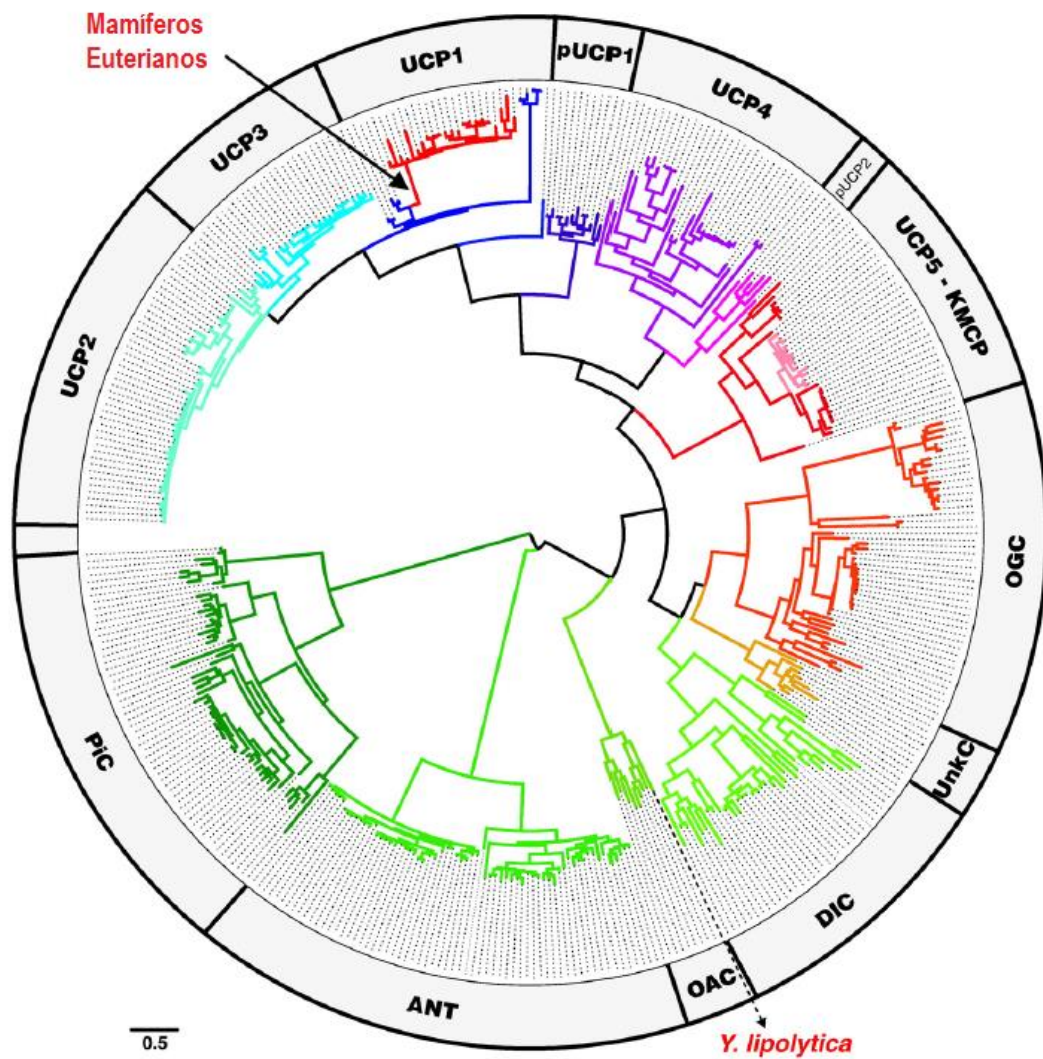


Figura 3 – Relações filogenéticas da família das proteínas desacopladoras (UCPs) e carreadores mitocondriais pertencentes a FCAM com alta homologia. 400 seqüências protéicas não redundantes de tamanho completo correspondendo aos carreadores de fosfato (PIC), nucleotídeos adenina (ANT), oxaloacetato (OAC), dicarboxilato (DIC), oxoglutarato (OGC), proteínas desacopladoras (UCP) e um conjunto de carreadores não definidos (UnkC) foram obtidos a partir do NCBI e alinhados com banco de dados públicos ENSEMBL. Outras abreviações: BMCP1: proteína carreadora mitocondrial cerebral 1 (também chamada de UCP5); KMCP: proteína carreadora mitocondrial cerebral do rim; pUCP: proteína desacopladora de planta. O ramo que conduz a UCP1 de eutérios e a posição do carreador OAC de *Y. lipolytica* estão indicados na figura (RIAL *et al.*, 2010).

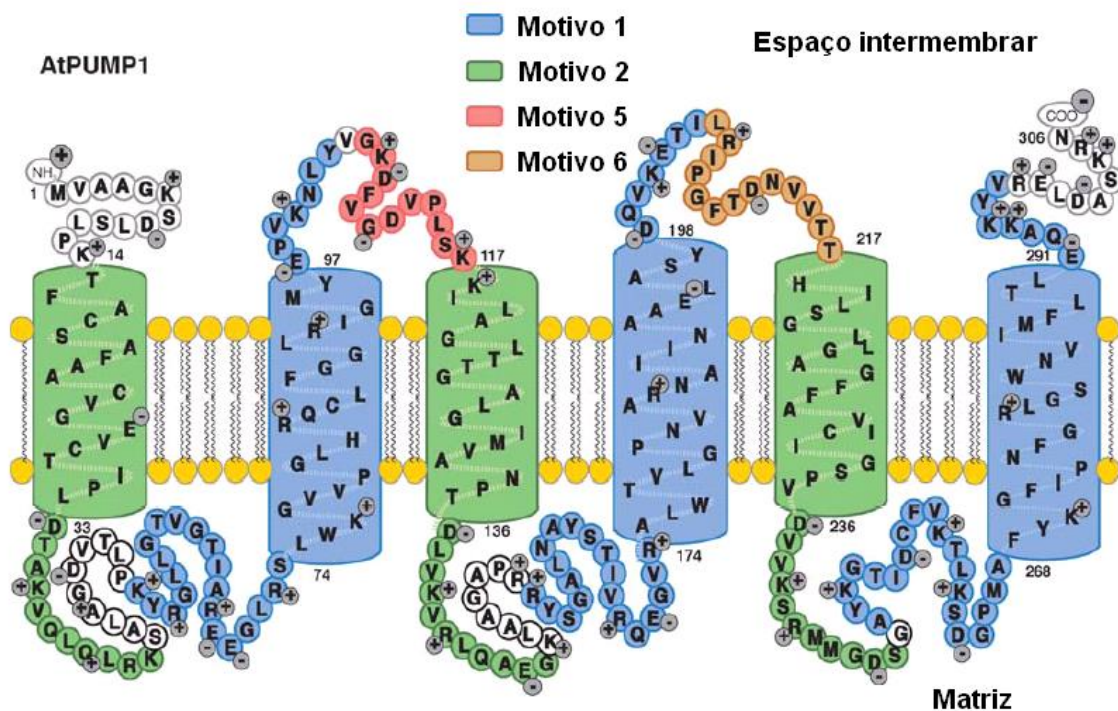


Figura 4 – Modelo estrutural da proteína AtPUMP1 mantendo regiões conservadas. Os motivos 1 e 2 são comuns a todos os membros dessa subfamília e envolvem o primeiro domínio transmembrana da proteína (região 2) ou o segundo domínio (região 1) de cada repetição na proteína. Os motivos 5 e 6 são específicos para pUCPs e ambas estão expostos no espaço intermembranar (VERCESI *et al.*, 2006).

As sequências dos resíduos de aminoácidos dos motivos específicos para UCPs de animais e de plantas foram analisados através do programa MEME-MAST (BAILEY; ELKAN, 1994; BAILEY; GRIBSKOV, 1998). De acordo com esse programa, oito motivos preditos foram associados com alguns grupos completos e específicos de UCPs/pUCPs. Assim, os motivos 1 e 2 são longos, com 50 e 30 aminoácidos, respectivamente e ocorrem em todas as UCPs. (BORECKY *et al.*, 2001a; VERCESI *et al.*, 2006). Estes motivos formam um conjunto dentro de cada domínio do polipeptídeo e os três conjuntos correspondem aproximadamente a 80% da pUCP (Figura 4). Sugere-se que estes motivos em conjunto foram conservados ao longo da evolução para manter a conformação das UCPs. Os motivos 5 e 6 são específicos para pUCPs e estão localizados dentro de duas alças externas, isto é, voltadas para o espaço intermembranar. Além disso, uma inserção específica de uma região rica no aminoácido alanina foi encontrada em pUCPs de cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz, estando ausente em sequências pUCPs de dicotiledôneas, indicando especificidade para as monocotiledôneas. Curiosamente, a proteína desacopladora do repolho do tipo skunk (SfUCPb) revela ausência do quinto motivo transmembranar, sugerindo regulação fisiológica diferente de desacoplamento desta isoforma (ITO, 1999, 2008, 2009; ZHU *et al.*, 2011).

A característica peculiar das UCPs, bem como de pUCPs é sua ativação por ácidos graxos livres (AGL) e inibição por nucleotídeos purínicos: GDP, GTP, ADP e ATP (VERCESI *et al.*, 1995; JEZEK *et al.*, 1996; BRAND *et al.*, 2004; CANNON *et al.*, 2006; SLUSE *et al.*, 2006). Tais características foram inicialmente identificadas em mitocôndrias de tecido adiposo marrom, associadas aos processos termogênicos (NICHOLLS; LOCKE, 1984), revelando maior ativação pelos ácidos graxos insaturados (BORECKÝ *et al.*, 2001b; BORECKÝ; VERCESI, 2005). O ácido linoleico é abundante nas plantas e o mesmo estimula a pUCP através do estímulo do consumo de O₂ no estado 4 induzindo queda do potencial de membrana (SLUSE *et al.*, 1998; JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 1998 e 2001; VERCESI *et al.*, 2001).

Echtay e colaboradores (2000), em experimentos com mutagênese sítio-dirigida na UCP1 animal mostraram que dois resíduos de histidina (H145 e H147), localizados no terceiro segmento transmembranar, pareciam essenciais para o transporte de H⁺. Entretanto, mutantes de levedura que expressam UCP1 destituída dos referidos

resíduos de histidina (H145 e H147) continuam apresentando atividade de transporte de H^+ (ZHANG *et al.*, 1999).

A inibição das UCPs/pUCPs por nucleotídeos de purina pode ser regulada pelo pH devido a ocorrência de grupos ionizados que vão interferir nos respectivos sítios de ligação (SAVIANI *et al.*, 1997; BORECKÝ; VERCESI, 2005; NAVET *et al.*, 2005; VERCESI *et al.*, 2006). No caso da interação com nucleotídeos livres o pH ótimo é 6,7 e existe um sítio de ligação específico denominado Sítio de Ligação a Nucleotídeos Purínicos, do inglês *Putative Nucleotide Binding Site* - PNBD, localizado no final da terceira alça da matriz (resíduos 261-269). Estudos com mutagênese sítio dirigida na UCP1 mostraram dependência do pH na ligação dos nucleotídeos com os resíduos de aminoácidos E190 e H214 dos sítios PNBD e esses são conservados nas pUCPs (KLINGENBERG; ECHTAY, 2001; RICQUIER; KADER, 1976; HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004). Entretanto, as pUCPs não contém os resíduos de histidina H145 e H147, presentes na UCP1 animal, supostamente essenciais para o transporte de H^+ (JEZEK; URBÁNKOVÁ, 2000).

A inibição da pUCP por nucleotídeos purínicos é, além disso, regulada pela composição do meio. A presença de $MgCl_2$ anula a inibição da pUCP de batata por ATP (SAVIANI *et al.*, 1997), como observado em UCP1 de mamíferos (JEŽEK *et al.*, 1998). Os íons Mg^{2+} formam um complexo com o ATP, impedindo sua inibição na atividade da pUCP. Assim, a concentração de Mg^{2+} citosólico livre poderá regular a eficiência da inibição da pUCP por nucleotídeos purina. Além do pH e da concentração de $MgCl_2$, o estado redox da ubiquinona igualmente tem influência na regulação das UCPs/pUCPs, revelando maior inibição pelos nucleotídeos purínicos com UQ no seu estado oxidado (JARMUSZKIEWICZ, *et al.*, 2004; NAVET *et al.*, 2005).

Além da inibição por nucleotídeos purina, essa enzima é inibida por BSA, que atua como um quelante, formando um complexo com os ácidos graxos e, portanto, diminuindo a sua disponibilidade como agentes ativadores (JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 2001).

A regulação da atividade da pUCP/UCPs é igualmente mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs) podendo-se citar como exemplo o radical superóxido ou por seus produtos de reação (ECHTAY *et al.*, 2001, 2002a; CONSIDINE *et al.*, 2003;

JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 2004; GILL; TUTEJA, 2010; MAILLOUX; HARPER, 2011).

O mecanismo pelo qual os ácidos graxos ativam o transporte de H^+ através das UCPs/pUCPs ainda não foi totalmente. Diante da falta de consenso sobre essa ativação, dois modelos foram propostos: tamponante e protonofórico.

O **modelo tamponante** prevê a existência de sítios específicos de ligação (asparagina e glutamina) no canal de prótons da UCP/pUCP para ácidos graxos livres, cujos grupos carboxila servem como doadores/aceptores de H^+ para grupos carboxila da proteína. No caso da UCP1 propõe-se que os resíduos de His 145 e 147 são os intermediários finais para a liberação de H^+ para a matriz. Assim, os prótons são transportados diretamente pela proteína, que funciona como canal (KLINGENBERG, 1990; WINKLER; KLINGENBERG, 1994) (Figura 5b).

O **modelo protonofórico** proposto por Garlid *et al.* (1996), considerou a hipótese elaborada por Skulachev (1991), na qual diferentes proteínas integrais de membrana, nomeadas de carreadores de íons, podem mediar o transporte único (uniporte) de ácidos graxos aniônicos. O transporte de prótons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial é realizado por um mecanismo cíclico de ácidos graxos, que tem início com a ligação do próton a ânions de ácidos graxos localizados na camada lipídica da face externa da membrana interna, neutralizando-os. Por mecanismo espontâneo de flip-flop, os ácidos graxos atravessam a bicamada lipídica, liberando H^+ na matriz e conseqüentemente retornando ao status de ácido graxo aniônico. O ácido graxo retorna à sua localização original através das UCPs, que cataliticamente exportam ânions de ácidos graxos a partir da monocamada da membrana mitocondrial interna do lado da matriz para a monocamada do espaço intermembranar, impulsionado pelo alto potencial de membrana interno negativo. Dessa forma, o ciclo de transporte de H^+ é completamente realizado, com liberação de um próton para cada ciclo na matriz mitocondrial, diminuindo o $\Delta\mu^+$ e a disponibilidade de energia para processos que requerem energia (SKULACHEV, 1991; GARLID *et al.*, 1996; 1998 2000; JEŽEK *et al.*, 1998,1999) (Figura 5a).

Dos modelos propostos, o protonofórico é atualmente o mais aceito (VERCESI *et al.*, 2006).

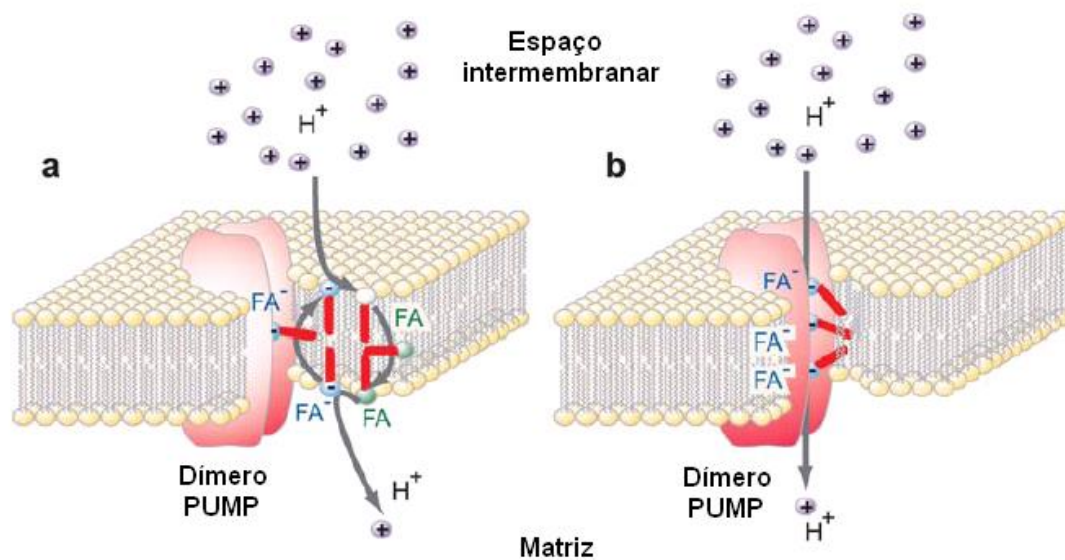


Figura 5 – Modelos hipotéticos propostos para os mecanismos de passagem de prótons H^+ do espaço intermembrana para a matriz: (a) modelo protonofórico de ácidos graxos (FA) e (b) modelo de uniporte de ácidos graxos. O ácido graxo está representado como uma molécula neutra (protonado), com a cabeça hidrofílica representada em verde ou como ânion (desprotonado) representado com cabeça hidrofílica em azul; as caudas hidrofóbicas estão representadas em vermelho (VERCESI *et al.*, 2006).

Relações filogenéticas e estrutura dos genes da família de pUCPs/UCPs.

As relações filogenéticas de seqüências de aminoácidos avaliáveis de UCPs oriundas de mamíferos, plantas e outros organismos revelam a presença de 5 subfamílias bem definidas de UCPs. A subfamília I contém as UCP1, 2 e 3 em animais. As pUCPs estão distribuídas em três subfamílias: a subfamília II contendo pUCPs dos tipos 1 e 2; a subfamília V agrupando pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 e a subfamília III, que inclui pUCPs dos tipos 3 de mono e dicotiledôneas, a UCP4 de mamíferos e a UCP de um eucarioto primitivo *Caenorhabditis elegans* (*CeUCP*). Por agrupar um organismo primitivo, esta última subfamília pode representar um grupo ancestral das UCPs. A família IV contém somente uma Proteína Carreadora Mitocondrial Cerebral-1 (BMCP-1/UCP5), sugerindo que a BMCP/UCP5 pode ter se separado de outras UCPs/pUCPs antes da divergência entre mamíferos e plantas. As seqüências dos carreadores malato-/2-oxoglutarato (M2OM) e a do dicarboxilato (DIC) de vários organismos foram incluídas como membros filogenéticos muito próximos da FCAM nesta análise (Figura 6). As subfamílias específicas de plantas estão subdividas em dois subgrupos intimamente relacionados correspondentes às pUCPs de monocotiledôneas e dicotiledôneas, sendo o grupo das monocotiledôneas o mais ancestral (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

A estrutura genômica e a localização das pUCPs foram descritas em alguns detalhes: o gene *AtUCP1* está localizado no cromossomo 3, enquanto o gene *AtUCP2* está mapeado no cromossomo 5, ambos possuindo estruturas gênicas quase idênticas, consistindo de 9 éxons e 8 introns. Seus parálogos presumidos (*AtUCP3*, *AtUCP4*, *AtUCP5* e *AtUCP6*) identificados (NOGUEIRA *et al.*, 2005) têm diferentes estruturas gênicas. Os genes *AtUCP3* e *AtUCP6* possuem somente dois éxons e estão localizados nos cromossomos 1 e 5, respectivamente; enquanto *AtUCP4* e *AtUCP5*, não possuem introns, estando localizados nos cromossomos 4 e 2, respectivamente (Figura 7).

Os ortólogos pUCPs de arroz (*OsUCP1*, *OsUCP2*, *OsUCP3* e *OsUCP4*) mostram uma estrutura gênica similar para seus correspondentes em *Arabidopsis*. Os genes *OsUCP1* e *OsUCP2* possuem 9 éxons e foram mapeados nos cromossomos 1 e 11, respectivamente. O gene *OsUCP3* está localizado no cromossomo 4, possuindo 2

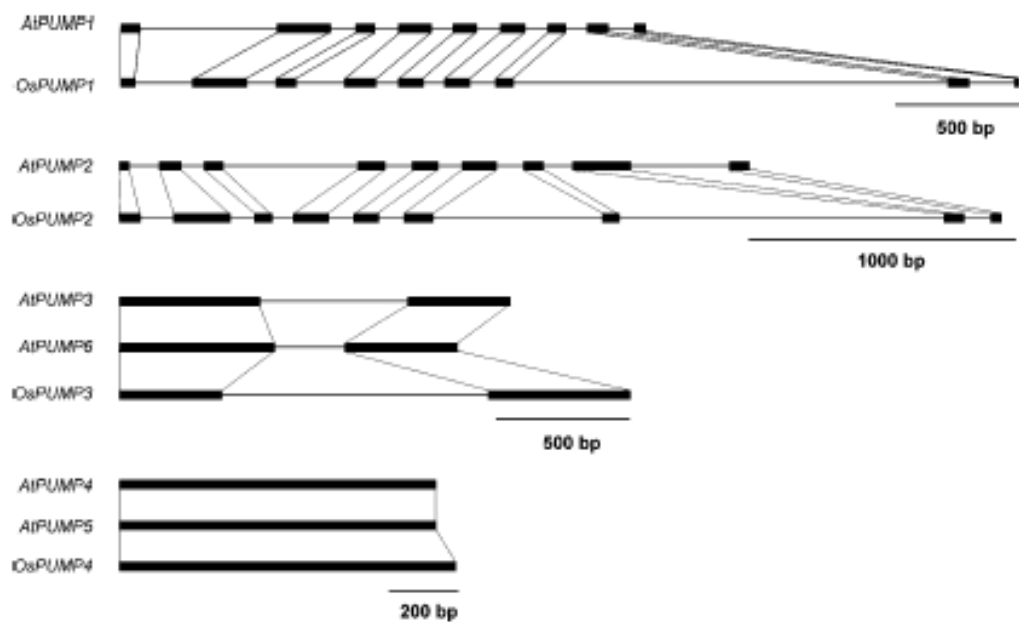


Figura 7 – Estrutura gênica das pUCPs de arroz e *Arabidopsis*. Os retângulos preenchidos representam os éxons e as linhas entre esses retângulos representam os íntrons. As barras indicam bp (pares de bases) do DNA cromossômico (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

éxons; enquanto o gene *OsUCP4* está mapeado no cromossomo 8, não possuindo íntrons.

As comparações da distribuição de éxons de várias pUCPs sugerem que esses genes podem ter se originado através de eventos de duplicação gênica. Além disso, a localização dos genes *AtUCP1*, *AtUCP2*, *AtUCP4* e *AtUCP5* dentro ou próximos a regiões duplicadas no genoma de *Arabidopsis* corrobora com esta hipótese (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Estes achados confirmam a existência de distintas subfamílias de pUCPs.

A árvore filogenética descrita por Nogueira *et al.* (2005), bem como a classificação citada por Borecký *et al.* (2006) também inclui outros representantes da FCAM, como o carreador de dicarboxilatos (DIC). Estes carreadores catalizam o transporte de dicarboxilatos (malato e succinato) em troca por fosfato, sulfato ou tiosulfato (De SANTIS *et al.*, 1976). Em plantas, estes carreadores podem desempenhar um importante papel em vários processos metabólicos, incluindo síntese de aminoácidos primários (assimilação de amônia), metabolismo dos ácidos graxos (mobilização durante a germinação das sementes), gliconeogênese e biossíntese de isoprenóides. Eles podem também estar envolvidos na exportação de equivalentes redutores da mitocôndria para o citosol via lançadeira malato-oxaloacetato (PALMIERI *et al.*, 1999).

Palmieri *et al.* (2008) identificaram em *Arabidopsis* a existência de isoformas de DICs, nomeados *DIC1*, *DIC2* e *DIC3*, propondo que os mesmos correspondem às respectivas pUCPs: *AtPUMP4*, *AtPUMP5* e *AtPUMP6* (BORECKÝ *et al.*, 2006). De acordo com a árvore filogenética de sequências de aminoácidos de transportadores mitocondriais de vários organismos, os referidos autores mostraram que os DICs (*DIC1*, *DIC2* e *DIC3*), apresentavam maior similaridade com os transportadores de dicarboxilato encontrados em animais e leveduras do que com as pUCPs.

AS pUCPs E OS ESTRESSES AMBIENTAIS

Todas as plantas possuem uma capacidade intrínseca para se ajustar as alterações ambientais circadianas e sazonais. Na verdade, essas alterações são consideradas muitas vezes fatores decisivos no controle de atributos fisiológicos, tais como duração da fase vegetativa, início do ciclo reprodutivo, intensidade da floração, tempo de frutificação e indução da senescência da planta. Além das perturbações circadianas regulares e sazonais, podem existir outros distúrbios rápidos e imprevisíveis no ambiente, resultando em situações de estresse (DEBNATH, *et al.*, 2011).

Essas alterações ambientais incluem os fatores abióticos tais como os estresses hídrico, osmótico e salino, bem como exposição a temperaturas extremas, ferimentos, condições de luminosidade excessiva ou fatores bióticos como ataque de patógenos (VERCAUTEREN *et al.*, 2001; VAN WEES *et al.*, 2003; WHITHAM *et al.*, 2003), exercendo importância fundamental na atmosfera, seja em condições *in vivo* (campo ou casa de vegetação) quanto *in vitro* (cultura de tecidos). A resposta da planta é complexa por que reflete no espaço e no tempo de integração dos efeitos do estresse e responde em todos os níveis subjacentes da organização (BLUM, 1996). Em condições de campo essas repostas podem ser sinérgica ou antagonicamente modificadas pela sobreposição de outros estresses.

Especialmente a salinidade e a seca são dois importantes fatores abióticos que limitam o crescimento e bom funcionamento da planta (MISRA *et al.*, 1990, 2002). Com o aumento da salinização, a água fica osmoticamente retida no solo e torna-se menos acessível à planta. A seca ocorre devido a muitas razões tais como disponibilidade limitada de água ou evaporação intensa.

Aproximadamente 22% das terras agrícolas em todo o mundo são salgadas e há uma crescente expansão de áreas sob injúrias pela seca (AHMED; SARWAT, 2009). Tais estresses abióticos são a principal causa da perda da safra mundial, reduzindo o rendimento médio por mais de 50%. Assim, a produção da colheita pode ser severamente afetada pelos estresses abióticos, tais como salinidade, seca e temperatura (MANIVANNAN *et al.*, 2008; ZUSHI *et al.*, 2009). Além disso, com o aumento da

população, há um desafio crescente para atender a demanda mundial por alimentos e aumentar a sustentabilidade na agricultura (ROYAL, 2009).

O estresse ativa alguns sensores moleculares iniciais relacionados ao estresse (embora a maioria seja desconhecida), desencadeando uma série de alterações nas plantas, afetando processos moleculares, bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, tais como ativação do Ca^{2+} citoplasmático e vias de sinalização de proteínas, levando a expressão de genes responsivos ao estresse e conseqüente alterações fisiológicas (GROVER *et al.*, 1998; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; ZHU, 2001b, 2002; MUNNS, 2002; WANG *et al.*, 2003; SEKI *et al.*, 2003). Entre essas conseqüências ocorrem respostas celulares, tais como acumulação de solutos assimiláveis e a produção de proteínas “marcadoras” do estresse e de compostos antioxidantes (WANG *et al.*, 2003). Podem ser citados como exemplo as plantas medicinais, que contém metabólitos secundários úteis que são sintetizados sob diferentes condições de estresses abióticos (DEBNATH *et al.*, 2011) ou a Oxidase Alternativa (AOX) de mitocôndrias de plantas amplamente usada como modelo de estudo da regulação de genes que codificam proteínas mitocondriais em resposta ao estresse ou disfunção mitocondrial (VANLERBERGHE; McINTOSH, 1997; FINNEGAN *et al.*, 2004; CLIFTON *et al.*, 2006; ARNHOLDT-SCHMITT *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2007).

As mudanças causadas por várias condições ambientais adversas são frequentemente devido a um estresse secundário, usualmente osmótico ou oxidativo. Assim, uma conseqüência direta dos estresses ambientais (osmótico e salino) é a acumulação de espécies reativas do oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido e radical hidroxila (WANG *et al.*, 2001; JALEEL *et al.*, 2007, 2008; JALEEL, 2009). Essas espécies reativas são geradas nas mitocôndrias, nos cloroplastos e nos peroxissomos como subprodutos inevitáveis do metabolismo aeróbico (BRAND *et al.*, 2004; MAURINO e FLUGGE, 2008; BANU *et al.*, 2009, ASHRAF, 2009; SCHWARZLANDER *et al.*, 2009; GILL, TUTEJA, 2010). As EROs podem atuar como moléculas sinais, entretanto, sob condições de estresse, ocorre uma produção excessiva dessas espécies reativas e a elevação dos seus níveis é prejudicial às células da planta, causando rápidos danos celulares pela ativação de reações em cadeia, danificando proteínas, lipídeos e DNA, perturbando a estabilidade estrutural e funcional

das proteínas de membrana e desfazendo a homeostase celular, em último caso resultando na morte celular (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; ZHU, 2001a; JEŽEK; HLAVATÁ, 2005; HALLIWELL, 2006; SCHWARZLANDER *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2010; SCHWARZLANDER *et al.*, 2012). Estas alterações são, dessa forma, interconectadas, e seus efeitos no metabolismo celular e crescimento da planta são similares (DEBNATH *et al.*, 2011). As células de plantas desenvolveram mecanismos não enzimáticos e enzimáticos para rigorosamente controlar seus níveis basais e assim limitar sua ação (MAURINO e FLUGGE, 2008; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Um número crescente de evidências tem indicado que as EROs desempenham papel principal na inibição da fotossíntese sob estresse, resultando em menor produtividade de culturas (FLEXAS *et al.*, 2006). Em adição a função de geradora de energia da célula, as mitocôndrias desempenham importante papel na manutenção da função cloroplastial durante estresse hídrico (ATKIN; MACHEREL, 2009). Várias evidências têm indicado que as (pUCPs) tem um papel proeminente na manutenção da função mitocondrial sob condições normais e de estresses (VERCESI *et al.*, 1995; BEGCY *et al.*, 2011).

Como já dito anteriormente, a mitocôndria, sede da respiração celular, é alvo de produção de EROS (MOLLER *et al.*, 2001) e já em meados dos anos 90, SKULACHEV (1996, 1997) propôs um mecanismo de defesa do ataque de EROS, através do desacoplamento mitocondrial, sem comprometer seriamente a energética celular. Nesse contexto, tem sido demonstrado que sistemas dissipadores de energia que aumentam o transporte de elétrons respiratório e conseqüentemente diminuem a eficiência da fosforilação oxidativa, reduzem a formação de EROs mitocondrial. Essa organela apresenta, além das enzimas envolvidas no funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, acoplada à fosforilação oxidativa, outras enzimas denominadas desacopladoras, que são a oxidase alternativa (AOX) e a proteína desacopladora de planta (pUCP) (BORECKÝ *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2011), constituindo-se, por tanto, sistemas preventivos da produção de EROs (JARMUSZKIEWICZ; WOYDA-PŁOSZCZYCA, 2008, MAILLOUX; HARPER, 2011).

Dessa forma, as pUCPs tem sido relacionadas na atenuação da geração de EROs mitocondrial baseado na sua capacidade em diminuir o acoplamento entre a oxidação de substratos e síntese de ATP (BOVERIS; CHANCE, 1973; SKULACHEV, 1996; POPOV *et al.*, 1997; KOWALTOWSKI *et al.*, 1998; HOURON-CABASSA *et al.*, 2002; BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010). A importância das proteínas desacopladoras como componentes de tolerância celular ao estresse oxidativo tem sido revelado em estudos realizados *in vitro* e *in vivo* usando diferentes modelos. Em plantas, a ativação ou a super expressão das pUCPs diminuem a produção de EROs e melhora a tolerância ao estresse oxidativo (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998; MAXWELL *et al.*, 1999; BRANDALISE *et al.*, 2003; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009; BEGCY *et al.*, 2011). Reciprocamente, a ausência de expressão de um gene pUCP nocauteado em *Arabidopsis* mutante promoveu estresse oxidativo (SWEETLOVE *et al.*, 2006). Similarmente, animais carecendo de uma função das UCPs mostraram níveis elevados de EROs intracelulares e estresse oxidativo (ARSENJEVIC *et al.*, 2000; VIDAL-PUIG *et al.*, 2000; McLEOD *et al.*, 2005 apud NOGUEIRA *et al.*, 2011).

De acordo com o exposto, vários estudos demonstraram que as pUCPs são ativadas pelas EROs, como estimulação de atividade por superóxido e/ou produtos de peroxidação lipídica (CONSIDINE *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004), sugerindo como principal papel fisiológico dessas enzimas a diminuição da produção de EROs sob condições de estresse, principalmente em tecidos não termogênicos (BRAND *et al.*, 2004, PASTORE *et al.*, 2007). Isso corrobora com função de proteção contra o estresse oxidativo, indicando que o desacoplamento mitocondrial mediado pelas pUCPs controla a formação de EROs mitocondrial por um mecanismo de retroalimentação negativa (PASTORE *et al.*, 2007), parecendo ser esta uma função ancestral das UCPs (BRAND *et al.*, 2004). Muitas adaptações de plantas aos estresses ambientais envolvem a participação mitocondrial, e neste cenário, um suave desacoplamento mediado pelas pUCPs parece ser fundamental para superar o estresse oxidativo elevado (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Como evidências experimentais, a aplicação de compostos que promovem o estresse oxidativo, tais como H₂O₂ ou menadiona, aumentam a expressão de genes codificando as pUCPs em diferentes espécies de plantas (DESIKAN *et al.*, 2001; BRANDALISE *et al.*, 2003). Estudos com atividades das pUCPs realizados através de

preparações mitocondriais com plântulas de trigo submetidas ao estresse salino (NaCl) ou osmótico (manitol), moderado e severo, mostrou aumento de atividade pUCP, sugerindo que estas enzimas desempenham um papel na prevenção de EROs (PASTORE *et al.*, 2007). Evidências indiretas de que as pUCPs se contrapõe ao estresse oxidativo foram obtidas quando folhas de plantas de tabaco transgênicas super expressando o gene UCP1 de *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP1*) exibiram um menor nível de danos oxidativos e maiores conteúdos de clorofila do que as plantas do tipo selvagem após diferentes tratamentos com H₂O₂ exógeno (BRANDALISE *et al.*, 2003b). Ainda em *Arabidopsis*, estudos em plantas com o gene *AtUCP1* nocauteado, devido a uma inserção T-DNA, mostrou uma fotorespiração restrita e menores taxas de oxidação da glicina fotorepiratória na mitocôndria, a qual foram associadas com menor assimilação de carbono pela fotossíntese (SWEETLOVE *et al.*, 2006).

Além de *Arabidopsis thaliana*, outros trabalhos envolvendo ativação das pUCPs por EROs foram realizados. Em trabalhos com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, a adição de ácido linoléico, que conhecidamente aumenta atividade da pUCP, resultou numa diminuição da produção de H₂O₂ (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998). Em trigo foi demonstrado que a pUCP é ativada pela produção de EROs mitocondrial (PASTORE *et al.*, 2000). Esta sensibilidade das UCPs às EROs parece ser uma propriedade geral, visto que, além de trigo, foi relatado que UCP1, UCP2 e UCP3 de animais também foram ativadas pelo radical superóxido (O₂⁻) (ECHTAY *et al.*, 2002b), com ativação da UCP2 ocorrendo no lado da matriz da membrana mitocondrial interna (ECHTAY *et al.*, 2002a), provavelmente através de um mecanismo envolvendo produtos provenientes da quebra da peroxidação lipídica, tais como 4-hidroxi-nonanal (MURPHY *et al.*, 2003). Mais recentemente, em trabalho com isolamento de mitocôndrias de trigo, Pastore *et al.* (2007) demonstraram que a atividade da WhUCP em resposta ao estresse osmótico/oxidativo é modulada por EROs através de uma mecanismo de retroalimentação. Em tal mecanismo, a condição de estresse induz o aumento da produção de EROs mitocondrial, com concomitante ativação das pUCPs, que em contrapartida, dissipam o potencial de membrana mitocondrial, inibindo a produção de EROs em larga escala, sugerindo função indireta dessas enzimas nos mecanismos de defesa antioxidante. Em trabalhos com isolamento de mitocôndrias de planta, respectivamente em tubérculos de batata (CONSIDINE *et al.*, 2003) e

topinambur, também conhecido como alcachofra de Jerusalém (PAVENTI *et al.*, 2006), as pUCPs também mostraram ativação pelas EROs. Ozawa *et al.* (2006) super expressando o gene de trigo *WhUCP* em arroz identificaram aumento de tolerância das plantas transgênicas ao estresse oxidativo promovido pela aplicação exógena de peróxido de hidrogênio, além de tolerância de estresse pelo frio. Mais recentemente, Popov *et al.* (2011) detectaram que a expressão da pUCP em plantas e culturas de células de *Lycopersicon esculentum* Mill foram regulados por baixas temperaturas (4^o C) e pelos níveis de H₂O₂ aplicados em combinação com antimicina A. Em plantas, assim como já citado para a UCP2 de origem animal, a ativação da pUCP parece ocorrer através do produto de peroxidação lipídica hidroxil-nonenal (SMITH *et al.*, 2004; MAILLOUX; HARPER, 2011).

O mecanismo proposto envolve a ativação das proteínas desacopladoras por superóxidos pelo lado da matriz da membrana mitocondrial interna (ECHTAY *et al.*, 2002b), onde o superóxido libera ferro de proteínas contendo centro ferro-enxofre, tais como a aconitase. O ferro (Fe²⁺) reage com o superóxido, formando radicais hidroxilas, que promovem a geração de radicais no centro de carbono dos fosfolipídeos, que iniciam a peroxidação lipídica, formando produtos rompidos, tais como 4-hidro-2-trans-nonenal, que ativam as UCPs (MURPHY *et al.*, 2003; ECHTAY *et al.*, 2003) e pUCP (SMITH *et al.*, 2004; BORECKÝ; VERCESI, 2005; VERCESI *et al.*, 2006), bem como o ANT (Brand *et al.*, 2004), aumentando a condutância de prótons na membrana interna mitocondrial (Figura 8). Este desacoplamento induzido é parte de um mecanismo regulatório proposto para diminuir a geração de superóxido mitocondrial, quando este se encontra em níveis muito elevados (Figura 9).

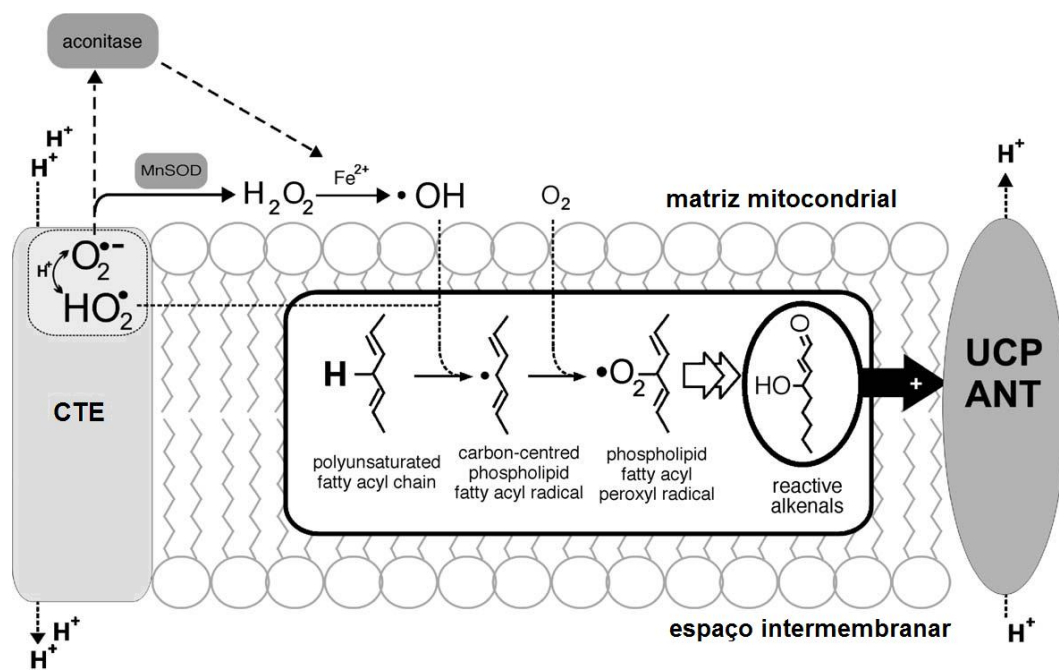


Figura 8 - Modelo proposto por Brand *et al.* (2004) para ativação dos carreadores mitocondriais (UCPs e ANT) pelo superóxido através da peroxidação lipídica.

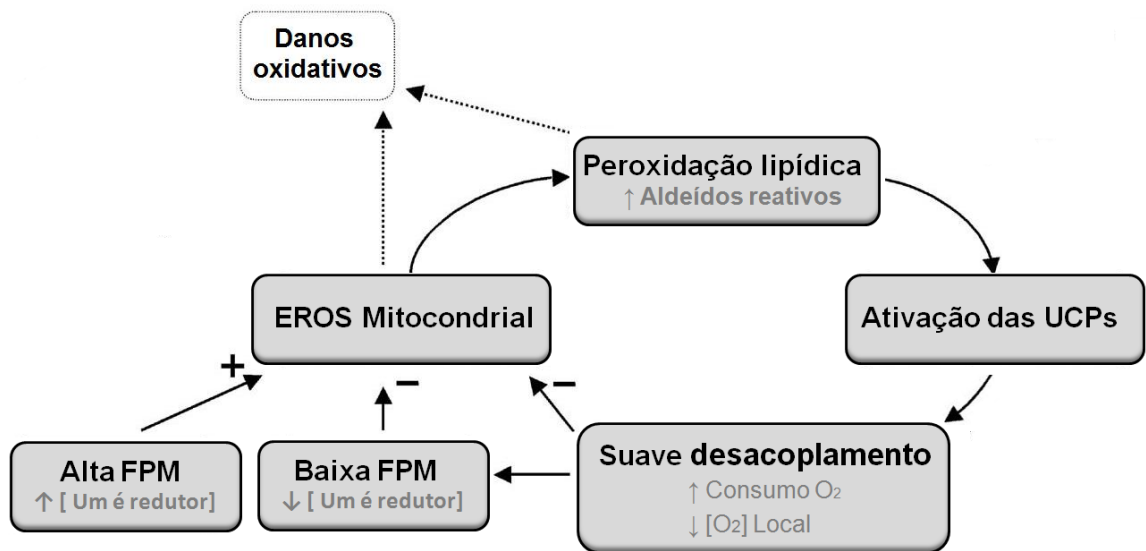


Figura 9 - Modelo de ativação das UCPs por EROS como uma função ancestral das UCPs (BRAND *et al.*, 2004).

Este possível papel fisiológico para as UCPs tem sido proposto baseado em duas observações: primeiro, a produção de superóxido na matriz a partir do complexo I é altamente dependente da magnitude da força próton-motora (FPM), e, segundo, o superóxido da matriz ativa a condutância de prótons das UCPs e induz suave desacoplamento. No modelo proposto, as UCPs respondem a superprodução de superóxido da matriz pela catálise de um suave desacoplamento, a qual baixa a FPM e diminui a produção de superóxido da CTE, atenuando os danos causados pelo superóxido, às expensas de ligeira diminuição da eficiência da fosforilação oxidativa (Figura 9). Em resumo, a sensibilidade das UCPs em relação ao estado redox sugere a existência de um mecanismo de retroalimentação negativa capaz de controlar a produção mitocondrial de EROs pela ativação de um desacoplamento controlado (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Esta retroalimentação, por proteger a célula de danos causados por EROS, deve representar uma função ancestral de todas as UCPs (BRAND *et al.*, 2004; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Em trabalhos com estudos de expressão gênica, a indução das *pUCPs* por EROs também foi observada. Em milho, uma indução da expressão do gene *ZmUCP* foi observada em resposta ao estresse oxidativo após tratamentos por peróxido de hidrogênio ou manadiona (BRANDALISE *et al.*, 2003a).

Em relação aos estresses osmótico e salino, existem poucos estudos em resposta à expressão gênica das *pUCPs*. Em trigo, a análise de transcritos de *WhUCPI* em plântulas submetidas a condições controle e de estresse osmótico e salino (moderado e severo) não mostrou aumentos significativos no nível de transcritos em todas as condições testadas (TRONO *et al.*, 2006). Corroborando com esses dados foi mostrado que dois genes *pUCP* em trigo, isto é, *WhUCPIa* e *WhUCPIb* não são induzidos por condições de estresses (VERCESI *et al.*, 2006). Entretanto, uma atividade máxima da *pUCP* foi detectada em mitocôndrias purificadas após a adição de linoleato, com valores equivalentes para as condições controle e de estresse salino (moderado e severo) e um evidente aumento da atividade da *pUCP* em torno de 27% em relação ao estresse osmótico (moderado e severo), sugerindo assim, que os níveis da proteína *pUCP* praticamente não foram alterados sob as condições de estresses testadas (TRONO *et al.*, 2006). O funcionamento da *pUCP* por ativação de ácidos graxos livres endógenos também foi avaliado, com aumento da atividade enzimática em situações de estresses,

com maiores valores observado no estresse salino severo. Essa discrepância entre inalteração do nível de transcritos e aumento de atividade enzimática indicam que os estresses mencionados acima modulam a atividade protéica e não a expressão dos genes relacionados.

Contrariamente, em milho, Dlasková e colaboradores (2006) detectaram um aumento nos níveis de RNAm para *ZmUCP1* em raízes e parte aérea da plântula após 24 horas de tratamento com NaCl 250 mM e propuseram, com base nos resultados obtidos, que os níveis elevados dessa proteína estariam inibindo o aumento da produção de EROs sob condições de estresse.

Em trigo, Pastore *et al.* (2007) observaram um aumento da atividade da pUCP em condições de estresse osmótico (moderado e severo) e uma alta indução em resposta ao estresse salino (moderado e severo).

Em 2006, Borecký e colaboradores identificaram uma família completa pUCP consistindo de cinco a seis membros presentes em dicots (*Arabidopsis thaliana*; *AtPUMP1-6*) ou monocotiledôneas (*Saccharum spp.*; *SsPUMP1-5*).

No caso de *Arabidopsis*, um modelo de dicotiledôneas, foi revelado um padrão dependente do estresse, com indução dos genes *AtPUMP1*, *AtPUMP4* e *AtPUMP5* em respostas à seca ou um padrão de pouca indução da expressão promovido por estresse salino severo para *AtUCP4* e *AtUCP5* (KREPS *et al.*, 2002; SEKI *et al.*, 2003). Nesta espécie, *AtPUMP1* e *AtPUMP5* foram positivamente regulados em resposta a estresses bióticos, tais como pela infecção por *Alternaria brassicicola* e por vírus de RNA (VAN WESS *et al.*, 2003; WHITHAM *et al.*, 2003).

Uma vez tendo sido identificada uma completa família multigênica em *Arabidopsis* por Borecký *et al.* (2006), um estudo mais recente foi realizado nesta espécie com o intuito de avaliar os efeitos do estresse oxidativo no perfil da transcrição dos genes *AtUCP1-5* (FÁVARO, 2008). Neste estudo, plântulas de *Arabidopsis thaliana* foram submetidas em condições de estresses salino e osmótico e o perfil de expressão gênica das pUCPs foi avaliado através de PCR quantitativa. Os resultados obtidos mostraram um comportamento de expressão gênica dependente do estresse, com ausência de alterações significativas no perfil de expressão gênica em resposta ao

estresse salino, mas com indução significativa dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* em resposta ao estresse por manitol.

Juntamente, estes resultados sugerem que as pUCPs contribuem como defensores antioxidantes de plantas pela inibição da produção de EROs mitocondrial em resposta aos estresses (PASTORE *et al.*, 2002; BEGCY *et al.*, 2011).

O trabalho pioneiro de Brandalise *et al.* (2003) com estresse oxidativo em *Arabidopsis* super expressando o gene *AtPUMP1* é uma evidência direta do papel das pUCPs na atenuação dos efeitos deletérios da super produção das EROs. Entretanto, uma evidência direta do papel protetor das pUCPs em resposta aos estresses abióticos ainda não havia sido comprovada. Nesse contexto, Begcy *et al.* (2011), trabalhando com *Arabidopsis* super expressando *AtUCP1*, analisaram a tolerância dessa planta em resposta aos estresses hídrico (Manitol 200, 300 e 400 mM) e salino (NaCl 100 e 175mM). Comparando linhagens transgênicas e do tipo selvagem, observaram que a super expressão de *AtUCP1* melhorou a germinação das sementes em todas as condições testadas, com as respostas mais significativas detectadas no estresse imposto por Manitol 400 mM ou NaCl 175 mM, onde a germinação das sementes das linhagens transgênicas apresentaram capacidade de germinação em torno de 40 e 60%, respectivamente, enquanto a linhagem do tipo selvagem foi completamente inibida em ambos os estresses citados. Estes resultados claramente indicam o papel das pUCPs na germinação das sementes sob estresse hídrico e salino. Detectaram um melhor perfil fenotípico das plantas adultas das linhagens transgênicas em comparação às linhagens do tipo selvagem nos estresses por Manitol 200 mM ou NaCl 175 mM, indicando que a super expressão de *AtUCP1* não somente melhorou a germinação das sementes, mas também protegeu completamente o crescimento da planta diante dos estresses citados. Estes fenótipos foram correlacionados com o aumento da retenção de água e maiores parâmetros de trocas gasosas nas plantas transgênicas super expressando *AtUCP1*. As plantas do tipo selvagem exibiram uma elevação da respiração em comparação a um suave aumento das linhagens transgênicas sob situações de estresses. Além disso, as plantas transgênicas apresentaram acumulação reduzida de peróxido de hidrogênio em folhas em comparação à linhagem selvagem diante dos estresses supracitados. Os resultados citados permitem concluir que os altos níveis de *AtUCP1* melhoraram a tolerância de *Arabidopsis*, fornecendo evidências diretas da performance superior das

plantas transgênicas aos múltiplos estresses abióticos e esta proteção foi correlacionada com o menor estresse oxidativo, estando estes dados em concordância com o papel das pUCPs na diminuição do desbalanceamento das EROs. Estes resultados também sugerem participação das pUCPs no fechamento estomático, correlacionando diretamente estas proteínas com a fotossíntese. A manipulação da expressão das proteínas desacopladoras em mitocôndrias de planta enfatiza o papel protetor das pUCPs *in vivo* e constitui-se numa nova abordagem para o melhoramento de culturas, resultando em plantas mais tolerantes aos desafios das condições ambientais.

Estudos de expressão gênica das pUCPs foram realizados em resposta a baixas temperaturas, a qual secundariamente resultam em estresse oxidativo, revelando dois grupos distintos de genes com resultados antagônicos: (1) os que apresentaram indução por baixas temperaturas: tratamentos pelo frio induziram a expressão em plantas não-termogênicas, tais como *Arabidopsis* (*AtPUMP1*, *AtPUMP4* e *AtPUMP5*) (MAIA *et al.*, 1998; BORECKÝ *et al.*, 2006), cana-de-açúcar (*SsPUMP4* e *SsPUMP5*) (BORECKÝ *et al.*, 2006) e batata (*StUCP*) (LALOI *et al.*, 1997) e em plantas termogênicas, como exemplo em repolho do tipo skunk (*SfUCPa* e *SfUCPb*) (ITO, 1999). (2) os genes não responsivos a baixas temperaturas: a indução pelo frio não foi observada em trigo (*WhUCPa* e *WhUCPb*) (MURAYAMA, HANDA, 2000), *Arabidopsis* (*AtPUMP2*) (WATANABE *et al.*, 1999, BORECKÝ *et al.*, 2006), arroz (*OsUCP*) (WATANABE, HIRAI, 2002), cana-de-açúcar (*SsPUMP1*, *SsPUMP2*, *SsPUMP3*) (BORECKÝ *et al.*, 2006) e em milho (*ZmPUMP*) (BRANDALISE *et al.*, 2003b). Numa nova abordagem experimental em trigo, empregando as cultivares “Mironovskaya 808” (M808) e “Chinese Spring” (CS) foi realizado um estudo de expressão em *Triticum aestivum* L., apresentando níveis de transcritos de *WhUCP1* em resposta a baixas temperaturas de forma não conclusiva, entretanto, com maior abundância de transcritos na cultivar M808 do que em CS (MIZUNO *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que *WhUCP1a* tenha participação na tolerância da cultivar M808 ao frio.

É curioso, pelo que foi exposto acerca da análise de transcritos de genes pUCP em *Arabidopsis* e em cana-de-açúcar em resposta ao frio, o padrão diferencial de expressão entre mono e dicotiledôneas, sugerindo que os membros de cada sistema dissipador de energia, de maneira similar às UCPs de mamíferos, estão sujeitos a uma regulação transcricional dependente de tecido e/ou órgão ou da natureza do estresse

(NOGUEIRA *et al.*, 2005). Além disso, os membros da família de genes pUCP de *Arabidopsis* e cana de açúcar mostraram diferentes padrões de regulação dependente do tempo de exposição ao estresse pelo frio (BORECKÝ; VERCESI, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2005; BORECKÝ *et al.*, 2006; VERCESI *et al.*, 2006).

Num estudo de exposição de *Arabidopsis* ao estresse pelo frio com fases curtas e longas de tratamento, as alterações de expressão de genes, abundância de proteínas e atividade da UCP mostraram que as quantidades das pUCPs aumentaram significativamente em folhas em exposição ao frio e os níveis de transcritos da UCPI exibiram aumento progressivo em resposta ao frio (ARMSTRONG *et al.*, 2008).

Trabalhos com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata mostraram que a indução da pUCP foi fortemente estimulada quando os tubérculos de batata foram estocados em baixas temperaturas (4° C). Estes resultados apoiaram a idéia principal da pUCP na termogênese e seu possível envolvimento no amadurecimento e senescência de frutos (NANTES *et al.*, 1999).

A identificação de genes pUCPs relacionados a baixas temperaturas sugeriu inicialmente a participação dessas proteínas em plantas termogênicas, tendo sido detectados em flores, inflorescências ou cones em várias famílias de plantas, incluindo Araceae (SEYMOUR *et al.*, 2003; SEYMOUR, 2004; WAGNER *et al.*, 2008; KAMATA *et al.*, 2009), Cycadaceae (TANG, 1987; SEYMOUR *et al.*, 2004), Nelumbonaceae (WATLING *et al.*, 2006) e Nymphaeaceae (SKUBATZ *et al.*, 1990a), sendo consensualmente relacionada com a atração de polinizadores, permitindo a reprodução das espécies em clima frio (SEYMOUR, 2001; SEYMOUR *et al.*, 2003; SEYMOUR, GIBERNAU, 2008), mas em alguns casos tem sido proposto para providenciar temperatura ótima para a germinação do pólen e crescimento do tubo polínico (ONDA *et al.*, 2008; SEYMOUR *et al.*, 2009). Enquanto o envolvimento da pUCP na termogênese ainda é especulativo, a participação da AOX neste processo há muito tempo é bem consolidado (MEEUSE, 1975). Levando-se em consideração a presença simultânea de dois sistemas dissipadores de energia e a descoberta da co-expressão de ambas as proteínas na termogênese em plantas, questiona-se o papel individual das pUCPs neste processo.

Até o presente momento, SrAOX e SrUCPs (SrUCPA e SrUCPB) foram identificados em *Symplocarpus renifolius* (ONDA *et al.*, 2007; ITO-INABA *et al.*, 2008b), sendo que SrUCPA possui seis domínios transmembranares, típicos de todas as UCPs, enquanto SrUCPB carece do quinto domínio, constituindo-se uma UCP atípica (ITO, 1999; ITO-INABA *et al.*, 2008a). Ito-Inaba *et al.* (2008b) identificaram expressão constitutiva de SrUCPA em vários tecidos independentes do estágio termogênico, enquanto a proteína SrUCPA foi detectada somente em tecido ou estágio termogênico.

Por outro lado, para SrAOX, a expressão gênica e proteica aumentaram especificamente em tecidos e estágios termogênicos. Estes dados sugerem que a co-expressão específica da proteína SrUCPA e SrAOX em tecidos termogênicos, bem como a alta expressão da proteína SrUCPA em mitocôndrias de espádice pode desempenhar um papel na termogênese em *S. renifolius* (ITO-INABA *et al.*, 2008b). Todavia, estes dados são inconsistentes com um relato inicial de que SrUCPB seria um novo fator termogênico em *S. renifolius* (ITO, 1999). Onda *et al.* (2008) também sugeriram co-expressão de transcritos SrUCPB e SrAOX em estames de *S. renifolius* e concluíram que a principal pUCP em mitocôndrias de espádices em repolho do tipo skunk é a isoforma SrUCPB, com base em análises da mobilidade eletroforética sem controle apropriado. Estes resultados indicaram que SrUCPB e SrAOX estão envolvidas na termoregulação específica de tecido em *S. renifolius* (ITO, 1999; ONDA *et al.*, 2008). Todavia, análises de espectrometria de massa identificaram SrUCPA, e não SrUCPB, como a principal pUCP em *S. renifolius* (ITO-INABA *et al.*, 2008a). Desse modo, parece menos provável que a presença de uma SrUCPB atípica possua correlação com a termogênese em plantas, parecendo ser esta um pseudogene ou um splicing alternativo de transcritos SrUCPA (ZHU *et al.*, 2011). Para investigar o que é realmente crítico na termogênese, foram investigadas diferenças entre repolhos do tipo skunk termogênicos (*Symplocarpus renifolius*) e não-termogênico (*Lysichiton camtschaticensis*). Embora uma estreita relação seja observada entre *S. renifolius* e *L. camtschaticensis*, com base em análises morfológicas e filogenéticas do DNA cloroplastial, somente *S. renifolius* apresenta características termogênicas e termoregulatórias. O fator crítico da termogênese foi estudado em profundidade em *S. renifolius* e *L. camtschaticensis* (ITO-INABA *et al.*, 2009b). A análise de transcritos revelou expressão constitutiva para AOX e pUCP em *Lysichiton camtschaticensis* em

vários tecidos, tais como espádice, espata, talo e folhas (ITO-INABA *et al.*, 2009b). Estudos prévios mostraram que o RNAm de *SrAOX* foi especificamente expresso em espádice termogênica, enquanto que em *SrUCPA* foi constitutivamente expresso em vários tecidos (ITO-INABA *et al.*, 2008b). O perfil de proteínas mitocondriais totais em *S. renifolius* foi similar a *L. camtschaticensis*. Todavia, os níveis de AOX e pUCP foram drasticamente diferentes entre *S. renifolius* e *L. camtschaticensis*. A intensidade de sinal da AOX foi significativamente maior em *S. renifolius*, enquanto a acumulação da pUCP foi muito menor em *S. renifolius* em comparação a *L. camtschaticensis*. A espécie *L. camtschaticensis* não exibiu expressão específica de tecido do gene *LcAOX*. Isto pode ser associado com a carência de termogênese em *L. camtschaticensis* (ITO-INABA *et al.*, 2009b). Estes resultados sugerem que a AOX desempenha um importante papel na termogênese em *S. renifolius* e que a contribuição da pUCP na termogênese nesta espécie pode ser menos significativa. Pelo exposto, nenhuma função termogênica exclusiva para as pUCPs foi evidenciada até o presente momento. Outras evidências experimentais correlacionam a participação de AOX e pUCP na prevenção da formação de EROs e, conseqüentemente, na tolerância a estresses.

A expressão da pUCP também pode ser modulada em relação a vários estímulos ambientais. Em *Arabidopsis*, evidências circunstanciais a partir de um perfil de expressão em larga escala revelaram uma regulação dependente de estresses (DESIKAN *et al.*, 2001; KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; SEKI *et al.*, 2002a, 2002b). Além de ser regulado por baixas temperaturas (NANTES *et al.*, 1999, NOGUEIRA *et al.*, 2003), os genes da pUCP respondem aos estresses por seca/estiagem, ventania (CHEONG *et al.*, 2002) e ácido abscísico (ABA). Uma variação da expressão também foi observada durante a morte celular programada induzida por calor (SWIDZINSKI *et al.*, 2002) e em resposta a ataque patogênico (VAN WEEW *et al.*, 2003; VERCAUTEREN *et al.*, 2001; WHITHAM *et al.*, 2003).

A expressão da pUCP é intensificada no estágio de senescência de amadurecimento de frutos de manga (COSTA *et al.*, 1999; CONSIDINE *et al.*, 2001) e nos últimos estágios de amadurecimento de frutos de tomate na própria planta (HOLTZAPFFEL *et al.*, 2002). Estes últimos resultados estão de acordo com o fato de que um estado mais elevado de desacoplamento é observado na respiração de

mitocôndrias isoladas de tomates maduros quando comparada com tomates verdes (COSTA *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

- Identificação *in silico* dos genes pUCPs em *Vigna unguiculata*;
- Identificação *in silico* dos genes pUCPs em plantas da ordem Fabales cujos genomas já foram sequenciados;
- Caracterização dos Sinais Protéicos de Transferência de Energia e assinaturas das pUCPs a partir do alinhamento de sequência de aminoácidos deduzidos a partir das pUCPs de *Vigna unguiculata* e demais representantes da ordem Fabales;
- Estudar a expressão de genes pUCPs de *Vigna unguiculata* sob diferentes condições de estresses abióticos;

MATERIAIS E MÉTODOS

Identificação *in silico* dos genes e cDNAs de pUCPs em *Vigna unguiculata*

Os genes e cDNAs de pUCPs de *Vigna unguiculata* foram obtidos através de buscas em banco de ESTs (etiquetas de sequência expressa) disponível no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e banco de GSS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss>) disponíveis no servidor da Web Cowpea Genomics (<http://cowpeagenomics.med.virginia.edu/>) utilizando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e as seguintes sequências de pUCPs de *Arabidopsis* como pergunta (isca) [*AtUCP1*: NM_115271; *AtUCP2*: NM_125287; *AtUCP3*: AEE29110.1; *AtUCP4*: AAK68799.1; *AtUCP5*: NM_127816 e *AtUCP6*: AED91400.1]

A partir dos dados de ESTs / GSS obtidos, contigs/singletons foram gerados através da ferramenta CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) disponível na Web. As sequências de aminoácidos deduzidos foram obtidas através da tradução dos contigs/singletons usando a ferramenta traduc (<http://web.expasy.org/translate/>).

Identificação *in silico* dos genes de pUCPs das fabales [*Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt) e *Phaseolus vulgaris* (Pv)]

Os genes de pUCPs da ordem Fabales foram obtidos através de buscas no banco de dados WGS do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e no Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) utilizando a ferramenta BLAST e as sequências de pUCPs de *Arabidopsis* e *Vigna unguiculata* como pergunta (isca).

A anotação de sequências de exons/introns dos genes de pUCPs da ordem Fabales foi feita comparando-se as sequências genômicas obtidas com sequências de mRNA / ESTs disponíveis no GenBank. As sequências de cDNAs deduzidos foram obtidas através da retirada dos introns, junção dos exons e as sequências de aminoácidos deduzidos foram obtidas através da tradução dos cDNAs deduzidos usando a ferramenta traduc (<http://web.expasy.org/translate/>).

Alinhamento de sequências e análise filogenética

Os alinhamentos de sequências foram feitos usando-se a ferramenta de alinhamentos múltiplos Clustal X (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As análises filogenéticas foram feitas usando-se a ferramenta MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2007).

MATERIAL VEGETAL

Obtenção e Germinação das sementes de *Vigna unguiculata*

As sementes de *Vigna unguiculata* L. Walp cv. Vita 5, foram fornecidas pelo banco de sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará e armazenadas em frascos de vidro, a uma temperatura de aproximadamente 4° C até a utilização nos experimentos.

As sementes foram previamente selecionadas e esterilizadas durante 5 minutos, com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), contendo 5,2% de cloro ativo diluído 1:5 (v/v), para eliminação de possíveis esporos de fungos presentes no tegumento das sementes. Em seguida, o NaOCl foi retirado, lavando-se as sementes em água corrente e posteriormente, em água destilada.

Em seguida, as sementes foram colocadas a germinar em folhas umedecidas de papel de filtro acondicionados em depósitos contendo água suficiente para mantê-los umedecidos durante 3 dias a 25° C, na ausência de luz. Após 3 dias, as plântulas foram transferidas para um sistema de hidroponia, contendo solução nutritiva de Hoagland [KNO₃ 3M, NH₄H₂PO₄ 1M, MgSO₄ 1M, Ca(NO₃)₂ 1M, Fe-EDTA 0,5%, Microelementos] e mantidas em tais condições por 3 mais dias.

Após o 6° dia de semeadura, as plântulas de *Vigna unguiculata* foram subdivididas em 3 grupos: controle, estresses ambientais abióticos [hídrico, salino, oxidativo e frio (4° C)] e tratamento hormonal por ácido salicílico (sinalizador de estresse biótico em plantas). A condição controle consistiu na manutenção das plântulas em solução nutritiva de Hoagland. Os estresses hídrico, salino, oxidativo e tratamento pelo frio consistiram em aplicações na solução nutritiva de PEG (Polietilenoglicol)

200,67 g/L; NaCl (100mM) e H₂O₂ 10 mM ou submissão das plântulas em câmara de germinação de fluxo controlado (intensidade de luz de 200µE. m⁻².s⁻¹ por um fotoperíodo de 12 horas em humidade relativa de 70%), respectivamente. Já o tratamento hormonal consistiu na aplicação de ácido salicílico 5 mM.

Para estudos de expressão gênica das pUCPs foi realizado um “pool” de raízes e folhas oriundo a partir de 3 plântulas de *V. unguiculata*, coletadas após 0, 6, 12 e 24 horas de aplicação dos estresses, imediatamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA total.

Desenho de primers para estudo da expressão gênica das pUCPs de *Vigna unguiculata*

Os estudos de expressão gênica foram feitos através de RT-PCR semi-quantitativa e quantitativa dos genes UCPIa, 1b, 2, 3, 4 e 5, usando primers específicos.

Os primers para RT-PCR semi-quantitativa foram desenhados usando a ferramenta OligoTech, enquanto que para RT-PCR quantitativa foram desenhados usando a ferramenta PerlPrimer (MARSHALL, 2004), com tamanho de amplicon variando de 500 a 800 bp para os genes *VuCPIa*, *VuUCPIb*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5*, respectivamente.

A amplificação do gene da actina foi usada para a normalização dos dados de RT-PCR semi-quantitativa já para RT-PCR quantitativa, três genes constitutivos foram testados na normalização: 2 genes para actina (actinas 4 e 5) e 1 gene para o fator de alojamento 1- α (EF1 α). Números de acesso: Actina 4 [Contig dos ESTs (FC458479.1, FC458478.1, FG842722.1, FG935871.1)], Actina 5 [Contig dos ESTs (FF557137.1, FG888906.1, FG831894.1, FG936422)], EF1 α [Contig dos ESTs (FG893964.1, FG893965.1, FG819685.10)].

A especificidade dos iniciadores obtidos foi estimada a partir de uma busca de similaridade no Genbank, por meio do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

As sequências dos primers usados em RT-PCR semi-quantitativa e quantitativa são mostradas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Todos os iniciadores foram encomendados junto à empresa Invitrogen.

GENE	SEQUÊNCIA DE PRIMERS
VuUCP1a F	5'GTGTGTACTATTCCGTTG 3'
VuUCP1a R	5'TGCTATATTGGGGCCAAG 3'
VuUCP1b F	5'GTGTGTACTATTCCTCTC 3'
VuUCP1b R	5'GTTATGTTGGGTCCAATC 3'
VuUCP2 F	5' TTC CTC TGG ACA CAG CTA AG 3'
VuUCP2 R	5'TCC ACA GAG CTG ATA TAC CC 3'
VuUCP3 F	5'ATC GTT CTC AGC TAT GGT GG 3'
VuUCP3 R	5'AAC CCA GAA CAC AAA TTG CC 3'
VuUCP4 F	5'GAA AAC AAC GCT CCC AAA CC 3'
VuUCP4 R	5' CCT TCA TGT TCA TCA CCC TC 3'
VuUCP5 F	5'CAT GCA GCT TCA AGA AAC GC 3'
VuUCP5 R	5'ACT CCT TGA GCA GCT TCC TG 3'

Tabela 1 – Primers específicos usados em ensaios de PCR semi-quantitativa. F = Forward (senso) e R = Reverse (anti-senso).

GENE	SEQUÊNCIA DE PRIMERS
Q- VuUCP1a – F	5' AGCTGGTGATGTAATATCCG 3'
Q- VuUCP1a – R	5' CCCAATTCTCAAACCTCCG 3'
Q- VuUCP1b – F	5' ACTATTCCTCTCGACACTGCA 3'
Q- VuUCP1b – R	5' TCTTCCCTGGCGATGGTTG 3'
Q- VuUCP2 – F	5' TCTGGACACAGCTAAGGCC 3'
Q- VuUCP2 – R	5' TTCCACAGAGCTGATATACCC 3'
Q- VuUCP3 – F	5' GTTGGGTATGAGCATCTGAG 3'
Q- VuUCP3 – R	5' AGGGCTGGCTATAATCTGAG 3'
Q- VuUCP4 – F	5' TGGATTGTGCTCTGAAGACG 3'
Q- VuUCP4 – R	5' CCTTAAGCAACTTGCGAACC 3'
Q- VuUCP5 – F	5' TTCTGTTGCATCGAATCCT 3'
Q- VuUCP5 – R	5' CTTATAAAGGGCAAGAGGT 3'
Q- Actin4 – F	5' GAACAGGAATGGTTAAGGCG 3'
Q- Actin4 – R	5' CTTGAGAGTCAGAATACCACG 3'
Q- Actin5 – F	5' CTTCCAACAGATGTGGATCT 3'
Q- Actin5 – R	5' CCATCTTAGAAGCACTTCCG 3'
Q-EF1a2 - F	5' GTAACAAGATGGATGCCACC 3'
Q-EF1a2 - R	5' CCACTTTCTTCAAATACGAGGAG 3'

Tabela 2 – Primers específicos usados em ensaios de PCR quantitativa (qPCR). F = Forward (senso) e R = Reverse (anti-senso).

Extração de RNA total

A extração de RNA total de folhas e raízes de *V. unguiculata*, cultivar Vita 5, submetidos a diferentes tratamentos: controle, PEG 200,7 g/L, NaCl 100 mM, H₂O₂ 10 mM e ácido salicílico 5 mM foi feita utilizando o “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Alemanha).

As folhas e raízes de *V. unguiculata* (200 mg) das diferentes condições de tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de gral e pistilo previamente resfriado, até a obtenção de um lisado celular pulverizado. Estes foram transferidos para um eppendorf contendo 900 µl de tampão de lise RLT e 20 µl de β-mercaptoetanol. O tampão RLT contém isotiocianato de guanidina, que inativa RNases.

A mistura no eppendorf foi homogeneizada por uma vigorosa agitação em “vortex”. A amostra homogeneizada foi aplicada numa mini coluna do “kit” (“QIAshedder spin column”- lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e em seguida centrifugada à 10600g por 2 minutos à temperatura ambiente em centrífuga Sorvall Biofuge *pico*, rotor F-4518-11 (Eppendorf, Alemanha). Um total de 900 µl do eluato foi então recuperado, transferido para um novo tubo eppendorf de 2 mL e adicionado 0,5 volume de etanol 95% (450 µl) misturado por pipetagem, fornecendo condições adequadas de ligação do RNA à coluna rosa. Posteriormente, 700 µl dessa mistura foram transferidos para a coluna de fixação de RNA (“RNeasy Plant Mini Kit”- rósea, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e realizada uma centrifugação a 8.000g por 15 segundos para lavagem, sendo o eluato descartado. Em seguida, foram adicionados 350 µl de tampão RW1 à coluna e centrifugou-se novamente a 8.000g durante 15 segundos, descartando-se o eluato. Nesta etapa, foi realizado um tratamento de digestão de possíveis amostras de DNA contaminantes na coluna, pela adição de Tampão DNase, deixando-se em reação por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 350 µl de tampão RW1 à coluna e centrifugou-se novamente a 8.000g durante 15 segundos, descartando-se o eluato. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, sendo adicionados 500 µl de tampão RPE, seguido de centrifugação por 8.000g por 15 segundos. O eluído foi descartado e o tubo coletor reutilizado na mesma coluna. Uma segunda aplicação de 500 µl de tampão RPE, seguido de centrifugação a 10.600g por 2 minutos foi realizada, com

a finalidade de remover resíduos de etanol. O RNA total foi eluído da coluna com 30 µl de água livre de RNase, centrifugando-se à 10.600g por 1 minuto. O RNA total foi quantificado, analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e armazenado a -20° C para subseqüentes reações de RT-PCR.

Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total

A quantificação de RNA total foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm em cubeta de quartzo. Para o cálculo da concentração utilizou-se a seguinte relação: densidade ótica igual a 1 corresponde a uma concentração de 40 µg/mL de RNA total.

A quantificação e avaliação da pureza dos RNAs foram realizadas por medidas de absorvância em 230, 260, 280 e 320 nm em aparelho de espectrofotômetro PHARMACIA BIOTECH, modelo ULTROSPEC 2000. Os parâmetros de pureza estabelecem que as relações de absorvância entre $^{260}/_{230}$ nm devem apresentar valores iguais ou superiores a 2,0 e as relações $^{260}/_{280}$ nm apresentar valores no intervalo entre 1,7 e 2,0. Os dados de quantificação obtidos foram confirmados por leitura em Nanodrop 2000c da marca Thermo Scientific. O fator de diluição da amostra foi de 100 (2 µl da amostra em 198 µl de água DEPC) e para o cálculo da concentração de RNA utilizou-se a seguinte fórmula:

$$[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/mL} \times \text{FD} \times \text{DO}_{260\text{nm}}$$

Onde:

[RNA] → concentração de RNA da amostra

40 µg/mL → concentração de 1 DO em 260 nm para RNA

FD → fator de diluição usado para fazer a leitura

DO 260 nm → densidade óptica no comprimento de onda 260 nm.

A integridade do RNA extraído foi avaliada visualizando-se as bandas de subunidades de RNA ribossomais após eletroforese em gel de agarose 1,5%. O equivalente a 0,5 µg da amostra de RNA foi aplicado em gel de agarose com tampão MOPS 1 x. A eletroforese foi feita utilizando-se cuba da marca PHARMACIA modelo GNA 100 (7.5 x 10cm) acoplado à fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power - pac 300) com amperagem constante de 50 mA por aproximadamente 30 minutos à temperatura de 25⁰ C. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5µg/ml) por aproximadamente 10 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida após exposição do gel a raios ultravioletas. As fotos foram capturadas num fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBis Pro com auxílio do software GelCapture™.

Ensaio de expressão dos genes da pUCP

Transcrição reversa (RT)

Amostras de RNA total (1 µg), isolados a partir do “RNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN) foram submetidas a uma reação de transcrição pela enzima transcriptase reversa. O ensaio foi realizado em tubos de eppendorf de 500 µl, usando-se o kit ImpromII™ Transcriptase Reverse (Promega, Estados Unidos), contendo a mistura de reação na Tabela 3.

RNA total 1 µg	Variável
Oligo dT ₁₈ 20 pmoles/µl	3 µl
dNTP 10 mM	1 µl
Tampão 5 x	4 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µl
Transcriptase Reversa	1 µl
Água DEPC	q.s.p. 20 µl

Tabela 3 - Mistura de reação da transcrição reversa (RT) usando RNA total de *Vigna unguiculata*

Uma etapa prévia de desnaturação do RNA foi feita a 70° C por 5 minutos. A enzima transcrição reversa foi adicionada e a reação foi realizada a 37° C por uma hora e em seguida essa enzima foi inativada aquecendo-se a 75° C por 10 minutos. As amostras foram guardadas a - 20° C.

Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) Semi-quantitativa

Os cDNAs obtidos por reação de transcrição reversa (RT) foram amplificados por reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR) utilizando-se o sistema GoTaq® DNA Polimerase (Promega, Estados Unidos) e oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para os genes *VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5* e para a actina (*Actina*), utilizado como controle constitutivo (COSTA *et al.*, 2004), de *Vigna unguiculata*. Os tubos contendo a mistura de reação (Tabela 3) foram colocados em um termociclador THECHNE TC-512 para a amplificação dos genes alvos em amostras de folhas e de raízes de plantas em condições controle e de estresses, sendo submetidos a ciclos de PCR (Tabela 4).

Eletroforese do cDNA amplificado

A avaliação da amplificação do cDNA das pUCPs e actina de folhas e raízes de *Vigna unguiculata* foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se TBE 1 x (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM) como tampão de corrida em cuba eletroforética da marca PHARMACIA modelo GNA 100 (7.5x10cm). Após a aplicação da amostra no gel (7 µl) para a visualização das bandas, foi aplicada uma corrente contínua de 40 mA durante 45 minutos a 25°C por uma fonte regulável BIO RAD (Power-pac 300). O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 10 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta de um fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBis Pro com auxílio do software GelCapture™.

Produto de Transcrição Reversa (RT)	Variável em função da concentração de 1 µg dos produtos de transcrição reversa
H2O Mili-Q estéril q.s.p. 25 µl	Variável em função da leitura espectrofotométrica da quantidade de RNA transcrito
dNTPs 5 mM	1 µl
Tampão 5x	5 µl
Primer Senso (F) 300 nm	1 µl
Primer Anti-senso (R) 300 nm	1 µl
Taq polimerasen (5 U)	0,1 µl

Tabela 4 - Mistura da reação de PCR para amplificação do(s) gene(s) que codificam UCP em *Vigna unguiculata*

Etapa		Temperatura (° C)	Tempo (minutos)
Pré-desnaturação		94	3
27 x	Desnaturação	94	1
	Anelamento	55	1
	Alongamento	72	00:30

Extensão	72	5
Armazenamento	4	α

Tabela 5 - Programa de PCR utilizado para amplificação do(s) gene(s) que codificam pUCP em *Vigna unguiculata*. α = tempo indeterminado.

Reação em Cadeia da DNA Polimerase por qPCR (PCR em Tempo Real)

As análises quantitativas da expressão dos genes alvo (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5*) foram realizadas através de PCR em Tempo Real usando os genes de referência da Actina (Actin 4, Actin 5) e Fator de Elongação α (EF1 α). Os primers específicos para os genes da pUCP e de referência foram desenhados a partir de sequências de genes identificados por busca *in silico*. Após análise filogenética dos genes identificados, as ferramentas de bioinformática “Perl primer” e “oligoTech” foram usadas no desenho dos *primers* específicos.

As relações de absorvância 260/280 nm realizadas em aparelho de Nanodrop permitiram a obtenção de valores precisos da concentração dos cDNAs na ordem de nanogramas. Assim, 100 ng do cDNA de cada amostra foram utilizados na reação de qPCR. Além dos ácidos nucleicos, o meio de reação era composto por iniciadores específicos (300 nm cada) 10 μ l de 2X Power SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems*), com volume final de 20 μ l. A reação de amplificação foi realizada através de 40 ciclos térmicos de 95°C por 15s, 55°C por 15s e 60° C por 20s. A desnaturação inicial aplicada foi de 95°C por 10 min. Para as análises da expressão dos genes selecionados de cada amostra, os níveis de expressão foram monitorados por um gene de referência (controle constitutivo) visando normalizar as amostras quanto a possíveis diferenças de quantidade de cDNA adicionadas em cada reação. *Primers* específicos para genes da Actina e fator de alongação 1 α foram desenhados e testados para a escolha do melhor controle endógeno.

O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador RealPlex 4S (Eppendorf®) através da detecção dos níveis de fluorescência do SYBR Green. As análises dos dados de fluorescência obtidos foram realizadas pelo *Realplex Software*. Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em triplicatas. Os *Cycle threshold* (Ct) utilizados para as análises resultaram da média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controle endógeno. Para a normalização, foram utilizados cálculos comparativos entre a expressão dos genes alvos e os genes de referência (*Housekeeping*), utilizando-se a equação $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{controle endógeno})$. Os valores obtidos de normalização foram empregados numa nova fórmula aritmética, visando a calibração das amostras: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{controle})$. A quantificação relativa foi obtida pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

RESULTADOS

Identificação *in silico* de genes e cDNAs de pUCPs em *Vigna unguiculata*

Os genes e cDNAs da pUCP de *Vigna unguiculata* foram identificados através de buscas em bancos de dados usando a ferramenta BLAST e as sequências de pUCPs de *Arabidopsis thaliana* como pergunta. Como ponto de partida foi feita uma busca em bancos de dados de ESTs (disponíveis no NCBI) de *Vigna unguiculata* revelando inúmeras sequências com alta identidade. Após tratamento dessas sequências com a ferramenta CAP3, 4 “contigs” e 1 “singleton” codificando para possíveis pUCPs foram obtidos. Análise adicional revelou que os 4 contigs correspondiam a sequências de cDNAs completas uma vez que continham as regiões não traduzíveis (5’ e 3’ UTRs), região traduzível e cauda poli A (Figuras 10, 13, 14 e 15). Já o singleton correspondia a uma sequência parcial da extremidade 5’ (Figura 12).

Essas 5 sequências foram traduzidas, para obtenção dos aminoácidos deduzidos e classificadas através de comparação com as sequências de pUCPs de *Arabidopsis thaliana* revelando que os “contigs” correspondiam a UCPs do tipo 1a, 3, 4, e 5 (Figuras 10, 13, 14 e 15) e o “singleton” a UCP do tipo 2 (Figura 12).

Em trabalho anterior (GARANTIZADO, 2007) já havíamos questionado sobre a presença de um segundo gene UCP1 em *Vigna unguiculata*. Dessa forma, uma busca no banco de GSS (disponíveis no servidor da *Web Cowpea Genomics*) de *Vigna unguiculata* foi realizada revelando a presença do gene UCP1b. A sequência genômica parcial desse gene evidencia os éxons 2, 3, 4 e 5, os introns 1, 2, 3, 4 e 5 e os aminoácidos deduzidos identificados (Figura 11).

Identificação *in silico* dos genes de pUCPs em plantas da ordem das fabales

Para melhor compreender o número de genes e características de exons/introns em genes das pUCPs de plantas da ordem fabales, os genes das pUCPs de *Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt) e *Phaseolus vulgaris* (Pv) foram anotados a partir dos genomas disponíveis na base de dados Phytozome. Os

```

cacacagaccctttaagaacatttttccattcgggaggaaccaagcttgatctctttctttt
caaaagggatcaaaaggaaggtctcaaatttgcatacgcaacccttggttcctttcctaa
gaatcacacaacatcATGGTAGCAGATTCTAAGTCCAAATCCGACCTCTCCTTCGGCAA
M V A D S K S K S D L S F G K
ATCTTIGCCAGCAGTGTCTTCTCTGCATGTTTTGCTGAGGTGTGTACTATTCCGTTGGAC
I F A S S A F S A C F A E V C T I P L D
ACTGCCAAAGTTAGGCTTCAGCTTCAGAAACAAGCAGCAGCTGGTGATGTAATATCCGTA
T A K V R L Q L Q K Q A A A G D V I S V
CCTAAATATAAGGGTATGCTGGGAACAGTTGGTACCATTGCAAGGGAAGAAGGTCTTTCA
P K Y K G M L G T V G T I A R E E G L S
GCACCTCGGAAGGGAATTGTGCCAGGGTTGCATCGTCAATGTGTGTACGGAGGTTTGAGA
A L W K G I V P G L H R Q C V Y G G L R
ATTGGGTTATATGAGCCTGTAAAGTCTTTGTATGTGGGGAAGGATCATGTTGGAGATGTT
I G L Y E P V K S L Y V G K D H V G D V
CCATTGTCAAAGAAAATCTTGTCTGGATTCAACTGGTGCCGTTGGCAATTGCAGTGGCA
P L S K K I L A G F T T G A V A I A V A
AATCCAACCTGATCTTGTGAAAGTCAGACTTCAAGCAGAAGGAAAACCTAGCTCCTGGTGT
N P T D L V K V R L Q A E G K L A P G V
CCCAGGCGCTACTCTGGATCTTTAAATGCTTATTCAACAATTGTGAGACAGGAAGGAGTG
P R R Y S G S L N A Y S T I V R Q E G V
GGGGCTCTTTGGACTGGTCTTTGGCCCCAATATAGCAAGAAATGGTATCATCAATGCTGCT
G A L W T G L G P N I A R N G I I N A A
GAATTAGCCAGCTATGATCAAGTGAAACAGACTATTTGAAAATTCAGGATTCAGTAC
E L A S Y D Q V K Q T I L K I P G F T D
AATGTTGTAACCTCACTCCTTGTCTGGTCTTGGGGCAGGGTTTTTTGCCGTCTGTATTGGC
N V V T H L L A G L G A G F F A V C I G
TCCCAGTAGATGTTAAGTCCAGAAATGATGGGAGATTCTAGTTACAAGAACACCCCTTGAT
S P V D V K S R M M G D S S Y K N T L D
TGTTTTATCAAAACATTGAAAAATGATGGACCAATGGCCTTTTATAAAGGGTTCCCTTCCA
C F I K T L K N D G P M A F Y K G F L P
AATTTGGACGACTAGGATCTTGAATGTGATCATGTTTCTAACCTTAGAACAGACTAAA
N F G R L G S W N V I M F L T L E Q T K
AATTCGTCAAAGTTTAGAGTCACTTGAaccgagttaccttgacaatttttctaagagg
N F V K S L E S S -
gcttgctactacagcaaatgcagtgga aattgtaga aataaagctttctcttttcattct
tcgaactgaagggatgtggtaaagcatttttctggggggaatttttctttttatttttg
ataataagtgaggatattgtattcatatatactagtaacttttagcactttccatatatt
ctgtaggattttcttgcaatttcatttcatttcttttaatttattatgaaacatgacata
actttttgtttcaaatttggtggagttgaagcctcagttccaataaaaaaaaaaaaaaa
a

```

Figura 10 - Sequência de nucleotídeos da região codificadora deduzida de aminoácidos da UCP1a de *Vigna unguiculata*. O códon de iniciação para metionina (ATG) está em verde e o códon de parada ou terminação (TGA) está em vermelho. A região traduzível está representada com letras maiúsculas. Abaixo de cada códon (trinca) está representado o aminoácido correspondente. A região 5' UTR está representada com letras minúsculas e corresponde aos nucleotídeos localizados antes do códon de iniciação, enquanto que a região 3' UTR corresponde aos nucleotídeos localizados após o códon de parada.

tatgggaggtggaactgtgcttagtta tcaaaat atgggtgtgctgggtataaagtgcctagcca
 attgctta cttgctgtgtgtgtattga acaatggccatagaggaaaggtgttttttactgat
 atgatgatgacagacaggtcttcgcacttttctggttgatttccatggttcaatatggatga
 tta ttttctggtggttttcaaaaccttccgcacatctgttat tttggccacaacacgaaggggt
 tttgaattctctctacgactgt aactatggccacat tggctgcaatcatgcaacacatgac
 tacaacacctcaat ttcgaaacctgattattctctggtttgtgga tcttggaaattaaaggg
 gtgggatcaattgatttactctaaaatcataat accctggtttggctaacctgtctaa tcttgg
 gctgcactgaaaatattgcttaagaaa caaatat ttcattagatatcttacgtgaaacagtt
 aaagatgtatactaaaa ttttcttagctgogaattgtagt cctattactctgtaaagattg
 gtaattgggttctgcttgttata tattactaagcta tcttgtgttttgagt tcaactgtcat
 attgctttaacaataacttagt ctttgtgtttgtataaact atttgtttgaaattaattgctc
 caataattcag **GTGTGTACTATTCCTCTCGACACTGCAAAAAGTTAGGCTTCAGCTTCAAAAA**
 V C T I P L D T A K V R L Q L Q K
CAGCCTGTGATTGGTGACGTGGTGGCCTTACCTAAAATATAGGGGAATGCTTGAACCGTTGC
 Q P V I G D V V A L P K Y R G M L G T V A
AACCATCGCCAGGGAAGAAGGTCTTTCAGCACCTTGGAAAGGGGATTGTACCAGGGCTACAAC
 T I A R E E G L S A L W K G I V P G L Q
GTCAATGTGTGAATGGAGGCTTAAGAATTGCATTATGATCCTgtgagtttggaaacctg
 R Q C V N G G L R I A L Y D P
 attggagaatgttcatttatttgcagttcatttcca cegtttgcttatgtgatctgatgaca
 tagatttcatggggtttataacag **GTAAAGAGCTTCTATGTGGACCTGACCATGTGGAGA**
 V K S F Y V G P D H V G D
TGTTCATGTCTAAGAAAATTCTTGCAGGATTTACAACCTGgtaaagcccattcctggacat
 V P L S K K I L A G F T T
 tgttgcgtttttagaattattgatacattatgcaaa accatgatgttgaaccacatgaactt
 gtgttatcatcag **GTGCTAIGGCAATTGCTGTGGCTAATCCAACAGATCTTGTGAAAGTTAG**
 G A M A I A V A N P T D L V K V R
ACTTCAATCTGAAGGAAAATTGCCCCCTGGTGTGCCCAGGC GTTACACTGGATCATTAATG
 L Q S E G K L P P G V P R R Y T G S L N
CTTATTCAACAATAGTGAGACAGgtatttgcataataactta atatggtttgtgaaaatggga
 A Y S T I V R Q
 cgtgtattcagtccttttctggttatacttggttt tgttcacttgccttcctacacatag **GA**
 E
AGGAGTTGGTGCTCTTTGGACTGGGATGGACCCAACATAACAAGAAATGGTATCATTAAATG
 G V G A L W T G I G P N I T R N G I I N
CTGCTGAATTGGCCAGCTATGATCAAGTGAAACAGgtaatgcaaaagacactggacttaatt
 A A E L A S Y D Q V K Q
 ttggagtaaaactttgtattctcttcat ttttacttttgtataactat tttcttttgttgcaga

Figura 11 – Sequência genômica parcial do gene UCP1b de *Vigna unguiculata*. A sequência de nucleotídeos dos éxons 2, 3, 4 e 5 estão em letras maiúsculas e em amarelo. Aminoácidos deduzidos são mostrados abaixo dos respectivos códon. Os introns 1, 2, 3, 4 e 5 são mostrados em letras minúsculas.

```

ggactcacatctatttctccctctggtggagtgtga aaggaacgcgactaacactgtttta
accgtgaa ctggattga agtagagtctcgtta acgaaagtggttacgtaaatgccactag
tctccttcagcttctta aactctcacacccaa accctttcttcttccagtgcttggcta
ccgtcagca ATGTCAGATCCGAACCAGATTTCGTTGCTCTAGCCTTCTTGTGCAGCGCT
      M S D P N Q I S F A L A F L C S A
TTCGCCGCTTGTITTCGCCGAGITTTGTACCATTCCTCTGGACACAGCTAAGGCCAGGCTT
F A A C F A E F C T I P L D T A K A R L
CAACTACAAAAGAAGGTAGGGGTTGATGATGGAGTGGGTTTACCTAAATACAAGGGCATG
Q L Q K K V G V D D G V G L P K Y K G M
CTAAGCACAAATTAAGACCATTGCTAGAGAAGAGGGTATAATCAGCTCTGTGGAAAGGAATT
L S T I K T I A R E E G I S A L W K G I
GTCCTGGTTTGCATCGCCAATGTTTATATGGAGGCTTAAGAATCGGATTATACGATCCT
V P G L H R Q C L Y G G L R I G L Y D P
GTCAAAACATTTCTTGTGGTAGTGCCTTTGTGGAGAGGTTCCAATATACCATATGATC
V K T F L V G S A F V G E V P I Y H M I
CTGGCTGCTCTGCTCACTGGTGCTTTAGCAATCACGATTGCTAATCCAATGATCTTGTI
L A A L L T G A L A I T I A N P T D L V
AAAGTTAGGCTTCAATCTGAAGGTCATCTGCCATCTGGGGTACCTAGGCGTTATTCTGGT
K V R L Q S E G H L P S G V P R R Y S G
GCCATAGATGCTTATTTAACTATATTGAGACAGGAAGGAATAGGGGCCTTGTGGACTGGG
A I D A Y L T I L R Q E G I G A L W T G
CTTGGGCCAAACATAGCAAGGAATGCAATTATAAATGCTGCTGAATTAGCTAGCTATGAT
L G P N I A R N A I I N A A E L A S Y D
CAAGTGAAACGGGTGAAATCCAGGATGATGGGGGATTC AACCTACAAAGCACA
Q V K R V K S R M M G D S T Y K A

```

Figura 12- Sequência de nucleotídeos 5' parcial da região codificadora e de aminoácidos deduzidos da UCP2 de *Vigna unguiculata*. O códon de iniciação para metionina (ATG) está em verde. A região traduzível está representada com letras maiúsculas. Abaixo de cada códon (trinca) está representado o aminoácido correspondente. A região 5' UTR está representada com letras minúsculas e corresponde aos nucleotídeos localizados antes do códon de iniciação.

gatagaacagaaacggttcatcatcgaactgctccgaatggctgaggaaaatagaatctaac
catggatgacctgatgaaataggaagaaacattgcagtgaaaagggttcggttgtagtaaca
gtcactgggttcttgaaaccgcttgtggtgagttaggtctttcttgaatgtacccaa**ATG**
M
AAACCAGGCCATGAACATGGTGGAGTTGATACTGCTCAAGCAAAGGTCTTACTAGCATCG
K P G H E H G G V D T A Q A K V L L A S
TTCTCAGCTATGGTGGCTGAGACCACGACTTCCCCATAGACTTGATCAAAAACAAGACTT
F S A M V A E T T T F P I D L I K T R L
CAACTGCAITGGCGAATCACTTTCATCGAAGCGTCCCACTGGTGCATATCGAATAGGTTTG
Q L H G E S L S S K R P T G A Y R I G L
GCCATTGTTCGTGAACAAGGTGTTGTAGGCCTTTATAGTGGCCTGTCTCCAGCAATATT
A I V R E Q G V V G L Y S G L S P A I I
AGACACATGTTCTACACTCCTATTTCGAATTGTGGGTATGAGCACTTGAGAAGTGTGGTT
R H M F Y T P I R I V G Y E H L R S V V
TCTGCTGATAATGGTTCATTCTCTGTTATTAGCAAGGCTGCGGTCGGTGGAACTCCGGT
S A D N G S F S V I S K A A V G G T S G
GTCATTGCTCAGATTATAGCCAGCCCTGCCGATCTTGTCAAGGTGAGGATGCAAGCTGAT
V I A Q I I A S P A D L V K V R M Q A D
GGCCAAAGGATGAAGCAAGGCTTCAACCTCGGTATTCGGGGCCATTTGATGCTCTGAAC
G Q R M K Q G L Q P R Y S G P F D A L N
AAAATTGTGGAGCTGAAGGTTTCGAGGACTGTGGAAGGGTGTITTTTCTAATATCCAA
K I V G A E G F R G L W K G V F P N I Q
AGAGCCTTCTAGTGAACAATGGGGGAACTTGGCTGTATGACCATGCTAAACAATTGTGA
R A F L V N M G E L G C Y D H A K Q F V
ATTAGAAGTAGGATAGCTGATGATAATGTTTATGCCCACACATTAGCTTCCATCATGTCA
I R S R I A D D N V Y A H T L A S I M S
GGTTTAGCAGCAACTTCTTAAAGTTGTCCAGCTGATGTTGTGAAGACTAGAATGATGAAT
G L A A T S L S C P A D V V K T R M M N
CAAGCAGCCCAAGAGGAAGGGAAGTITTTATATAATAGCTCTTATGATTGCTTGGTAAAG
Q A A Q E E G K V L Y N S S Y D C L V K
ACAGTAAAAGTTGAAGGAATAAGAGCATTGTGGAAGGATTTTCCCACTTGGGCAAGG
T V K V E G I R A L W K G F F P T W A R
CTTGGCCCATGGCAATTTGIGTICTGGGTTACCTATGAGAAGTTTAGAAAATTTGCAGGT
L G P W Q F V F W V T Y E K F R K F A G
CTCTCTTCTTCT**TGA**tatggatattttgatttatattgcatgtaattcatacataataaat
L S S F -
tcacactagtcacagaatccactcttttcaacttttagcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 13- Sequência de nucleotídeos da região codificadora deduzida de aminoácidos da UCP3 de *Vigna unguiculata*. O códon de iniciação para metionina (ATG) está em verde e o códon de parada ou terminação (TGA) está em vermelho. A região traduzível está representada com letras maiúsculas. Abaixo de cada códon (trinca) está representado o aminoácido correspondente. A região 5' UTR está representada com letras minúsculas e corresponde aos nucleotídeos localizados antes do códon de iniciação, enquanto que a região 3' UTR corresponde aos nucleotídeos localizados após o códon de parada.

```

cctaattccaattggtctcaatagcttcaaatttctctactttttcatctcattcttcaa
aaagcaaaccaattcattaccaactctagttaaccttattcatccccattctcatt
ttccgaca caacaaaaa catcatcatcatc ATGGGTGTCAAAGGTTTCGTCGAGGGAGGC
M G V K G F V E G G
ATCGCTTCCATCATCGCCGGATGTTCCACACATCCACTTGATTGATCAAGGTCCGCATG
I A S I I A G C S T H P L D L I K V R M
CAGCTCCAGGGAGAAAAACAACGCTCCCAAACCGGTTCACAATCTCCGACCCGCACCTCGCC
Q L Q G E N N A P K P V H N L R P A L A
TTC AATCCGGTTCAAACGTCACGTGGCGACCATTCCGCAGGCTCGTGTGGGCCCCATA
F Q S G S N V H V A T I P Q A R V G P I
GGGGTGGCGTCCGCCTCGTTCAGCAAGAAGGCCCTTGGCGCCCTCTTCTCCGGCGTCTCC
G V G V R L V Q Q E G L A A L F S G V S
GCCACCGTCTCCGCCAGACGCTCTACTCCACCACC CGCATGGGGCTCTACGACATCCTC
A T V L R Q T L Y S T T R M G L Y D I L
AAGACCAAGTGGACCGACCCCGCCTCCGGCACCATGCATCTCGGCCGCAAGATCGAGGCC
K T K W T D P A S G T M H L G R K I E A
GGCCTCATCGCCGGCGCCATCGGAGCCGCCGTGGAAACCCGGCGGACGTTGCCATGGT
G L I A G A I G A A V G N P A D V A M V
CGAATGCAGGCCGACGGGCGCCTCCCGCCGGCAGAGCGGCGCAACTACAAGTCCGTCTGTG
R M Q A D G R L P P A E R R N Y K S V V
GACGCCATCCTGCGTATGGCGAGGCAAGAGGGCGTTATTAGCCTGTGGAGAGGTTTCATCG
D A I L R M A R Q E G V I S L W R G S S
CTTACTGTGAACCGCGCCATGCTCGTACTGCGTGCAGCTCGCGTCTTACGACCAGTTC
L T V N R A M L V T A S Q L A S Y D Q F
AAAGAGATGATTCTCCAGAGGGGCGTGATGCGCGATGGGCTTGGGACCCATGTCACGGCG
K E M I L Q R G V M R D G L G T H V T A
AGTTTCGCGGCAGGGTTCGTGGCGGCGGTGGCGTCAAACCCCGTGGACGTGATCAAGACG
S F A A G F V A A V A S N P V D V I K T
AGGGTGAATGAACATGAAGGTGGAGCCTGGGTCTCCGCCACCTTACGCCGGCGCGTGGAT
R V M N M K V E P G S P P P Y A G A L D
TGTGCTCTGAAGACGGTGGTGGCGAGGGGCCCATGGCCCTCTACAAGGGTTTCGTGCCT
C A L K T V R A E G P M A L Y K G F V P
ACGATCTCGAGGCAGGGACCCTTACC GTTGTGCTGTTTCGTGACACTGGAACAGGTTTCGC
T I S R Q G P F T V V L F V T L E Q V R
AAGTTGCTTAAGGATTTTTGAacggtagatcgacgaagaagacgatgacgaaaaatgcttc
K L L K D F -
tttccttttcaataagatctgttttgttttgggtgttgtgttgtattgtgataccgatatt
gtagtactagaatggtaattttgtttattttatctgtgaatcaatgagaagttaaagttt
tccgattgggttttgacaccataaaaaa aaaaaa aaaaaa

```

Figura 14- Sequência de nucleotídeos da região codificadora deduzida de aminoácidos da UCP4 de *Vigna unguiculata*. O códon de iniciação para metionina (ATG) está em verde e o códon de parada ou terminação (TGA) está em vermelho. A região traduzível está representada com letras maiúsculas. Abaixo de cada códon (trinca) está representado o aminoácido correspondente. A região 5' UTR está representada com letras minúsculas e corresponde aos nucleotídeos localizados antes do códon de iniciação, enquanto que a região 3' UTR corresponde aos nucleotídeos localizados após o códon de parada.

dados revelaram 6 genes em *Cajanus cajan* (*CcUCP1a*, *CcUCP1b*, *CcUCP2*, *CcUCP3*, *CcUCP4* e *CcUCP5*); 8 genes (*GmUCP1a*, *GmUCP1b*, *GmUCP2*, *GmUCP3*, *GmUCP4a*, *GmUCP4b*, *GmUCP5a* e *GmUCP5b*) e 3 possíveis pseudogenes (*GmPseudoUCP1a*, *GmPseudoUCP1b* e *GmPseudoUCP3*) em *Glycine max*; 7 genes (*MtUCP1a*, *MtUCP1b*, *MtUCP2*, *MtUCP3*, *MtUCP4*, *MtUCP5a* e *MtUCP5b*) em *Medicago truncatula* (Mt) e 6 genes (*PvUCP1a*, *PvUCP1b*, *PvUCP2*, *PvUCP3*, *PvUCP4* e *PvUCP5*) em *Phaseolus vulgaris* (Pv).

A Figura 16 mostra a estrutura gênica da pUCP1 (figura 16a) e pUCP2 (Figura 16b) das plantas *Arabidopsis thaliana* (At), representante da ordem Brassicales e das plantas *Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt) e *Phaseolus vulgaris* (Pv), representantes da ordem Fabales. Todos estes representantes apresentam a mesma estrutura gênica, composta por 9 exons e 8 íntrons. Em relação ao comprimento gênico apresentando pelas pUCPs dos tipos 1 e 2, referentes as variações no tamanho dos exons e íntrons, o gene *AtUCP1* apresentou o menor comprimento dentre todas as sequências analisadas, podendo ser destacado o menor tamanho do primeiro intron em relação aos demais membros da família multigênica. Variações no tamanho dos íntrons 6, 7 e 8, maiores nos genes das pUCPs das demais leguminosas do que em *Arabidopsis* foram também observadas. Os genes *GmUCP1a* e *MtUCP1a* apresentaram padrão similar de comprimento de exons e íntrons. Uma similaridade de comprimento gênico foi também detectada entre os genes *GmPseudoUCP1a* e *PvUCP1a*. Similaridades com pequenas variações no tamanho de exons e íntrons foram observados entre os genes *CcUCP1a* e *PvUCP1a* ou entre *GmUCP1b*, *GmPseudoUCP1b*, *MtUCP1b* e *PvUCP1b*. No caso das pUCP2, variações no comprimento dos íntrons 3, 6, 7 e 8 são observadas, com maiores tamanhos detectados nas leguminosas em relação a *Arabidopsis*. Especificamente observado para *PvUCP2*, variações são detectadas para os íntrons 1, 3, 5, 6, 7 e 8 maiores que em *AtUCP2*.

A figura 17 mostra a estrutura dos genes das UCPs 3 (A), 4 (B), 5 (C) e 6 (D) das plantas *Arabidopsis thaliana* (At), representante da ordem Brassicales e das plantas *Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt) e *Phaseolus vulgaris* (Pv), representantes da ordem Fabales. As pUCPs do tipo 3 apresentam estrutura gênica formada por três exons e dois íntron, exceto para *AtUCP3*, formada por dois exons e 1

intron. O gene *AtUCP3* também apresentou o primeiro exon ligeiramente maior que nas demais espécies de leguminosas. O padrão de comprimento do exon 2 nas pUCP3

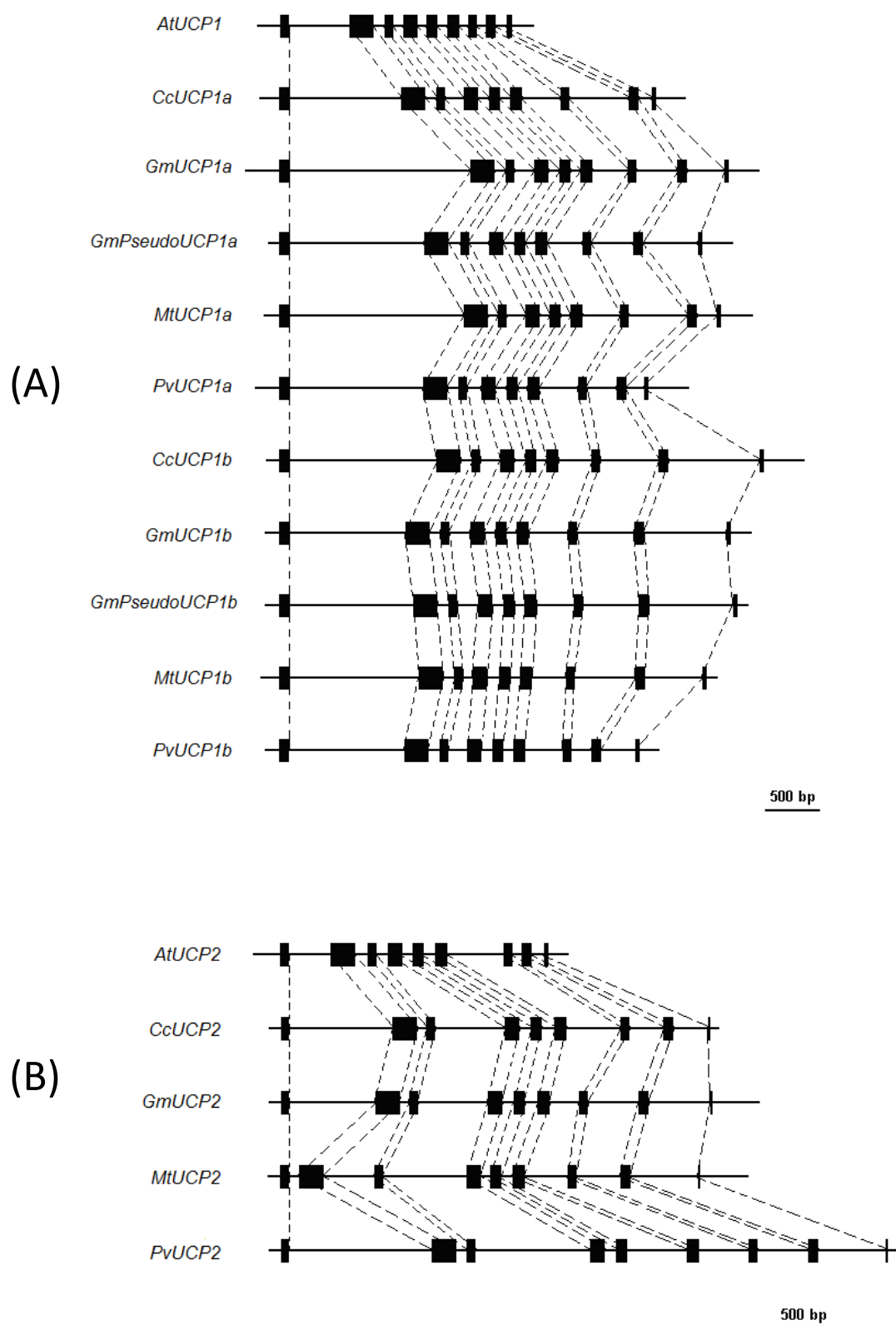


Figura 16 – Estrutura de 9 exons (retângulos preenchidos) e 8 introns (linhas entre os retângulos) dos genes *pUCP1* (A) e *pUCP2* (B) das plantas *Arabidopsis thaliana* (At) [ordem Brassicales] e *Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt) e *Phaseolus vulgaris* (Pv) [ordem Fabales]. As barras indicam os números de bp (pares de bases) do DNA cromossômico.

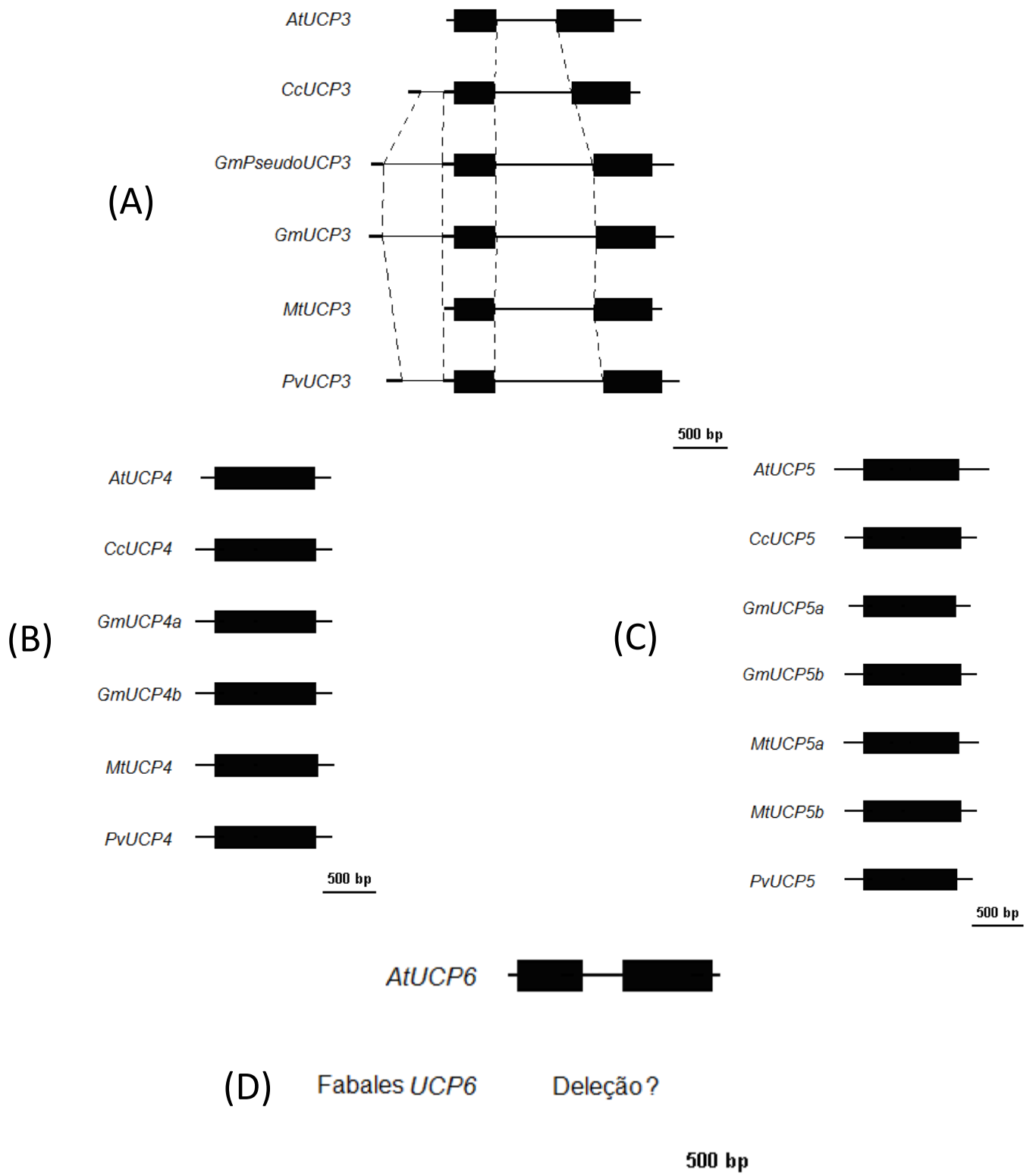


Figura 17 – Estrutura gênica das UCPs 3 (A), 4 (B), 5 (C) e 6 (D) das plantas *Arabidopsis thaliana* (At) [ordem Brassicales] e *Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt) e *Phaseolus vulgaris* (Pv) [ordem Fabales]. Exons (retângulos preenchidos); introns (linhas entre os retângulos). As barras indicam os números de bp (pares de bases) do DNA cromossômico.

mostrou-se similar entre as espécies analisadas, entretanto ocorrendo variações no tamanho do segundo intron presente na composição gênica desta isoforma, evidenciando maiores similaridades entre *AtUCP3* e *CcUCP3* ou entre os genes *GmPseudoUCP3*, *GmUCP3*, *MtUCP3* e *PvUCP3*. Já as pUCPs dos tipos 4 e 5 apresentam genes estruturalmente formados por um único exon (ausência de íntrons). Em relação a UCP6, esse gene é estruturalmente formado por 2 exons e 1 intron, sendo encontrado em *Arabidopsis*, mas não detectado em nenhum dos genomas de plantas da ordem Fabales.

As Figuras 18, 19 e 20 mostram os alinhamentos das sequências de aminoácidos deduzidos das pUCP1-2, pUCP-3 ou pUCP4-5-6 de *Vigna unguiculata* (Vu), respectivamente, com as sequências de *Arabidopsis thaliana* (At), *Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt) e *Phaseolus vulgaris* (Pv), para a identificação dos três SPTE (Sinal Protéico de Transferência de Energia), típico das UCPs. O alinhamento entre pUCPs dos tipos 1 e 2 evidenciou sequências quase que completamente conservadas no 1^o SPTE entre as várias espécies, com exceção da substituição do aminoácido não-polar valina (V) por outro aminoácido não-polar alanina (A) em VuUCP2. O 2^o SPTE mostrou uma única variação, com substituição do aminoácido alanina (A) pelo aminoácido não-carregado polar serina (S) em PvUCP2, VuUCP2, MtUCP2, PvUCP1b, VuUCP1b e AtUCP2, enquanto que o 3^o SPTE mostrou uma única substituição de valina (V) por isoleucina (I) em AtUCP2 (Figura 18).

O alinhamento entre pUCPs do tipo 3 mostrou mais variações do que o observado em pUCPs dos tipos 1 e 2 em relação ao 1^o SPTE, com substituição do aminoácido não-polar isoleucina (I) pelo aminoácido não-polar valina (V) em PvUCP3 e substituições consecutivas do aminoácido não-polar isoleucina (I) pelo aminoácido não-carregado polar treonina (T) e substituição do aminoácido não-polar leucina (L) pelo aminoácido não-polar metionina (M), respectivamente, em AtUCP3. As 2^a e 3^a sequências conservadas do SPTE não mostraram variações nas pUCP3 (Figura 19). O alinhamento entre pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 mostrou variações no 1^o SPTE, com substituições dos aminoácidos metionina (M) por leucina (L), ambos não-polares e por substituição do aminoácido não-carregado polar glutamina (Q) pelo aminoácido carregado positivamente histidina (H), ambas substituições em AtUCP4. O 2^o SPTE

apresentou substituição do aminoácido alanina (A) por serina (S) em CcUCP5. O 3^o SPTTE apresentou substituições de valina (V) por isoleucina (I) em PvUCP5, VuUCP5,

Figura 18 - Alinhamento de pUCPs dos tipos 1 e 2 de *Vigna unguiculata* e demais representantes da ordem Fabales. Em amarelo estão representadas sequências conservadas de 12 aminoácidos denominados SPTE; Em cinza-claro estão representados as “assinaturas” das pUCPs. **TH** (Treonina-Histidina): sequência de dois aminoácidos conservados, sendo específicos das UCPs/pUCPs. [**R** (fonte vermelha) = Arginina 182; **E** (sombreado verde) = Glutamato 190; **H** (sombreado em preto) = Histidina 214, sendo um dos dois aminoácidos conservados específicos das pUCPs envolvido na ligação ao PNBD] = aminoácidos conservados. A sequência **LWTG** (fonte vermelha/sombreado cinza) representa o início do quarto segmento α -hélice, antecedendo a terceira assinatura UCP (**PNIARNAIVNAAELAS**) em PvUCP2, com variações nos demais membros. O sexto segmento α -hélice, na qual contém parte do quarto sinal específico das UCPs, inicia-se com uma sequência de nove resíduos de aminoácidos em glutamato (E261) até glicina (G269) **EGFLAFYKG** (sombreado verde / fonte branca + sombreado cinza / fonte verde) para PvUCP2, com algumas variações para demais membros. A quarta assinatura específica das pUCPs tem intersecção com o início deste sexto segmento α -hélice, seguido por FLP / FIP, sendo portanto, a sequência completa **FYKGFLP** em PvUCP2, com variações nos demais membros. Em sombreado azul está representado a sequência PNBD, com 16 resíduos de aminoácidos e em sombreado cinza-escuro os 7 resíduos do quarto segmento citosólico.

Figura 19 – Alinhamento de pUCPs do tipo 3 de *Vigna unguiculata* e demais representantes da ordem Fabales. Em amarelo estão representadas sequências conservadas de 12 aminoácidos denominados SPTE; Em cinza-claro estão representados as “assinaturas” das pUCPs. **AH** (Alanina-Histidina): sequência de dois aminoácidos conservados, sendo específicos das UCPs/pUCPs. [**R** (fonte vermelha) = Arginina 182; **E** (sombreado verde) = Glutamato 190; **H** (sombreado em preto) = Histidina 214, sendo um dos dois aminoácidos conservados específicos das pUCPs envolvido na ligação ao PNBD] = aminoácidos conservados. A sequência **LWKG** (fonte vermelha/sombreado cinza) representa o início do quarto segmento α -hélice, antecedendo a terceira assinatura UCP (**PNIQRAFLVNMGELGC**). O sexto segmento α -hélice, na qual contém parte do quarto sinal específico das UCPs, inicia-se com uma sequência de nove resíduos de aminoácidos em glutamato (E261) até glicina (G269) **EGIRALWKG** (sombreado verde / fonte branca + sombreado cinza / fonte verde). A quarta assinatura específica das pUCPs tem intersecção com o início deste sexto segmento α -hélice, seguido por FFP, sendo portanto, a sequência completa **LWKGFFP**. Em sombreado azul está representado a sequência PNBD, com 16 resíduos de aminoácidos e em sombreado cinza-escuro os 7 resíduos do quarto segmento citosólico.

Figura 20 - Alinhamento de pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 de *Vigna unguiculata* e demais representantes da ordem Fabales. Em amarelo estão representadas sequências conservadas de 12 aminoácidos denominados SPTE; Em cinza-claro estão representados as “assinaturas” das pUCPs. **TH** (Treonina-Histidina): sequência de dois aminoácidos conservados, sendo específicos das UCPs/pUCPs. [**R** (fonte vermelha) = Arginina 182; **Q** (fonte verde) = Glutamina 190; **H** (sombreado em preto) = Histidina 214, sendo um dos dois aminoácidos conservados específicos das pUCPs envolvido na ligação ao PNBD] = aminoácidos conservados. A sequência **LWRG** (fonte vermelha/sombreado cinza) representa o início do quarto segmento α -hélice, antecedendo a terceira assinatura UCP (**LTVNRAMIVTASQLAS**) para VuUCP5, com variações nos demais membros. O sexto segmento α -hélice, na qual contém parte do quarto sinal específico das UCPs, inicia-se com uma sequência de nove resíduos de aminoácidos em glutamato (E261) até glicina (G269) **EGPLALYKG** (sombreado verde / fonte branca + sombreado cinza / fonte verde) para PvUCP5, com algumas variações para demais membros. A quarta assinatura específica das pUCPs tem intersecção com o início deste sexto segmento α -hélice, seguido por FLP / FVP, sendo portanto, a sequência completa **LYKGFIP** em PvUCP5, com variações nos demais membros. Em sombreado azul está representado a sequência PNBD, com 16 resíduos de aminoácidos e em sombreado cinza-escuro os 7 resíduos do quarto segmento citosólico.

GmUCP5a, MtUCP5a, GmUCP4b e AtUCP6; substituição de isoleucina (I) por valina (V), valina (V) por metionina (M) e metionina (M) por alanina (A) em AtUCP6 (Figura 20).

As sequências de todas as isoformas de pUCPs mostradas nas figuras 18, 19 e 20 foram submetidas a um rastreamento (screening) para a detecção da presença de quatro motivos comuns exclusivos, também chamados de sinais ou “assinaturas” específicas das UCPs proposto por Ježek & Urbánková (2000). Nestas figuras podem ser vistos os quatro sinais específicos das UCPs, localizados, respectivamente, no primeiro, segundo, quarto e sexto domínio α -hélice, além de uma sequência conservada de dois aminoácidos “doublet” também específicos das UCPs, sendo cisteína-histidina ou treonina-histidina (C-H ou T-H), localizados no quinto domínio α -hélice. As pUCPs dos tipos 1 e 2 (Figura 18), bem como 4, 5 e 6 (Figura 20) apresentam esta sequência conservada de dois aminoácidos, enquanto que nas pUCPs do tipo 3 há uma substituição de treonina (T) para alanina (A), sendo porém conservada em todas as sequências analisadas (Figura 19).

As pUCPs dos tipos 1 e 2 (Figura 18) apresentam cinco substituições de aminoácidos no primeiro sinal específico das UCPs, como a alteração da primeira fenilalanina (F) presente na sequência pelo aminoácido não-polar valina (V) em CuUCP2 e AtUCP1 ou da segunda fenilalanina (F) por valina (V) em PvUCP1a, VuUCP1a, GmP-UCP1a, GmUCP1a, CcUCP1a, MtUCP1a, GmP-UCP1b, GmUCP1b, CcUCP1b, PvUCP1b, VuUCP1b e AtUCP1. Ocorreram também substituições da segunda fenilalanina (F) pelo aminoácido não-polar isoleucina (I) em MtUCP1b ou pelo aminoácido não-polar leucina (L) em AtUCP2 e de isoleucina (I) por leucina (L) em GmP-UCP1b e GmUCP1b. O segundo sinal específico apresentou sete modificações, como a substituição do aminoácido carregado positivamente histidina (H) pelo aminoácido não-carregado e polar glutamina (Q) em PvUCP1b e VuUCP1b; alteração entre aminoácidos não-polares de leucina (L) por valina (V) em VuUCP1a e VuUCP1b ou por isoleucina (I) em AtUCP2; substituição do aminoácido aromático tirosina (Y) pelo aminoácido não-carregado e polar asparagina (N) em GmPUCP1b, GmUCP1b, CcUCP1b, PvUCP1b e VuUCP1b ou por fenilalanina (F) em AtUCP1; mudança entre

aminoácidos não-polares de glicina (G) por alanina (A) em MtUCP2, GmP-UCP1b, GmUCP1b, PvUCP1b, CcUCP1b, PvUCP1b e VuUCP1b ou de leucina (L) por metionina (M) em AtUCP1. O terceiro sinal específico apresentou cinco modificações, dentre elas substituições de prolina (P) por alanina (A) ou de isoleucina (I) por valina (V), respectivamente em GmUCP2 ou MtUCP1b e AtUCP1; substituições do quarto e sexto aminoácidos alanina (A) por treonina (T) em PvUCP1b e VuUCP1b ou por glicina (G) em PvUCP1a, VuUCP1a, GmP-UCP1a, GmUCP1a, MtUCP1a, GmP-UCP1b, GmUCP1b, CcUCPb, PvUCP1b e VuUCPb. Por último, alteração de isoleucina (I) por valina (V) em AtUCP2.

As pUCPs do tipo 3 (Figura 19) apresentaram duas alterações no primeiro sinal específico: substituições da primeira treonina (T) por serina (S) em MtUCP3 e AtUCP3 ou da segunda treonina por valina (V) em AtUCP3. O segundo sinal específico apresentou quatro substituições: alteração de isoleucina (I) por fenilalanina (F) em GmPseudoUCP3; substituição de metionina (M) por leucina (L) em PvUCP3, CcUCP3, MtUCP3 e AtUCP3; substituição de treonina (T) por serina (S) em GmUCP3 ou de valina (V) por isoleucina (I) em AtUCP3. No terceiro sinal, ocorreu substituição de glicina (G) por alanina (A) em PvUCP3.

As pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 mostraram sete alterações de resíduos de aminoácidos no primeiro sinal, como substituição de serina (S) por alanina (A) em AtUCP6; treonina (T) por valina (V) em CcUCP5, GmUCP5b e AtUCP4; valina (V) por isoleucina (I) em PvUCP4, VuUCP4, GmUCP4a, GmUCP4b, MtUCP4, CcUCP5, GmUCP5b, MtUCP5b, AtUCP4, AtUCP6; cisteína (C) por serina (S) em MtUCP5a ou por alanina (A) em AtUCP6; treonina (T) por serina (S) em VuUCP5, PvUCP4, VuUCP4, CcUCP4, GmUCP4b, MtUCP4, CcUCP5, GmUCP5b, MtUCP5b, AtUCP5 e AtUCP4 ou por leucina (L) em AtUCP6 (Figura 20). No segundo sinal específico, oito modificações foram identificadas, como substituição da metionina (M) por valina (V) em GmUCP5a, MtUCP5a, PvUCP4, VuUCP4, CcUCP4, GmUCP4b, GmUCP4a, GmUCP5b, MtUCP5b e AtUCP5 ou por isoleucina (I) em CcUCP5 e AtUCP6 ou por leucina (L) em AtUCP4. O aminoácido treonina (T) foi substituído para metionina (M) em CcUCP4 e AtUCP6, por leucina (L) em CcUCP5 e GmUCP5b ou por cisteína (C) em MtUCP5b. A segunda treonina na sequência sinal foi substituída por alanina (A) em

AtUCP6. O aminoácido leucina (L) substituído por isoleucina (I) em AtUCP6. O terceiro sinal mostra cinco modificações, como variações a substituição de valina (V) por isoleucina (I) em AtUCP5 e AtUCP4; isoleucina (I) por leucina (L) em PvUCP4, CcUCP4, GmUCP4b, GmUCP4a, MtUCP4, CcUCP5, GmUCP5b, MtUCP5b; alanina (A) por serina (S) em AtUCP5; serina (S) por alanina (A) em AtUCP4 ou por treonina (T) em AtUCP6 (Figura 20).

Todas as pUCPs apresentam o quarto sinal específico, embora este não seja completamente exclusivo das UCPs, em virtude do mesmo conter sequências comuns ao sítio de ligação a nucleotídeos purínicos (PNBD), representado nas Figuras (18, 19 e 20), de acordo com Bouillaud *et al.* (1994). O sítio PNBD é composto por dezesseis aminoácidos e antecede ao quarto segmento citosólico, composto por sete resíduos de aminoácidos.

O quarto segmento α -hélice, correspondente ao terceiro sinal específico, se inicia por um resíduo de aminoácido livre, seguido pela sequência L W _ G (leucina, triptofano, aminoácido variável, glicina). Os dezesseis aminoácidos que formam o terceiro motivo homólogo se inicia com uma prolina (P178) conservada nas pUCPs dos tipos 1 e 2 (Figura 18) e pUCPs do tipo 3 (Figura 19), sendo observada nesta mesma posição lisina (L178) nas pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 (Figura 20). Neste mesmo motivo foi identificado um resíduo de arginina (R182) conservado em todas as pUCPs. Dois resíduos de aminoácidos foram quase que conservados em todas as pUCPs, sendo eles glutamato (E190) e histidina (H214), com substituição para glutamina (Q190) nas pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 (Figura 20). O resíduo de H214 corresponde a sequência de dois aminoácidos “doublet” específico de todas as UCPs. Estes dois resíduos, E190 e H214, estão envolvidos no controle da dependência do pH dos nucleotídeos purínicos em relação ao PNBD (Figuras 18, 19 e 20).

O sexto segmento α -hélice, na qual contém parte do quarto sinal específico das UCPs, inicia-se com uma sequência de nove resíduos de aminoácidos do glutamato (E261) até glicina (G269) (Figuras 18, 19 e 20). Esta sequência, embora apresente algumas substituições, é conservada em todas as UCPs/pUCPs e é considerada como “elemento de reconhecimento aos nucleotídeos putativos”, sendo os três últimos resíduos conservados em todas as pUCPs, com exceção de tirosina (Y) para triptofano

(W) nas pUCPs do tipo 3 (Figura 19). Estes três aminoácidos são essenciais para a inibição do transporte de prótons nas UCPs por nucleotídeos purínicos.

Além das sequências sinais supracitadas, vários resíduos de aminoácidos são conservados nas UCPs/pUCPs, como prolina (P32) e lisina (K37) ou prolina (P231) e aspartato (D233) integrantes do primeiro e segundo SPTE, respectivamente.

A árvore filogenética, construída através de ferramentas de bioinformática, comparando os genes pUCPs de plantas da ordem Fabales (*Cajanus cajan*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*) e *Arabidopsis thaliana* (ordem Brassicales) é mostrada na Figura 21. As pUCPs estão divididas em três grandes grupos, sendo um deles representado pelas pUCPs dos tipos 1 (1a e 1b) e pUCP2, outro grupo composto pelas pUCP4-5-6 e o mais distante representado pelas pUCP3. As pUCPs de *Vigna unguiculata* estão marcadas em amarelo. Nenhuma pUCP do tipo 6 foi identificada em representantes da ordem Fabales.

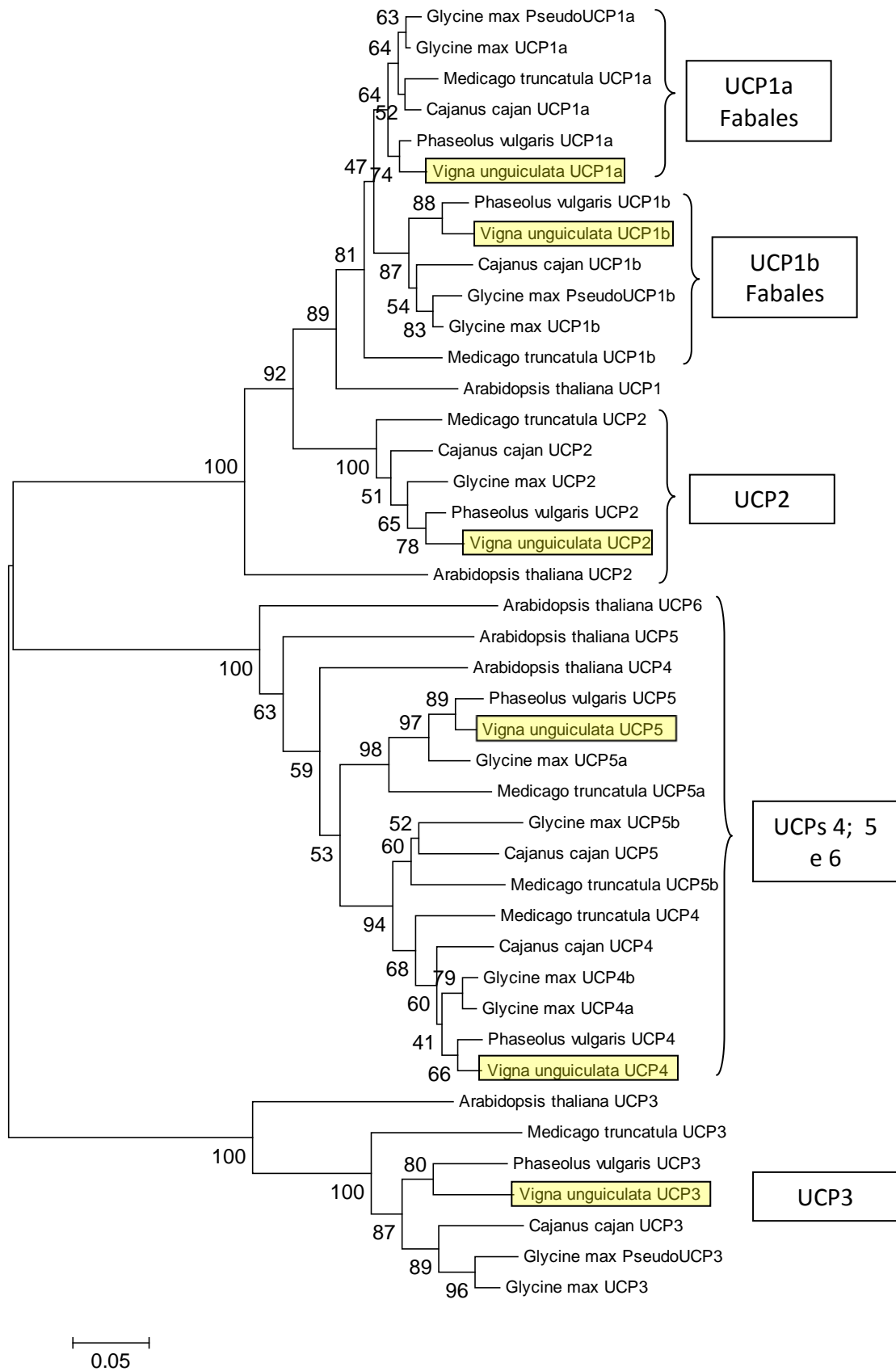


Figura 21 – Árvore filogenética das UCPs de plantas da ordem Fabales (*Cajanus cajan*, *Glycine max*, *Medicago truncatula* e *Phaseolus vulgaris*) e *Arabidopsis thaliana* (ordem Brassicales). As UCPs de *Vigna unguiculata* estão marcadas de amarelo.

Expressão de gene(s) da pUCP em *Vigna unguiculata* por RT-PCR semi-quantitativa

A expressão de gene(s) da pUCP em *V. unguiculata* cv. Vita 5 foi inicialmente avaliada através de RT-PCR semi-quantitativa usando-se oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos *VuUCP1a* e *VuUCP1b* e RNA total extraído de folhas nas condições controle e de estresse por NaCl 100 mM, PEG 200,67 g/L, H₂O₂ 10 mM e ácido salicílico 0,5 mM.

Os resultados de RT-PCR revelaram a amplificação de fragmentos de cDNA de tamanho molecular esperado (500 bp) em todas as condições testadas. Conforme pode ser observado na Figura 22, para o gene *VuUCP1a*, não houve diferença aparente na intensidade das bandas amplificadas das diferentes amostras quando comparadas a condição controle em todos os tempos testados. Já o gene *VuUCP1b* apresentou aumento de expressão na presença de PEG 200,67 g/L, H₂O₂ 10 mM e ácido salicílico 0,5 mM nos tempos 6, 12 e 24 horas.

Um estudo de expressão da pUCP foi avaliado em resposta ao estresse pelo frio (4° C) em comparação à condição controle (28° C) para os genes *VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5*. A Figura 23 mostra que não houve diferenças na intensidade das bandas amplificadas em todas as condições testadas.

Os dados de expressão para a pUCP (*VuUCP1a* e *VuUCP1b*) foram comparados com à expressão gênica da AOX nas mesmas condições experimentais (COSTA *et al.*, 2010), caracterizando uma co-expressão gênica entre pUCP e AOX em situações de estresses abióticos em *Vigna unguiculata* (dados não mostrados). Os genes *VuUCP1a* e *VuAox2a* não apresentaram diferenças nas intensidades das bandas quando comparadas à condições controle em todas as condições estudadas. Na condição de estresse por PEG, a intensidade das bandas amplificadas evidenciaram indução de expressão para o gene *VuUCP1b* nos tempos de 6 e 12 horas, diminuindo esse perfil com 24 horas de estresse, enquanto que os genes *VuAOX1* e *VuAOX2b* apresentaram maiores intensidades das bandas nos tempos 6, 12 e 24 horas, entretanto apresentando *VuAOX2b* maior indução no tempo de 24 horas, contrastando com o perfil de *VuUCP1b* especificamente neste intervalo de tempo. O estresse oxidativo

imposto pela aplicação de H_2O_2 apresentou perfil de expressão similar para os genes *VuUCP1b*, *VuAOX1* e *VuAOX2b*, com aumento da intensidade das bandas com 6 e 12 horas e diminuição com 24 horas de estresse. Já o tratamento por ácido salicílico mostrou três perfis distintos, com aumento de expressão para *VuUCP1b* nos tempos de 6 e 12 horas e decréscimo da expressão no tempo de 24 horas, indução de expressão para *VuAOX1* com 6, 12 e 24 horas, mas sem diferenças na intensidades das bandas neste intervalo de tempo e expressão para *VuAOX2b* com intensidade das bandas aproximadamente duas vezes maior no tempo de 6 horas, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. O estresse por baixas temperaturas (4° C) não apresentou indução da expressão para os genes *pUCPs*, contrastando com o perfil de expressão dos genes *AOX*, na qual apresentaram indução da expressão para *VuAOX1* e *VuAOX2b* com 24 horas de estresse, sendo o primeiro gene citado aproximadamente duas vezes mais expresso que o segundo (dados não mostrados).

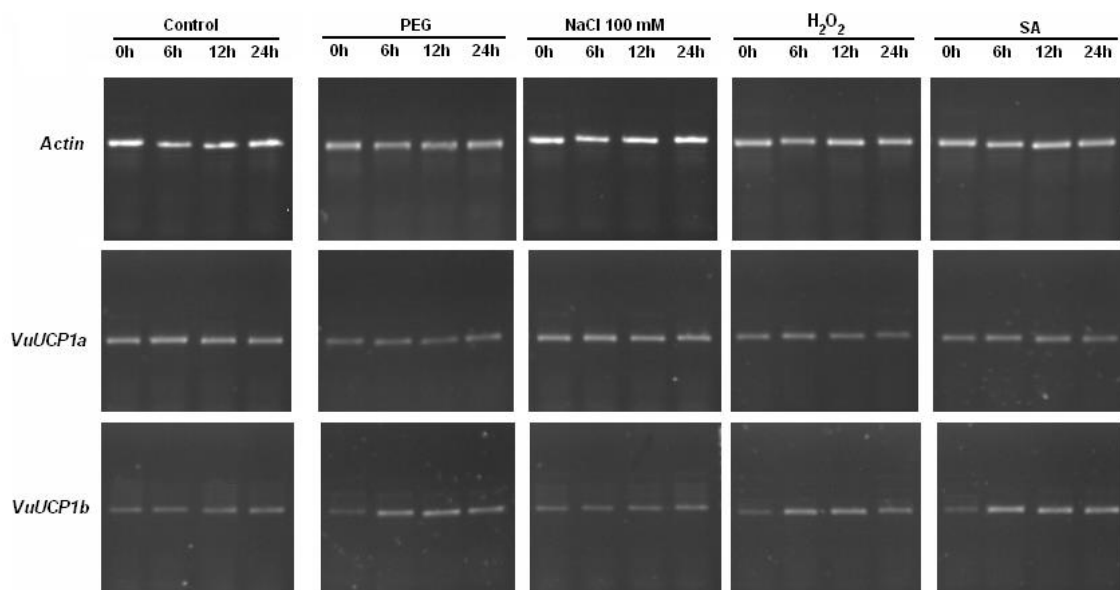


Figura 22 – Expressão diferencial dos genes *VuUCP1a* e *VuUCP1b* em folhas de *Vigna unguiculata* nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas de estresse com NaCl 100 mM, PEG 200,67 g/L, ácido salicílico 0,5 mM e H₂O₂ 10 mM. A amplificação da Actina foi usada como controle constitutivo.

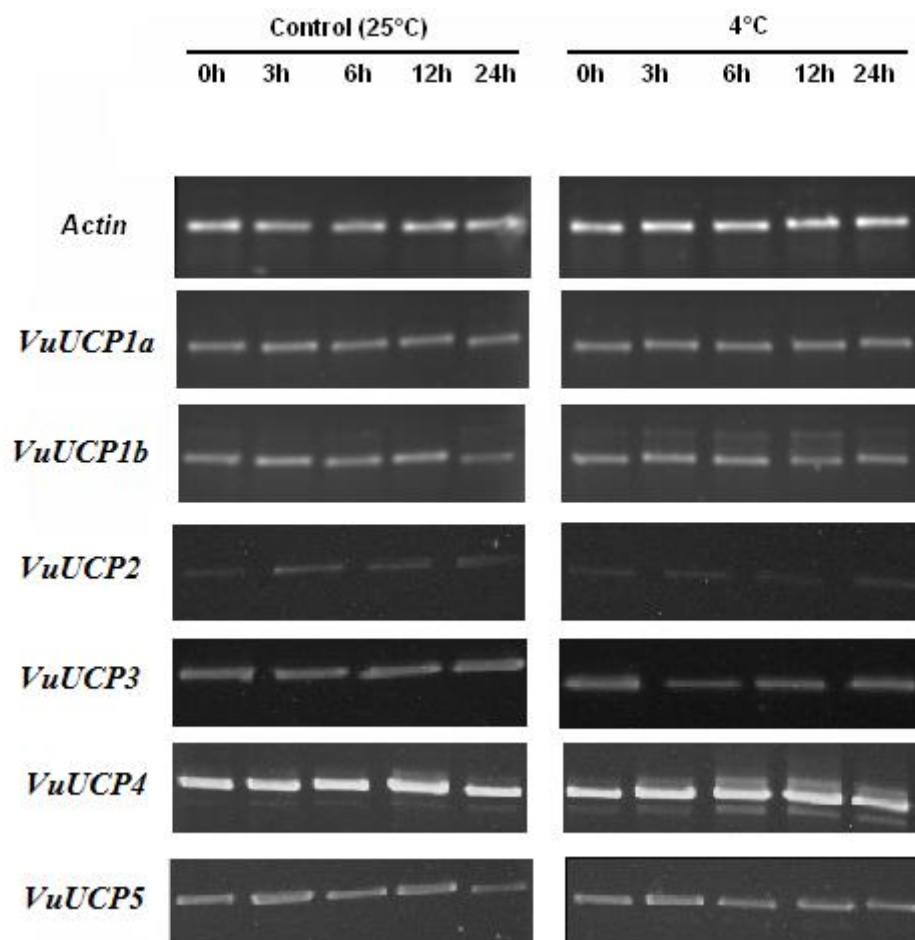


Figura 23 – Expressão diferencial dos genes *VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5* em folhas de *Vigna unguiculata* nos tempos de 0, 3, 6, 12 e 24 horas de estresse pelo frio a 4°C. A amplificação da Actina foi usada como controle constitutivo.

Expressão de gene(s) da pUCP em *Vigna unguiculata* por RT-PCR Quantitativa (qPCR)

A expressão de genes da pUCP foi avaliada através da técnica de RT-PCR quantitativa (qPCR). Como pode ser observado na Figura 24, a análise da expressão relativa para a isoforma *VuUCP1a* não mostrou diferenças significativas, nos tecidos raízes e folhas, em todas as condições testadas. Estes dados estão em concordância com o perfil de expressão gênica para *VuUCP1a* em folhas de *Vigna unguiculata* obtida através de PCR semi-quantitativa (Figura 22).

A Figura 25 mostra os dados de expressão de *VuUCP1b* em raízes e folhas nas diferentes condições de tratamento. Em raiz, na condição de tratamento por PEG houve um aumento de expressão nos tempos 6 e 12 horas em cinco vezes, aumentando para uma indução máxima de sete vezes com 24 horas de exposição ao estresse (Figura 25a). O estresse salino acarretou um aumento na expressão de 3 vezes nos tempos 6 e 12 horas, diminuindo para 1 vez com 24 horas de estresse, em raízes. O perfil de expressão sob estresse oxidativo induzido por H₂O₂ apresentou níveis equivalentes de indução de expressão com aproximadamente 2,5 vezes nos tempos de 6, 12 e 24 horas de estresse. O tratamento por ácido salicílico ocasionou a maior indução de expressão observada, com aumento de 11 vezes no tempo de 6 horas, decaindo para 3 vezes nos tempos 12 e 24 horas (Figura 25a).

A Figura 25b mostra o perfil de expressão de *VuUCP1b* em folhas nas mesmas condições de estresses supracitas. Um aumento no nível de transcritos pode ser observado nas condições de tratamento por PEG, H₂O₂ e ácido salicílico, nos tempos 6 e 12 horas, com aumento de indução de 5 vezes em comparação à condição controle, sendo diminuído para 3 e 4 vezes, respectivamente para PEG e H₂O₂ no tempo 24 horas. A condição de ácido salicílico manteve o perfil de expressão em 24 horas similar aos tempos de 6 e 12 horas de tratamento.

A Figura 26 mostra o perfil de expressão de *VuUCP2* em condições controle e de estresses. Em raízes, não foram observadas diferenças significativas no perfil de expressão em todas as condições de tratamento (controle e estresses). Em folhas (Figura 26b), um padrão semelhante foi identificado, com exceção para a condição de

tratamento por PEG, na qual apresentou inibição da expressão quando comparada à condição controle.

A expressão de *VuUCP3* em raízes de *Vigna unguiculata* (Figura 27a) aumentou de forma considerável em todas as condições de estresses estudadas, quando comparadas à condição controle. Os tratamentos com PEG e NaCl apresentaram perfis similares, ambos apresentando indução de 7 e 2 vezes com 6 e 12 horas de tratamento, respectivamente. Com 24 horas de estresse, a condição imposta pelo PEG manteve o mesmo padrão apresentado com 6 e 12 horas, enquanto que o estresse salino diminuiu a indução para 1 vez. Os tratamentos por H₂O₂ e ácido salicílico também mostraram padrões similares, com aumento no teor de transcrição em aproximadamente 4 vezes no tempo de 6 horas de exposição, diminuindo para indução de 1 vez nos tempos 12 e 24 horas para H₂O₂ e diminuindo para valores aproximadamente iguais à condição controle nos tempos 12 e 24 horas na condição por ácido salicílico. Em folhas, o perfil de expressão em condições de estresses não diferiu significativamente da condição controle em todos os intervalos de tempos estudados.

A expressão gênica de *VuUCP4* em raízes (Figura 28a) não apresentou elevação nos níveis de transcritos em todos os estresses testados, em comparação à condição controle. Em folhas, da mesma forma (Figura 28b), não foram observadas diferenças entre as condições de tratamento estudadas.

O perfil de expressão de *VuUCP5* mostrado na figura 29 mostra ausência de indução de expressão em raízes em todas as condições testadas. Em contraste, em folhas, um aumento no nível de transcritos foi encontrado em todas as condições de estresses, com aumento de aproximadamente 9 e 8 vezes para PEG e NaCl, respectivamente, nos tempos de 6 e 12 horas de aplicação dos respectivos estresses. Com 24 horas de tratamento, essa indução teve um leve declínio para aproximadamente 9 e 6 vezes, com PEG e NaCl, respectivamente. O tratamento por H₂O₂ induziu numa relação aproximada de 8 vezes para 6 horas de estresse e de 6 vezes nos tempos de 12 e 24 horas de submissão ao estresse. Já o tratamento por ácido salicílico induziu aproximadamente um aumento de 6 vezes nos tempos de 6, 12 e 24 horas.

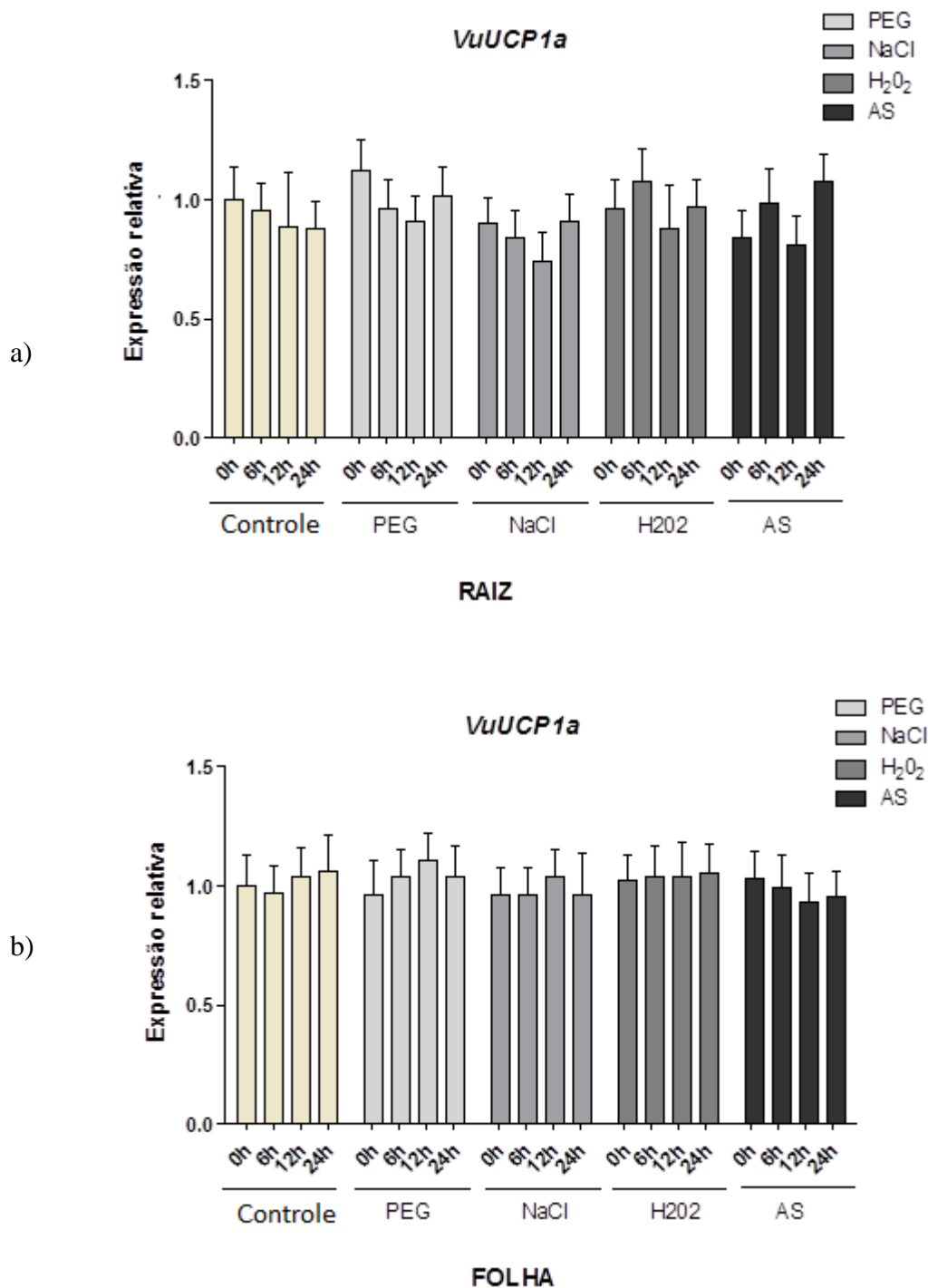


Figura 24 – Nível de expressão dos transcritos do gene *VuUCP1a* normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo *Efla* em raízes (a) e folhas (b) de *Vigna unguiculata* com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H₂O₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR. Cálculos realizados a partir do método $2^{-\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Média de três réplicas de reação.

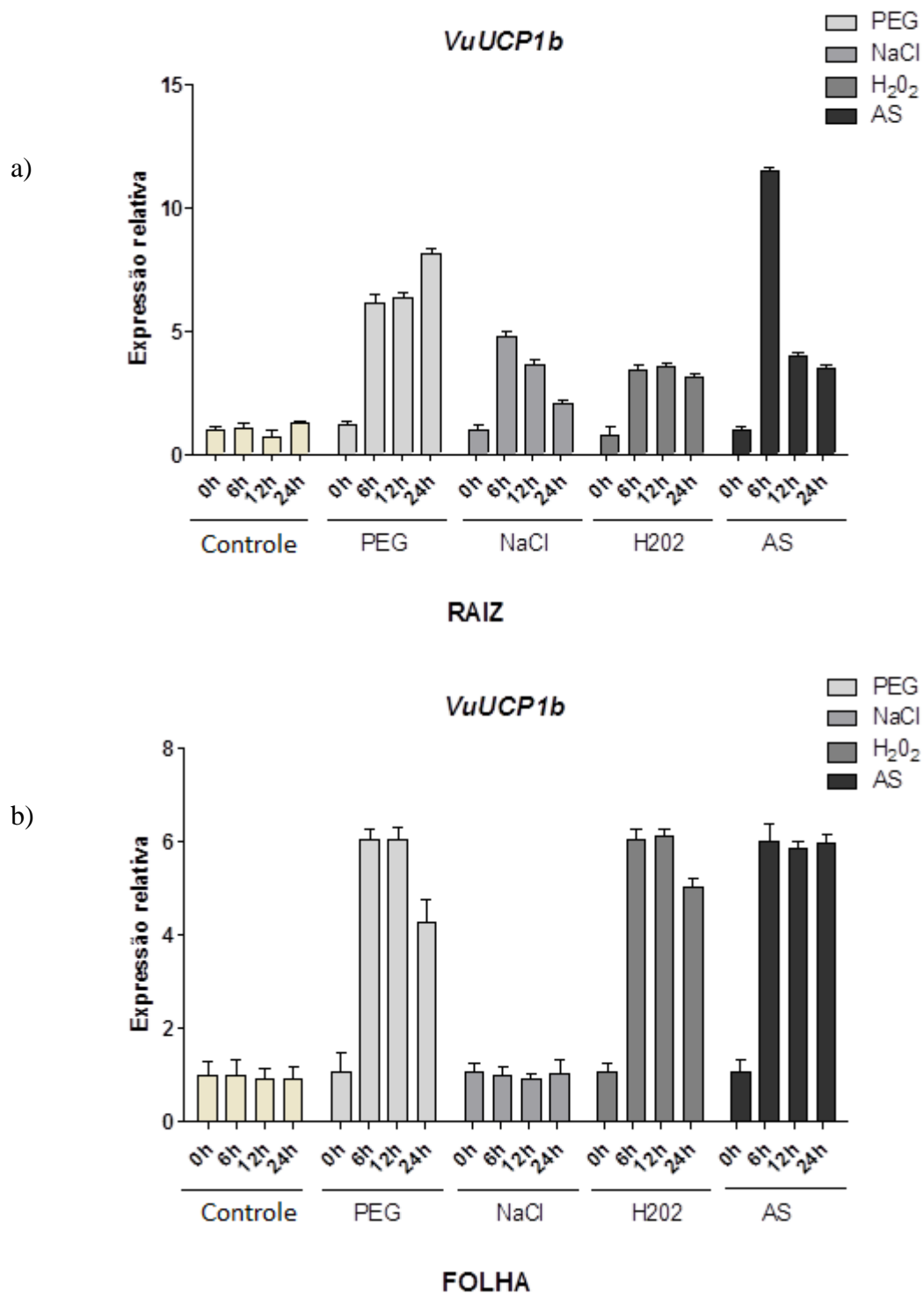
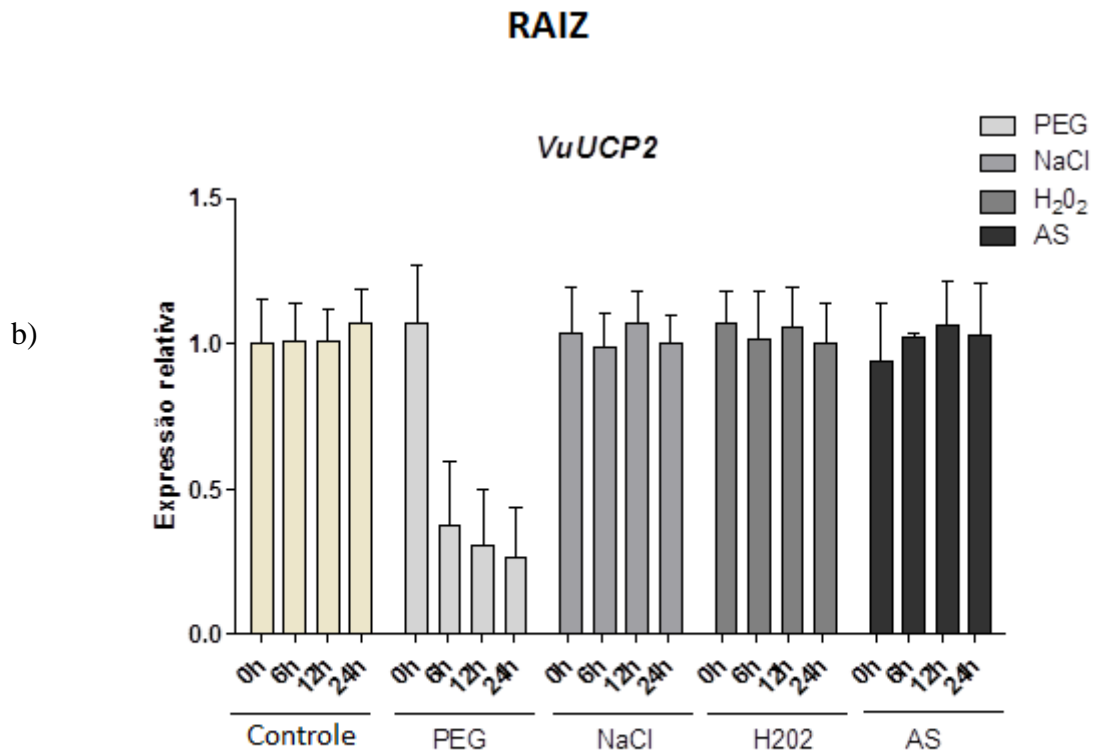
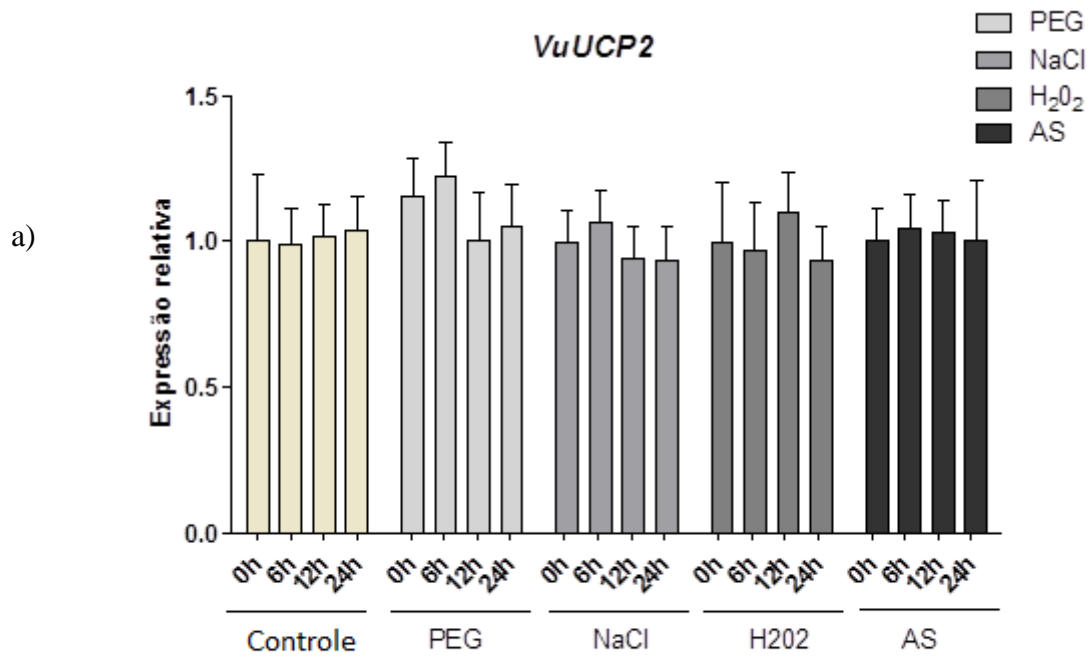


Figura 25 – Expressão do gene *VuUCP1b* em raízes (a) e folhas (b) de *Vigna unguiculata* com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H₂O₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR. Cálculos realizados a partir do método $2^{-\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Média de três réplicas de reação.



FOLHA

Figura 26 – Expressão do gene *VuUCP2* em raízes (a) e folhas (b) de *Vigna unguiculata* com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H₂O₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR. Cálculos realizados a partir do método $2^{-\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Média de três réplicas de reação.

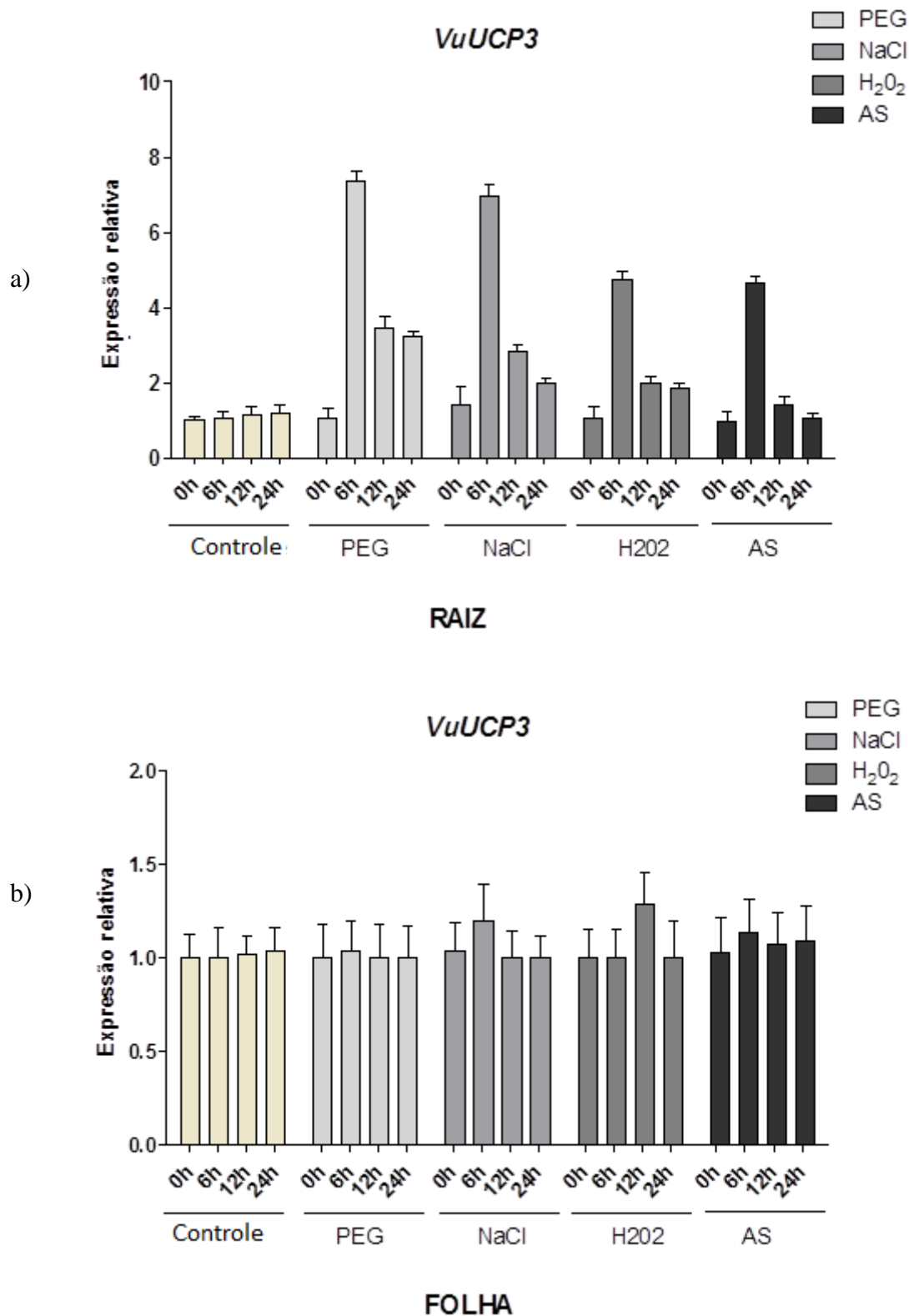


Figura 27 – Expressão do gene *VuUCP3* em raízes (a) e folhas (b) de *Vigna unguiculata* com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H₂O₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR. Cálculos realizados a partir do método $2^{-\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Média de três réplicas de reação.

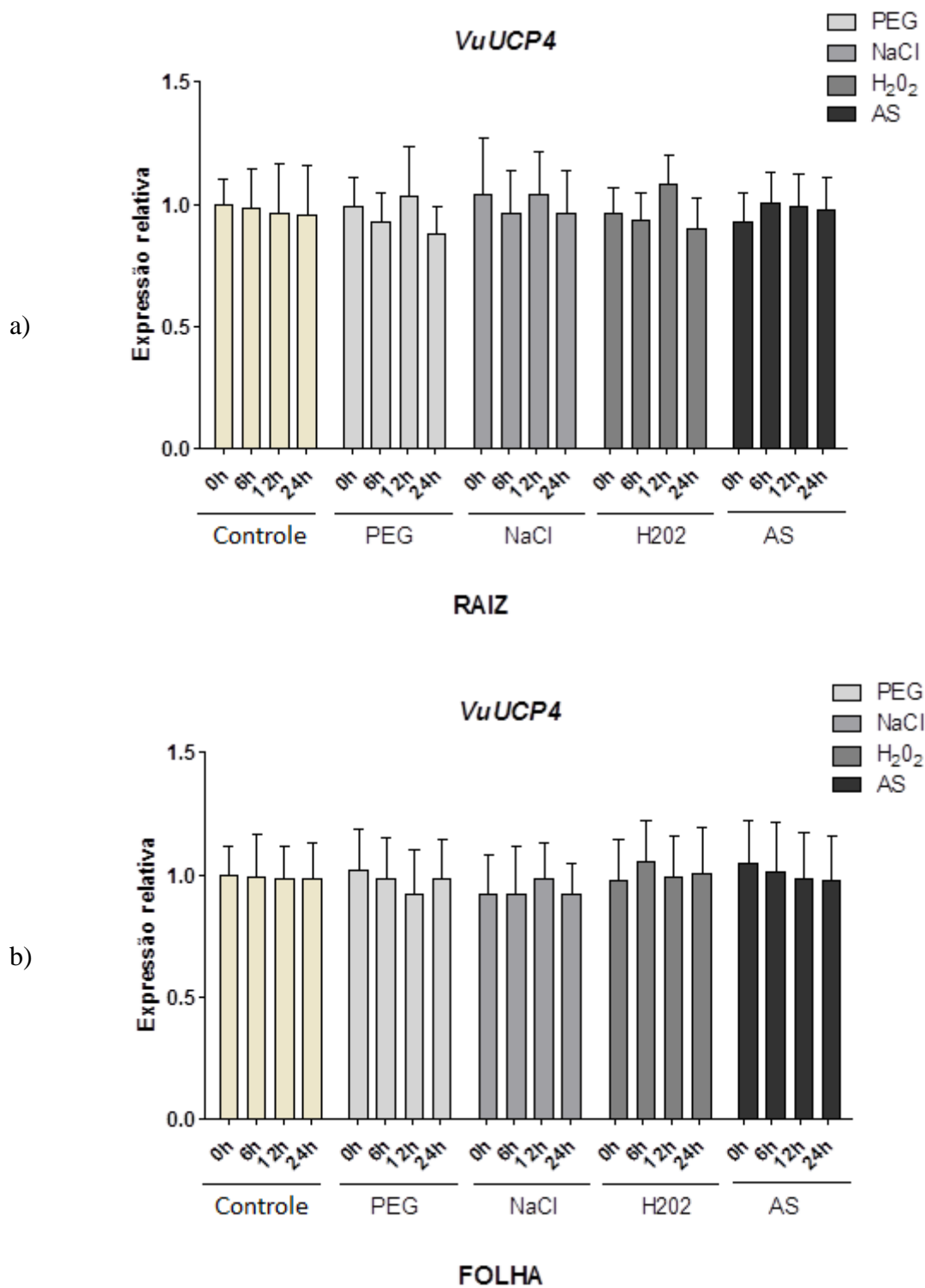


Figura 28 – Expressão do gene *VuUCP4* em raízes (a) e folhas (b) de *Vigna unguiculata* com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H₂O₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR. Cálculos realizados a partir do método $2^{-\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Média de três réplicas de reação.

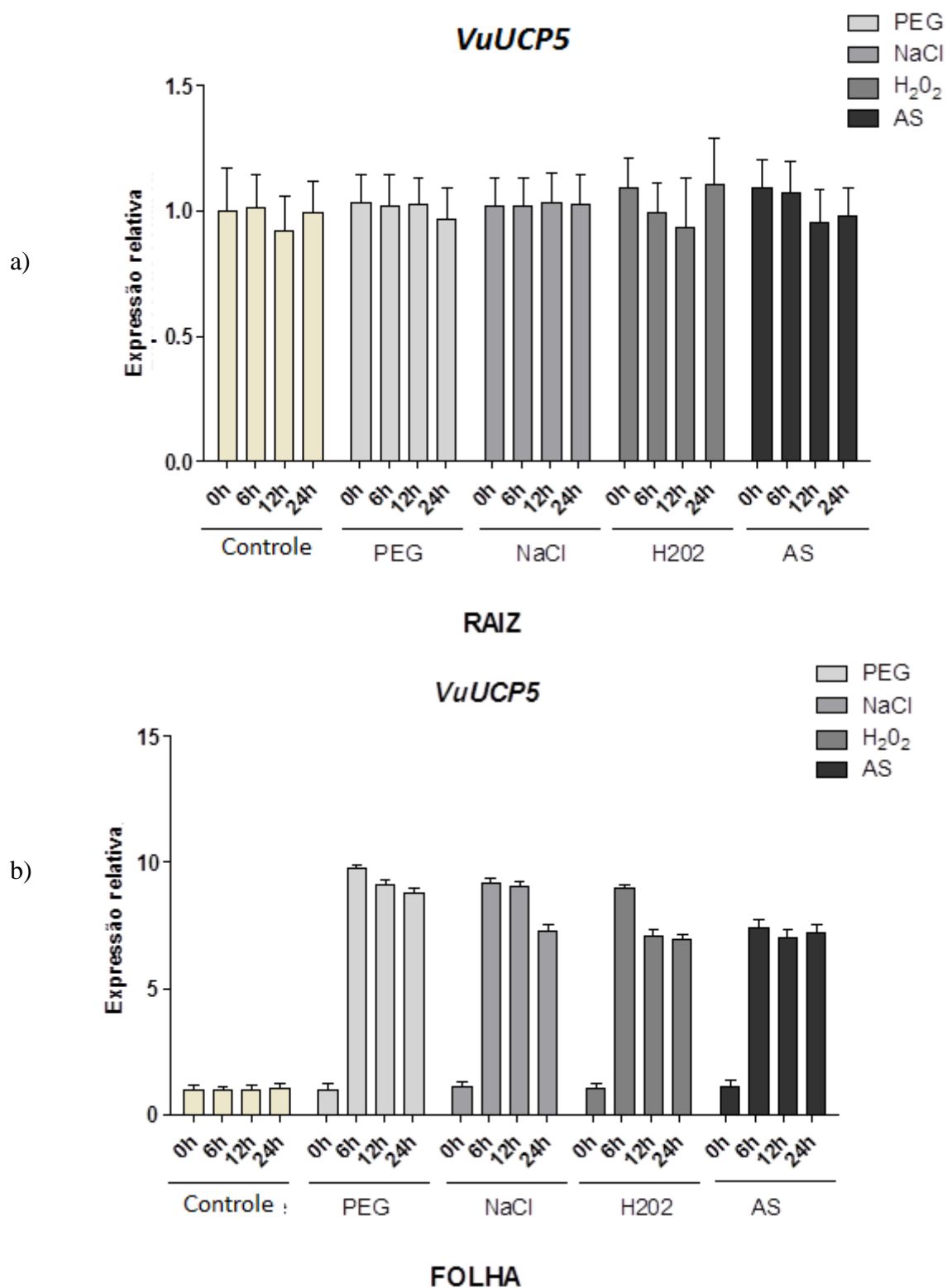


Figura 29 – Expressão do gene *VuUCP5* em raízes (a) e folhas (b) de *Vigna unguiculata* com 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento em condições controle ou de estresses por PEG 200, 67 g/L, NaCl 100 mM, H₂O₂ 10 mM e Ácido Salicílico 5 mM obtida através de RT-qPCR. Cálculos realizados a partir do método $2^{-\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Média de três réplicas de reação.

DISCUSSÃO

As proteínas desacopladoras de planta (pUCPs) pertencem à Família Carreadora de Ânions Mitocondriais (FCAM), na qual estão incluídos outros representantes com alta similaridade de sequência, dentre eles os transportadores de nucleotídeos adenina (TNA), malato-oxoglutarato (TMO), fosfato inorgânico (TF) e dicarboxilatos (DIC) (JEZEK;URBÁNKOVÁ, 2000; BORECKY *et al.*, 2001a; RIAL; ZARDOYA, 2009). Essas enzimas foram incluídas no grupo FCAM por possuírem alta identidade de sequência com os outros carreadores e transportarem formas aniônicas de ácidos graxos ou outros ânions (BORECKY *et al.*, 2001a).

Através de análises *in silico* com busca em banco de dados foi possível a identificação de uma provável família completa de genes codificando as pUCPs em *Vigna unguiculata*, como pode ser visto nas sequências parciais ou completas de cDNAs e de aminoácidos de VuUCP1a, VuUCP1b, VuUCP2, VuUCP3, VuUCP4 e VuUCP5, caracterizando uma família multigênica nesta espécie (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15). Até o presente momento, uma única família multigênica completa de pUCPs foi identificada em um representante das dicotiledôneas, em *Arabidopsis*, na qual Borecký *et al.*, (2006) identificaram seis genes, nomeados de *AtPUMPI-6*. Em outras espécies de dicotiledôneas, a existência de genes codificando as pUCPs foram descritos, porém em menor número de cópia de genes, como *SrUCPa* e *SrUCPb* em *Symplocarpus renifolius* (ITO, 1999; ITO-INABA *et al.*, 2008b), *HmUCPa* em *Helicodiceros muscivorus* (Ito *et al.*, 2003), *MnUCP* em manga (CONSIDINE *et al.*, 2001) e tomate (HOLTZAPFFEL *et al.*, 2002). Nas espécies de monocotiledôneas, uma família multigênica completa foi identificada em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) por Borecký *et al.* (2006), composto por cinco genes, denominados *SsPUMPI-5*. Em arroz, Watanabe & Hirai (2002) identificaram inicialmente dois genes de pUCPs denominados *OsUCP1* e *OsUCP2*, posteriormente mais dois genes foram identificados e a família multigênica foi nomeada de *OsPUMPI-4* (NOGUEIRA *et al.* (2005). Representantes com uma ou duas cópias das pUCPs foram identificadas, como *WhUCPa* e *WhUCPb* em trigo (MURAYAMA; HANDA, 2000) e *ZmUCP* em milho (BRANDALISE *et al.*, 2003; HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004).

Diante do exposto, pela primeira vez está sendo identificada em dicotiledôneas uma família multigênica da pUCP com duplicação do gene pUCP1 (*VuUCP1a* e *VuUCP1b*).

Uma análise das famílias multigênicas de plantas da ordem Fabales confirma a duplicação do gene pUCP1 em todas as espécies analisadas (Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21). Outro achado importante foi a ausência do gene pUCP6 nessas espécies, indicando que ele pode ter sido deletado em plantas da ordem Fabales após separação do ancestral comum de *Arabidopsis* e Fabales.

Uma árvore filogenética construída através de ferramentas de bioinformática, comparando os genes pUCPs de plantas da ordem Fabales (*Cajanus cajan*, *Glycine max*, *Medicago truncatula* e *Phaseolus vulgaris*) e *Arabidopsis thaliana* (ordem Brassicales) apresentou uma classificação dessas proteínas desacopladoras em três clados, abrangendo em um deles as pUCPs dos tipos 1a, 1b e 2 e em outro clado as pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 e o mais distante incluindo as pUCPs do tipo 3 (Figura 21). Esta classificação encontra-se em concordância com a classificação proposta para as pUCPs entre monocotiledôneas e dicotiledôneas proposta por Borecký *et al.* (2006), na qual as pUCPs dos tipos 1 e 2 foram inseridas no grupo II, pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 inclusas no grupo III e as pUCPs do tipo 3 classificadas no grupo VI.

Um alinhamento das sequências de aminoácidos das pUCPs de *Vigna unguiculata* (Vu) com as sequências deduzidas a partir de *Arabidopsis thaliana* (At), *Cajanus cajan* (Cc), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt) e *Phaseolus vulgaris* (Pv), mostrou uma característica estrutural das proteínas desacopladoras, que é a presença de três sequências conservadas de 12 aminoácidos, denominada de SPTE (Sinal Protéico de Transferência de Energia) (Figuras 18, 19 e 20). Segundo Borecký *et al.* (2001), a principal característica das pUCPs é a presença de três SPTE. Portanto, as sequências identificadas em *Vigna unguiculata* são pUCPs verdadeiras. Estas sequências foram também conservadas nas pUCPs identificadas em *Arabidopsis* (*AtPUMPI-6*) e em cana-de-açúcar (*SsPUMPI-5*) (BORECKÝ *et al.*, 2006). A sequência conservada do SPTE - P-x-(DE)-x-(LIVAT)-(RK)-x-(LRH)-(LIVMFY)-(QGAIVM), é típica de todos os carreadores de ânions mitocondriais. Estes SPTE são encontrados em todos os carreadores mitocondriais, contendo uma, duas ou três cópias deste sinal (LALOI, 1999). Variantes destes sinais foram identificados em UCPs de

plantas e animais (BORECKY *et al.*, 2001a). Todas as proteínas desacopladoras, exceto UCP4 e SfUCP, possuem três SPTE, um em cada repetição da proteína. As UCPs/pUCPs possuem três cópias deste sinal, enquanto os outros membros FCAM possuem somente uma ou duas cópias deste sinal (BORECKÝ *et al.*, 2006). Um exemplo a ser citado é o carreador malato- oxoglutarato (M2OM), que carece da segunda cópia do SPTEs (BORECKÝ *et al.*, 2006). Portanto, a exigência em relação à identificação concomitante dos três SPTE em alinhamentos de aminoácidos objetivando-se identificar novas isoformas das pUCPs como critério para se diferenciar as pUCPs dos outros carreadores de ânions mitocondriais presentes na FCAM foi respeitada neste trabalho.

Além da presença dos três sinais SPTE estabelecidos como critério por Borecký *et al.* (2001a) para a confirmação de uma dada sequência de aminoácidos como pertencente a UCP/pUCP verdadeira, anteriormente Jezek & Urbánková (2000) já haviam se referido a existência de motivos de sequências comuns exclusivas das proteínas desacopladoras dentro da família de genes de proteínas carreadoras de ânions mitocondriais. Estes autores confirmaram a existência de quatro sequências específicas nas α hélices das UCPs no primeiro, segundo, quarto e sexto domínio helicoidal, na qual denominaram de “assinaturas das UCPs”. Entretanto, o sexto domínio não é totalmente específico das UCPs, visto que abrange também sete resíduos de aminoácidos pertencentes ao domínio putativo de ligação a nucleotídeos purínicos (PNBD) (KLINGENBERG; ECHTAY, 2001; HOURTON-CABASSA *et al.*, 2004).

No alinhamento de sequências entre as pUCPs de *Vigna unguiculata* e várias espécies de leguminosas também foram identificados os quatros sinais ou assinaturas específicas das UCPs/pUCPs, com algumas substituições de aminoácidos. O trabalho referencial destes sinais desenvolvido por Jezek & Urbánková (2000) aponta algumas substituições possíveis para determinados resíduos de aminoácidos. Por exemplo, o primeiro sinal das UCPs inicia-se com alanina (A) ou serina (S), seguido de cisteína (C) ou treonina (T), sendo, portanto, estabelecido um padrão de possíveis substituições de aminoácidos. Assim, com base nestas observações, constatou-se que as pUCPs dos tipos 1 e 2 apresentaram o primeiro sinal UCP com substituições de aminoácidos de acordo com as alterações previstas por esses autores. Já no segundo sinal específico UCP, dentre os quinze aminoácidos que o compõe, apenas a substituição de tirosina (Y) por

asparagina (N) não está em concordância com os dados dos autores referidos, uma vez que os mesmos propõem substituição de tirosina (Y) por [fenilalanina (F), serina (S), leucina (L) ou treonina (T)]. No terceiro sinal das UCPs dos tipos 1 e 2, composto por dezesseis resíduos, apenas uma substituição não prevista pelos autores de referência foi observada. Este mesmo padrão dos sinais das UCPs é identificado nas demais isoformas. Entretanto, vale ressaltar que o trabalho de Jezek & Urbánková (2000) identificando estes sinais agrupou UCPs de origem animal, sendo incluídas nestas apenas duas UCPs de plantas, no caso StPUMP e AtPUMP. Assim, como o alinhamento em foco envolve apenas UCPs de plantas, possíveis substituições de aminoácidos diferentes do padrão previsto por Jezek & Urbánková (2000) seria esperado.

O quarto e último sinal segmento α -hélice não é considerado propriamente um sinal ou assinatura específica das UCPs em virtude de o mesmo conter parte do sinal PNBD. Entretanto, o mesmo apresenta sequências conservadas em todas as UCPs/pUCPs, portanto sendo mencionados. Em interseção com este sinal, está uma sequência regulatória de reconhecimento aos nucleotídeos putativos, composta por nove resíduos de aminoácidos conservados, de posição específica 261 até 269, na qual o alinhamento entre *Vigna unguiculata* e demais leguminosas mostrou até cinco resíduos conservados, inclusive os dois últimos, de posição 268 e 269. De acordo com Bouillaud *et al.* (1994), os três últimos resíduos são essenciais para a inibição pelos nucleotídeos do transporte de prótons nas UCPs. Estes autores demonstraram a importância destes aminoácidos com uma proteína desacopladora mutante denominada UCP Δ 3, na qual foram deletados os três últimos aminoácidos, sendo eles fenilalanina, lisina e glicina (F267, K268, G269). Como resultados, observaram que a deleção destes aminoácidos resultou em uma proteína mutante com desacoplamento de prótons ativados por ácidos graxos livres, porém sem inibição por nucleotídeos purínicos.

Numa região correspondente ao quinto domínio transmembranar, uma sequência conservada de dois aminoácidos, sendo cisteína-histidina (C-H) ou treonina-histidina (T-H) foi nomeada por Jezek & Urbánková (2000) como específico das UCPs. Essa dupla de aminoácidos foi observada nas pUCPs dos tipos 1 e 2, bem como 4, 5 e 6 (Figuras 18, 19 e 20), ocorrendo uma alteração de cisteína (C) para alanina (A) nas pUCP3, formando A-H. Essa histidina que compõe essa sequência “dupla” conservada,

de posição 214, têm relação juntamente com o aminoácido glutamato (E190), na ligação ao sítio PNBD, sendo conservado nas pUCPs.

Além dos três SPTE, das quatro assinaturas das UCPs e da sequência dupla conservada C-H ou TH, vários resíduos de aminoácidos foram reconhecidamente conservados entre as seis isoformas de pUCPs no alinhamento entre *Vigna unguiculata* e demais espécies da ordem Fabales, como prolina (P32) e lisina (K37), integrantes do primeiro SPTE e prolina (P231) e aspartato (D233), presentes no segundo SPTE. Estas sequências conservadas são citadas por Jezek & Urbánková (2000), Bouillaud *et al.* (1994) e também identificadas no alinhamento de várias espécies de pUCPs entre mono e dicotiledôneas (BORECKÝ *et al.*, 2006).

Nogueira *et al.* (2005) e Borecký *et al.* (2006) mostraram árvores filogenéticas pondo em evidência a distribuição de pUCPs de várias espécies de plantas em três distintos clados, além de outros filogeneticamente mais distantes contendo transportadores de dicarboxilatos (DIC). Já Palmieri *et al.* (2008) apresentaram uma árvore filogenética de proteínas FCAM ressaltando a existência de clados com sequências de aminoácidos de transportadores de dicarboxilatos muito próximos aos de transportadores de animais e de leveduras e distantes de pUCPs. Portanto, tais autores discordam da classificação proposta por Borecký *et al.* (2006). Convém salientar, que a distribuição proposta por Palmieri *et al.* (2008) foi limitada a poucas espécies de planta. Ademais, Borecký *et al.* (2006) demonstraram através de cinética de transporte de prótons (H^+) uma ativação da AtPUMP5 por ácido linoleico e inibição por nucleotídeos de purina, caracterizando atividade das pUCPs. A distribuição das pUCPs de *Vigna unguiculata* e demais representantes da ordem Fabales, numa árvore filogenética, classificou as sequências protéicas em três distintos clados, concordando com a classificação feita por Borecký *et al.* (2006).

A análise comparativa da estrutura gênica de pUCPs entre os membros de Fabales e *Arabidopsis* mostrou conservação no número de exons e introns (Figura 16 e 17). Em relação às pUCPs dos tipos 1a, 1b e 2, esta análise mostrou estrutura gênica composta por 9 exons e 8 introns, enquanto que as pUCPs dos tipos 3 mostraram disposição formada por 3 exons e 2 intron. Os genes pUCPs dos tipos 4 e 5 apresentaram estrutura formada por apenas 1 exon, com ausência de introns. Este

padrão gênico estrutural foi detectado em *Arabidopsis* por Nogueira *et al.* (2005) e Borecký *et al.* (2006). Os genes ortólogos da pUCP (*OsPUMP1-4*) em arroz mostraram estrutura gênica similar ao padrão descrito em *Arabidopsis* (NOGUEIRA *et al.*, 2005; BORECKÝ *et al.*, 2006). Os mesmos autores correlacionaram que a localização de *AtPUMP1*, *AtPUMP2*, *AtPUMP4* e *AtPUMP5* dentro ou próximos a regiões de duplicação do genoma de *Arabidopsis* e as similaridades de estrutura gênica entre pares dos membros da família sugerem que estes genes originaram-se através de eventos de duplicação gênica. Estas observações estão de acordo com a definição de três subfamílias distintas de pUCPs dispostas numa árvore filogenética, na qual a subfamília II contém pUCPs dos tipos 1 e 2, a subfamília III contém as pUCPs dos tipos 4, 5 e 6 e a subfamília VI contém UCP4 e pUCPs do tipo 3 (BORECKÝ *et al.*, 2006). O alinhamento da estrutura de exons/introns das pUCPs de várias espécies de leguminosas (Figuras 16 e 17) revelaram conservação do posicionamento de introns. Embora tenha sido identificado um padrão de similaridade gênica entre os genes das pUCPs entre várias espécies de dicotiledôneas filogeneticamente próximas a *Vigna unguiculata* com *Arabidopsis* (Figuras 16 e 17) ou entre a monocotiledônea cana-de-açúcar e *Arabidopsis* (NOGUEIRA *et al.*, 2005; BORECKÝ *et al.*, 2006), pode ser claramente notado que os genes das leguminosas são maiores que os seus correspondentes em *Arabidopsis*, em virtude da variação no tamanho dos exons e, principalmente, do tamanho dos introns. O primeiro exon de *AtUCP1* é ligeiramente menor que os respectivos exons correspondentes nas demais pUCPs das leguminosas (Figura 16). Uma descrição mais detalhada mostra que os genes pUCPs do tipo 1 em todas as leguminosas apresentam introns com tamanhos significativamente maiores que em *Arabidopsis*, alcançando-se até mesmo, como nos casos de *GmUCP1a* e *MtUCP1a*, intron 1 com tamanho cerca de três vezes maior que em *AtUCP1*. Este padrão é também observado nos genes pUCP2, com *PvUCP2* apresentando intron 1 três vezes maior que em *AtUCP2*. Estas oscilações no tamanho do primeiro exon e introns 1 e 6 foram também observadas na composição de exons/introns identificada em *AtUCP2* por Borecký *et al.* (2006). Nas pUCP3, os genes também são maiores que os correspondentes *AtUCP3*, mas com menor variação do único intron apresentado nesses genes. Estas variações no comprimento dos introns foram observadas entre *AtUCP3* e *OsUCP3* por Nogueira *et al.* (2005). O perfil de composição exons/introns nas pUCPs dos tipos 4 e 5 foi semelhante àqueles observados por Nogueira *et al.* (2005) e Borecký *et al.* (2006).

O tamanho bem como o número de introns tem importante influência na expressão gênica (transcrição) em eucariotos, já que a transcrição é um processo lento (aproximadamente 20 nucleotídeos transcritos por segundo) e energeticamente caro (2 ATPs gastos por nucleotídeo) (CASTILLO-DAVIS *et al.*, 2002). Considerando que os introns são transcritos e fazem parte do mRNA primário eles influenciam tanto no tempo quanto no gasto de energia durante o processo de transcrição.

No nematóide *C. elegans* e em humanos genes altamente expressos estão relacionados com introns curtos (CASTILLO-DAVIS *et al.*, 2002). Entretanto, nem todos os organismos estudados mostram uma correlação entre expressão gênica e introns curtos. Já é conhecido que genes altamente expressos de várias leveduras e organismos unicelulares possuem introns mais longos do que genes que são expressos em baixos níveis (VINOGRADOV, 2001). Em plantas, já foi relatado tanto em monocotiledôneas (*Oryza sativa* L.) quanto em dicotiledôneas [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyenh] que genes altamente expressos contêm introns mais longos e em maior número e transcritos primários maiores do que genes expressos em baixos níveis (REN *et al.*, 2006).

Os dados de expressão gênica em *Vigna unguiculata* mostraram resultados relacionados com a proposta defendida por Castillo-Davis *et al.* (2002) quanto a economia de energia perante os processos de transcrição, vez que dois genes mostraram perfis diferentes de transcrição, sendo *VuUCP1a* um gene expresso de forma constitutiva, enquanto *VuUCP1b* apresentou aumento de expressão em ambos os tecidos, com uma diferença pontual em relação ao estresse por NaCl, detectado em raízes e ausente em folhas. Ambos os genes apresentam a mesma organização genômica composta por 9 exons e 8 introns, com variações no tamanho do exon 1, maior em *pUCP1a* do que em *pUCP1b* em representantes da ordem Fabales. Essa variação no tamanho do intron 1, maior nas *pUCPs* do tipo 1a em comparação a *pUCPs* do tipo 1b observado em representantes da ordem Fabales segue o padrão de seleção por economia de energia (CASTILLO-DAVIS *et al.*, 2002), sendo observado também em *Phaseolus vulgaris* (*PvUCP1a* e *PvUCP1b*), espécie filogeneticamente mais próxima a *Vigna unguiculata*.

O gene *VuUCP2* não apresentou alteração do nível de transcritos em praticamente todas as condições testadas, com exceção para uma inibição de expressão na condição de estresse imposto por PEG em folhas com 6, 12 e 24 horas. Tal gene é também constituído por 9 exons e 8 introns, e tem um transcrito primário maior do que os transcritos primários de *UCP1a* e *UCP1b* principalmente em *Phaseolus vulgaris*, espécie filogeneticamente mais próxima a *Vigna unguiculata*, corroborando com a ideia já mencionada de Castillo-Davis *et al.* (2002) de que genes menos compactos são menos expressos.

Portanto, os genes *UCP1* e *UCP2* parecem seguir uma seleção para a economia de energia, já que genes induzidos por estresse (*VuUCP1b*) apresentam introns menores. Esse mesmo padrão já foi verificado anteriormente para os genes *VuAox1* e *VuAox2b*, de *Vigna unguiculata*, ambos genes co-expressos e induzidos em resposta a estresse (COSTA *et al.*, 2010).

Para os demais genes (*VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5*) pode ser feita alguma correlação com a expressão em condições de estresse. Enquanto *VuUCP4* apresentou expressão constitutiva, *VuUCP3* teve a expressão estimulada em até 6 vezes e *VuUCP5* estimulada em até 9 vezes. Assim, o gene *VuUCP5* (ausência de introns) sendo mais expresso em relação ao gene *VuUCP3* (1 intron) também estaria corroborando com a seleção para a economia de energia em condições de estresse.

Após uma caracterização da estrutura gênica, alinhamento de nucleotídeos e correlações filogenéticas entre as diferentes isoformas de pUCPs, um estudo de expressão gênica das proteínas desacopladoras *VuUCP1a* e *VuUCP1b* foi realizado inicialmente através de PCR semi-quantitativa em plantas submetidas a diferentes estresses ambientais (NaCl 100 mM, PEG 200,67 g/L, H₂O₂ 10 mM e ácido salicílico 0,5 mM). Os resultados mostraram que o nível de transcritos do gene *VuUCP1a* ficou inalterado quando comparadas à condição controle, contrastando com o nível de transcritos do gene *VuUCP1b* que apresentou elevação em resposta a estresses por PEG 200,67 g/L, ácido salicílico 0,5 M e H₂O₂ 10 mM nos tempos 6, 12 e 24. Esses dados indicam que *VuUCP1a* é expresso de forma constitutiva, enquanto que *VuUCP1b* é detectado no controle e induzido em resposta do estresse (Figura 22).

Um estudo de expressão da pUCP avaliando as resposta ao estresse em relação ao frio (4° C) comparado à condição controle (28° C) para os genes *VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5* mostrou que não ocorreu alterações no padrão de transcritos em todas as condições testadas (Figuras 23), indicando que as pUCPs não estão relacionadas à termogênese em *Vigna unguiculata*.

Alguns estudos com pUCPs dos tipos 1 e 2 já foram realizados em outras espécies. Um dos primeiros trabalhos relacionando as pUCPs e estresse pelo frio mostraram que *AtPUMP1* em *Arabidopsis* foi induzida por baixas temperaturas (4° C) com 24 e 48 horas de exposição (MAIA *et al.*, 1998). Entretanto, outros genes como *AtPUMP2* em *Arabidopsis* (WATANABE *et al.*, 1999) e *WhUCP1a* e *WhUCP1b* em trigo (MURAYAMA, HANDA, 2000) não responderam a estresse causado pelo frio. Estes dois últimos genes citados em trigo podem ser correlacionados aos genes *VuUCP1a* e *VuUCP1b* em *Vigna unguiculata*. Assim, embora os resultados de expressão para *VuUCP1a* e *VuUCP1b* sejam inalterados em resposta ao estresse pelo frio, contrastando com os dados de Maia *et al.* (1998) em *Arabidopsis*, os mesmos estão em concordância para *WhUCP1a* e *WhUCP1b* em trigo (MURAYAMA, HANDA, 2000), devendo-se ressaltar ao fato peculiar de que as três plantas citadas embora sejam não-termogênicas, apresentem discrepância em resposta ao frio. Outras espécies de monocotiledôneas também não apresentaram resposta ao frio, como *OsUCP* em arroz (WATANABE, HIRAI, 2002), *SsPUMP1-3* em cana-de-açúcar (BORECKÝ *et al.*, 2006) e *ZmPUMP* em milho (BRANDALISE *et al.*, 2003b). Por último, um estudo de expressão gênica mais recente foi realizado em trigo por Mizuno *et al.* (2007) empregando duas cultivares “Mironovskaya 808” (M808) e “Chinese Spring” (CS). Este trabalho mostrou resultados dependente da cultivar, com maior teor de transcritos de *WhUCP1* em resposta ao frio para M808 em comparação a CS, sugerindo que *WhUCP1a* tenha participação apenas da cultivar M808 em resposta ao frio.

A co-expressão entre pUCP e AOX (COSTA *et al.*, 2010) mostrou que ambos os sistemas desacopladores apresentaram genes com expressão constitutiva (*VuUCP1a* e *VuAOX2a*). Em relação aos genes *VuUCP1b*, *VuAOX1* e *VuAOX2b*, uma co-expressão induzida pelos estresses por PEG, H₂O₂, ácido salicílico e frio (4° C) foi observada, sendo este um dado inédito, visto que outros trabalhos de expressão gênica entre esses

sistemas dissipadores e suas atividades durante o amadurecimento de frutos de tomate (SLUSE; JARMUSZKIEWICZ, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2002) ou manga (CONSIDINE *et al.*, 2001) mostraram que pUCP e AOX trabalham sequencialmente durante o estágio de amadurecimento de frutos, enquanto que em *Vigna unguiculata* tais genes apresentaram uma co-expressão diante dos estresses estudados. A presença simultânea da pUCP e AOX tem levantado questionamentos sobre o porquê das plantas necessitarem de dois sistemas dissipadores de energia com funções aparentemente similares. A resposta para esta redundância é a prevenção da excessiva produção de EROs de forma regulada, uma vez que se a pUCP não contrabalançar rapidamente os níveis de EROs, inicia-se a participação da AOX neste processo, de modo que esta regulação é justificada pela proteção subsequente de proteínas, lipídeos e DNA do compartimento mitocondrial e celular dos danos causados por essas espécies reativas (BORECKÝ *et al.*, 2006; DORDAS, 2009).

Estudos dos genes pUCPs 2, 3, 4 e 5 em resposta ao frio foram realizadas em cana de açúcar e *Arabidopsis* (BORECKÝ *et al.* 2006). Nesses estudos, os autores não identificaram diferenças nos níveis de transcritos para o gene *SsUCP2* e *AtUCP2* em relação à condição controle. O gene *SsUCP3* não foi detectado, enquanto *AtUCP3* não foi regulado pelo frio. Um aumento no perfil de expressão foi detectado para os genes *SsPUMP4* e *SsPUMP5* com 12, 24 e 48 horas de exposição ao frio (4° C) em cana-de-açúcar e um pico de expressão com 3 e 6 horas de estresses para *AtPUMP4* e *AtPUMP5* em *Arabidopsis*, restabelecendo-se os níveis basais com 48 horas de tratamento. Os genes *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5* não apresentaram diferenças no nível de transcritos entre condições controle e de estresse pelo frio, contrastando parcialmente com o perfil de expressão gênica identificado em cana-de-açúcar e *Arabidopsis* (BORECKÝ *et al.*, 2006). A falta de genes de pUCPs em *Vigna unguiculata* responsivos ao frio pode ser um fator limitante na adaptação dessa planta a climas mais frios. Até o presente momento, estudos relacionando a termogênese em várias espécies da família *Araceae* mostraram que a AOX desempenha um importante papel na termogênese e que a contribuição da pUCP parece ser menos significativa. Pelo exposto, nenhuma função termogênica exclusiva para as pUCPs foi evidenciada até o presente momentos (ZHU *et al.*, 2011). Um estudo de expressão gênica das pUCPs através da técnica de PCR quantitativa (qPCR) foi realizado para os genes *VuUCP1a*,

VuUCP1b, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5* em condições controle ou de estresses por NaCl 100 mM, PEG 200,67 g/L, H₂O₂ 10 mM e ácido salicílico 0,5 mM nos tecidos raízes e folhas em quatro diferentes intervalos de tempo (0, 6, 12 e 24 horas de tratamento). Os resultados de *VuUCP1a* e *VuUCP1b* em folhas foram similares aos obtidos anteriormente para estes genes por PCR semi-quantitativa, com aumento dos níveis de expressão para PEG, H₂O₂ e ácido salicílico. Contrariamente, em trigo a análise de transcritos de *WhUCP1* em plântulas em relação ao estresse osmótico não mostrou diferenças significativas no nível de transcritos (TRONO *et al.*, 2006). Já em *Arabidopsis*, uma planta dicotiledônea, *AtUCP1* apresentou indução de expressão em resposta à seca (KREPS *et al.*, 2002). A existência de dois genes com alta identidade dentro de uma mesma espécie poderia ser explicada através da possível existência ao longo da evolução de eventos de duplicação gênica, justificando a existência de dois genes pUCPs do tipo 1, nomeados *VuUCP1a* e *VuUCP1b*, mostrando padrões de respostas diferentes, sendo um constitutivo e o outro responsivo aos estresses ambientais. Sabidamente, uma consequência direta dos estresses abióticos é a formação de EROs. Assim, Brandalise *et al.* (2003) observaram indução de expressão de *ZmUCP* em milho após adição de peróxido de hidrogênio ou menadiona. O mesmo ocorreu em *Vigna unguiculata* após adição de peróxido, com aumento de transcritos com 6, 12 e 24 horas.

Em raízes, um padrão de expressão para *VuUCP1a* e *VuUCP1b* foi observado, com aumento de indução da expressão para *VuUCP1b* em relação aos estresses por PEG, H₂O₂ e ácido salicílico. Entretanto, neste tecido, além da indução em relação aos estresses citados, uma indução da expressão gênica foi observada em relação ao estresse salino, concordando com dados de expressão de *Vigna unguiculata* através de PCR semi-quantitativa, na qual o estresse foi dependente do tecido (GARANTIZADO *et al.*, 2011).

O perfil de expressão para *VuUCP2* mostrado na Figura 26 mostra inalteração de expressão em raízes e folhas em todas condições testadas quando comparadas as condições controle. Estudos de expressão gênica com *AtPUMP2* mostraram relevância nos dados de expressão apenas em estudos envolvendo a morte celular programada (SWIDZINSKI *et al.*, 2002). Watanabe *et al.* (1999) identificaram ausência de indução de *AtPUMP2* em resposta ao tratamento pelo frio. Posteriormente, em um estudo mais

completo com a identificação de dois genes UCPs em arroz, nomeados *OsUCP1* e *OsUCP2*, foi observado que ambos os genes apresentavam processamento anormal do pre-RNAM, resultando em múltiplas formas anormais de transcritos, com produtos de tradução apresentando atividades anormais das UCPs. (WATANABE; HIRAI, 2002). Nenhum clone de cDNA normal de transcritos UCPs foi revelado no presente estudo. Além disso, análises de northern blot revelaram que nenhum dos genes UCPs exibiram aumento de expressão pelo frio, indicando que em folhas de arroz em tratamento pelo frio não existe expressão funcional das pUCPs. Entretanto, nenhum destes dois últimos estudos citados examinaram a expressão gênica sob outros tipos de estresses que poderiam aumentar a produção mitocondrial de EROs, tais como seca, estresses bióticos, H₂O₂ ou estresse oxidativo induzido por menadiona. Assim, não se pode excluir a possibilidade de *WhUCPs* e *OsUCPs* serem regulados por tais condições.

Em abordagem semelhante de expressão desse gene das UCPs em cana-de-açúcar, Borecký *et al.* (2006) não detectaram indução de transcritos da *SsPUMP2* em tratamento pelo frio (4° C) em intervalo de tempo de 0, 6, 12, 24 e 48 horas de submissão. Em outro estudo com *Arabidopsis*, nenhuma expressão foi identificada para *AtPUMP2* em resposta ao frio com até 48 horas de submissão do estresse (BORECKÝ *et al.*, 2006 Apud FIGUEIRA; ARRUDA, 2011). Um estudo mais recente foi realizado em plântulas de *Arabidopsis* visando avaliar os efeitos do estresse oxidativo no perfil da transcrição dos genes pUCPs nesta espécie, sendo identificada expressão dependente do estresse, com ausência de indução de *AtUCP2* em resposta ao estresse salino, mas com aumento de expressão diante do estresse osmótico imposto pela adição de manitol (FÁVARO, 2008).

O perfil de expressão para *VuUCP3* mostrou indução de expressão em todos os tratamentos impostos, com dependência do tecido estudado, apresentando aumento de expressão em raízes em até 7 vezes em relação a condição controle e ausência de indução da expressão em relação as folhas nas mesmas condições de submissão ao estresse.

Até o presente momento, apenas dois modelos de plantas tinham suas famílias multigênicas bem caracterizadas com *Arabidopsis* (dicotiledônea) apresentando 6 genes e cana de açúcar (monocotiledônea) apresentando 5 genes (BORECKÝ *et al.*, 2006).

Em outras espécies, apenas um ou dois genes são relatados. Portanto, existem poucos trabalhos de referência em estudos de expressão das pUCPs em relação aos genes *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5*. Em cana-de-açúcar, Borecký *et al.* (2006) observaram que os transcritos de *SsPUMP3* não foram detectados em folhas durante tratamento pelo frio (4° C), sugerindo que esse gene não é induzido por baixas temperatura. Da mesma forma, *AtPUMP3* não se mostrou ser regulado por baixas temperaturas. Os dados de expressão para *VuUCP3* em *Vigna unguiculata* em folhas seguiram os mesmos perfis de expressão de *SsPUMP3* e *AtPUMP3* embora com diferenças na aplicação dos estresses impostos por Borecký *et al.* (2006). Em estudos com plântulas de *Arabidopsis* em tratamentos por NaCl ou manitol por 12, 24 e 48, não foram observadas mudanças na expressão de *AtUCP3* em ambos os estresse, sugerindo que tais genes não apresentam regulação pelos fatores abióticos investigados, ao contrários do valores de expressão gênica observados em *Vigna unguiculata*.

Em relação a *VuUCP4*, nenhum aumento de expressão foi observado em todas as condições de estresses impostos em raízes e folhas. Em *Arabidopsis*, o gene *AtUCP4* apresentou inibição de sua expressão em todos os tratamentos impostos: ACC, precursor do hormônio etileno, ABA, manitol e NaCl (FÁVARO, 2008). Essa inibição de expressão levanta o questionamento do possível papel desse gene em *Arabidopsis*. Em relação ao frio (4° C), uma elevação no nível de transcritos foi evidenciada para *SsPUMP4* e *AtPUMP4*, em cana-de-açúcar e *Arabidopsis*, respectivamente (BORECKÝ *et al.*, 2006).

Evidências adicionais das respostas aos estresses da família gênica das pUCPs podem ser obtidas através de análise do perfil de expressão por microarranjos. Assim, experimentos de expressão de genes *AtPUMPs* sob tratamentos específicos em plantas do tipo selvagem podem revelar genes regulados positiva ou negativamente, possibilitando investigação da indução ou repressão da família gênica pUCP em *Arabidopsis* sob diferentes abordagens experimentais. Assim, Desikan *et al.* (2001) em estudo sobre regulação do transcriptoma de *Arabidopsis* pelo estresse oxidativo observou indução de *AtPUMP4* por H₂O₂, relacionando o papel chave das proteínas desacopladoras no equilíbrio da produção de EROs mitocondrial como consequência dos estresse abiótico. Seki *et al.* (2002b) em um monitoramento do perfil de expressão de 7000 genes usando microarranjos de cDNA de tamanho completo identificaram em

Arabidopsis o gene *AtPUMP4* induzido pelos tratamentos pelo frio e seca e um perfil de repressão desse gene pelo estresse por alta salinidade ao longo do tempo de submissão do estresse (1, 2, 5, 10 e 24 horas). Um experimento semelhante foi realizado identificando *AtPUMP4* como um gene responsivo ao tratamento por ácido abscísico (ABA) (SEKI *et al.*, 2002a).

O perfil de expressão de *VuUCP5* mostrado na Figura 29 revela ausência de indução de expressão em raízes em todas as condições testadas. Em contraste, em folhas, um aumento no nível de transcritos foi encontrado em todas as condições de estresses, com aumento de aproximadamente até 9 e 8 vezes para PEG e NaCl, respectivamente, nos tempos de 6 e 12 horas de aplicação dos respectivos estresses.

Em estudos de expressão em resposta ao estresse pelo frio (4° C) foi observado um aumento de expressão para *AtPUMP5* e *SsPUMP5* (BORECKÝ *et al.*, 2006). Kreps *et al.* (2002a) observaram correlação de expressão gênica de *AtPUMP5* através de alteração do transcriptoma de *Arabidopsis* em resposta ao estresses salino, osmótico e por baixas temperaturas. Seki *et al.* (2002b) em experimentos com microarranjos usando sondas de cDNA de tamanho completo em *Arabidopsis* identificaram *AtPUMP5* como um gene responsivo a tratamentos por seca, frio, alta salinidade, sendo também induzido por tratamento por ácido abscísico (ABA). Este gene apresentou também regulação positiva por estresses bióticos como infecção por *Alternaria brassicicola* e vírus de RNA (VAN WESS *et al.*, 2003; WHITHAM *et al.*, 2003). Em adição, *AtPUMP5* apresentou indução por ventania (CHEONG *et al.*, 2002).

Os estresses abióticos, dentre eles seca e salinidade, apresentam como efeitos secundários a produção de EROs, sendo a mitocôndria a maior fonte dessas espécies reativas (MAILLOUX; HARPER, 2011). Nesse contexto, vários autores tem sugerido que as pUCPs atuam na regulação da produção de EROs mitocondrial, em estudos que relacionam a fisiologia das pUCPs na proteção da célula contra o estresse oxidativo (JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 1998; BRANDALISE *et al.*, 2003b; GILL; TUTEJA, 2010). Assim, objetivando identificar os efeitos do estresse oxidativo no processo de transcrição de genes pUCPs, plântulas de *Vigna unguiculata* foram submetidas a tratamentos de estresses hídrico e salino, considerando que em resposta secundária

ocasionam o desbalanceamento de EROs mitocondrial e elevam o nível de estresse oxidativo nessa organela.

Os dados de expressão para *VuUCP5* mostram ausência de indução de expressão em raízes em todas as condições testadas em contraste com o perfil de expressão em folhas, com aumento no nível de transcritos de 9 e 8 vezes para PEG e NaCl, respectivamente, indutores dos estresses hídrico e salino. Como previamente mencionado, os estresses hídrico/salino desencadeiam uma resposta secundária na função mitocondrial, alterando a expressão de genes pUCPs. Essa correlação de atenuação dos níveis deletérios de EROs pelas proteínas desacopladoras foi demonstrado experimentalmente, quando Brandalise *et al.* (2003) demonstraram que plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *AtPUMP1* apresentaram maior resistência ao estresse imposto pela aplicação de H₂O₂ por até 48 horas de tratamento. Em concordância com essa evidência experimental, o tratamento de plântulas de *Vigna unguiculata* por H₂O₂ induziu o gene *VuUCP5* em cerca 8 vezes no tempo 6 horas de estresse e em cerca de 6 vezes nos tempos 12 e 24 horas de submissão ao estresse. Assim, com base na análise de expressão pode-se sugerir que *VuUCP5* participa da resposta adaptativa aos estresses hídrico/salino. Esses valores de expressão de *VuUCP5* estão de acordo com os dados de expressão em *Arabidopsis*, com pico de expressão de *AtUCP5* de 2,55 x após 12 horas de tratamento (FÁVARO, 2008).

O tratamento por ácido salicílico induziu aproximadamente um aumento de até 11 vezes para o gene *VuUCP1b* em raízes com 6 horas de submissão ao estresse e 5 vezes em folhas. Os genes *VuUCP3* e *VuUCP5* foram também detectados com 3, 5 e 6 vezes de aumento de expressão, respectivamente (Figuras 25, 27 e 29). Em *Arabidopsis*, um estudo de expressão gênica com ácido salicílico 100 µM em suspensão de cultura de células com 3, 12 e 24 horas de tratamento envolvendo *AtUCP1* e *AtUCP2* mostrou equivalência de expressão entre os dois genes estudados, com discreto aumento de *AtUCP1* com 24 horas de submissão ao estresse (CLIFTON *et al.*, 2005). Sabidamente, o ácido salicílico é um composto fenólico, atuando como importante efector molecular em plantas (KLESSING; MALAMY, 1994). Sua participação na regulação de um grande número de processos, envolvendo a termogênese, resposta de defesa contra o ataque de patógenos, síntese do etileno e o amadurecimento de frutos é bem conhecida (YANG *et al.*, 1997; LESLIE; ROMANI, 1988; NORMAN *et al.*, 2004). Existem

também evidências para o papel do ácido salicílico na regulação das respostas da planta a estresses abióticos, dentre eles radiação UV e ozônio (SENARATNA *et al.*, 2000). Os estresse abióticos desencadeiam, conseqüentemente, a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e como já citado anteriormente, as EROs ativam a expressão das pUCPs por mecanismo de suave desacoplamento mitocondrial. Da mesma forma, a oxidase alternativa (AOX), uma proteína dissipadora de energia também presente em mitocôndrias de plantas, tem função de proteção contra a produção de EROs mitocondrial (COSTA *et al.*, 2010). Assim, o aumento de expressão para *VuUCP1b*, *VuUCP3* e *VuUCP5* seria uma resposta de regulação das pUCPs em *Vigna unguiculata* à produção excessiva de EROs, precisando estes mecanismos serem melhor caracterizados.

A regulação da expressão dos genes respiratórios tem sido amplamente investigada em plantas durante o crescimento e desenvolvimento normal bem como durante as condições de estresses adversas. Nas plantas, a expressão de genes mitocondriais e atividade variam entre tecidos e até durante o desenvolvimento do tecido. Por exemplo, os tecidos florais têm elevados níveis de transcritos mitocondriais e existem diferenças claras entre mitocôndrias de tecidos fotossintéticos e não fotossintetizantes. Dessa forma, não ocorre um aumento geral da transcrição para todos os genes que codificam proteínas mitocondriais, mas muitas vezes para membros específicos de uma família multigênica que apresentam indução da expressão. Estas observações dão suporte aos diferentes padrões observados de regulação de expressão dos genes pUCPs nos dois tecidos estudados (raízes e folhas), concordando com a ideia de que a expressão de diferentes genes (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5*) parecem ser tanto específica de tecido, do estágio de desenvolvimento e da natureza do estresse estudado (MILLAR *et al.*, 2011).

CONCLUSÕES

A pUCP de *Vigna unguiculata* é codificada por uma família multigênica constituída por no mínimo seis genes (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4* e *VuUCP5*), apresentando maior similaridade com a família multigênica de pUCPs de *Phaseolus vulgaris*;

A duplicação gênica de pUCP1 (*VuUCP1a* e *VuUCP1b*), detectada em *Vigna unguiculata*, bem como a ausência de pUCP6 foi confirmada em várias espécies da ordem *Fabales*, cujo genoma está disponível e sequenciado;

O alinhamento de sequências pUCPs entre *Arabidopsis* e representante da ordem *Fabales* incluindo *Vigna unguiculata* evidencia três sequências conservadas (SPTe), 4 assinaturas das pUCPs, sequência de dois aminoácidos, além de outros aminoácidos conservados, não deixando dúvidas da existência de pUCPs verdadeiras em *Vigna unguiculata*;

A relação de estrutura gênica e de expressão parecem relacionadas para uma seleção de economia de energia em condições de estresses;

Os genes *VuUCP1a*, *VuUCP2* e *VuUCP4* apresentaram expressão constitutiva, enquanto *VuUCP1b*, *VuUCP3* e *VuUCP5* mostraram-se modulados por estresses. Portanto, a duplicação do gene pUCP1 (*VuUCP1a* e *VuUCP1b*) está relacionada com uma neofuncionalização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, P., SARWAT, M. Growth and antioxidant responses in mustard (*Brassica juncea* L.) plants subjected to combined effect of gibberellic acid and salinity. **Arch Agro Soil Sci.** v. 56, p. 575–588, 2009.

ALMEIDA, A.M.; NAVET, R.; JARMUSZKIEWICZ, W.; KHOMSI, H.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E.; SLUSE, E.E. Cyanide- resistant, ATP-synthesis-sustained and uncoupling protein sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. **Plant Physiol.** v.119, p. 1323-1330, 2002.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, (17), P. 3389-3402, 1997.

ARCO, A.; SASTRÚSTEGUI, J. New mitochondrial carriers: an overview. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 62, p. 2204–2227, 2005.

ARNHOLDT-SCHMITT, B.; COSTA, J.H.; FERNANDES DE MELO, D. AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? **Trends In Plant Scienc.** V. 11, p. 281-287, 2006.

ARSENJEVIC, D.; ONUMA, H.; PECQUEUR, C.; RAIMBAULT, S.; MANNING, B.S.; MIROUX, B.; COUPLAN, E. ALVES-GUERRA, M.C.; GOUBERN, M.; SURWIT, R.; BOUILLAUD, F. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. **Nat Genet.** v. 26, p. 435-439, 2000.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 01 p. 84-93, 2009.

ATKIN, O. K.; MACHEREL, D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance . **Ann. Bot.** v. 103, p. 581-597, 2009.

AZZU, V.; JASTROCH, M.; DIVAKARUNI, A.S.; BRAND, M.D. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1797, p. 785–791, 2010.

BAILEY; T.L.; ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. **Proc. Second Intl. Conf. Intell. Syst., Mol. Biol.** pp. 28-36, Menlo Park , Calif: AAAI Press.

BAILEY; T.L.; GRIBSKOV, M. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. **Bioinformatics**, v. 14, p. 48-54, 1998.

BANU, M. N. A.; HOQUE, A.; WATANABE-SUGIMOTO, M.; MATSUOKA, M.; NAKAMURA, Y.; YOSHIMASA, SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Proline and glycinebetaine induce antioxidant N defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. **J. Plant Physiol.**, v. 166, n. 02 p. 146-156, 2009.

BEGCY, K.; MARIANO, E. D.; MATTIELLO, L.; NUNES, A. V.; PAULO MAZZAFERA, P.; MAIA, I. G.; MENOSSI, M. An Arabidopsis Mitochondrial Uncoupling Protein Confers Tolerance to Drought and Salt Stress in Transgenic Tobacco Plants. **Plos One**. v. 6, p. 1-9, 2011.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. **Phys. Plant.** v. 138, p. 447- 462, 2010.

BLUM, A. Crop responses of drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regul.** v. 20, p. 135–148, 1996.

BORECKÝ, J., MAIA, I.G., ARRUDA, P. Mitochondrial Uncoupling in Mammals and Plants. **Biosc. Rep.**, v. 21 (2), 201-11, 2001a.

BORECKÝ, J., MAIA, I.G.; COSTA, A.D.; JEŽEK, P.; CHAIMOVICH, H. Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.**, v. 505, p. 240-44, 2001b.

BORECKÝ, J., NOGUEIRA, F.T.S.; de OLIVEIRA, K.A.P.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E. The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the genes families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. **J. exp. Bot.** v. 57(4), p. 849-64. 2006.

BORECKÝ, J., VERCESI, A.E. Plant Uncoupling Mitochondrial Protein and Alternative Oxidase: Energy Metabolism and stress. **Biosc. Rep.**, v. 25, p. 3-4, 2005.

BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLONI-GIACONINO, A.; ROSSIER, C.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J.; MUZZIAN, P.; GIACOBINO, J.P. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **FEBS Lett.** v. 408, p. 39-42, 1997.

BOUILLAUD, F.; ARECHAGA, I.; PETIT, P.X.; RAIMBAULT, S.; LEVI-MEYRUEIS, C.; CASTEILLA, L.; LAURENT, M.; RIAL, E.; RICQUIER, D. A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. **The EMBO J.** v.13 (8), p. 1990-1997, 1994.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J.** v. 134, p. 707–716, 1973.

BRAND, M. D. AFFORTIT, C.; ESTEVES, T.C.; GREEN, K.; LAMBERT, A.J.; MIWA, S. PAKAY, J.L.; PARKER, N. Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. **Free Rad. Biol. Med.** v. 37, p. 755-767, 2004.

BRANDALISE, M., MAIA, I.G., BORECKÝ, J., VERCESI, A.E., ARRUDA, P. Overexpression of Plant Uncoupling Mitochondrial Protein in Transgenic Tobacco Increases Tolerance to Oxidative Stress. **J..Bioenerg. Biomemb.**, v. 35 (3), 2003a.

BRANDALISE, M., MAIA, I.G., BORECKÝ, J., VERCESI, A.E., ARRUDA, P. ZmPUMP encodes a maize mitochondrial uncoupling protein that is induced by oxidative stress. **Plant Sci** v. 165, p. 329-35, 2003b.

CANNON, B.; SHABALINA, I.G.; KRAMAROVA, T. V. PETROVIC, N.; NEDERGAARD. Uncoupling protein: a role in protection against reactive oxygen species – or not? **Biochim. Bioph. Acta.** v. 1757(5-6), p. 449-458, 2006.

CARLINI, D.B.; CHEN, Y.; STEPHAN, W. The relationship between third-codon position nucleotide content, codon bias, mRNA secondary structure and gene expression in the Drosophilid alcohol dehydrogenase genes Adh and Adhr. **Genetics**. v. 159, p. 623-633, 2001.

CASTILLO-DAVIS, C. I.; MEKHEDOV, S. L.; HARTL, D. L. KOONIN, E. V.; KONDRASHOV, F. A. Selection for short introns in highly expressed genes. **Nat Genet**. v. 31, p. 415-418, 2002.

CAVALHEIRO, R.A.; FORTES, F.; BORECKÝ, J.; FAUSTINONI, V.C.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E. Respiration, oxidation phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 37, p. 1455-61, 2004.

CHEONG, Y.H.; CHANG, H.S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**. v. 129, p. 661-77, 2002.

CHIEN, L.F.; WU, Y. C.; CHEN, H. P. Mitochondrial energy metabolism in young bamboo rhizomes from *Bambusa oldhamii* and *Phyllostachys edulis* during shooting stage. **Plant. Phys. Bioc.** v. 49, p. 449-457, 2011.

CLIFTON, R.; LISTER, R.; PARKER, K. L.; SAPPL, P. G.; ELHAFEZ, D.; MILLAR, A. H.; DAY, D. A.; WHELAN, J. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.** v. 58, p. 193-212, 2005.

CLIFTON, R.; MILLAR, A.H.; WHELAN, J. Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypass. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1757, p. 730-741, 2006.

CONSIDINE, M.J.; DALEY, D.O.; WHELAN, J. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. **Plant Physiol.** v. 126, p. 1619-1629, 2001.

CONSIDINE, M.J.; GOODMAN, M.; ECHTAY, K.S.; LALOI, M. WHELAN, J. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 22298-302, 2003.

COSTA, A.D.T.; NANTES, I.L.; JEŽEK, P.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. **J. Bioenerg. Biomembr.** v. 31, p. 527-33, 1999.

COSTA, J.H.; HASENFRATZ-SAUDER, M.P.; PHAM-THI, A.T.; SILVA LIMA, M.G.; DIZENGREMEL, P.; JOLIVET, Y.; FERNANDES DE MELO, D. Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes 2a and 2b. **Plant. Sci.** v. 167, p. 233-239, 2004.

COSTA, J. H.; JOLIVET, Y.; HASENFRATZ-SAUDER, M. P.; ORELLANO, E. G.; SILVA LIMA, M. G.; DIZENGREMEL, P.; FERNANDES DE MELO, D. Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance. **J. Plant Physiol.** v. 164, p. 718-727, 2007.

COSTA, J.H.; FERNANDES DE MELO, D.; GOUVEIA, Z.; CARDOSO, H.G.; PEIXE, A.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. The alternative oxidase family of *Vitis vinifera* reveals an attractive model to study the importance of genomic design. **Phys. Plant.** v. 137, P. 553-565, 2009.

COSTA, J. H.; MOTA, E.F.; CAMBURSANO, M. V.; LAUXMANN, M.A.; OLIVEIRA, L.M.N.; SILVA LIMA, M.G.; ORELLANO, E.G.; FERNANDES DE MELO, D. Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. **J. Plant Physiol.** v. 167, p. 561-570, 2010.

DEBNATH,M.; PANDEY, M.; BISEN, P. S. An Omics Approach to Understand the Plant Abiotic Stress. **OMICS J. Integ. Biol.** v. 15 (11), 2011.

DE SANTIS, A.; ARRIGONI, O.; PALMIERI, F. Carrier-mediated transport of metabolites in purified bean mitochondria. **Plant Cell Physiol.** v. 17, p. 1221-1233, 1976.

DESIKAN, R.; A-H-MACKERNESS, S.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiol.** v.. 127, p. 159-172, 2001.

DEUTSCH; M.; LONG, M. Intron-exon structure of eukaryotic model organism. **Nucleic Acids Res.** v. 27, p. 3219-3228, 1999.

DIETRICH, M. O.; HORVATH, T.L. The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. **Pflugers Arch,** v. 459(2), p. 269-275, 2010.

DIVAKARUNI; A.S.; BRAND, M.D. The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. **Physiol.** v. 26, p. 192-205, 2011.

DLASKOVA, A.; SPACEK, T.; SKOBISOVÁ, E.; SANTOROVÁ, J.; JEZEK, P. Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling protein in vitro and in vivo. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1757, n. 05, p. 467-473, 2006.

DONGEN, J. T. V. ;GUPTA, K. J.; RAMIREZ-AGUILAR, S.J.; ARAÚJO, W.L.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A.R. Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathway. **J. Plant Phys.** v. 168(12), p. 1434-1443, 2011.

DORDAS, C. Nonsymbiotic hemoglobins and stress tolerance in plants. **Plant Sci.** v. 176, p. 433–440, 2009.

DUESTER, G. JORNVAL, H.; HATTIELD, G.W. Intron-dependent evolution of the nucleotide-binding domains within alcohol dehydrogenase and related enzymes. **Nucleic Acids Res.** V.14, p. 1931-1941, 1986.

ECHTAY, K.S.; ESTEVES, T.C.; PAKAT, J.L.; JEKABSONS, M.B.; LAMBERT, A.J.; PORTERO-OTIN, M.; PAMPLONA, R.; VIDAL-PUIG, A.J.; WANG, S.; ROEBUCK, S.J.; BRAND, M.D. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. **EMBO J.** v. 22, p. 4103-4110, 2003.

ECHTAY, K.S.; MURPHY, M.P.; SMITH, R.A. TALBOR, D.A.; BRAND, M.D.. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidant. **J. Biol. Chem.** V. 277, p. 47129-35, 2002b.

ECHTAY, K.S.; ROUSSEL, D.; St-PIERRE, J.; JEKABSONS, M.B.; CADENAS, S. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. v.. 415, p. 96-99b, 2002a.

ECHTAY, K.S.; WINKLER, E.; FRISCHMUTH, K.; KLINGENBERG, M. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H (+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc. Natl.Acad. Sci.* . v. 98, p. 1416-1421, 2001.

ECHTAY, K.S.; WINKLER, M.; BIONENGRABER, M.; KLINGENBERG, M. Site-directed mutagenesis identifies residues in uncoupling protein (UCP1) involved in three different functions. **Biochem.** v. 39, p. 3311-3317, 2000.

FÁVARO, R.D. Análise bioquímica, estudos da relação estrutura-função e de expressão da proteína desacopladora mitocondrial de plantas. 2008. 94p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FIGUEIRA; ARRUDA. Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress. **J. Bioenerg. Biomembr.** v. 43, p. 67-70, 2011.

FLEURY, C.; NEVERONA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S. CHAMPIGNY, O. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat. Genet.** v. 15, p. 269-272, 1997.

FLEXAS, J.; Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiol. Plant.** v. 127, p. 343-352, 2006.

FRIDELL, Y.W.C.; SÁNCHEZ-BLANCO, A.; SILVIA, B.A.; HELFAND, S.L. Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein . **J. Bioenerg. Biomembr.** v. 36, p. 219-228, 2004.

GARANTIZADO, F.E.A. Caracterização da Proteína Desacopladora de Planta (pUCP) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 2007.102p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

GARANTIZADO, F.E.A.; COSTA, J.H.; MAIA, I.G.; FERNANDES DE MELO, D. Expressão diferencial dos genes *VuUCP1a* e *VuUCP1b* em caupi sob estresse salino. **Rev. Ciênc. Agron.** v.42 (2), p. 404-408, 2011.

GARLID, K. D. ; OROSZ, D.E.; MODRIANSKÝ, M.; VASSANELLI, S. JEZEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 2615-2620, 1996.

GARLID, K. D.; JABUREK, M.; JEZEK, P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. **FEBS Lett** v. 438, p. 10–14, 1998.

GARLID, K.D.; JABUREK, M.; JEŽEK, P.; VARECHA, M. How do uncoupling proteins uncouple?, **Biochim Biophys Acta**, v.1459, p.383-389, 2000.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Phys. Biochem.** v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

HADDRILL, P.R.; CHARLESWORTH, B.; HALLIGAN, D.L.; ANDOLFATTO, P. Pattern of intron sequence evolution in *Drosophila* are dependent upon length and GC content. **Genome Biol.** v. 6, R.67, 2005.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox Biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HIRABAYASHI, M.; LJIRI, D.; KAMEI, Y.; TAJIMA, A.; KANAI, Y. Transformation of skeletal muscle from fast to slow-twitch during acquisition of cold tolerance in the chick. **Endocrinology**. v. 146, p. 399-405, 2005.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: University of California/The College of Agriculture. 1950. 32 p. (Circular 347).

HOLTZAPFFEL, R.C.; FINNEGAN, P.M.; MILLAR, A.H.; BADGER, M.R.; DAY, D.A. Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold storage. **Funct. Plant Biol.** v. 29, p. 827-834, 2002.

HOURTON-CABASSA, C., MATOS, A.R., ZACHOWSKI, A., MOREAU, F. The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating in plant mitochondria. **Plant Physiol. Biochem**, v. 42, p. 283,290, 2004.

HOURTON-CABASSA, C.; MESNEAU, A.; MIROUX, B. ROUSSAUX, J.; RICQUIER, D. Alternation of plant mitochondrial proton conductance by free fatty acids. Uncoupling proteins involvement. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 41533-41538, 2002.

HUGHES; J.; CRISCUOLO, F. Evolutionary history of the UCP gene family: gene duplication and selection. **BMC Evol. Biol.** v. 8, p. 1-13, 2008.

ITO, K. Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). **Plant Sci.** v. 149, p. 167-73, 1999.

ITO, K.; ABE, Y.; JOHNSTON, S.D.; SEYMOUR, R.S. Ubiquitous expression of a gene encoding for uncoupling protein isolated from the thermogenic inflorescence of the dead horse arum *Helicodicerus muscivorus*. **J. Exp. Bot.** v. 54, p. 1113-14, 2003.

ITO-INABA, Y.; HIDA, Y.; ICHIKAWA, M.; KATO, Y.; YAMASHITA, T. Characterization of the plant uncoupling protein, SrUCPA, expressed in spadix mitochondria of the thermogenic skunk cabbage. **J. Exp. Bot.** v. 59, p. 995-1005, 2008b.

ITO-INABA, Y.; HIDA, Y.; INABA, T. What is critical for plants thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. **Planta.** v. 231, p. 121-130, 2009b.

ITO-INABA, Y.; HIDA, Y.; MORI, H.; INABA, T. Molecular identity of uncoupling proteins in thermogenic skunk cabbage. **Plant Cell Physiol.** v. 49, p. 1911-1916, 2008a.

ITO-INABA, Y.; SATO, M.; MASUKO, H.; HIDA, Y.; TOYOOKA, K.; WATANABE, M.; INABA, T. Developmental changes and organelle biogenesis in the reproductive organs of thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). **J Exp Bot** v. 60 (13), p. 3909–3922, 2009a.

JALEEL, C. A.; PANNEERSELVAM, R. Variations in the antioxidative and indole alkaloid status in different parts of two varieties of *Catharanthus roseus*: an important folk herb, 2007. **Chin J Pharmacol Toxicol.** v. 21, p. 487–494, 2007.

JALEEL, C.A. (2009). Changes in non enzymatic antioxidants and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* with different soil salinity regimes. **Bot Res Inter** v. 2, p. 01-06, 2009.

JALEEL, C.A.; SANKAR, B.; MURALI, P.V.; GOMATHINAYAGAM, M.; LAKSHMANAN, G.M.; PANNEERSELVAM, R. Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. **Colloids Surf B Biointerfaces.** v. 62, p. 105–111, 2008.

JARMUSZKIEWICZ, W., NAVET, R.; ALBERICI, L.C.; DOUETTE, P. SLUSE-GOFFART, C.M. Redox state of endogenous Coenzyme Q modulates the inhibition of linoleic acid-induced uncoupling by guanosine triphosphat in isolated skeletal muscle mitochondria. **J. Bioenerg. Biomembr.** v. 36, p. 493-502, 2004.

JARMUSZKIEWICZ, W., SLUSE-GOFFART, C.M., VERCESI, A.E., SLUSE, F.E. Alternative Oxidase and Uncoupling Protein: Thermogenesis Versus Cell Energy Balance. **Biosc. Rep.**, v.21, p. 213-22, 2001.

JARMUSZKIEWICZ, W., WOYDA-PŁOSZCZYCA, A. Mitochondrial uncoupling proteins: regulation and physiological role. **Postepy Biochem.**, v.54, p. 179-187, 2008.

JARMUSZKIEWICZ, W.; ALMEIDA, A.M.; SLUSE-GOFFART, C.M., SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 34882-86, 1998.

JARMUSZKIEWICZ, W.; BEHRENDT, M.; NAVET, R.; SLUSE, F.E. Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development, **FEBS Lett.** v. 532, p. 459-464, 2002.

JARMUSZKIEWICZ, W.; MILANI, G.; FORTES, F.; SCHREIBER, A.Z.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. First evidence and characterization of a uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*, **FEBS Lett.** v. 467, p. 145-149, 2000.

JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; HRYNIEWECKA, L.; SLUSE, F.E. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*: **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 23198-202, 1999.

JEŽEK, P.; COSTA, A.D.; VERCESI, A.E. Important amino acid residues of potato plant uncoupling protein (StUCP). **Braz. J. Med. Res.** v. 33, p. 1413-1420, 2000.

JEŽEK, P. Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins. **J. Bioenerg. Biomembr.** v. 31, p. 457-466, 1999.

JEŽEK, P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins –UCPn. **Int. J. Bioch. Cell Biol.** v. 34, p. 1190-1206, 2002.

JEZEK, P., ENGSTOVÁ, H., ZACHOVÁ, M., VERCESI, A.E., COSTA, A.D.T., ARRUDA, P., GARLID, K.D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling protein. **Bioq. Et. Biophys. Acta**, v. 1365, p. 319-327, 1998.

JEZEK, P., HLAVATÁ, L., Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism, **Intern. J. Biochem. & Cell Biol**, v. 37 (12), p. 2478-2503, 2005.

JEZEK, P.; URBÁNKOVÁ, E. Specific sequence motifs of mitochondrial uncoupling proteins. **IUBMB Life** v. 49, p. 63-70, 2000.

JEŽEK, P.; BORECKÝ, J.; ZÁČKOVÁ, M.; COSTA, A.D.T.; ARRUDA, P. Possible basic and specific functions of plant uncoupling proteins (pUCP). **Biosci. Rep.** v. 21, p. 237-245, 2001.

JEŽEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Evidence for anion-transporting plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 32743-48, 1996.

KABAT, A.P.; ROSE, R.W. Molecular identification of uncoupling proteins 2 and 3 in carnivorous marsupial, Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). **Physiol. Biochem Zool.** v. 77 (1), p. 109-115, 2004.

KAMATA, T.; MATSUKAWA, K.; KAKIZAKI, Y.; ITO, K. In vivo redox state of the ubiquinone pool in the spadices of the thermogenic skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. **J. Plant. Res.** v. 122, p. 645-649, 2009.

KLEIN, S.L.; STRAUSBERG, R.L.; WAGNER, L.; PONTIUS, J.; CLIFTON, S.W.; RICHARDSON, P. Genetic and genomic tools for Xenopus research: the NIH Xenopus initiative. **Dev. Dyn.** v. 225, p. 384-391, 2002.

KLESSING, D. F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Mol. Biol.** v. 26, p. 1439-1458, 1994.

KLINGENBERG, M. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. **Trends. Biochem. Sci.** v. 15, p. 108-12, 1990.

KLINGENBERG, M.; ECHTAY, K.S. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 1504, p. 128-143, 2001.

KOWALTOWSKI, A.J.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. **FEBS Lett.** v. 425, p. 213-216, 1998.

KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Rad. Biol. Med.** v. 47, p. 333-343, 2009.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.** v. 26, p. 463-471, 1999.

KREPS, J.A.; WU, Y.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J.F. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiol.** v. 130, p. 2129-2141, 2002.

LALOI, M. Plant mitochondrial carrier: an overview. **Cell. Mol. Life. Sci.** v. 56, p. 918-944, 1999.

LALOI, M.; KLEIN, M.; RIESMEIER, J.W.; MULLER-ROBER, B.; FLEURY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**. v. 389, p. 135-136, 1997.

LEDESMA, A.; LACOPA, M.G.; RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Gen. Biol.** v. 3(12), p. 3015.1-3015.9, 2002.

LESLIE, C.A.; ROMANI, R.J. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. **Plant Physiol.** v. 88, p. 833-837, 1988.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method.** v. 25(4), p. 402-408, 2001.

MAIA, I.G.; BENEDETTI, C.E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S.R.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. AtPUMP: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. **FEBS Lett.**, v. 429, p. 403-406, 1998.

MAILLOUX, R.J.; HARPER, M.E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. **Free Rad. Biol. Med.** v. 51, p. 1006-1015, 2011.

MANIVANNAN, P. *et al.* Protection of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. plants from salt stress by paclobutrazol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, (02), p. 315-318, 2008.

MAO, W.G.; YU, X.X.; ZHONG, A.; BRUSH, J.; SHERWOOD, S.W.; ADAMS, S.H.; PAN, G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. **FEBS Lett.** v. 443, p. 326-330, 1999.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics.** v. 20(15), p. 2471-2472, 2004.

MATTICK, J.S.; CAGEN, M.J. The evolution of controlled multitasked gene network: the role of introns and other non-coding RNAs in the development of complex organisms. **Mol. Biol. Evol.** v. 18, 161-1630, 2001.

MAURINO, V. G.; FLUGGE, U. Experimental systems to assess the effects of reactive oxygen species in plant tissues. **Plant. Signal Behav.** v.3(11), p. 923-928, 2008.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; McINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proced. Nat. Acad. Scienc. USA.** V. 96, p. 8271-8276, 1999.

McLEOD, C.J.; AZIZ, A.; HOYT, R.F. Jr.; McCOY, J.P.Jr.; SACK, M.N. **J. Biol. Chem.**, v.280, p. 33470-33476, 2005.

MEEUSE, B.J.D. Thermogenic respiration in Aroids. **Annu. Rev. Plant. Physiol.** v. 26, p. 117-126, 1975.

MILLAR, A.H.; HEAZLEWOOD, J.L. Genomic and proteomic analysis of mitochondrial carrier proteins in Arabidopsis. **Plant Physiol.** v. 131, p. 443-453, 2003.

MILLAR, A.H.; WHELAN, J.; SOOLE, K.L.; DAY, D.A. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annu. Rev. Plant. Biol.** v. 62, p. 79 – 104, 2011.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFICI -YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stress. **Plant Cell Environ.** v. 33, p. 453-467, 2010.

MISRA, A N.; MISRA, M.; DAS, N. Plant responses to salinity: metabolic changes and the use of plant tissue culture—a perspective. In **Environmental Concern and Tissue Injury, Part-I. R. Prakash and S.M. Choubey**, eds. (Jagmandir Books, New Delhi), p. 77–84, 1990.

MISRA, A.N.; BISWAL, A.K.; MISRA, M. Physiological, biochemical and molecular aspects of water stress in plants, and their biotechnological applications. **Proc Nat Acad Sci USA.** v.72, p. 115–134, 2002.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature.** v. 191, p. 144–148, 1961.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, **Trends Plant Sci,** v.9, p.405-10, 2002.

MIZUNO, N.; SUGIE, A.; KOBAYASHI, F.; YAKUMI, S.; Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. **J. Plant Physiol.** v. 165 (13), p. 462-46, 2008.

MOLLER , I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport , NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.** v. 52, p. 561-591, 2001.

MUNNS, R. Comparative Physiology of Salt and Water Stress. **Plant Cell Env** v. 25, p. 239 - 250, 2002.

MURAYAMA, S.; HANDA, H. Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature. **Mol. Gen. Genet.** v. 264, p. 112-18, 2000.

MURPHY, M.P.; ECHTAY, K.S.; BLAIKIE, F.H.; ASIN-CAYUELA, J.; COCHEME, H.M. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 48534-45, 2003.

NANTES, I.L., FAGIAN, M.M., CATISTI, R., ARRUDA, P., MAIA, I.G., VERCESI, A.E. Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 457, p. 103-106, 1999.

NAVET, R.; DOUETTE, P.; PUTTINE-MARIQUE, F. ; SLUSE-GOFFART, C.M.; SLUSE, F.E. Activation and regulation of plant uncoupling protein in potato tuber mitochondria . **FEBS Lett.** v. 579, p. 4437-4442, 2005.

NICHOLLS, D.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1. **J. Bioenerg. Biomembr.** v. 31, p. 399, 418, 1999.

NICHOLLS, D.G.; LOCKE, R. Thermogenic mechanisms in brown fat. **Physiol. Rev.** V. 64, P. 1–64, 1984.

NOGUEIRA, F.T.S.; SASSAKI, F.T.; MAIS, I.G. Arabidopsis thaliana Uncoupling Proteins (AtUCPs): insights into gene expression during development and stress response and epigenetic regulation. **J Bioenerg Biomembr.** v. 43, p. 71–79, 2011.

NOGUEIRA, F.T.; DE ROSA, V.E. JR.; MENOSSI, M., ULIAN, E.C., ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiol.** v. 132, p. 1811-1824, 2003.

NOGUEIRA, F.T.S.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. Genomic structure and regulation of mitochondrial uncoupling protein genes in mammals and plants. **Biosc. Rep.** v. 25, p. 209-225, 2005.

NORMAN, C.; HOWELL, K. A.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. M.; DAY, D. A. Salicylic acid is an uncoupling and inhibitor of mitochondrial electron transport. **Plant Physiol.** v. 134, p. 492-501, 2004.

ONDA, Y.; KATO, Y.; ABE, Y.; ITO, T.; ITO-INABA, Y.; MOROHASHI, M.; ITO, Y.; ICHIKAWA, M.; MATSUKAWA, K.; OSTUKA, M.; KOIWA, H.; ITO, K. Pyruvate-sensitive AOX exists as a non-covalently associated dimer in the homeothermic spadix of skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. **FEBS Lett**, v. 581, p. 5852-5858, 2007.

ONDA, Y.; KATO, Y.; ABE, Y.; ITO, T.; MOROHASHI, M.; ITO, Y.; ICHIKAWA, M.; MATSUKAWA, K.; KAKIZAKI, Y.; KOIWA, H.; ITO, K. Functional

coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. **Plant Physiol.** v. 146, p. 636-645, 2008.

OZAWA, K.; MURAYAMA, S.; UEHARA, A.K.; HANDA, H. Overexpression of wheat mitochondrial uncoupling protein in rice plants confers tolerances to oxidative stresses promoted by exogenous hydrogen peroxide and low temperature. **Mol. Breed.** v. 18, p. 51-56, 2006.

PALMIERI, L.; VOZZA, A.; HONLINGER, A.; DIETMEIER, K.; PALMISANO, A.; ZARA, V.; PALMIERI, F. The mitochondrial dicarboxylate Carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. **Mol. Microbiol.** v. 31, p. 569-577, 1999.

PALMIERI, L.; ROTTENSTEINER, H.; GIRZALSKY, W.; SCARCIA, P.; PALMIERI, F.; ERDMANN, R. Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. **EMBO J.** v. 20, p. 5049–5059, 2001.

PALMIERI, L.; PICAULT, N.; ARRIGONI, R.; BESIN, E.; PALMIERI, F.; HODGES, M. Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposome sans functional characterization. **Biochem. J.** v. 410, p. 621-629, 2008.

PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria, **FEBS Letters**, v.470, p.88-92, 2000.

PASTORE, D.; LAUS, M. N.; Di FONZO, N.; PASSARELLA, S. Reactive oxygen species inhibit the succinate oxidation-supported generation of membrane potential in wheat mitochondria. **FEBS Lett** v. 516, p. 15-19, 2002.

PASTORE, D.; TRONO, D.; LAUS, M.N.; Di FONZO, N.; FLAGELLA, Z. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. **J. Exp. Bot.** v.58, n. 2 p.195-210, 2007.

PAVENTI, C.; PASTORE, D.; BOBBA, A.; PIZZUTO, R.; Di PEDE, S.; PASSARELLA, S. Plant uncoupling protein in mitochondria from aged-dehydrated slices of Jerusalem artichoke tubers becomes sensitive to superoxide and to hydrogen peroxide without increase in protein level. **Biochimie.** v. 88, p. 179-188, 2006.

PFEIFFER, M.; KAYSER, E.B.; YANG, X.; ABRAMSON, E.; KENASTON, M.A.; LAGO, C.U.; LO, H.H.; SEDENSKY, M.M.; LUNCEFORD, A.; CLARKE, C.F.; SARAH, J.; WU, S.J.; MCLEOD, C.; FINKE, C.T.; MORGAN, P.M.; MILLS, E.M. *Caenorhabditis elegans* UCP4 Controls Complex II-Mediated Oxidative Phosphorylation Through Succinate Transport. **J. Biol. Chem.** v.4, p. 37712-37720, 2011.

PICAULT, N.; HODGES, M.; PALMIERI, L.; PALMIERI, F. The growing family of mitochondrial carriers in Arabidopsis. **TRENDS in Plant Sci.** v.9 (3), p. 1360-1385, 2004.

POPOV, V.N.; SIMONIAN, R.A.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria, **FEBS Letters**, v.415, p. 87-90, 1997.

POPOV, V. N.; EPRINTSEV, A. T.; MALTSEVA, E. V. Activation of Genes Encoding Mitochondrial Proteins Involved in Alternative and Uncoupled Respiration of Tomato Plants Treated with Low Temperature and Reactive Oxygen Species. **Russ. J. Plant Physiol.**, 2011, v.58 (5), pp. 914–920, 2011.

RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C.; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M. F.; SURWIT, R.S.; RICQUIER, D.; WARDEN, C. Uncoupling protein-2:

a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat genet.** v. 15, p. 269-272, 1997.

REN, X. Y.; VORST, O.; FIERS, M.W.E.J.; STIEKEMA, W.J.; NAP, J.P.; In Plants, highly expressed genes are the least compact. **Trends Genet.** v. 22, p. 528, 532, 2006.

RIAL, R.; ZARDOYA, R. Oxidative stress, thermogenesis and evolution of uncoupling proteins. **J. Biol.** v, 8(58), p. 1-5, 2009.

RIAL, E.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, L.; GALLARDO-VARA, E.; ZARAGOZA, P.; MOYANO, E.; GONZÁLEZ-BARROSO, M. M. Lipotoxicity, fatty acid uncoupling and mitochondrial carrier function. **Bioch. Biophys. Acta**, V. 1797, p. 800–806, 2010.

RICQUIER, D., BOUILLAUD, F., The uncoupling protein homologue: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP e AtUCP. **Biochem. J.**, v. 345, p. 161-179, 2000.

RICQUIER, D.; KADER, J.C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 73, p. 577-83, 1976.

ROYAL, S. Reaping the benefits: science and the sustainable intensification of global agriculture. **Royal Society London, UK**, 2009.

SANCHIS, D.; FLEURY, C.; CHOMIKI, N.; GOUBERN, M.; HUANG, Q.L.; NEVEROVA, M.; GREGOIRE, F.; EASLICK, J.; RAIMBAULT, S.; LEVI-MEYRUEIS, C.; MIROUX, B.; COLLINS, S.; SELDIM, M.; RICHARD, D.;

WARDEN, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling protein activity in recombinant yeast. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 34611-34615, 1998.

SAVIANI, E.E.; da SILVA Jr., A. MARTINS, I.S. Photoaffinity labelling of the uncoupling protein from potato tuber mitochondria. **Plant Physiol. Biochem.** v. 35, p. 701-706, 1997.

SCHWARZLANDER, M.; FRICKER, M.D.; SWEETLOVE, L.J. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: Effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1787, p. 468-475, 2009.

SCHWARZLANDER, M.; LOGAN, C. D.; JOHNSTON, I. G.; JONES, N. S.; MEYER, A. J.; FRICKER, M. D.; SWEETLOVE, L. J. Pulsing of membrane potential in individual mitochondria: a stress-induced mechanism to regulate respiratory bioenergetics in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24 (3), p. 1188-1201, 2012.

SEKI, M., KAMEI, A., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current opinion in Biotechnology**, v. 14, 197-199, 2003.

SEKI, M.; ISHIDA, J.; NATUSAKA, M.; FUJITA, M.; NANJO, T. Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. **Funct. Integr. Genomics.** v. 2, p. 282-91, 2002a.

SEKI, M.; NATUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M. Monitoring the expression profiles of 7,000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant. J.** v. 31, p. 279-92, 2002b.

SENARATNA, T.; TOUCHELL, D.; BUNN, T.; DIXON, K. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. **Plant Growth Regul.** . v. 30, p. 157-161, 2000.

SEYMOUR, R. S.; GIBERNAU, M. Respiration on thermogenic inflorescences of *Philodendron melinonii*: natural pattern and responses to experimental temperatures. **J. Exp. Bot.** v. 59, p. 1353-1362, 2008.

SEYMOUR, R.S. Dynamics and precision of thermoregulatory responses of eastern skunk cabbage *Symplocarpus floetidus*. **Plant Cell Environ.** v. 27, p. 1014-1022, 2004.

SEYMOUR, R.S. Biophysics and physiology of temperature regulation in thermogenic flowers. **Biosci. Rep.** v. 21, p. 223-236, 2001.

SEYMOUR, R.S.; GIBERNAU, M.; ITO, K. Thermogenesis and respiration of inflorescences of the dead horse arum, *Helicodiceros muscivorus*, a pseudo-thermoregulatory aroid associated with fly pollination. **Funct. Ecol.** v. 17, p. 886-894, 2003.

SEYMOUR, R.S.; ITO, Y.; ONDA, Y.; ITO K. Effects of floral thermogenesis on pollen function in Asian skunk cabbage *Symplocarpus renifolius*. **Biol. Lett.** v. 5, p. 568-570, 2009.

SEYMOUR, R.S.; TERRY, I.; ROEMER, R.B. Respiration and thermogenesis by cones of the Australian cycad *Macrozamia machinii*. **Funct. Ecol.** v. 18, p. 925-930, 2004.

SEYMOUR, R.S.; WHITE, C.R.; GIBERNAU, M. Environmental biology: Heat reward for insect pollinators. **Nature.** v. 426, P. 243-244, 2003.

SHABALINA, S.; SPIRIDONOV, N. The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. **Genome Biol.** v. 5, p. 105, 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 3, p. 217-223, 2000.

SKUBATZ, H.; WILLIAMSON, P.S.; ACHNEIDER, E.L.; MEUSE, B.J.D.; Cyanide-insensitive respiration in thermogenic flowers of *Victoria* and *Nelumbo*. **J. Exp. Bot.** v. 41, p. 1335-1339, 1990a.

SKULACHEV, V. P. **Uspekhi Sovrem Biol.** v. 46, p. 241-263 (in Russian), 1958.

SKULACHEV, V.P. Role of uncoupled and non-uncoupled oxidations in maintenance of safely levels of oxygen and its one-electron reductants. **Quart. Rev. Biophys.** v. 29, p. 169-202, 1996.

SKULACHEV, V.P. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. **Proc. 5th Intern. Biochem. Congr.** v. 5, p. 365-374, 1963.

SKULACHEV; V. P.; MASLOV, S. **Biokhimiya.** v. 25, p. 1058-1064, 1960.

SLUSE, F.E., JARMUSZKIEWICZ, W., NAVET, R., DOUETTE, P., MATHY, G., SLUSE-GOFFART, C.M. Mitochondrial UCPs: New insights into regulation and impact. **Bioq. Et. Biophys. Acta.**, v. 20, p. 1-6, 2006.

SLUSE, F.E.; ALMEIDA, A. M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; VERCESI, A. E. Free fatty acid regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. **FEBS. Lett.** v. 433, p. 237-40, 1998.

SLUSE; F. E.; JARSMUSZKIEWICZ, W. Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. **Braz J. Med. Biol. Res.** v. 33, p. 259-268, 2000.

SLUSE; F. E.; JARSMUSZKIEWICZ, W. Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. **FEBS Lett**, v. 510, p. 117-120, 2002.

SMITH, A.M.; RANCLIFFE, R.G.; SWEETLOVE, L.J.; Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 51944-52, 2004.

SOKOLOVA, I.M.; SOKOLOV, E.P. Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. **FEBS. Lett.** v. 579, p. 313-17, 2005.

STUART, J.A.; HARPER, J.A.; BRINDLE, K.M.; BRAND, M.D. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish. Ectothermic vertebrates. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1413, p. 50-54, 1999.

SWEETLOVE, L. J.; LYTOVCHENKO, A.; MORGAN, M. ; NUNES-NESE, A.; TAYLOR, N. L.; BAXTER, C. J.; EICKMEIER, I.; FERNIE, A.R. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, p. 19587-19592, 2006.

SWIDZINSKI, J.A.; SWEETLOVE, L.J. LEAVER, C.J. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. **Plant. J.** v. 30, p. 431-446, 2002.

SWIDZINSKI, M.; LOGAN, D.C.; JOHNSTON, I.G.; JONES, N.S.; MEYER, A.J.; FRICKER, M.D.; SWEETLOVE, L.J. Pulsing of membrane potential in individual mitochondria: a stress-induced mechanism to regulate respiratory bioenergetics in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. v. 24(3), p. 1188-1201, 2012.

TALBOT, D.A.; HANUISE, N.; REY, B.; ROUANET, J-L.; DUCHAMP, C. Superoxide activates a GDP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes putagonicus*). **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 312, p. 983-988, 2003.

TALBOT, D.A.; LAMBERT, A.J.; BRAND, M.D. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. **FEBS Lett.** v. 556, p. 111-115, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** v. 24, p. 1596-1599, 2007.

- TANG, W. Heat production in cycad cones. **Bot. Gaz.** v. 148, p. 165-174, 1987.
- TRONO, D.; SOCCIO, M.; MASTRANGELO, A.M.; SIMONE, V.; FONZO, N.; PASTORE, D. The transcript levels of two plant mitochondrial uncoupling protein (pUCP)-related genes are not affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings showing an increased level of pUCP activity , **Bioncience Report**, v. 26, n. 03, p. 351-361, 2006.
- UEMURA, S.A.; LUO, S.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 9709-9715, 2000.
- VAN WEES, S.C.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; GLAZEBROOK, J. Characterization of the early response of Arabidopsis to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. **Plant. Physiol.** v. 132, p. 606-17, 2003.
- VANLERBERGHE; G. C.; McINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function . **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.** v. 48, p. 703-34, 1997.
- VERCAUTEREN, I.; VAN DER SCHUEREN, E.; VAN MONTAGU, M.; GUEYSEN, G. *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. **Mol. Plant. Microbe. Interact.** , v. 14, p. 288-99, 2001.
- VERCESI, A. E.; The Discovery of an Uncoupling Mitochondrial Protein in Plants. **Bioscience Reports**, v. 21, p. 195-200, 2001.

VERCESI, A.E., BORECKY, J., MAIA, I.G., ARRUDA, P., CUCCOVIA, I.M., CHAIMOVICH, H. Plant Uncoupling Mitochondrial Protein. **Annun. Rev. Plant. Biol.**, v.57, p. 383-404, 2006.

VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMP plants. **Nature**. v. 375, p. 24-25, 1995

.

VIANNA, C. R.; HAGEN, T.; ZHANG, C-Y.; BACHMAN, E.; BOSS, O. et al., Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. **Physiol. Genomics**. v. 5, p. 137-145, 2001.

VIDAL-PUIG, A.; SOLANES, G.; GRUJIC, D.; FLIER, J.S.; LOWEL. B.B. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 235, p. 79-82, 1997.

VINOGRADOV, A. E. Intron length and codon usage. **J. Mol. Evol.** v. 52, p. 2 – 5, 2001.

VINOGRADOV, A. E. Noncoding DNA, isochores and gene expression: nucleosome formation potential. **Nucleic Acids. Res.** v. 33, p. 559-563, 2005.

VISSER, W.; F., VAN ROERMUND C. W., WATERHAM H. R.; WANDERS R. J. Identification of human PMP34 as a peroxisomal ATP transporter. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 299, p. 494–497, 2002.

TANG, Y.; SHAH, J.; KLESSING, D.F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Gene Dev.** v. 11, p. 1621-1639, 1997.

WAGNER, A. M.; KRAB, K. WAGNER, M.J.; MOORE, A.L. Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1777, p. 993-1000, 2008.

WANG, B.; LUTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. **J Exp Bot.** v. 52, p. 2355–2365, 2001.

WANG, W.; VINO CUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta.** v. 218, p. 1-14, 2003.

WATANABE, A.; HIRAI, A. Two uncoupling proteins genes of the rice (*Oryza sativa* L.): molecular study reveals the defects in the pre-mRNA processing for the heat-generating proteins of the subtropical cereal. **Planta.** , v. 215, p. 90-100, 2002.

WATANABE, A.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A. AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiol.** . v. 40, p. 1160-1166, 1999.

WATLING, J.R.; ROBINSON, S.A.; SEYMOUR, S. Contribution of the alternative pathway to respiration during thermogenesis in flowers of the sacred lotus. **Plant Physiol.** v. 140, p. 1367-1373, 2006.

WHITHAM, S.A.; QUAN, S.; CHANG, H.S.; COOPER, B.; ESTES, B. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis plants. **Plant. J.** v. 33, p. 271-283, 2003.

WINKLER, E.; KLINGENBERG, M. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 2508-2515, 1994.

ZHANG, C. Y.; HAGEN, T.; MOOTHA, V. K.; SLIEKER, L. J.; LOWELL, B. .B. Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system. **FEBS Lett.** v. 449, p. 129-134, 1999.

ZHU, J. K. Cell signaling under salt, water and cold stress. **Curr. Opin. Plant. Biol.** v. 4, p. 401-406, 2001.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trens Plants Sci.** v. 6, p. 66-71, 2001a.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transductions in plants. **Annu Rev. Plant Biol.** v. 53, p. 247-273, 2002.

ZHU, Y.; LU, J.; CHEN, F.; LENG, F.; LI, H. Regulation of Thermogenesis in Plants: The interaction of Alternative Oxidase and Plant Uncoupling Mitochondrial Protein. **J. Int. Plant Biol.** v. 53 (1), p. 7-13, 2011.

ZUSHI, K. et al. Developmental and tissue-specific changes in oxidative parameters and antioxidant systems in tomato fruits grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 122 (01), p. 362-368, 2009.

