

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DESACOPLADORA DE PLANTA
(pUCP) DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp.**

FRANCISCO EDSON ALVES GARANTIZADO

FORTALEZA – CE

2007

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DESACOPLADORA DE PLANTA
(pUCP) DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp.**

FRANCISCO EDSON ALVES GARANTIZADO

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

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Dirce Fernandes de Melo

FORTALEZA – CE

2007

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

-
- G193c Garantizado, Francisco Edson Alves.
Caracterização da proteína desacopladora de planta (pUCP) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.
/ Francisco Edson Alves Garantizado. – 2007.
121 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2007.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.
Coorientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.
1. Proteínas de transporte. 2. Química vegetal. 3. Mitocôndrias. 4. Feijão-de-corda I. Título.

CDD 574.192

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP), 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 dissertação foi feita e apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, encontrando-se a disposição dos interessados na Coordenação do curso.

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

Francisco Edson Alves Garantizado

Defesa formal de Dissertação aprovada em 26 de abril de 2007 pela banca Examinadora constituída por:

Prof^ª. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFC

Orientadora

José Hélio Costa

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFC

Co-Orientador/Examinador

Prof^º. Dr. Ivan de Godoy Maia

Departamento de Genética/Unesp- São Paulo

Examinador

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	01
1 – Breve histórico sobre a descoberta das pUCPs.....	04
2 – Regulação das UCPs.....	06
3 – Relação entre a pUCP e a AOX.....	10
4 – Caracterização bioquímica.....	11
5 – Relações filogenéticas e estrutura dos genes da família de pUCPs/UCPs.....	16
6 – Expressão dos genes pUCPs em tecidos específicos.....	19
7 – Função das pUCPs.....	22
7.1 – Participação das pUCPs durante amadurecimento de frutos.....	22
7.2 – Controle da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS).....	22
7.3 – Resposta a estresses ambientais.....	27
7.4 – Termogênese.....	27
7.5 – Eficiência fotossintética.....	28
OBJETIVOS	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
1 – MATERIAL VEGETAL.....	30
2 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	31

2.1 – Extração da fração mitocondrial.....	31
2.2 – Determinação da proteína mitocondrial.....	33
2.3 – Ensaio polarográfico.....	33
2.4 – Cálculo do consumo de oxigênio.....	34
2.5 – Cálculo do controle respiratório (C.R.).....	35
2.6 – Cálculo da relação ADP/O.....	35
2.7 – Avaliação da integridade da membrana externa.....	36
2.8 – Caracterização da atividade da pUCP.....	37
3 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	37
3.1 – Desenho dos primers para pUCP.....	37
3.2 – Extração de RNA total.....	39
3.3 – Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total.....	39
3.4 – Ensaio de expressão da pUCP.....	40
3.4.1 – Transcrição reversa (RT).....	40
3.4.2 – Reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR).....	40
3.5 – Eletroforese dos produtos amplificados por RT-PCR.....	44
3.6 – Purificação dos produtos de RT-PCR.....	44
3.7 – Ligação inserto-vetor.....	45
3.8 – Vetor de clonagem pCR4-TOPO.....	47
3.9 – PCR em colônia.....	49
3.10 – Mini preparação de plasmídios por lise alcalina.....	49
3.10.1 – Preparação de meios de cultura.....	51
3.10.2 – Soluções usadas na mini preparação de plasmídios.....	52

3.11 – Sequenciamento.....	53
3.12 – Alinhamento de sequências e análises filogenéticas.....	53
3.13 – Isolamento de DNA genômico.....	53
3.14 – Eletroforese do DNA.....	54
3.15 – Amplificação do(s) fragmento(s) genômico(s) codificando pUCP em <i>V. unguiculata</i>	55
RESULTADOS	58
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	58
Integridade da membrana mitocondrial externa.....	58
Relação ADP/O e Controle Respiratório (C.R.).....	58
Caracterização da atividade enzimática da pUCP em <i>Vigna unguiculata</i>	61
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA pUCP EM <i>Vigna unguiculata</i>	67
Aplicação de estresse abiótico em plântulas de <i>Vigna unguiculata</i>	67
Extração de RNA total.....	67
Expressão de gene(s) da pUCP em folhas de <i>Vigna unguiculata</i>	70
Clonagem e seqüenciamento de gene(s) da pUCP em folhas de <i>Vigna unguiculata</i>	70
Purificação dos produtos de RT-PCR.....	70
PCR em colônia.....	73
Alinhamento de sequências e análise filogenética.....	73
A pUCP de <i>V. unguiculata</i> é codificada por uma família multigênica?.....	77
Isolamento do DNA genômico de <i>Vigna unguiculata</i>	77
Amplificação dos fragmentos gênicos da pUCP.....	77
DISCUSSÃO	80

CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo estrutural dos domínios das proteínas carreadoras mitocondriais....	02
Figura 2 – Árvore filogenética de membros representativos da superfamília de carreadores de ânions mitocondriais.....	03
Figura 3 – Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial de plantas.....	05
Figura 4 – Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial com destaque para a pUCP...07	
Figura 5 – Modelos hipotéticos propostos para os mecanismo de passagem de prótons H ⁺ do espaço intermembrana para a matriz.....	09
Figura 6 – Vias respiratórias em mitocôndrias de tomate.....	13
Figura 7 – Modelo estrutural da proteína AtPUMP1 mantendo regiões conservadas.....	15
Figura 8 – Árvore filogenética não enraizada de 5 subfamílias de UCPs e outras sequências de carreadores mitocondriais.....	17
Figura 9 – Estrutura gênica das pUCPs de arroz.....	18
Figura 10 – Modelo de ativação dos carreadores mitocondriais (UCPs e ANT) pelo superóxido através da peroxidação lipídica.....	25
Figura 11 – Modelo de ativação das UCPs por ROS.....	26
Figura 12 – Esquema de extração de mitocôndrias de hipocótilos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.....	32
Figura 13 – Alinhamento de seqüências de aminoácidos de 10 diferentes pUCPs, feito no programa Clustal X mostrando as regiões utilizadas para dedução dos oligonucleotídeos degenerados dos primers Pump1 e Pump2.....	38
Figura 14 – Mapa gênico e de restrição do vetor plasmidial PCR4-TOPO.....	48

Figura 15 – Consumo de oxigênio dependente de Ascorbato (Asc) e citocromo c (CIT c) de mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cultivar Vita 5.....	59
Figura 16 – Oxidação do malato/glutamato em presença de ADP por mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp em pH 7,2.....	60
Figura 17 – Oxidação do succinato em presença de ácido linoléico (LA) por mitocôndrias de hipocótilos de <i>Vigna unguiculata</i> em pH 6,5 (A), 7,2 (B) e 7,8 (C)....	62
Figura 18 – Oxidação do malato/glutamato em presença de ácido linoléico (LA) por mitocôndrias de hipocótilos de <i>Vigna unguiculata</i> em 6,5 (A), 7,2 (B) e 7,8 (C).....	63
Figura 19 – Percentual de estímulo do consumo de oxigênio por ácido linoléico em mitocôndrias de hipocótilos de <i>Vigna unguiculata</i> em diferentes pHs, tendo succinato ou malato como substrato.....	65
Figura 20 – Percentual de estímulo do consumo de oxigênio por ácido linoléico, plamítico, mirístico e láurico em mitocôndrias de hipocótilos de <i>Vigna unguiculata</i> , em diferentes pHs, tendo malato como substrato.....	66
Figura 21 - Plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Vita 5 submetidas a diferentes estresses abióticos após 3 dias de germinação e 7 dias de desenvolvimento.....	68
Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de RNA total isolado de folhas de <i>Vigna unguiculata</i> nas condições: 1) controle, (2) NaCl 100 mM, (3) H ₂ O ₂ 1 mM e (4) PEG 200,67 g/L.....	69
Figura 23 - Análise dos transcritos da pUCP em folhas de <i>Vigna unguiculata</i> sob condições de estresses abióticos: 1 - controle; 2 - NaCl 100 mM; 3 - H ₂ O ₂ 1 mM e 4 - PEG200,67g/L.....	71
Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 1,5 % do produto de amplificação da pUCP purificado.....	72

Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos clones recombinantes contendo o cDNA amplificado com os primers degenerados Pump1/Pump2 através de PCR em colônia.....	74
Figura 26 – Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos deduzidos de cDNAs codificando a pUCP de <i>V. unguiculata</i> (<i>VuUCP</i>) e soja (<i>GmUCP1a</i> e <i>GmUCP1b</i>) obtido através do programa Clustal X.....	75
Figura 27 – Árvore filogenética de 19 proteínas deduzidas de seqüências completas de cDNAs alinhadas com a seqüência da <i>VuUCP1a</i> construída através do método neighbor-joining do programa CLUSTAL X.....	76
Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA genômico de <i>V. unguiculata</i> (Vu) e DNA do bacteriófago λ digerido com a enzima de restrição <i>Hind</i> III (M).....	78
Figura 29 – Eletroforeses em gel de agarose 1,5% dos fragmentos gênicos amplificados usando-se diferentes temperaturas de anelamento (38 a 62° C).....	79
Figura 30 – Esquema representativo da estrutura gênica de <i>VuUCP1a</i> mostrando as posições dos oligonucleotídeos deduzidos.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variantes específicas dos sinais protéicos de transferência de energia (SPTE).....	14
Tabela 2 – Mistura de reação da transcrição reversa usando RNA total de <i>Vigna unguiculata</i>	41
Tabela 3 – Mistura de reação de PCR para ampliação do(s) gene(s) da pUCP de <i>Vigna unguiculata</i>	42
Tabela 4 – Program de PCR utilizado para amplificação do(s) gene(s) da pUCP em <i>Vigna unguiculata</i>	43
Tabela 5 – Mistura de reação da ligação do produto de RT-PCR ao vetor pCR4-TOPO.....	46
Tabela 6 – Mistura de reação da PCR em colônia para detecção do(s) gene(s) da pUCP.....	50
Tabela 7 – Mistura de reação de PCR para amplificação de fragmentos genômicos codificando pUCP em <i>Vigna unguiculata</i>	56
Tabela 8 – Programa de PCR utilizado para amplificação de fragmentos genômicos codificando pUCP em <i>Vigna unguiculata</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AOX – Oxidase Alternativa

cDNA – DNA complementar

CIT c – Citocromo c

DMSO – Dimetilsulfóxido

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etileno diamino tetra-acético

Hind III – Enzima de restrição de *Haemophilus influenzae* Rd.

IPTG – Isopropiltiogalactosídeo

KCN – Cianeto de Potássio

LA – Ácido linoléico

LB Agar – Agar Luria-Bertani

LB líquido – Caldo Luria-Bertani

mRNA – RNA mensageiro

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da DNA polimerase I

PEG – Polietileno glicol

pUCP – Proteína desacopladora de planta

PUMP- Proteína mitocondrial desacopladora em plantas

rRNA – RNA ribossômico

RT-PCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da DNA polimerase I

SDS – Sódio dodecil sulfato

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

UCP – Proteína desacopladora

X-gal – 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-galactosídeo

RESUMO

As proteínas desacopladoras de planta (pUCPs) são proteínas integrais de membrana, localizadas na membrana mitocondrial interna, pertencentes a Família de Carreadores de Ânions Mitocondriais (FCAM), responsáveis pela dissipação do gradiente eletroquímico de prótons, gerado pela respiração, como calor. Na presença de ácidos graxos livres (AGL), as pUCPs facilitam a reentrada de prótons do espaço intermembranar para a matriz, desviando-os da ATP Sintase, inibindo assim a fosforilação oxidativa. A função dessas enzimas ainda não está completamente elucidada, mas a literatura sugere a sua participação em processos de amadurecimento de frutos, adaptação a situações de estresses bióticos e abióticos e proteção da célula evitando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Sua participação na termogênese adaptativa é questionável. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a atividade enzimática da pUCP de mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp através de ensaios polarográficos, identificar o(s) gene(s) das pUCPs, estudando a sua expressão em diferentes situações de estresses abióticos. A atividade da pUCP foi avaliada em presença de ácidos graxos (palmítico, linoléico, mirístico e láurico) e BSA tendo succinato e malato como substratos e distintos pHs (6,5, 7,2 e 7,8). As maiores atividades foram obtidas com ácido linoleico na presença de succinato em pHs mais alcalinos (7,2 e 7,8). Primers degenerados a partir de dez diferentes pUCPs, denominados pump1 e pump2, foram desenhados para a amplificação dos fragmentos gênicos por RT-PCR e PCR. Isolou-se o RNA total de folhas de plântulas de *V. unguiculata* submetidas a diferentes condições de estresses (NaCl 100mM, H₂O₂ 1mM e PEG 200,67g/L) que foram amplificadas por RT-PCR, purificadas e clonadas no plasmídeo pCR4-TOPO. Sete fragmentos gênicos de aproximadamente 760 pb foram seqüenciados, apresentando 100% de identidade entre si. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos desse fragmento de cDNA com a soja revelou 94% de homologia com *GmUCP1a* e 90% de homologia com *GmUCP1b*. Os resultados sugerem que o gene do feijão identificado em *V. unguiculata* (*VuUCP1a*) é ortólogo ao gene *GmUCP1a* de soja (*Glycine max*). A expressão de *VuUCP1a* em feijão em condições de estresses abióticos (salino, oxidativo e osmótico) através de análise por

RT-PCR revelou um perfil diferencial, sugerindo indução de expressão de *VuUCP1a* apenas em resposta ao estresse salino. Isolou-se o DNA genômico de *V. unguiculata* e dois fragmentos gênicos (1700 e 1900pb) foram amplificados por PCR. A amplificação de dois fragmentos distintos a partir do DNA genômico sugere a existência de pelo menos dois genes codificando pUCPs em feijão, sendo assim, a pUCP é codificada por uma família multigênica.

ABSTRACT

The uncoupling proteins of plants (pUCPs) are integral proteins of membrane, located in the mitochondrial inner membrane, belong the Mitochondrial Anion Carrier Family (MACF). They are responsible for the dissipation as heat of the electrochemical gradient of protons, generated during respiration. In the presence of free fatty acid acids (FFA), the UCPs facilitate the re-entry of protons from intermembrane space for the matrix and these protons are deviated from the influence of the ATP sintase what leads to the inhibition the oxidative phosphorilation. The function of these enzymes completely is still not elucidated, but literature suggests its participation in processes of fruit maturation, in the adaptation to stress conditions and in cell protection by avoiding the production of reactive species of oxygen (EROS). The involvement of this enzyme in adaptive thermogenesis is questionable. The objective of the present work was to characterize the enzymatic activity of pUCP of mitochondria from hypocotyls of *Vigna unguiculata* (L.) Walp through polarographic assays and to identify the(s) gene(s) of pUCPs, through its expression in different conditions of abiotic stress. The activity of pUCP was evaluated in the presence of fatty acids (palmitic, linoleic, myristic and lauric) and BSA, having succinate and malate as oxidizable substrates at different pHs (6,5, 7,2 and 7,8). The highest activities were obtained in the presence of linoleic acid, succinate as substrate and with more alkaline pHs (7,2 and 7,8). Degenerate primers, obtained from ten different pUCPs, called pump1 and pump2, has been designed for amplification of the gene fragments through RT-PCR and PCR. The total RNA was isolated from plants leaves of *V. unguiculata* submitted to different stress conditions (100 mM NaCl, 1 mM H₂O₂ and 200,67 g/L PEG) and cDNAs fragments amplified by RT-PCR had been purified and cloned in the plasmid PCR4-TOPO. Seven cDNA fragments of approximately 760 pb had been sequenced and presented 100% of identity among themselves. The comparison of the deduced amino acid sequence of this cDNA fragment with those of soybean disclosed 94% of identity with the gene *GmUCP1a* and 90% of identity *GmUCP1b* soybean gene. These results suggest that the pUCP gene identified in *V. unguiculata* (*VuUCP1a*) is ortologous to the *GmUCP1a* gene from soybean (*Glycine max*). The expression of genes of pUCP in beans, under abiotic stress

conditions (salinity, oxidative and osmotic conditions) analyzed through RT-PCR disclosed a differential profile what suggests induction of expression of *VuUCP1a* only in response to salt stress. The genomic DNA of *V. unguiculata* was isolated and two gene fragments (1700 and 1900 pb) had been amplified by PCR. The amplification of two fragments from the genomic DNA suggests the existence of at least two pUCPs genes in beans what leads to the conclusion of a pUCP multigenic family.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela conclusão deste trabalho e por tudo que fez por mim, como permitir o convívio com pessoas tão especiais durante a realização desta obra.

Agradeço, infinitamente, á profa. Dirce Fernandes de Melo, por sua maneira ímpar de orientação, com dedicação e empenho, com sabedoria relevante durante a vida acadêmica e preparação para o mercado de trabalho.

Ao Dr. José Hélio Costa, pela sua fundamental orientação nos seus conhecimentos de Biologia molecular e sua co-orientação neste trabalho.

À profa. Maria da Guia Silva Lima, por fazer parte dos meus primeiros passos na vida acadêmica ainda na iniciação científica

À profa. Francisca Denize Lessa Nogueira, pelo seu entusiasmo e ensinamentos criteriosos referentes à metodologia científica.

À amiga e Alana Cecília Menezes Sobreira, que entre momentos difíceis, sempre mostrou apoio e incentivo para que pudesse dar continuidade a este trabalho.

À amiga Erika Freitas Mota, pela vivência científica e apoio nas disciplinas cursadas ao longo desta jornada.

À amiga Luciana Maia Nogueira de Oliveira, por sua experiência e opiniões sobre experimentos de Biologia molecular

Ao amigo João Henrique Frota Cavalcanti, por sua contribuição nos experimentos científicos e apoio na tomada de decisões nas horas necessárias.

Aos amigos ou colegas de laboratório que convivi durante esses dois anos de desenvolvimento de dissertação: Valeska, Déborah Rebolças, Camila Freitas, Mirele Vasconcelos, Neuza Félix, Flávio Saraiva, Yuri Maia.

A todos os demais professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que contribuíram através de seus conhecimentos para minha formação.

Ao meu irmão Manoel, pelo apoio de sempre por toda a minha vida acadêmica.

Ao meu pai, pelos seus conselhos e serenidade ensinados para contornar problemas cotidianos da vida.

A minha família, por acreditarem em meu potencial para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos Luciano Menezes Pereira, Francisco Feitosa Júnior, Pedro Manoel, Luciana Pereira, Edson Filho Holanda, Clóvis Filho, dentre outros, pelo incentivo na formação acadêmica.

INTRODUÇÃO

As proteínas desacopladoras (UCPs) são proteínas integrais de membrana, localizadas na membrana mitocondrial interna, responsáveis pela dissipação do gradiente eletroquímica de prótons, na forma de calor. Na presença de ácidos graxos livres (AGL), as UCPs facilitam a reentrada de prótons do espaço intermembranar para a matriz, desviando-os do canal de H^+ da ATP Sintase (Fo), inibindo assim a fosforilação oxidativa (Vercesi *et al.*, 2006).

As UCPs pertencem a uma subfamília que faz parte de uma superfamília gênica carreadora de ânions, denominada Família de Carreadores de Ânions Mitocondriais (FCAM) (Borecký *et al.*, 2001a; Smith *et al.*, 2004; Sluse *et al.*, 2006).

O modelo estrutural das proteínas carreadoras de ânions foi descrito em eucariotos e propõe a existência de três domínios de 100 aminoácidos, cada um com dois segmentos α -hélices transmembrana hidrofóbicos, separados por um giro hidrofílico extra-membrana no lado da matriz. O transporte de metabólitos e de outros solutos, através da membrana mitocondrial interna, ocorre às expensas de tais carreadores (Figura 1) (Laloi, 1999; Millar & Heazlewood, 2003).

Além disso, uma seqüência de consenso chamada de SPTE (Sinal Protéico de Transferência de Energia) “P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY]-[QGAIVM]” é encontrada em todos os carreadores mitocondriais, contendo uma, duas ou três cópias deste sinal. As semelhanças entre esses transportadores indicam que todos eles são membros da superfamília carreadora mitocondrial (Laloi, 1999).

Os carreadores mitocondriais, em sua maioria, transportam ânions (ácidos graxos, ADP, ATP, fosfato, oxoglutarato, malato, aspartato, glutamato, citrato ou piruvato) e alguns transportam substratos em forma zwitteriônica (ornitina, carnitina ou glutamina) (Borecký *et al.*, 2001a). Tais transportadores foram distribuídos numa árvore filogenética, com destaque para as UCPs (Figura 2) (Ledesma *et al.*, 2002). Segundo Millar & Heazlewood (2003), esses transportadores recebem nomes específicos, de acordo com o metabólito transportado, dentre eles o transportador de nucleotídeo adenina (TNA), malato-oxoglutarato (TMO) e o fosfato inorgânico (TF).

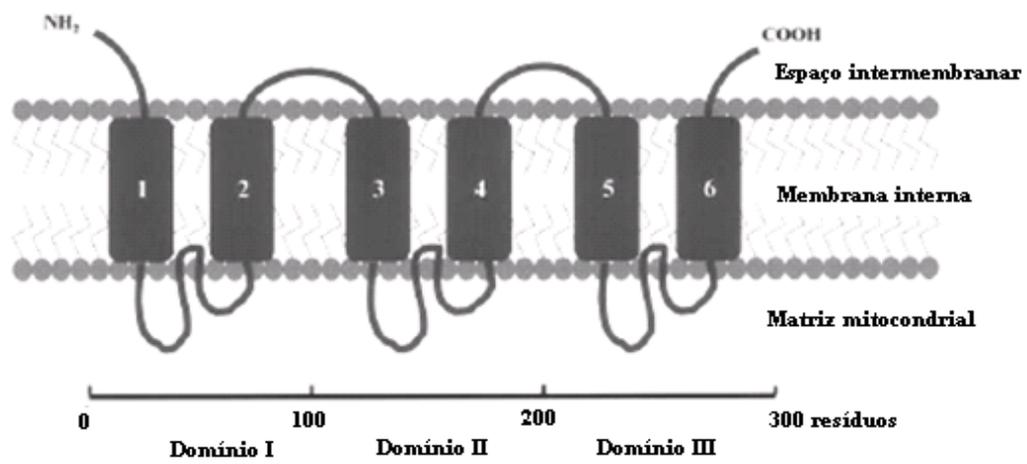


Figura 1- Modelo estrutural dos domínios das proteínas carreadoras mitocondriais (Laloi, 1999).

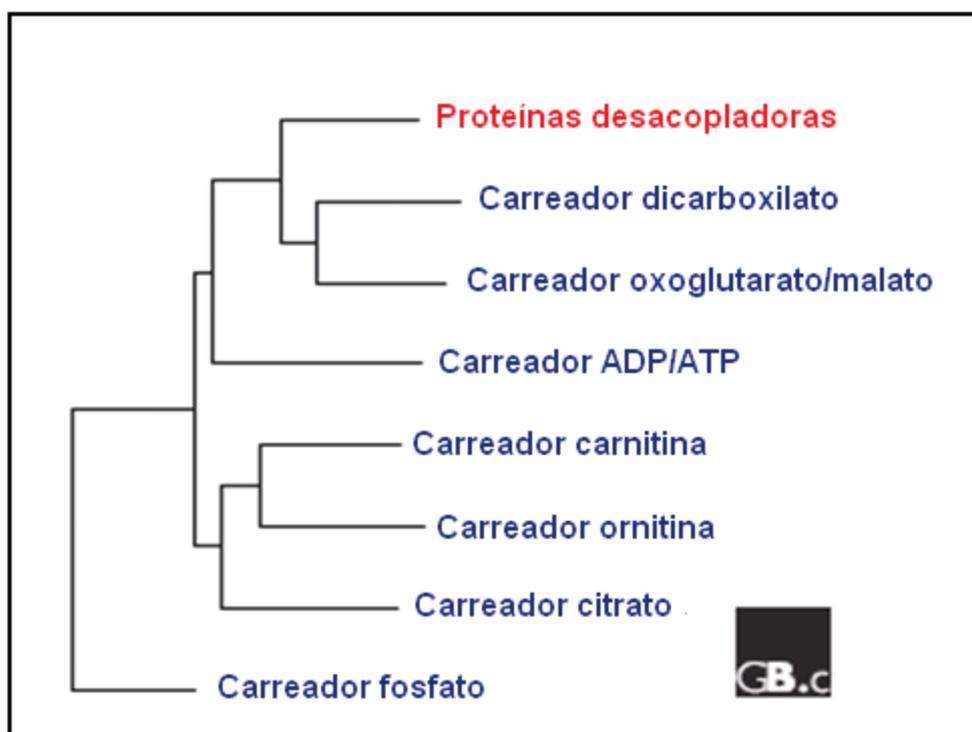


Figura 2- Árvore filogenética de membros representativos da superfamília de carreadores de ânions mitocondriais, a qual inclui as UCPs (Ledesma *et al.*, 2002).

A despeito da caracterização bioquímica de tais carreadores em planta, pouco se sabe sobre a sua caracterização molecular (Millar & Heazlewood, 2003).

O estudo do genoma de *Arabidopsis* revelou seqüências de 45 proteínas carreadoras mitocondriais com base na homologia com leveduras e animais, sem identificação dos produtos gênicos expressos direcionados para a mitocôndria (Millar & Heazlewood, 2003).

A UCP, um transportador recentemente descoberto em plantas, pode estar envolvida na regulação da fosforilação oxidativa por diminuição do potencial eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. A figura 3 mostra a cadeia de transporte de elétrons ilustrando a UCP e carreadores de fosfato (Pi) e nucleotídeos adenina (TNA) (Laloi, 1999).

Apesar do genoma de *Arabidopsis* ter revelado a presença de novos membros FCAM em planta, a função e a especificidade de cada um permanece sem ser determinada. Assim, fica claro que o estudo voltado aos transportadores mitocondriais de planta está apenas começando e um maior número de análises precisa ser realizado no sentido de alcançar melhor entendimento sobre as interações metabólicas entre organelas, as quais são de suma importância para o seu metabolismo.

1. Breve histórico sobre a descoberta das UCPs

As UCPs foram primeiramente identificadas em mitocôndrias de tecido adiposo marrom de mamíferos em 1976, sendo denominada de termogenina, em decorrência de sua função, posteriormente, nomeada UCP1 (Ricquier & Kader, 1976; Smith *et al.*, 2004). Por dissipar a energia do gradiente de H^+ como calor, essa enzima desempenha papel fundamental na manutenção da temperatura corporal em recém-nascidos, aclimatados ao frio e em mamíferos hibernantes (Borecký & Vercesi, 2005).

Bouillaud *et al.*, (1985), clonaram o cDNA da UCP1, 9 anos depois de sua descoberta. Em adição à UCP1, quatro outras subfamílias de UCPs já foram descritas em mamíferos: UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5 ou BMCP (Proteína mitocondrial cerebral) (Hourton-Cabassa *et al.*, 2004; Sluse *et al.*, 2006).

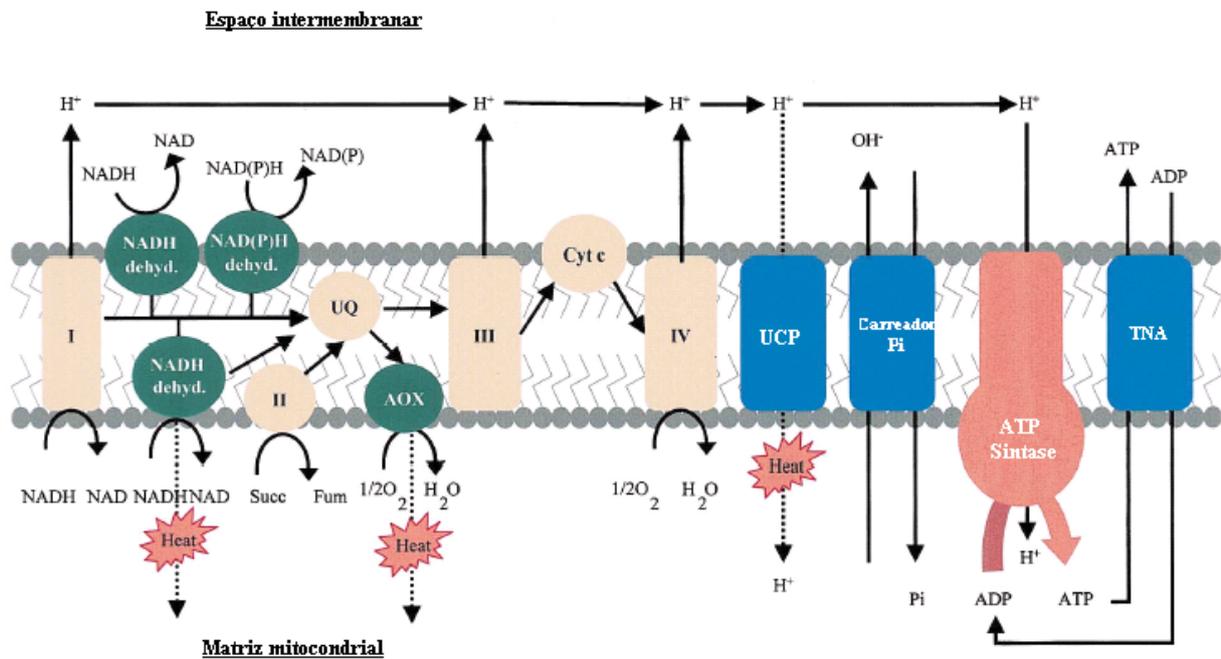


Figura 3 – Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial de plantas. As proteínas envolvidas na transferência de elétrons comuns a animais e plantas estão representadas em laranja, proteínas específicas de plantas em verde e carreadores mitocondriais envolvidos na fosforilação oxidativa em azul. I representa o complexo da NADH desidrogenase ou complexo I; II representa o complexo succinato ou complexo II; III representa complexo da citocromo c redutase ou complexo III; IV representa o complexo da citocromo c oxidase ou complexo IV; dehyd, desidrogenase; Succ, succinato; Fum, fumarato; AOX, Oxidase alternativa; Cyt c, citocromo c (Laloi, 1999).

Somente em 1995, quase duas décadas da descoberta da UCP1, Vercesi *et al.*, (1995) detectaram uma proteína desacopladora diferente em mitocôndrias de tubérculos de batata e a nomearam de PUMP - “Plant Uncoupling Mitochondrial Protein”, significando Proteínas Mitocondriais Desacopladoras de Plantas.

No reino *Plantae*, o primeiro cDNA homólogo para *UCPI* foi isolado de uma biblioteca de flores de batata (*Solanum tuberosum*) em 1997, sendo denominado *StUCP*. Seu perfil de expressão indicou a presença de RNAm em caules, raízes, flores e frutos, bem como em folhas estressadas pelo frio (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).

Além de plantas, UCPs homólogas já foram identificadas em outros organismos, incluindo animais (Bouillaud *et al.*, 2001; Borecký *et al.*, 2001a), protistas e fungos (Jarmuszkiwicz *et al.*, 1999 e 2002; Cavalheiro *et al.*, 2004).

A descoberta da UCP em planta e outros organismos põe em evidência que a mesma não é específica para tecidos de mamíferos, como se acreditava inicialmente. Recentemente, a nomenclatura PUMP para proteína desacopladora de planta tem sido 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).

2. Regulação das UCPs

As proteínas desacopladoras regulam de maneira eficiente a fosforilação oxidativa. A pUCP, na presença de ácidos graxos livres (AGL), permite o retorno de prótons do espaço intermembranar de volta para a matriz, desviando sua passagem da ATP sintase, dissipando o gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) como calor. Isto resulta num desacoplamento entre respiração e síntese de ATP, processo que deu nome a esta classe de proteínas (Figura 4) (Borecký & Vercesi, 2005).

As pUCPs, assim como as UCPs dos tipos 1, 2 e 3 requerem ácidos graxos como cofatores para a sua atividade. Assim, observa-se que a maior característica

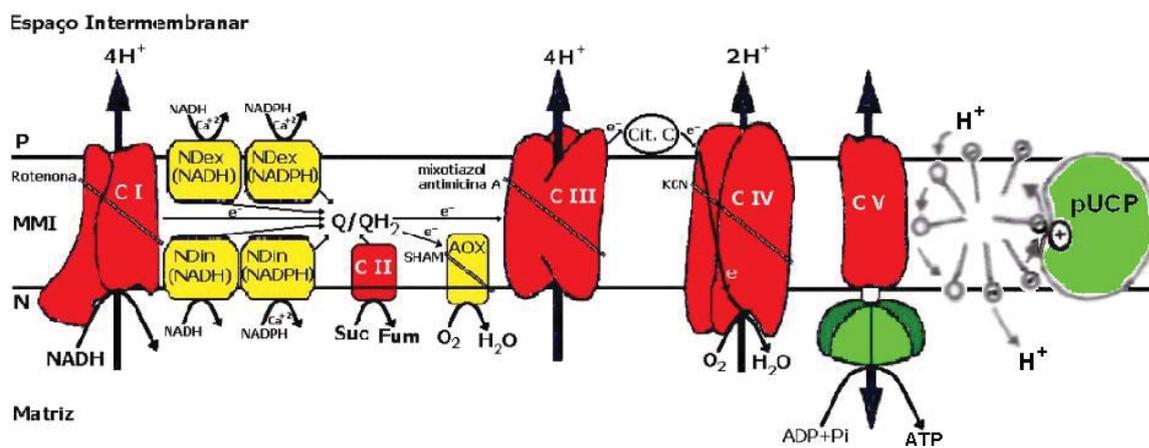


Figura 4- Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial de plantas com destaque para a pUCP. As enzimas específicas de plantas estão representadas em amarelo. As bombas de prótons dos complexos I, III e IV bem como o complexo II e a ATP sintase (complexo V) estão representadas em vermelho. A pUCP (proteína desacopladora de plantas) está representada em verde. Os inibidores dos complexos I, III e IV estão indicados.

distintiva da pUCP, bem como de todas as UCPs, é a sua ativação por ácidos graxos livres (Hourton-Cabassa *et al.*, 2004).

Por outro lado, as pUCP/UCPs são inibidas por nucleotídeos purínicos, tais como ATP e GTP (Brand *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2006; Sluse *et al.*, 2006). Além desses inibidores, essa enzima é inibida por BSA, que complexa ácidos graxos e, portanto, diminui a disponibilidade dos mesmos como agentes ativadores (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001).

O efeito estimulador de diferentes ácidos graxos foi avaliada na UCP1 de mamíferos (Ježek & Garlid, 1990) e AtUCP1 (Borecký *et al.*, 2001b), revelando maior ativação pelos ácidos graxos insaturados (Borecký & Vercesi, 2005).

O ácido linoléico (AL), um ácido graxo insaturado naturalmente abundante em planta, estimula fortemente o consumo de oxigênio no estado 4 e induz simultaneamente a queda do potencial de membrana em mitocôndrias de tubérculo de batata (Vercesi *et al.*, 2001) e fruto verde de tomate (Sluse *et al.*, 1998; Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998 e 2001).

Uma seleção de atividade cinética do fluxo de H⁺ da pUCP em *Arabidopsis*, em sistema de proteolipossomos, com diferentes ácidos graxos livres, revelou que a proteína AtUCP1 recombinante é estimulada por diferentes ácidos graxos em extensão similar, dentre eles laurílico, mirístico, palmítico, oléico, linoléico e linolênico. A atividade supracitada foi maior para os ácidos mirístico e linoléico e menor para os ácidos palmítico e linolênico (Vercesi *et al.*, 2006).

A pUCP é inibida de maneira dependente do pH (Borecký & Vercesi, 2005; Vercesi *et al.*, 2006). Por exemplo, a AtUCP1 recombinante reconstituída em proteolipossomos é inibida por ATP de maneira dependente do pH (Borecký *et al.*, 2001b).

A inibição da pUCP por nucleotídeos purínicos é, além disso, regulada pela composição do meio. A presença de MgCl₂ 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 Mg²⁺ formam um complexo com o ATP, impedindo sua inibição na atividade da pUCP. Assim, a concentração de Mg²⁺ citosólico livre poderá regular a eficiência da inibição da pUCP por nucleotídeos purina.

Alguns autores citam também a ativação da pUCP/UCPs por espécies reativas de oxigênio (EROS), tendo como exemplo o radical superóxido (Echtay *et al.*, 2002a; Considine *et al.*, 2003) e também pela ubiquinona no seu estado redox (Echtay *et al.*, 2001; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2004).

Duas possíveis hipóteses de transporte de prótons podem ser citadas: na primeira delas, o transporte de prótons é realizado por um mecanismo cíclico de ácidos graxos livres (Figura 5a) e, na outra, os prótons são transportados diretamente pela UCP1, que funciona como um canal (Figura 5b), sendo a primeira hipótese atualmente a mais aceita.

O modelo conhecido como protonofórico foi introduzido por Garlid *et al.*, (1996) e considera a hipótese elaborada por Skulachev (1991), na qual diferentes proteínas integrais de membranas, nomeadas de carreadores de íons, podem mediar o uniporte de ácidos graxos aniônicos.

O modelo tamponante é um mecanismo cíclico, que tem início quando os prótons se ligam a ânions de ácidos graxos na face externa da membrana interna, deixando-os com carga neutra. Por simples mecanismo de flip-flop, os ácidos graxos atravessam a bicamada lipídica, liberando os prótons na matriz, ficando novamente com carga negativa. O ciclo se fecha quando os ácidos graxos retornam para a face externa da membrana interna, mediada pela UCP1 (Ježek *et al.*, 1998; Ježek, 1999; Vercesi *et al.*, 2006).

A UCP tem o sítio ativo com carga líquida positiva, essencial para a neutralização da carga líquida negativa do ácido graxo. Os ácidos graxos ligam-se na UCP em seus grupos carboxilas terminais, que servem como doadores/aceptores de H⁺ por existirem em tais grupos carboxilas os aminoácidos asparagina ou glutamina, responsáveis pela carga líquida positiva do sítio ativo da enzima. Para a UCP1, resíduos Histina 145 e 147 são propostos como liberadores finais de prótons dentro da matriz. (Klingenberg, 1990; Winkler & Klingenberg, 1994; Vercesi *et al.*, 2006).

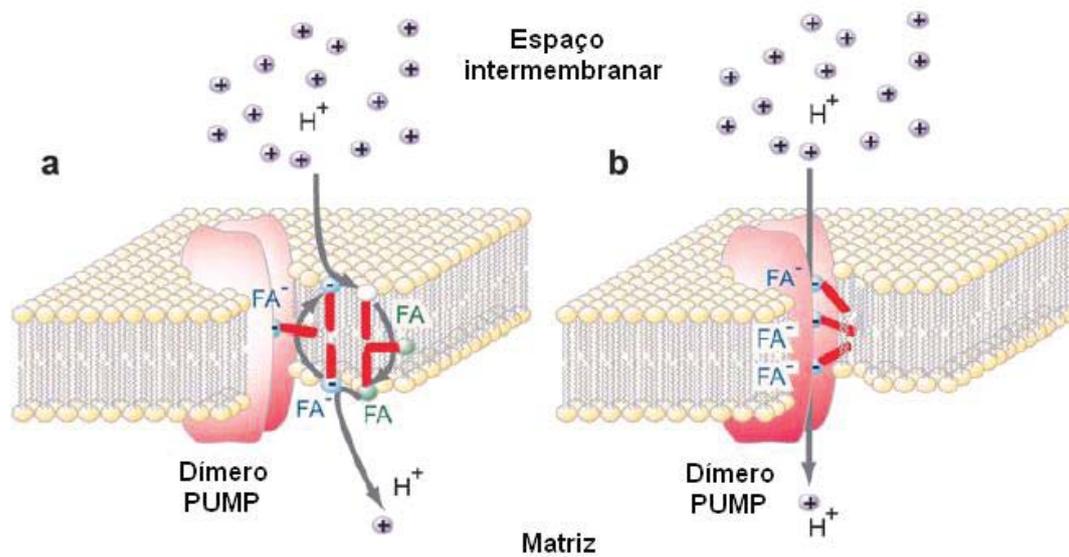


Figura 5 – Modelos hipotéticos propostos para os mecanismos de passagem de prótons H^+ do espaço intermembrana para a matriz: (a) modelo protonofórico de ácidos graxos (FA) e (b) modelo de uniporte de ácidos graxos. O ácido graxo está representado como uma molécula neutra (protonado), com a cabeça hidrofílica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

3. Relação entre a pUCP e a AOX

As mitocôndrias de plantas possuem a presença simultânea de dois sistemas dissipadores de energia (pUCP e AOX) conduzindo ao mesmo efeito final, resultando na diminuição da síntese de ATP (Sluse & Jarmuszkiewicz, 2000; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001; Calegario *et al.*, 2003; Malgorzata & Jarmuszkiewicz, 2005; Borecký & Vercesi, 2005).

A Oxidase Alternativa (AOX), descoberta em tecidos de plantas termogênicas, representa uma ramificação na cadeia respiratória ao nível da ubiquinona, catalisando a oxidação do ubiquinol pelo oxigênio molecular sem a formação de um gradiente eletroquímico de prótons, dissipando a energia redox como calor (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001; Calegario *et al.*, 2003).

Aparentemente, a única função fisiológica óbvia atribuída para a AOX e pUCP em tecidos termogênicos especializados em animais e plantas era a geração de calor correlacionada com o aumento da temperatura (termogênese): AOX gerando calor em espádices da família *Araceae* durante processos reprodutivos e pUCP gerando calor em tecido adiposo marrom de recém-nascidos, mamíferos hibernantes e aclimatados ao frio. Portanto, como já citado, a AOX e pUCP, curiosamente, trabalham diminuindo a síntese de ATP, dissipando energia como calor (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001).

A figura 6 nos mostra as rotas de energia em mitocôndrias de plantas a partir do succinato. Pode-se observar que a via alternativa, formada pelo Complexo II-AOX é totalmente dissipadora de energia livre redox e pode ser inibida por ácidos hidroxâmicos (Ácido Benzohidroxâmico - BHAM), conhecido inibidor da AOX. A via citocrômica, composta pelos Complexos II-III-IV, na presença de BHAM, conservam a energia redox num gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$), que pode ser otimizada e convertida em ATP (potencial fosfato), levando-se em consideração que a via da pUCP esteja inativa e a fenda de prótons (H^+) seja negligenciável. Na presença de AGL, o $\Delta\mu\text{H}^+$ é dissipado através da atividade da pUCP, considerando-se que a ATP sintase (via citocrômica) e AOX estejam inibidas por oligomicina e BHAM, respectivamente (Sluse & Jarmuszkiewicz, 2000; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001).

4. Caracterização bioquímica

As pUCPs são proteínas integrais de membrana com massa molecular aparente em torno de 30 a 33 KDa (Hourton-Cabassa *et al.*, 2004). A pUCP consiste de 295-320 aminoácidos organizados numa estrutura contendo três domínios homólogos. Assim como para os outros membros da FCAM, as pUCPs possuem esses domínios com cerca de 100 aminoácidos compreendendo duas α -hélices transmembranas ligadas por giros hidrofóbicos localizados no lado da matriz contendo o sinal protéico de transferência de energia (SPTE) P-x-[DE]—X-[LIVAT]-[RK]-X-[LRH]-[LIVMFY], característico de todos os carreadores de ânions mitocondriais (Figura 7). As UCPs possuem três cópias deste sinal, enquanto os outros membros FCAM possuem somente uma ou duas cópias deste sinal (Tabela 1) (Borecký *et al.*, 2006). Oito domínios preferenciais têm sido associados com alguns grupos completos ou específicos de pUCP/UCPs. Os motivos 1 e 2 são extensos (50 e 30 aminoácidos respectivamente) e ocorrem em todas as UCPs, formando uma seqüência dentro de cada domínio de polipeptídeo. As três seqüências correspondem em torno de 80% da pUCP (Figura 6). Isto nos leva a supor que essas seqüências foram conservadas durante a evolução para a manutenção da conformação das UCPs. Os motivos 5 e 6 são específicos para as pUCPs e estão localizados dentro de dois giros ou voltas externas, expostos no espaço intermembranar (Vercesi *et al.*, 2006).

Uma análise do perfil de cargas deduzida a partir da seqüência de aminoácidos de UCPs de batata, *Arabidopsis* e cana-de-açúcar estimou seus pontos isoelétricos num intervalo de pH entre 8.8 e 10.5. Em pH fisiológico (7-7.5), a carga calculada do polipeptídeo pUCP é cerca de +14 (Vercesi *et al.*, 2006). De acordo com Ježek *et al.* (2001), a unidade funcional das pUCPs é um homodímero, sendo necessários estudos adicionais para melhor caracterização estrutural dessas enzimas.

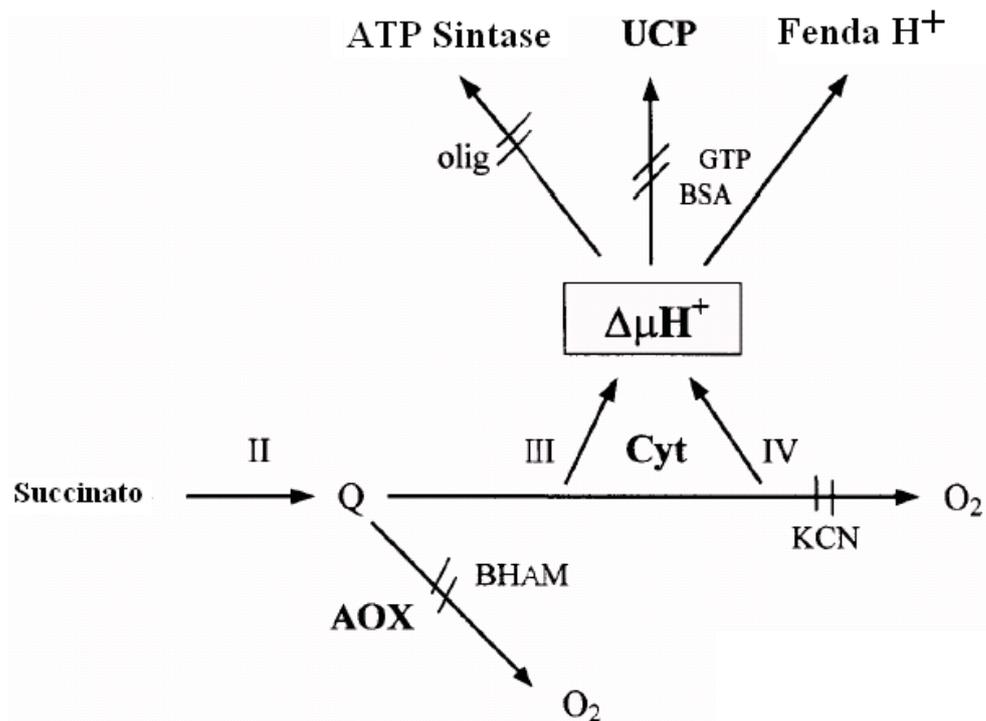


Figura 6 - Vias respiratórias em mitocôndrias de tomate. Complexo II, succinato desidrogenase; complexo III, citocromo bc1; complexo IV, citocromo c oxidase; AOX, oxidase alternativa; Cyt, via citocrômica; Q, ubiquinona; UCP, proteína desacopladora; $\Delta\mu\text{H}^+$, gradiente eletroquímico de prótons formado através da via citocrômica; ABHM, ácido benzohidroxâmico; KCN, cianeto de potássio; Olig, oligomicina; GTP, guanosina trifosfato; BSA, albumina sérica bovina (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001).

Nome da proteína	1o Sinal	2o Sinal	3o Sinal
UCP1 ^a	PLDTAKVRL-QLQ	PTEVVKVR[LM]-QAQ	PVDVVKTRF-[IV]NS
UCP2 ^a	PLDTAKVRL-QLQ	PTDVVKVRF-QAQ	PVDVVKTRY-MNS
UCP3 ^a	PLDTAKVRL-QLQ	PTDVVKVRF-QAQ	PVDVVKTRY-MNS
UCP4 ^a	PLDLTKTRL-QMQ	PTDLVKV●●-QMQ ^b	PADVKSRI-MNQ
BMCP1 ^a	PVDLTKTRL-QVQ	PTDLVKIRM-QAQ	PVDVVRTRM-MNQ
AtPUMP1-2	PLDTAKVRL-QIQ	PTDLVKVRL-Q[AS]E	PVDV[VM]KSRM-MGD
AtPUMP3	PIDLTKTRM-QLH	PADLVKVRMQAD	PADVVKTRM-MNG
AtPUMP4	PLDLIKVRM-QLQ	PADVAMVRM-QAD	PVDVIKTRV-MNM
AtPUMP5	PLDLIKVRM-QLQ	PADVAMVRM-QAD	PVDVIKTRV-MNM
AtPUMP6	PLDLIKVRM-QLH	PADVAMVRM-QAD	PIDVVKTRM-MN● ^b
SsPUMP1	PLDTAKVRL-QLQ	PTDLVKVRL-QAD	PVDVVKSRM-MGD
SsPUMP2	PLDTAKVRL-QLQ	PTDLVKVRL-QAE	PVDVVKSRM-MGD
SsPUMP3	PLDAVKTRL-QLH	PADLMKVRM-QAD	PADVIKTRM-MNQ
SsPUMP4	PLDLIKVRM-QLQ	PADVAMVRM-QAD	PVDVVKTRM-MNM
SsPUMP5	PLDLIKVRM-QLQ	PADVAMVRM-QAD	PVDVVKTRM-MNM
M2OM ^a	PIDMVKVKI-QLG	-	PFDYVKTQI-QKM
AtM2OM	PIDMIKVRI-QLG	-	PFDYVKTQI-QKM
SsM2OM	PIDMVKVRI-QLG	-	PFDYVKTQI-QKM

Tabela 1 – Variantes específicas dos sinais protéicos de transferência de energia (ETPS).

^a Variantes de sinais representativos para todas as espécies de plantas;

^b círculos preenchidos representam possíveis deleções de sinais;

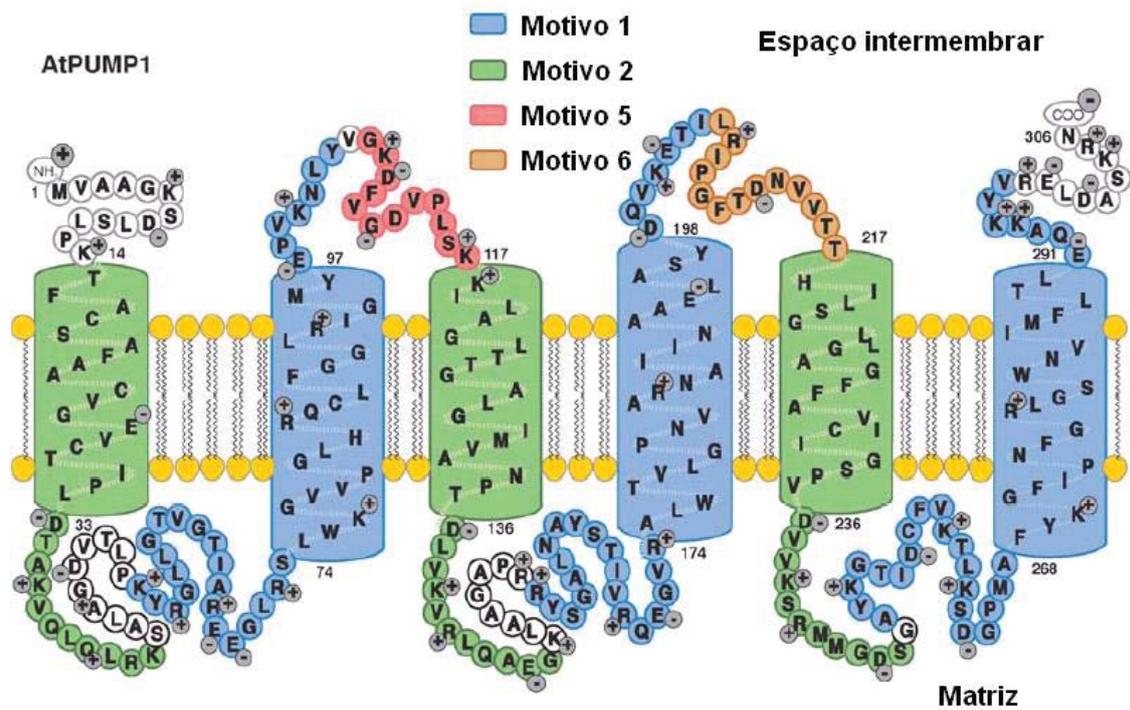


Figura 7 – Modelo estrutural da proteína AtPUMP1 mantendo regiões conservadas. Os motivos 1 e 2 são comuns a todos os membros dessa subfamília e envolvem o primeiro domínio transmembrana da proteína (região 2) ou o segundo domínio (região 1) de cada repetição na proteína. Os motivos 5 e 6 são específicos para pUCPs e ambas estão expostos no espaço intermembranar (Vercesi *et al.*, 2006).

5. 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 8). 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).

Recentemente, Sokolova & Sokolov (2005) elaboraram uma hipótese para a existência da UCP6 em invertebrados, podendo esta representar uma ancestral das UCPs dos tipos 1, 2 e 3 de vertebrados. Infelizmente, nenhuma seqüência pUCP foi incluída no presente estudo.

A estrutura genômica e a localização das pUCPs têm sido 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. Seus parálogos presumidos (*AtUCP3*, *AtUCP4*, *AtUCP5* e *AtUCP6*), recentemente 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 íntrons, estando localizados nos cromossomos 4 e 2, respectivamente (Figura 9).

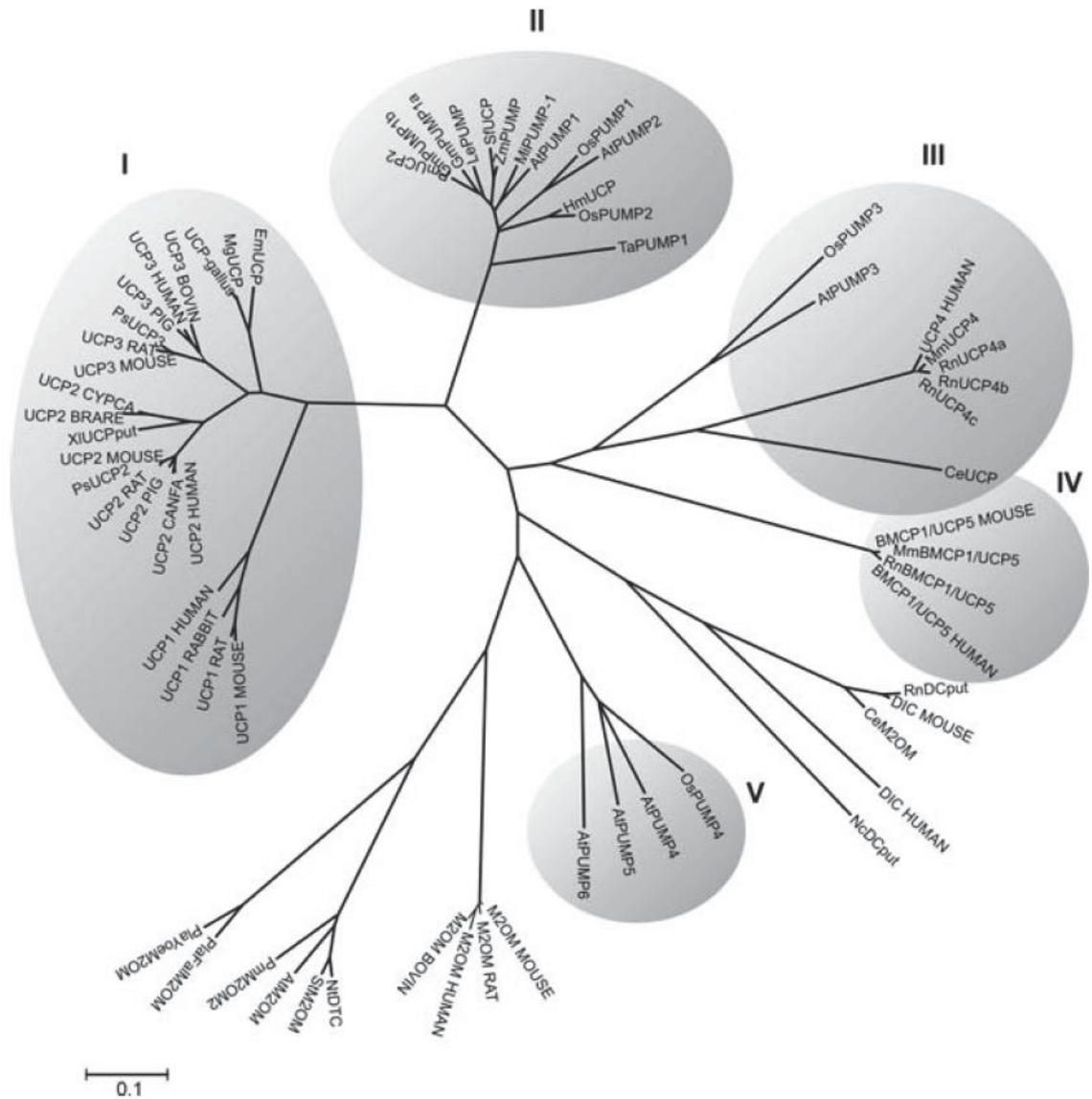


Figura 8 – Árvore filogenética não enraizada de 5 subfamílias de UCPs representadas por números de I a V e outras seqüências de proteínas carreadoras mitocondriais de diferentes origens (Nogueira *et al.*, 2005).

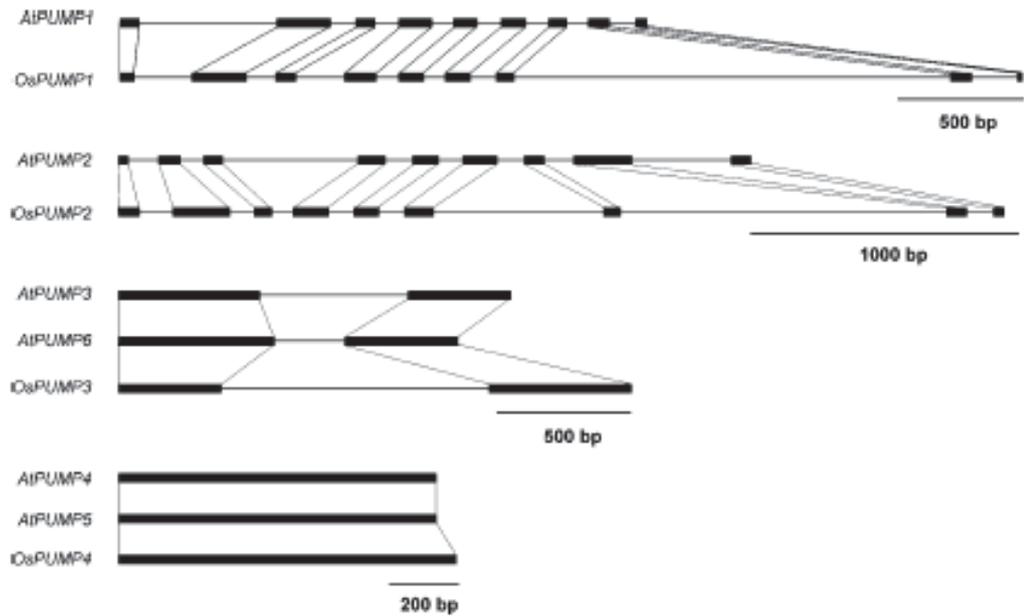


Figura 9 – Estrutura gênica das pUCPs de arroz e *Arabidopsis*. Os retângulos preenchidos representam os éxons e as linhas entre esses retângulos representam os íntrons. As barras indicam bp (pares de bases) do DNA cromossômico (Nogueira *et al.*, 2005).

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 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.

6. Expressão dos genes pUCPs em tecidos específicos

Nas últimas décadas, o isolamento de cDNA e análises genômicas têm identificado diferentes genes, codificando as proteínas desacopladoras com significativo grau de homologia com a UCP1, sugerindo novos papéis. As proteínas mitocondriais podem ser codificadas tanto pelo DNA mitocondrial, quanto pelo DNA nuclear. O genoma mitocondrial codifica somente uma fração da informação genética requerida para a sua biogênese e função (McIntosh, 1994). A regulação do número de cópias e transmissão do genoma mitocondrial está, indubitavelmente, sob controle nuclear, como é o caso das proteínas desacopladoras.

Já foram identificadas quatro UCPs homólogas em mamíferos, sendo elas UCP2 (específica de tecido adiposo marrom especializado na termogênese adaptativa), UCP3 (expressa em diferentes tecidos, principalmente músculo esquelético), UCP4 e UCP5 ou BMUCP1 (expressos em tecido cerebral) (Ricquier & Bouillaud, 2000; Yu *et al.*, 2000; Hourton-cabassa *et al.*, 2004; Sluse *et al.*, 2006; Vercesi *et al.*, 2006).

As proteínas desacopladoras são supostamente encontradas em todos os organismos eucarióticos (Borecký *et al.*, 2001b). A única exceção conhecida é para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que não apresenta nenhuma forma de UCP (ElMoualij *et al.*, 1997; Borecký & Vercesi, 2005).

A existência das UCPs em protozoários, fungos, plantas, insetos e peixes sugerem que as proteínas desacopladoras emergiram mais cedo, durante a evolução, como um membro distinto da FCAM, provavelmente antes da divergência dos reinos *Plantae*, *Animalia* e *Fungi* (Hourton-Cabassa *et al.*, 2004).

As pUCPs já foram identificadas em diferentes tipos de plantas, incluindo mono e dicotiledôneas, bem como em diferentes situações de estresses (Nogueira *et al.*, 2005).

Em batata, Lalo *et al.* (1997) observaram que o perfil de expressão da pUCP indicou a presença de RNAs correspondentes em caules, raízes, flores e frutos, como também em folhas estressadas pelo frio. Com abordagem similar, Nantes *et al.* (1999) também mencionaram uma fraca indução do gene *StUCP* observada em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), expostos à baixas temperaturas (4° C por poucos dias).

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 ubiquamente expressa em floretos e apêndices termogênicos machos, não-termogênicos fêmea, bem como em órgãos em formato de espádice (Nogueira *et al.*, 2005).

Dois genes codificando a pUCP em *Arabidopsis* já foram caracterizados: *AtUCP1* (Maia *et al.*, 1998) e *AtUCP2* (Watanabe *et al.*, 1999). Num recente levantamento realizado por Borecký *et al.* (2006), uma provável família multigênica de proteínas desacopladoras em plantas tem sido descrita e caracterizada para a dicotiledônea *Arabidopsis* (*AtUCP4*, *AtUCP5* e *AtUCP6*) e a monocotiledônea cana-de-açúcar (*SsUCP1*, *OsUCP2*, *OsUCP3*, *OsUCP4* e *OsUCP5*). 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 (Nogueira *et al.*, 2005).

Os padrões de expressão distintos das famílias gênicas entre mono e dicotiledôneas durante estresse pelo frio sugerem que, de maneira similar às UCPs de mamíferos, as pUCPs são largamente expressas em diferentes células ou na regulação transcricional de tecidos e órgãos (Borecký & Vercesi, 2005; Borecký *et al.*, 2006).

A expressão da pUCP também pode ser modulada em relação a outros estímulos ambientais. Em *Arabidopsis* uma regulação dependente de estresses foi observada (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). Além disso, um estudo de expressão por estresse salino severo foi observado em *AtPUMP4* e *AtPUMP5*, apresentando-se negativamente regulado (Seki *et al.*, 2002b).

Junto à *A. thaliana*, cDNAs de UCPs homólogas têm sido identificadas em arroz, trigo, milho, manga, tomate e representantes termogênicas da família *Aracea* (Hourton-Cabassa *et al.*, 2004).

Em arroz os cDNAs *OsUCP1* e *OsUCP2* correspondem a 2 genes nucleares com uma exibição anormal de splicing de RNAm, ocorrendo assim, um processamento defeituoso do preRNAm, restando, claramente, a ausência de qualquer pUCP funcional (Watanabe & Hirai, 2002).

Em trigo, os cDNAs *WhUCP1a* e *WhUCP1b* correspondem a RNAm provavelmente codificados por uma pequena família multigênica, não sendo induzidos por tratamento pelo frio (Murayama & Handa, 2000).

Por outro lado, um simples gene pUCP foi encontrado em milho (*ZmUCP*). A expressão desse gene foi ubíqua e insensível ao frio (Brandalise *et al.*, 2003a), sendo induzido por estresse oxidativo (Brandalise *et al.*, 2003b).

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 verdes quando comparada com tomates maduros (Costa *et al.*, 1999).

Em plantas termogênica da família *Aracea*, como por exemplo *Symplocarpus foetidus*, foram identificados 2 cDNAs (*SfUCPa* e *SfUCPb*) isolados de uma biblioteca de cDNAs de espádice (Ito, 1999). O cDNA *SfUCPa* e *SfUCPb* foram especificamente expressos em espádice, em resposta a exposição ao frio.

7. Função das pUCPs

As pUCPs apresentam algumas funções durante situações de suave desacoplamento como consequência de uma regulação transcricional ou bioquímica: aceleração das taxas metabólicas, acelerando a respiração; participação nos processos de amadurecimento de frutos, participação em suave termogênese, prevenção da formação das espécies reativas de oxigênio (EROS) como consequência do suave desacoplamento (Ježek *et al.*, 2001), resposta a estresses ambientais (Nogueira *et al.*, 2005; Vercesi *et al.*, 2006) e contribuição na eficiência fotossintética da planta (Sweetlove *et al.*, 2006).

7.1 - Participação das pUCPs durante amadurecimento de frutos

Segundo Ježek *et al.* (2001), existem evidências que apóiam a idéia de que a explosão respiratória que ocorre em alguns frutos durante o processo de amadurecimento estaria ligada à função das pUCPs. A expressão dos genes pUCPs é fortemente aumentada nos estágios de senescência durante o amadurecimento de fruto, sugerindo um estágio específico de regulação da pUCP.

Em tomate, uma pUCP foi isolada na sua forma ativa e detectada imunologicamente com anticorpos anti-batata em todos os seus estágios de amadurecimento. Além de tomate, uma banda de 32 KDa de pUCP ou seu dímero foi detectada imunologicamente em frações mitocondriais de vários frutos climatéricos ou em frutos os quais se observa um aumento das taxas respiratórias: maçã, pêra, pêssego, banana, melão, mamão e manga. A composição do abacaxi, do pseudofruto morango e da laranja, um fruto não-climatérico, contém antígenos pUCP em suas frações mitocondriais, assim como os demais. Todos esses resultados dão suporte à hipótese da participação da pUCP no pico da respiração climatérica (Ježek *et al.*, 2001).

7.2. Controle da produção das espécies reativas de oxigênio (EROS)

A maior parte da energia aeróbica celular é gerada pela via respiratória mitocondrial, onde ocorre a redução do oxigênio molecular por quatro elétrons. As espécies reativas de oxigênio (EROS) se originam de uma redução parcial do oxigênio molecular ao nível dos complexos respiratórios ou na produção do ubiquinol, formando elétrons desemparelhados livres, tais como superóxido primário, ($O_2^{\bullet -}$) e seu ácido conjugado radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), os radicais hidroxila (OH^{\bullet}), carbonato (CO_3^{\bullet}), peroxil (RO_2^{\bullet}) e alcoxil (RO^{\bullet}) (Ježek & Hlavatá, 2005).

As espécies reativas de oxigênio podem causar danos, tendo como primeiro alvo, proteínas mitocondriais e DNA, conseqüente prejudicando o metabolismo celular. Desta forma, condições que aumentam ou diminuem o nível de redução de carreadores de elétrons mitocondriais levam a um aumento ou diminuição na produção de EROS, respectivamente (Vercesi *et al.*, 2006).

Os sistemas dissipadores de energia, como AOX e UCP são relacionados com a diminuição da produção de EROS *in vitro* e *in vivo*, podendo ser considerados como sistemas antioxidantes endógenos adicionais, prevenindo danos oxidativos na célula, a eficiência na célula ao nível de produção de energia, mas às expensas da fosforilação oxidativa (Sluse & Jarmuszkiewicz, 2000).

Skulachev (1991) demonstrou que a produção de EROS pela mitocôndria é baixa e constante até certo nível de potencial transmembrana ($\Delta\psi$); todavia, sobre este limiar a produção de EROS aumenta quase linearmente com o $\Delta\psi$. O limiar está na transição do estágio 3 (respiração fosforilante) para o estágio 4 (respiração basal não-fosforilante). Isto induz a postular que a pUCP desempenha um fino ajuste do $\Delta\psi$ para um nível ótimo da fosforilação oxidativa e produção mínima de EROS.

As UCPs podem também ser ativadas por superóxido gerado extra mitocondrialmente (Echtay *et al.*, 2002a; 2002b) e superóxido gerado na matriz mitocondrial sob condições não fisiológicas (Echtay *et al.*, 2002b) ou fisiológicas (Talbot *et al.*, 2004). Assim, o superóxido produzido pela cadeia de transporte de elétrons (CTE) pode causar suave desacoplamento da mitocôndria por ativação da condutância de prótons das UCPs (Brand *et al.*, 2004). Este suave desacoplamento

diminui a taxa de respiração, gerando menos superóxido e diminuindo a tensão de O₂ tecidual e concentração constante dos componentes respiratórios no estado reduzido (Vercesi *et al.* 2006). Estas condições diminuem as quantidades dos componentes dos complexos respiratórios I e III na forma de doador de um elétron (Crofts, 2004), assim protegendo a mitocôndria de danos oxidativos (Kowaltowski & Vercesi, 1999).

As perspectivas do mecanismo pela qual o superóxido ativa a UCP implica na formação de um produto da lipoperoxidação lipídica, 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE), que induz o desacoplamento da mitocôndria através das UCP1, 2 e 3 e também através de um translocador nucleotídeo adenina (TNA) (Echtay *et al.*, 2003). 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 centrados de carbono, 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 10). 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 11).

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 (PMF), 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 PMF 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 11). Esta retroalimentação negativa, por proteger a célula de danos causados por EROS, devem representar uma função ancestral de todas as UCPs.

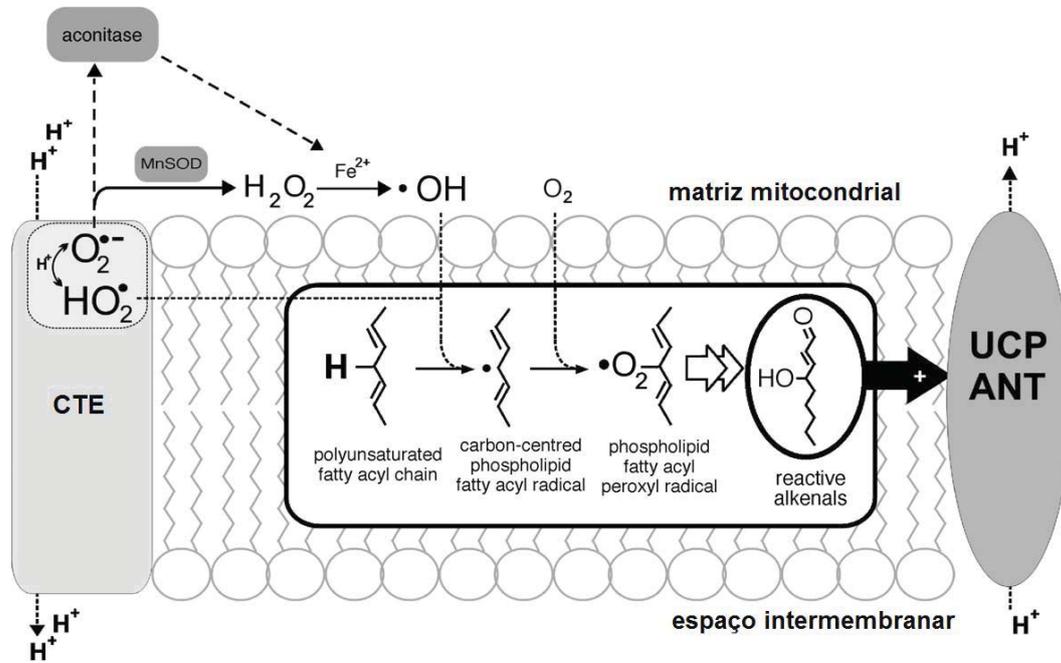


Figura 10 - Modelo proposto por Brand *et al.* (2004) para ativação dos carreadores mitocondriais (UCPs e ANT) pelo superóxido através da peroxidação lipídica.

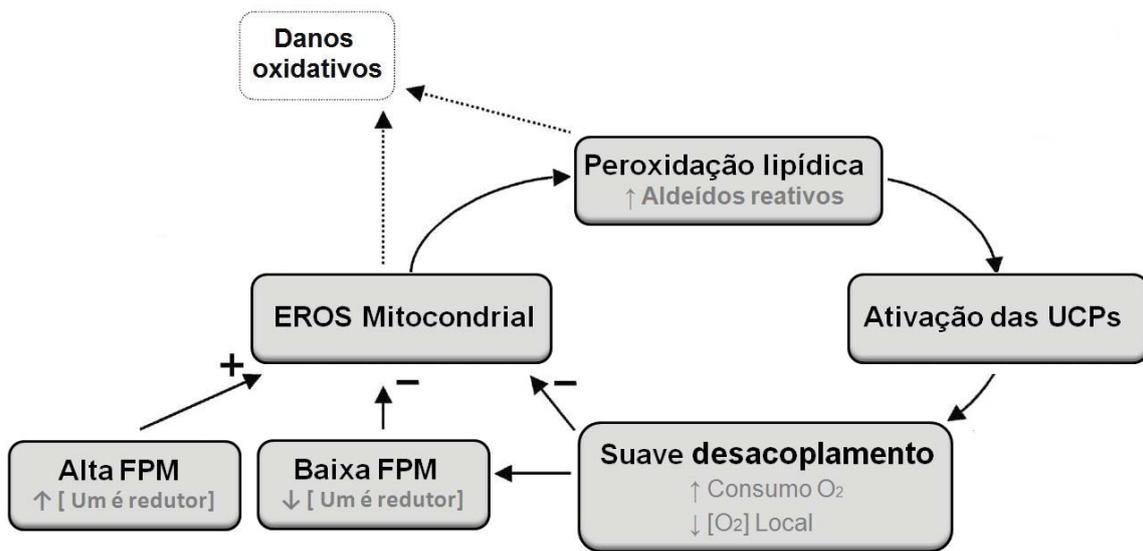


Figura 11 - Modelo de ativação das UCPs por EROS como uma função ancestral das UCPs (Brand *et al.*, 2004).

7.3. Resposta a estresses ambientais

A indução da pUCP pode ser uma consequência do aumento da concentração intracelular de EROS sob condições de estresses bióticos e abióticos, tais como ataque de patógenos, alta luminosidade, seca ou estiagem, alta ou baixa temperatura e estresse mecânico. O estresse por salinidade severa apresenta inibição da expressão gênica da pUCP em contraste com outros estresses. Muitas linhas de evidências sugerem que a contribuição da pUCP pode ser importante para respostas antioxidantes. Alguns genes pUCP, por sua vez, apresentam indução de expressão quando as plantas ficam expostas aos agentes geradores de estresse oxidativo, assim como, H₂O₂ ou menadiona. Plantas transgênicas com altos níveis de *AtPUMP1* apresentam um aumento de tolerância ao estresse oxidativo (Brandalise *et al.*, 2003a e b; Vercesi *et al.*, 2006).

A indução da expressão do gene *pUCP* no estresse pelo frio foi observada em batata e *Arabidopsis*. Mais recentemente, estudos revelaram que os genes *AtPUMP1* e *5* são induzidos por estresse causado pela seca e por infecção com *Alternaria brassicicola* e por vírus com genoma de RNA. O gene *AtPUMP5* também pode ter expressão induzida por danos causados por fatores de estresse abiótico, tais como vento, chuva e granizo; e fatores bióticos, particularmente, por insetos herbívoros, indicando um possível papel fisiológico da proteína *AtPUMP5* na planta. A expressão do gene *AtPUMP1* e *2* aumentou durante a morte celular programada induzida pelo calor, diferentemente do que ocorre na senescência, implicando que alguns dos produtos gênicos *pUCP* devem desempenhar um papel limitante na formação de EROS, após a exposição ao calor (Vercesi *et al.*, 2006).

7.4. Termogênese

O desacoplamento entre a respiração e a fosforilação levam para uma dissipação direta da energia eletroquímica como calor, sugerindo um possível envolvimento das UCPs na termogênese. Até o presente momento, esta função ficou clara somente para UCP1 de mamíferos, abundante no tecido adiposo marrom, onde deve constituir até 5% do total de proteínas mitocondriais em mamíferos aclimatados. As pUCPs estão presentes em mitocôndrias de plantas em menor quantidade e

provavelmente não estão aptas para promover a termogênese (Calegario *et al.*, 2003; Hourton-Cabassa *et al.*, 2004). Outros dados fornecem evidências que as UCP2-5 também não são termogênicas (Argyropoulos & Harper, 2002; Goglia & Skulachev, 2003).

As análises do perfil de expressão de um gene pUCP de *Helicodiceros muscivorus* (HmUCPa) (Ito *et al.*, 2003), um lírio *arum* altamente termogênico, revelam que este gene é ubiquamente expresso em ambos órgãos florais termogênicos e não-termogênicos, sugerindo que este produto gênico não está envolvido na produção de calor específico de órgão. A termogênese em plantas parece ser relatada mais fortemente para a atividade da AOX (Leach *et al.*, 1996). A atividade da AOX leva ao aumento de temperatura em processos reprodutivos e, possivelmente, ao amadurecimento de alguns frutos climatéricos (Vercesi *et al.*, 2006).

7.5. Eficiência fotossintética

A localização das proteínas desacopladoras em plantas (UCPs) na membrana mitocondrial interna e sua relação com a diminuição das espécies reativas de oxigênio já foi discutido anteriormente. Embora sua função catalítica e regulação em plantas já tenha sido descrita, a função fisiológica das UCPs em plantas ainda não está completamente esclarecida. Para ampliar os conhecimentos das funções das UCPs em plantas, Sweetlove *et al.* (2006) realizaram análises bioquímicas e fisiológicas de um gene mutante silenciado em *Arabidopsis* (*AtUCP1*) para avaliar se a UCP1 é requerida para a eficiência da fotossíntese. A ausência do gene UCP1 resultou em estresse oxidativo localizado, não impedindo a habilidade da planta para resistir a uma ampla variação de estresse abióticos. Entretanto, a ausência desse gene resultou num fenótipo fotossintético, sendo detectada uma restrição na fotorrespiração com uma diminuição na taxa de oxidação da glicina fotorrespiratória na mitocôndria. Esta alteração está associada a uma diminuição da taxa de assimilação de carbono fotossintético. Assim, estes resultados sugerem que a função principal das UCPs em folhas de *Arabidopsis* está relacionada a manutenção do estado redox da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial para facilitar o metabolismo fotossintético.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar uma caracterização bioquímica e molecular das proteínas desacopladoras mitocondriais de plantas (pUCP) em *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Objetivos específicos:

- Estabelecer os parâmetros necessários para o isolamento de frações mitocondriais de hipocótilos de *Vigna unguiculata*;
- Caracterizar a atividade enzimática da pUCP, através de ensaios polarográficos, utilizando-se diferentes ácidos graxos;
- Desenhar primers degenerados para amplificar fragmentos gênicos codificando pUCPs em *Vigna unguiculata*;
- Estudar a expressão de genes pUCP em *Vigna unguiculata* sob diferentes tipos de estresses abióticos;
- Clonar e seqüenciar fragmento(s) de cDNA(s) codificando pUCPs em *Vigna unguiculata* empregando primers degenerados;
- Comparar as seqüências de aminoácidos deduzidos das seqüências de cDNAs com as seqüências de aminoácidos de outras pUCPs;
- Construir uma árvore filogenética, estabelecendo relações filogenéticas das pUCPs de *Vigna unguiculata* com pUCPs de outras espécies de plantas;
- Amplificar fragmentos (clones) genômicos codificando pUCP empregando DNA genômico de *V. unguiculata* e primers degenerados;

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas sementes de feijão de corda *Vigna unguiculata* (L.) Walp, anteriormente denominada *Vigna sinensis* (L.) Savi e corrigido segundo Verdcourt (1970). As experiências foram realizadas utilizando sementes da cultivar Vita 5 provenientes da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Ceará (safra de 2000-2002). Após a colheita, as sementes foram armazenadas em frascos de vidro, a uma temperatura de aproximadamente 4°C.

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.

Para o isolamento de frações mitocondriais de hipocótilos de *V. unguiculata*, as sementes foram semeadas em papel de filtro embebido em água destilada, sendo posteriormente germinadas por um período de sete dias em ausência de luz. Após esse período, foram coletados os hipocótilos das plântulas para isolamento da fração mitocondrial.

Para o estudo da expressão gênica da pUCP sob condições de estresse um experimento em sistema de hidroponia foi preparado. As sementes foram germinadas em papel de filtro, embebido em água destilada, durante três dias, sendo então transferidas para um sistema de hidroponia, e submetidas a condições controle e de estresse, em casa de vegetação, até o 7º dia. A condição controle consistiu na manutenção das plântulas em solução nutritiva (KNO₃ 1M, NH₄H₂PO₄ 1M, MgSO₄ 1M, Ca(NO₃)₂ 1M, Fe-EDTA 0,5% e microelementos) e as condições de estresse na aplicação ao meio nutritivo de H₂O₂ 1mM, NaCl 100mM e PEG 200,7 g/L. As folhas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido para a extração de RNA total.

2- CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

2.1. Extração da fração mitocondrial

As mitocôndrias de hipocótilos de plântulas estioladas foram isoladas pelo método de Ikuma, 1970, modificado por Silva Lima *et al.* (1977). Os hipocótilos (aproximadamente 400 g) foram cortados em pedaços de aproximadamente 5 cm, lavados com água fria e triturados em liquidificador marca WALLITA, modelo BETA, com um meio de extração (1200 ml), previamente resfriado, contendo: Manitol 0,35 M, EDTA 2 mM, L-Cisteína 4 mM, BSA 0,1% (p/v) em tampão MOPS 30 mM sendo o pH ajustado com KOH 5 N para 7,4.

Os hipocótilos foram separados em duas porções de 200 g, triturados com \pm 300 ml de meio usando 4 pulsos de 1 segundo e o homogenato obtido foi filtrado em tela de nylon com malha de 150 μ m. Em seguida, os resíduos de hipocótilos foram submetidos a nova trituração mantendo-se a proporção inicial de 200 g / 300 ml do meio de extração e o novo homogenato foi filtrado na mesma tela. O homogenato resultante das triturações foi submetido à centrifugação diferencial. Todo o processo de obtenção do homogenato foi feito em baixa temperatura, com pH mantido em torno de 7 com KOH 0,1 M, quando necessário.

O processo de centrifugação foi realizado em centrífuga refrigerada, marca IEC, modelo B-22 M, à temperatura de 4° C.

A primeira centrifugação foi realizada a 1100xg com um rotor GSA, por 10 minutos, sendo o precipitado descartado.

O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação a 9500xg, usando o mesmo rotor, por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado, e o precipitado, onde se encontrava a fração mitocondrial, foi ressuspensão em meio de lavagem, contendo Manitol 0,35 M, EDTA 1 mM em tampão MOPS 10 mM, pH ajustado para 7,2 com KOH 5N. Esse procedimento foi realizado com baixo volume de meio de lavagem, aproximadamente 1 ml, com ajuda de um pincel de cerda macia, de modo suave, para não romper as membranas mitocondriais.

O homogenato originado da ressuspensão dos precipitados foi transferido para tubos de centrifuga completando-se o volume com meio de lavagem e em seguida foi

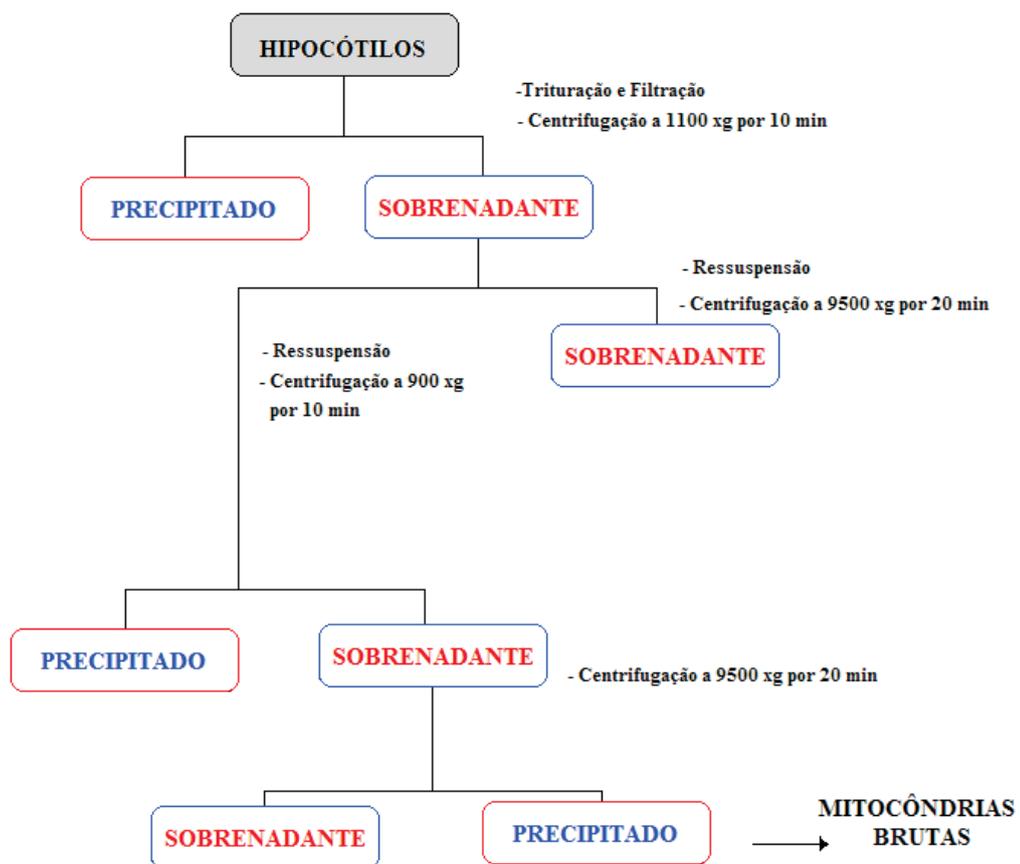


Figura 12 - Esquema de extração de mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

submetido à centrifugação a 900xg, com rotor SS34, por 10 minutos. Após a centrifugação o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado usando o mesmo rotor, a 9500xg por 20 minutos. Esta etapa foi repetida mais uma vez para eliminar resíduos de BSA contidos no meio de extração. A fração mitocondrial bruta foi finalmente obtida ressuspensão do precipitado resultante em aproximadamente 1 ml de meio de lavagem.

2.2. Determinação da proteína mitocondrial

A concentração da proteína mitocondrial foi determinada pelo método do biureto modificado por Gornall *et al.* (1949). A modificação consistiu na adição de colato de sódio, visando à solubilização das proteínas das membranas.

Os reagentes foram adicionados na seguinte seqüência: colato de sódio, em concentração final de 0,25%; hidróxido de sódio, em concentração final de 8,0%, com alíquota de 50 µl da fração mitocondrial e sulfato de cobre, em concentração final de 1,0%, em um volume final de 3,0 ml. Após 15 minutos, tempo necessário para desenvolvimento da coloração característica do biureto, as leituras foram feitas em espectrofotômetro, marca PHARMACIA BIOTECH, modelo ULTROSPEC 2000, em 540 nm. A leitura da absorbância da amostra foi realizada contra um padrão branco composto pelos reagentes supracitados, com exceção da alíquota da fração mitocondrial. A concentração de proteína foi determinada em relação a uma curva padrão de BSA.

Partindo-se de 400 g de hipocótilos, foi obtida a média de 55 mg de proteína mitocondrial.

2.3. Ensaio polarográfico

Os ensaios polarográficos, com o intuito de medir o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias, foram realizados em um oxígrafo, marca HANSATECH, polarizado com

0,8 V, utilizando-se um eletrodo de oxigênio tipo Clark, acoplado a uma câmara de reação de volume igual a 1,85 ml. Este eletrodo é constituído por um catodo de platina e um anodo de prata, unidos por uma ponte de KCl 3 M, isolada do meio por uma membrana de polietileno. O oxigênio atravessa a membrana, sofrendo redução na superfície do catodo que se encontra polarizada. A despolarização resultante do processo de oxidação do catodo gera uma corrente, estequiometricamente relacionada com a quantidade de oxigênio reduzido, sendo amplificada e transmitida a um registrador. A velocidade de difusão do oxigênio, através da membrana, depende do gradiente de pressão existente entre a amostra e a superfície do eletrodo, importando numa medida direta de concentração de oxigênio presente no meio. Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ \text{C}$). O meio de fosforilação consistiu de: Manitol 0,35 M, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, KH_2P_0_4 10 mM. O pH do meio variou de acordo com o tipo e a necessidade do ensaio (6,5; 7,2 e 7,8), com o volume final da cubeta de 1,85 ml, sendo a homogeneização garantida por um pequeno agitador magnético anexado à câmara de reação.

2.4. Cálculo do consumo de oxigênio

A quantidade de oxigênio em uma solução pode ser calculada a partir do seu coeficiente de solubilidade, o qual é dependente da temperatura e da composição eletrolítica.

No presente trabalho, realizado a 25°C , o consumo de oxigênio foi realizado em presença de Manitol, com concentração de O_2 dissolvido no meio de fosforilação igual a $230 \mu\text{M}$, segundo Fernandes de Melo (1978). A concentração de oxigênio na câmara de reação foi de $425,5 \text{ nmoles} / 1,85 \text{ ml}$, equivalendo a $851 \text{ nátomos de oxigênio} / 1,85 \text{ ml}$.

Partindo-se da altura do papel do registrador, 185 mm, determinou-se que cada milímetro corresponderia ao consumo de $2,3 \text{ nmoles de O}_2$ ou $4,6 \text{ nátomos de oxigênio}$, sendo a velocidade de consumo de oxigênio determinada a partir da seguinte expressão:

$$V = C \times h \times t^{-1}, \text{ onde:}$$

V = velocidade de consumo de oxigênio em η moles de $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$;

$C = 2,3$ – constante equivalente ao consumo de oxigênio em η moles por milímetro de altura do papel;

h = altura em milímetros percorrida ao longo do papel, variável em função da origem e integridade da preparação mitocondrial, substrato e vigência ou não de ADP;

$t = 1$ minuto, que correspondia à distância horizontal de 12 mm.

2.5. Cálculo do controle respiratório (C.R.)

O controle respiratório foi determinado no pH 7,2, utilizando-se como substrato, malato (15 mM)/glutamato (3 mM) com adições sucessivas de ADP (54 μ M), mensurados segundo Chance & Williams (1956), a partir da seguinte expressão:

$$\text{C.R.} = V_3 / V_4, \text{ onde:}$$

C.R. = Controle respiratório (coeficiente);

V_3 = velocidade do consumo de oxigênio no estado 3, em presença de substrato e ADP;

V_4 = velocidade do consumo de oxigênio no estado 4, em presença apenas do substrato.

Na determinação do C.R. foi utilizado o segundo estado 4.

2.6 . Cálculo da relação ADP/O

A relação ADP/O indica o número de moléculas de ADP acopladas ao consumo de oxigênio ao longo da cadeia transportadora de elétrons. Segundo Chance & Williams (1956), o consumo de oxigênio de uma suspensão de mitocôndrias, em meio isotônico, aumenta na presença de um substrato, assim como a adição de ADP provoca um aumento imediato na taxa de utilização de oxigênio. A duração do aumento desse consumo é dependente da concentração de ADP adicionada ao meio de reação, considerando que a quantidade de oxigênio utilizada é proporcional à de ADP fosforilado, convertido em ATP, podendo ser calculada diretamente a partir dos traçados polarográficos.

Partindo-se da premissa de que a preparação mitocondrial esteja íntegra, a relação ADP/O varia segundo os valores teóricos de 2 ou 3, de acordo com o substrato oxidado.

A relação ADP/O foi calculada segundo Chance & Williams (1956), através da seguinte expressão:

$$\text{ADP/O} = \text{ADP} \times h^{-1} \times C, \text{ onde:}$$

ADP = nmoles de ADP adicionados ao meio de reação;

h^{-1} = altura em milímetros, percorrida ao longo do papel, na vigência do consumo de ADP e de substrato indicativa do estado 3;

C = 4,6 – constante equivalente ao consumo de oxigênio em nátomos por milímetro de altura de papel.

2.7. Avaliação da integridade da membrana externa

A integridade da membrana mitocondrial externa foi avaliada comparando-se a oxidação do citocromo *c* pelo ascorbato, em presença dos meios isotônico e hipotônico, conforme descrito por Neuburger et al (1982), em pH 7,2. O princípio desta avaliação é que a molécula do citocromo *c*, reduzida pelo ascorbato, é oxidada pela cadeia transportadora de elétrons por ocasião da ruptura da membrana mitocondrial externa, que por sua vez é impermeável ao citocromo *c*. O estímulo do consumo de oxigênio pelo citocromo *c* reduzido é função do grau de ruptura da membrana externa, sendo o estímulo máximo obtido sob condições hipotônicas. Assim, o grau de integridade da membrana externa foi avaliado através da comparação do consumo de oxigênio entre os dois meios, sendo expresso em porcentagem.

No ensaio em meio isotônico (meio de fosforilação) foram feitas as seguintes adições: 1 mg de proteína mitocondrial, ascorbato 5 mM, citocromo *c* 8 mM e KCN 1 mM em um volume final de 1,85 ml.

No ensaio em meio hipotônico, inicialmente, 1 mg de proteína mitocondrial era adicionada a 0,925 ml de água milli-Q e a mistura homogeneizada, a alta velocidade, por 3 minutos. Em seguida, eram adicionados 0,925 ml de meio de fosforilação, ascorbato 5 mM, citocromo *c* 8 mM e KCN 1 mM, em um volume final de 1,85 ml.

A inibição do consumo de oxigênio pelo KCN, em ambos os meios, demonstra a participação da citocromo oxidase mitocondrial.

2.8. Caracterização da atividade da pUCP

A caracterização da atividade enzimática da pUCP foi realizada polarograficamente através do estímulo do consumo de O₂ por ácidos graxos e inibição por BSA.. Ao meio de reação foram previamente adicionados Propil-galato 0,1 mM, ATP 170 μM, rotenona 5 μM e oligomicina 2,5 μM/mg de proteína e o traçado polarográfico era iniciado adicionando-se 1 mg de proteína mitocondrial. Succinato 8 mM e malato (13 mM)/ glutamato (3 mM) foram utilizados como substratos oxidáveis. Após a adição destes substratos, 10 μM de ácido linoléico (AL), bem como outros

ácidos graxos (palmítico, mirístico e láurico), na mesma concentração, foram usados. A inibição do consumo de oxigênio foi dada pela adição seqüencial de BSA 0,5% e KCN 1 mM.

3 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

3.1. Desenho dos primers para pUCP

Os genes da pUCP de *Vigna unguiculata* foram amplificados por PCR utilizando “primers” degenerados, desenhados com base nos motivos conservados presentes em UCPs de plantas “PLDTAK VRLQLQ (N-terminal)” e no motivo “IMFLTLEQ (carboxila terminal)” em pUCPs de plantas do tipo 1 e 2. Abaixo estão as seqüências dos primers deduzidos Pump1 e Pump2, obtidos a partir do alinhamento de seqüências de aminoácidos de 10 diferentes pUCPs (Figura 13).

Seqüências dos primers deduzidos:

Pump1: 5' CYAAAGTTAGRCTBCAGC 3'

Pump2: 5' ARAACATDATNACATTCCA 3'

3.2. Extração de RNA total

A extração de RNA total de folhas de *V. unguiculata*, cultivar Vita 5, submetidos a diferentes tratamentos: controle, H₂O₂ 1mM, NaCl 100mM e PEG 200,7 g/L foi feita utilizando o “RNeasy Plant Mini Kit” – QIAGEN. Folhas de *V. unguiculata* (200 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo até a obtenção de um pó fino, que então foi transferido para um eppendorf contendo 900 µl de tampão RLT e 20 µl de β-mercaptoetanol. 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 5415C, 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. Posteriormente, transferiu-se o volume dessa mistura para a coluna de fixação de RNA (“RNeasy Plant Mini Kit”- rósea, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugou-se a 10.600g por 15 segundos. O eluato foi descartado, adicionou-se 700 µl de tampão RW1 à coluna e centrifugou-se novamente a 10.600g durante 15 segundos descartando-se o eluato. Em seguida, a coluna foi lavada duas vezes com 500 µl de RPE centrifugando-se a 15 segundos e 2 minutos, respectivamente. O RNA total foi eluído da coluna com 40 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.

3.3. 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 pureza dos RNA totais foi calculada através da relação de absorvância A_{260}/A_{280} que deve ficar entre 1,8 e 2,0.

A integridade do RNA total foi avaliada a partir de eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x (tris- 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM). As amostras foram preparadas com 1/10 do volume do tampão de carga contendo azul de bromofenol 0,4% (m/v), xileno cianol 0,4% e glicerol 50% (v/v). A migração foi feita a 80V.

3.4. Ensaio de expressão da pUCP

3.4.1. Transcrição reversa (RT)

Amostras de RNA total, 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 a Onniscrypt Transcriptase Reversa (Qiagen) contendo a mistura de reação na tabela 2.

A mistura de reação foi submetida a 70° C por 5 minutos e transferida imediatamente para o gelo. A reação de transcrição reversa foi realizada a 37° C por uma

hora e em seguida a transcriptase reversa foi inativada aquecendo-se a 75° C por 10 minutos. As amostras foram guardadas a - 20° C.

3.4.2. Reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR)

Os produtos da reação de transcrição reversa (cDNA) e os primers degenerados, deduzidos anteriormente foram utilizados para amplificação do(s) gene(s) da pUCP através da reação em cadeia da Polimerase (PCR). A mistura de reação ilustrada na Tabela 3 foi submetida a ciclos de PCR (Tabela 4) num termociclador, da marca MJ RESEARCH, PTC-200 (Pertier thermal cycler).

Tampão 10x	2 µl
dNTP mix (5mM cada)	2 µl
Oligo dT ₁₈ 6 pmoles/µl	10 µl
RNA total 2 µg	Variável
Onniscrypt Transcriptase Reversa 4u/ µl	1 µl
Água DEPC	q.s.p. 20 µl

Tabela 2- Mistura de reação da transcrição reversa usando RNA total de *Vigna unguiculata*

Tubos	Volume
cDNA	5 μ l
Água Milli-Q estéril	28,3 μ l
95° C por 5 minutos → gelo por 2 minutos	

dNTPs 5 mM	2 μ l
Tampão 10x	5 μ l
MgCl ₂ 50 mM	2,5 μ l
pump 1 17 pmol/ μ l	2 μ l
pump 2 17 pmol/ μ l	2 μ l
Actina F 20 pmol/ μ l	1,5 μ l
Actina R 20 pmol/ μ l	1,5 μ l
Taq 5u/ μ l	0,2 μ l

Tabela 3 - Mistura da reação de PCR para amplificação do(s) gene(s) da pUCP de *Vigna unguiculata*

Temperatura (° C)	Tempo (minutos)
95	5
95	1
53	1
72	2
30 CICLOS	
72	10
4	Indefinido

Tabela 4 - Programa de PCR utilizado para amplificação do(s) gene(s) da pUCP em *Vigna unguiculata*

3.5. Eletroforese dos produtos amplificados por RT-PCR

Uma eletroforese em gel de agarose 1,5% foi realizada para observação das bandas correspondentes ao(s) cDNA(s) da pUCP e da actina. O desenho dos primers da actina, usado como controle constitutivo, foi realizado com base em alinhamentos de seqüências de aminoácidos de soja e *Vigna radiata*. A composição do gel de agarose 1,5% continha TBE 1X (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM) como tampão de corrida. 5 µL de cada amostra amplificada bem como marcador na concentração de 500ng (λ DNA/digerido por Hind III - AMERSHAN PHARMACIA BIOTECH) foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada em aparelho da marca PHARMACIA, modelo GNA 100 (7.5x10cm), utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power- pac 300) com amperagem constante de 60 mA, por aproximadamente 2 horas, à temperatura de 25°C. O gel foi fixado com brometo de etídio submetendo-se à agitação por 15 minutos numa solução a 0,5 µg/ml. O gel foi lavado em água durante 15 minutos e em seguida visualizado e fotografado usando um transluminador acoplado a um vídeo de monitoramento e a uma registradora.

3.6. Purificação dos produtos de RT-PCR

A amostra de RT-PCR, estresse por H₂O₂ 1 mM, foi purificada com o objetivo de eliminar produtos inespecíficos amplificados. Nesse intuito, 40 µL do produto de RT- PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5 %, e, após corrida eletroforética, a banda de 760pb foi cortada do gel e purificada, utilizando-se o kit de extração do gel. (QIAquick Gel Extraction Kit - Qiagen). A banda foi pesada para adicionar-se o tampão QG (proporção de 300µL para 100 mg de gel) e em seguida a mistura foi submetida a 50° C durante 10 minutos para a dissolução do gel, agitando-se de 2 em 2 minutos em aparelho Vortex. Uma vez dissolvido, o homogenato foi aplicado numa coluna acoplada a um tubo coletor e centrifugado a 20.800g por 1 minuto, descartando-se o eluato. Em seguida, a coluna foi lavada com 700 µl de tampão PE (com etanol 100%), seguido de duas centrifugações, a 20.800g por 1 minuto, para eliminar todos os resíduos de etanol. A coluna foi transferida para um

novo eppendorf de 1,5 ml, deixando-se “em repouso” por um intervalo de 5 minutos. O fragmento purificado foi eluído adicionando 50 µl do tampão EB à coluna e centrifugando-a a 20.800, por 1 minuto. Uma segunda eluição foi feita obtendo-se 100 µl da amostra com tampão EB.

A amostra foi concentrada através de precipitação em etanol e ressuspensão num pequeno volume de água mili-Q estéril. Assim, a amostra foi precipitada adicionando-se 80 µl de água estéril, 20 µl de acetato de sódio 3M e 500 µl de etanol 100% (-20° C) e deixando-se a mistura incubada à -20° C por 2 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 17.900g por 15 minutos e o precipitado, praticamente invisível, foi ressuspensão em 10 µl de água mili-Q estéril.

A confirmação da purificação do fragmento de cDNA da pUCP foi observada através de uma eletroforese em gel de agarose 1,5% usando 1 µl do produto purificado.

3.7. Ligação inserto-vetor

O cDNA purificado foi clonado no vetor pCR4-TOPO (INVITROGEN). A mistura de reação da ligação do produto de RT-PCR ao vetor plasmídico pCR4-TOPO está ilustrada na Tabela 5.

A mistura de reação acima foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida, colocada no gelo. Adicionou-se 3 µl da reação a 0,5 vial (25 µl) de células competentes *E. coli* Mach1TM-T1^R, levada ao gelo por mais 15 minutos, transferida para um banho-maria de 42° C por 45 segundos e retornada imediatamente ao gelo. Adicionou-se 250 µl de meio SOC à temperatura ambiente, cultivando-se em seguida as células a 37° C por uma hora, sob agitação de 200 rpm. As células foram plaqueadas em meio LB ágar ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37° C durante toda a noite.

Produto de PCR	4 μ l
Solução salina (1,2M NaCl e MgCl ₂ 0,06 M)	1 μ l
Água estéril	0,5 μ l
pCR4-TOPO VETOR (10ng/ μ l)	0,5 μ l

Tabela 5 – Mistura de reação da ligação do produto de RT-PCR ao vetor pCR4-TOPO.

3.8. Vetor de clonagem pCR4-TOPO

Existem diferentes vetores de clonagem, contudo os mais usuais são os obtidos a partir de genoma viral e de plasmídio bacteriano. Nesse trabalho foi utilizado o vetor plasmídico pCR4-TOPO (Invitrogen), um sistema conveniente para a clonagem de produtos de PCR (Figura 13). Esse vetor apresenta um tamanho molecular de 3956 pb, com um sítio promotor para Plac e LacZ α —ccdB, respectivamente. Esta região promotora LacZ α —ccdB compreende o sítio de clonagem para produtos de PCR entre as bases 294-295. Este vetor apresenta ainda um gene de resistência à kanamicina no intervalo de bases de 1159-1953 e um gene que confere resistência à ampicilina entre as bases 2203-3063.

O vetor plasmídico pCR4-TOPO permite uma seleção direta de recombinantes através de interrupção do gene letal ccdB em *E. coli*. O vetor contém o gene ccdB ligado à porção C-terminal do fragmento LacZ α . A ligação do produto de PCR impede a expressão do gene de ligação LacZ α —ccdB, permitindo o crescimento apenas de recombinantes positivos, quando comparada com a transformação nas células TOP10. As células contendo o vetor não recombinante não crescem após o plaqueamento. Assim, um ensaio de diferenciação entre colônias azuis e brancas não é necessário.

LacZ α initiation codon

	M13 Reverse priming site								T3 priming site
201	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCCAAGCTCA	GAATTAACCC	TCACTAAAGG			
	GTGTGTCCTT	TGTCGATACT	GGTACTAATG	CGGTTTCGAGT	CTTAATTGGG	AGTGATTTC			
261	GACTAGTCCT	GCAGGTTTAA	ACGAATTGCG	CCTT	PCR Product	AAGGGC	GAATTCGGG		
	CTGATCAGGA	CGTCCAAATT	TGCTTAAGCG	GGA	Product	TTCCCG	CTTAAGCGCC		
311	CCGCTAAATT	CAATTCGCCC	TATAGTGAGT	CGTATTACAA	TTCACTGGCC	GTCGTTTTAC			
	GCGGATTTAA	GTTAAGCGGG	ATATCACTCA	GCATAATGTT	AAGTGACCGG	CAGCAAAATG			

T7 priming site

M13 Forward (-20) priming site



Figura 14 – Mapa gênico e de restrição do vetor plasmidial pCR4-TOPO. Esse vetor possui: região promotora Plac (2-216); promotor LacZ α —ccdB (217-810), sítio de ligação de primers universais M13 forward (355-370); gene que codifica a kanamicina (1159-1953) e ampicilina (2203-3063).

3.9. PCR em colônia

Os clones positivos crescidos nas placas LB ágar ampicilina (100 µg/mL) foram detectados através de PCR em colônia. Assim, as colônias foram tocadas com um palito estéril, repicadas numa nova placa LB ágar contendo ampicilina 100 µg/mL e as células remanescentes no palito foram homogeneizadas em 50 µl de água estéril. 5 µl das células homogeneizadas foram usados na reação de PCR conforme Tabela 6 e o programa de PCR utilizado foi o mesmo descrito na Tabela 4. As placas repicadas foram colocadas em estufa a 37° C para crescimento das colônias por toda a noite.

3.10. Mini preparação de plasmídios por lise alcalina

A mini preparação de plasmídios consistiu em purificar os plasmídios recombinantes para posterior seqüenciamento (Sambrook *et al.*, 1989).

Inicialmente, cada uma das colônias positivas foi tocada com palito estéril sob chama de fogo, inoculadas em 10 ml de meio Terrific Broth em presença de ampicilina 0,1mg/ml e deixadas sob agitação por uma noite, a 37° C. No dia seguinte, um estoque de colônias foi preparado adicionando-se 750µl de cultura a 250µl de glicerol autoclavado e guardado a – 70° C. Duas alíquotas de 1,2 ml de cultura, em eppendorfs de 1,5ml, foram usadas para a purificação de plasmídeos. As culturas foram centrifugadas à 2700g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 200µl de solução A1 (ver item 3.10.2), utilizando um Vortex. Adicionou-se 300µl de Solução A2 (ver item 3.10.2), deixando-se a amostra em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram acrescentados 300µl da solução de acetato de potássio 3M pH 5.2 (Solução A3 - ver item 3.10.2), na temperatura de 4° C e a mistura resultante foi centrifugada a 17900g por 10 minutos. O precipitado foi descartado, o sobrenadante foi misturado a uma solução de Fenol/Clorofórmio 1:1(v/v), homogeneizado por inversão e centrifugado a 17900g por 5 minutos. A fase aquosa foi recuperada, acrescida de um volume igual de Isopropanol 100% a 4° C (homogêneo) e centrifugada à 18500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500µl de etanol

Tubos	1-10
Água Milli-Q estéril	27 μ l
Colônias	5 μ l

100° C por 5 minutos

dNTPs 5mM	2 μ l
Tampão 10x	5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	5 μ l
PUMP1	2 μ l
PUMP2	2 μ l
Taq	2 μ l

Tabela 6 – Mistura da reação da PCR em colônia para detecção do(s) gene(s) da pUCP.

80%. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensão em 32µl de água de RNase 100µg/ml, e deixando à temperatura de 37° C por 20 minutos. Em seguida, 8µl de NaCl 4 M e 40µl de PEG 8000 13% foram adicionados à amostra, deixando-se em banho de gelo por 20 minutos. Nova centrifugação a 14000 por 15 minutos a 4° C foi realizada e o precipitado formado foi lavado com 500µl de etanol 80% (previamente resfriado a 4° C). A amostra foi centrifugada a 17900g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA plasmídico precipitado foi ressuspensão em 20µl de água estéril.

3.10.1. Preparação de meios de culturas

1) LB Ágar

- NaCl 1%.....10g
- Peptona/Triptona 1%.....10g
- Extrato de levedura 0,5%..... 5g

Adicionar um pequeno volume de água estéril e ajustar pH para 7 com solução de NaOH 5 N. Aferir para volume de 1 litro com água destilada. Acrescentar 20 g de ágar e autoclavar a solução.

2) Meio LB líquido

- NaCl 1%.....1g
- Peptona/Triptona 1%.....1g
- Extrato de levedura 0,5%.....1,5g

Adicionar água estéril, ajustando o pH para 7.0 com solução de NaOH 5 N. Aferir volume para 100mL com água destilada

3) Meio Terrific Broth

- Bacto- triptona.....1,2g
- Extrato de levedura.....2,4g
- Glicerol.....0,4 mL

- KH_2PO_40,03856g
- K_2HPO_40,209g
- Água deionizada q.s.p.....100 ml

Após aferir volume com água deionizada para 100 ml, o meio foi dividido em alíquotas de 10 ml em 10 erlenmeyer, sendo o material levado a autoclave em seguida.

4) Meio SOC

- Triptona 2%
- Extrato de levedura 0,5%
- NaCl 10 mM
- KCl 2,5 mM
- MgCl_2 10 mM
- MgSO_4 10 mM
- Glucose 20 mM

Aferir volume com água deionizada para 10 ml.

3.10.2. Soluções usadas na mini preparação de plasmídeos

1) SOLUÇÃO A1

- Tris (25 mM).....0,302g
- EDTA (10 mM).....0,292g
- Água q.s.p.....100ml
- pH.....8,0
- Autoclavar a solução

2) SOLUÇÃO A2 (Preparar na hora do experimento)

- NaOH (0,2N).....25 mL (Estoque 0,4)
- SDS (1 %).....25 mL (Estoque 2 %)
- Volume final.....50 mL
- Não autoclavar a solução

3) SOLUÇÃO A3

- CH₃COONa (Acetato de potássio 3 M).....12,30g
- Água q.s.p.....50 mL
- pH..... 5,2
- Não autoclavar a solução
- Armazenar a solução a 4° C.

3.11. Seqüenciamento

As amostras plasmidiais purificadas foram seqüenciadas no Departamento de Genética/IB - Unesp, Botucatu, São Paulo, usando-se o kit Big Dye (Applied Biosystems) e um seqüenciador automático modelo ABI 377 (Applied Biosystems).

3.12. Alinhamentos de seqüências e análises filogenéticas

Os alinhamentos de seqüências, bem como a construção de árvore filogenética da pUCP foram feitos usando o programa CLUSTAL-X (Thompson *et al.*, 1997).

3.13. Isolamento de DNA genômico

O DNA genômico foi isolado de folhas jovens e saudáveis obtidas de plântulas com 4 dias de germinação (Doyle & Doyle. 1987).

Um tubo Falcon com 10 ml de tampão CTAB e 10 μ l de β -mercaptoetanol foi previamente colocado em banho-maria à 65°C. Aproximadamente 1g de folhas jovens foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, até se obter um pó fino. O macerado foi então adicionado ao tampão CTAB e colocado em banho-maria à 65°C por 10 minutos, agitando-se de tempo em tempo. Ao macerado foram adicionados 10 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitando suavemente, sendo em seguida, centrifugado por 20 minutos a 1400 g. A fase aquosa foi recuperada e submetida à nova extração com clorofórmio. Em seguida, foi adicionado ao tubo Falcon 2/3 de volume de isopropanol e agitado, suavemente, por inversão. O DNA foi precipitado na forma de filamentos, deixado por 30 minutos à temperatura ambiente, centrifugado por 15 minutos a 12 000 g e em seguida, o precipitado foi lavado com 10 mL de solução de lavagem (etanol 75% e acetato de amônia 10 mM) e deixado sobre a bancada por 20 minutos. O sobrenadante foi eliminado suavemente e o precipitado aderido às paredes foi recuperado com auxílio de um papel "kleenex". O precipitado foi ressuspenso em 0,75 mL de tampão TE em tubos eppendorf de 2 mL, sendo adicionados 10 μ L de solução de RNase (10 μ g/mL) e incubados à 37°C por 15 minutos. A solução foi dividida em dois tubos de 2 mL e precipitada pela adição de 190 μ L de acetato de amônia 7,5 M e 1,2 mL de etanol absoluto em cada tubo e deixada à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 22 900 g por 10 minutos, o sobrenadante foi eliminado, o precipitado foi lavado com etanol 70% e deixado secar sobre a bancada. O precipitado correspondente ao DNA genômico foi ressuspenso em 200 μ L de TE e incubado por 20 minutos à 65°C com a tampa aberta.

O grau de pureza do DNA foi medido através de densidade óptica (DO) a 260, 280 e 230nm e a qualidade do mesmo foi avaliada em gel.

3.14. Eletroforese do DNA

Para verificar que as extrações do DNA genômico foram bem sucedidas quanto à degradação, pureza e quantificação uma eletroforese em gel de agarose 0,7% foi realizada. O gel de agarose foi preparado em TBE 1X (Tris-Borato 45 mM,

EDTA 1 mM). Foram aplicados em cada poço 0,5µg de DNA e a corrida eletroforética foi realizada em aparelho da marca PHARMACIA, modelo GNA 100 (7.5x10cm), utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power- pac 300), com amperagem constante de 60 mA por, aproximadamente, 2 horas à temperatura de 25°C. Em seguida, o gel foi fixado com solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) sob agitação por 15 minutos e lavado com água por 15 minutos. Enfim, o gel foi visualizado e fotografado usando um transluminador, acoplado a um vídeo de monitoramento e a uma registradora.

3.15. Amplificação do(s) fragmento(s) genômico(s) codificando pUCPs em *V. unguiculata*.

Amostras de DNA genômico de *Vigna unguiculata* (Cultivar Vita 5) foram submetidas à amplificação através de PCR utilizando os primers degenerados pump1/pump2, conforme a mistura de reação ilustrada na tabela 7.

A PCR foi realizada em um termociclador MJ RESEARCH PTC-200 (Pertier thermal cycler) utilizando um gradiente de temperatura de anelamento de acordo como está descrito tabela 8.

Tubos	DNA feijão V-5 1µg
DNA Vita 5 0,2µg/µL	5 µL
H ₂ O estéril	30,9 µL

100° C por 5 minutos

dNTPs 5 mM	2 µL
Buffer 10 X	5 µL
MgCl ₂ 50 mM	2,5 µL
Primer pump1 17pmol//µL	1,8 µL
Primer pump2 17pmol//µL	1,8 µL
Taq 5u/µL	1 µL

Tabela 7- Mistura da reação de PCR para amplificação de fragmentos genômicos codificando pUCP em *V. unguiculata*.

Etapa	Temperatura (° C)	Tempo (min)
Desnaturação	92	1
Anelamento (gradiente 38 a 62° C)	38, 44.5, 47.9, 51.9, 55.3, 62	2
Alongamento	72	2
CICLO 40x		
Extensão	72	10
Armazenamento	4	indefinido

Tabela 8- Programa de PCR utilizado para amplificação de fragmentos genômicos codificando pUCP em *V. unguiculata*.

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Integridade da membrana mitocondrial externa

A figura 15 mostra uma avaliação da integridade das mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5. Os traçados polarográficos revelam o estado de integridade da membrana mitocondrial externa com as mitocôndrias incubadas em meios isotônico (A) e hipotônico (B) na presença de ascorbato 5mM, citocromo c 8mM e KCN 1mM em pH 7,2. Pode-se observar que as mitocôndrias em meio isotônico (A), ou seja, sem ruptura induzida pela tonicidade do meio, apresentam um consumo de oxigênio de 16,1 η moles de O_2 .mg de proteína⁻¹. min⁻¹, decorrente da redução do citocromo c pelo ascorbato devido a um certo grau de ruptura da membrana mitocondrial externa, ocasionado pelo processo de isolamento mitocondrial. Já em meio hipotônico (B), onde as mitocôndrias estariam submetidas a um grau máximo de ruptura, o consumo de oxigênio foi de 73,6 η moles de O_2 .mg de proteína⁻¹. min⁻¹, isto é, 4,6 vezes mais elevado do que o observado com as mitocôndrias em meio isotônico. Esses resultados permitem estimar, conforme está descrito em Material e Métodos, a integridade mitocondrial que foi de 78,13%. O grau de integridade da membrana mitocondrial externa foi semelhante em 3 experimentos independentes.

Relação ADP/O e Controle Respiratório (C. R.)

A figura 16 apresenta o consumo de oxigênio da fração mitocondrial de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, na presença de malato (13 mM)/ glutamato (3 mM) como substrato oxidável, seguido de sucessivas adições de ADP (54 μ M), em pH 7,2. Após as adições de ADP, foram medidos os consumos de oxigênio nos estados 3 e 4, e foram determinados os C. R. e as relações ADP/O, como está descrito em Material e Métodos. As demais preparações escolhidas para serem utilizadas com outros objetivos apresentavam sempre traçados comparáveis aos da

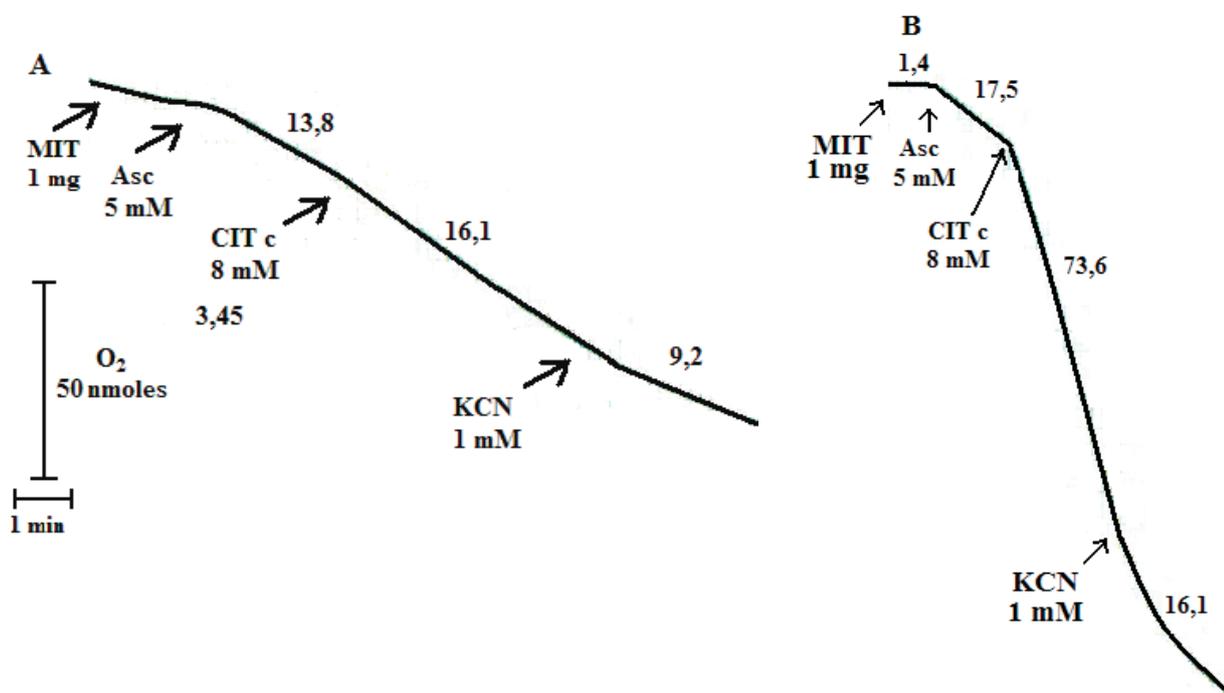


Figura 15 – Consumo de oxigênio dependente de ascorbato (Asc) e citocromo c (CIT c) de mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 5. Os números ao longo dos traçados referem-se ao consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹.

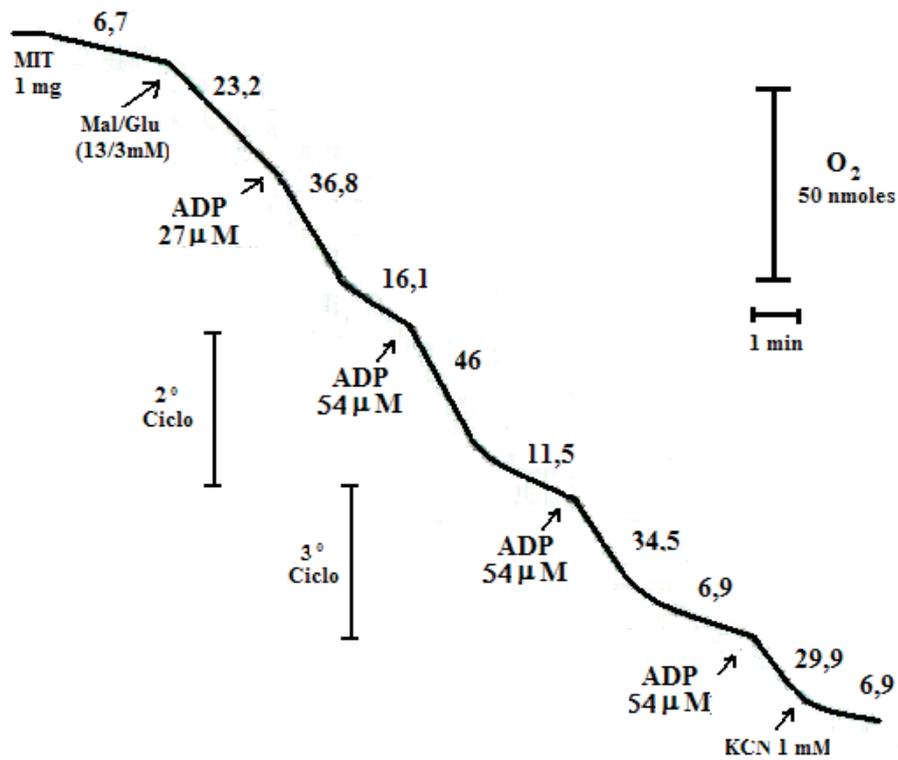


Figura 16 – Oxidação do malato/glutamato em presença de ADP por mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp em pH 7,2. Os números ao longo do traçado indicam o consumo de oxigênio em η moles de O₂ · mg de proteína⁻¹ · min⁻¹.

Figura 16, tomada como padrão. Dois ciclos de fosforilação nas mitocôndrias foram desencadeados pelas adições sucessivas de ADP, sempre mostrando maior consumo de oxigênio na vigência do estado 3, com valores comparáveis aos encontrados em mitocôndrias de sorgo por Fernandes de Melo (1978) e por Lima-Júnior (1999) em mitocôndrias de feijão.

Para fins da avaliação das relações ADP/O e C.R., foram utilizados os valores de consumo de oxigênio, em nmoles de O₂. mg de proteína⁻¹. min⁻¹, nos estados 3 e 4, durante os 2º e 3º ciclos de fosforilação. As relações ADP/O foram de 2,17 e 2,5 e os C.R. de 4 e 5 respectivamente.

Caracterização da atividade enzimática da pUCP em *Vigna unguiculata*

A atividade da pUCP foi avaliada polarograficamente através do estímulo do consumo de O₂ exercido por ácidos graxos livres e inibição por BSA 0,5% na presença de 0,1mM de propil galato (inibidor da Aox), 2,5 µM de oligomicina (inibidor da ATPase mitocondrial) e 170 µM de ATP usando malato/glutamato e succinato como substratos. Os traçados polarográficos mais semelhantes à média em 3 experimentos independentes são ilustrados nas Figuras 17 e 18.

A Figura 17 mostra a taxa de respiração de mitocôndrias isoladas de hipocótilos de *Vigna unguiculata* evidenciando a atividade enzimática da pUCP após a adição de ácido linoléico (AL) 10 µM, em pH 6,5 (A), 7,2 (B) e 7,8 (C) usando succinato (8 mM) como substrato oxidável. Em pH 6,5 (A), a adição de AL não estimulou o consumo de oxigênio contrariamente ao observado nos pHs 7,2 (B) e 7,8 (C). Em pH 7,2 o AL estimulou a respiração de 55,2 para 84,9 nmoles de O₂.mg de proteína⁻¹. min⁻¹ correspondendo a 65% de estímulo enquanto que em pH 7,8 (C), o consumo de oxigênio passou de 31,3 para 43 nmoles de O₂.mg de proteína⁻¹. min⁻¹ correspondente a 54% de estímulo induzido pelo AL. Como também pode ser observado, a adição de BSA 0,5% após AL inibiu o consumo de O₂ em 22, 13 e 14% nos pHs 6,5, 7,2 e 7,8,

respectivamente. A adição subsequente de cianeto de potássio (KCN) bloqueou a respiração mitocondrial.

A Figura 18 mostra a taxa de respiração de mitocôndrias isoladas de hipocótilos de *Vigna unguiculata* revelando a atividade enzimática da pUCP após a adição de ácido linoléico (AL) 10 μM nos pHs 6,5 (A), 7,2 (B) e 7,8 (C) usando malato (13 mM)/glutamato (3 mM) como substrato oxidável. Em pH 6,5(A) a adição de AL 10 μM não estimulou o consumo de oxigênio. Em pH 7,2 (B), a adição de AL estimulou o consumo de oxigênio de 18,4 para 27,6 nmoles de O_2 .mg de proteína⁻¹. min⁻¹

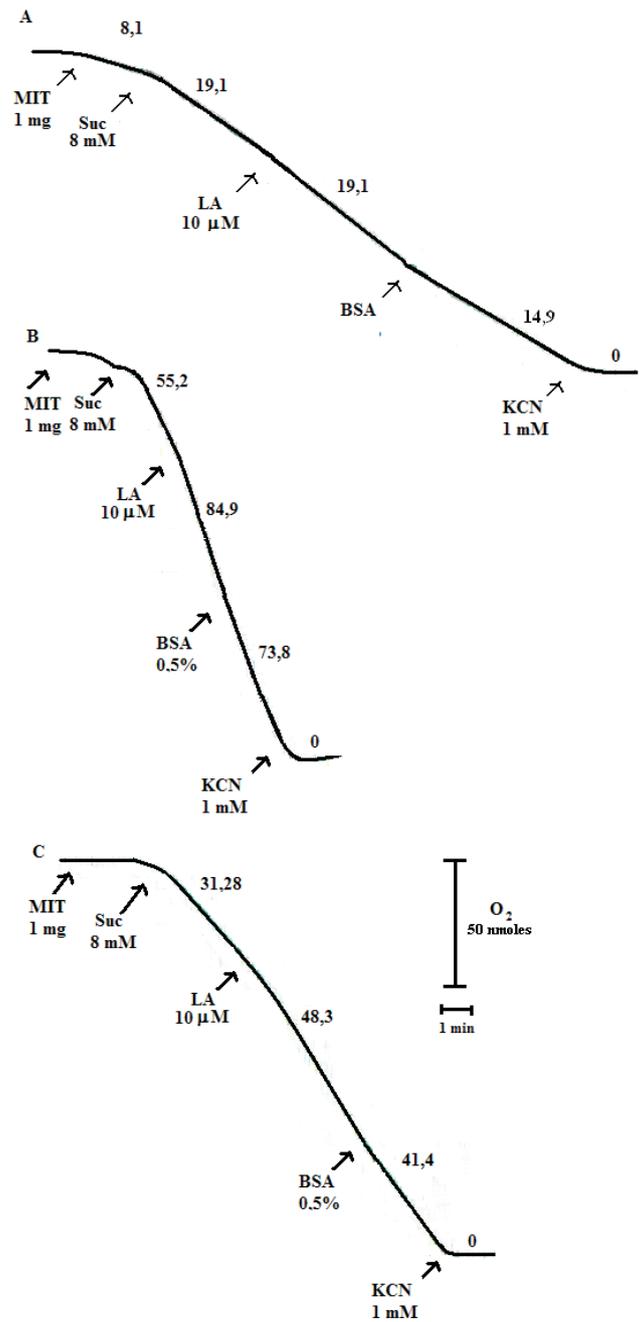


Figura 17 – Oxidação do succinato em presença de ácido linoléico (LA) por mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata* em pH 6,5 (A), 7,2 (B) e 7,8 (C). Os números ao longo do traçado indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹.

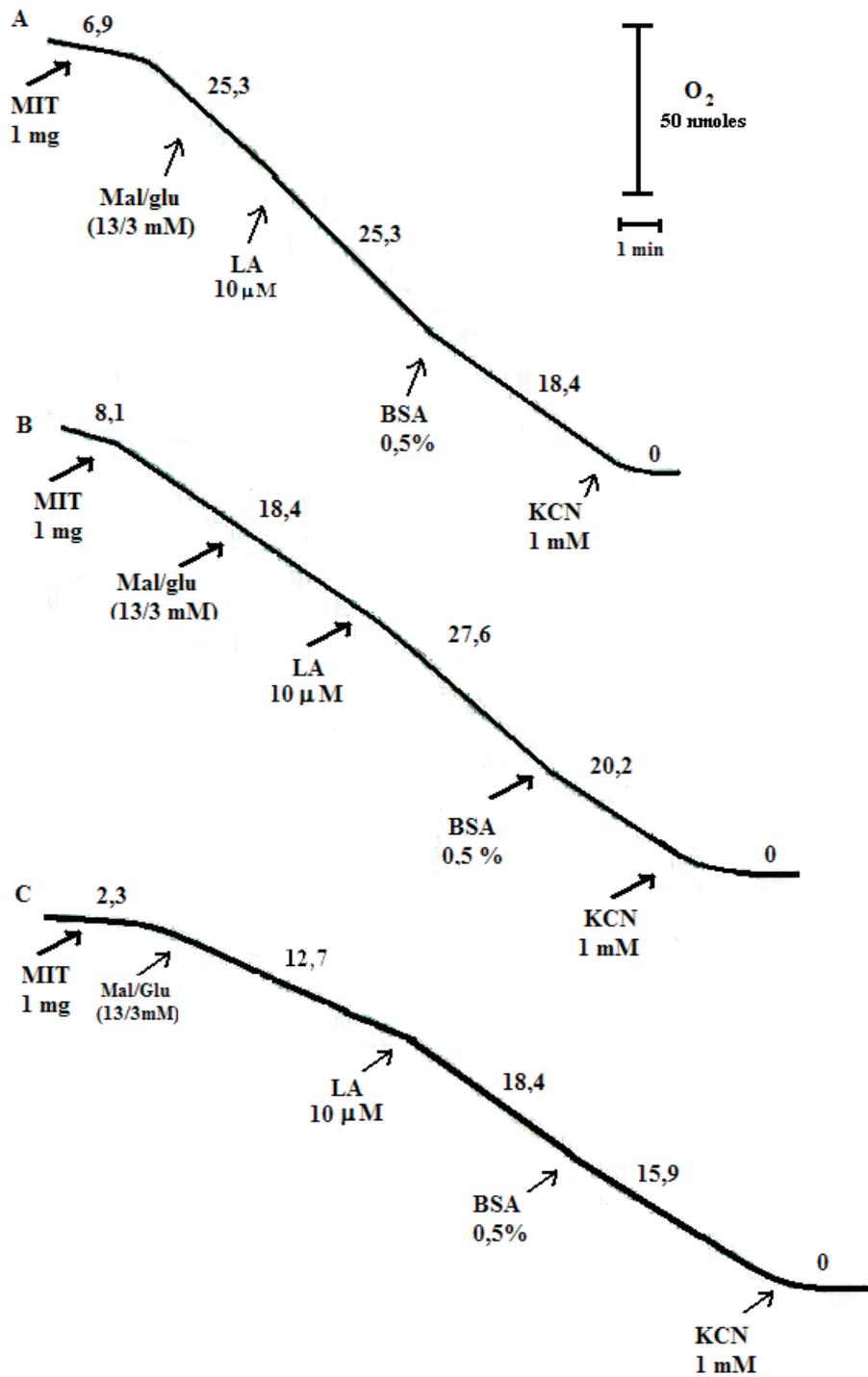


Figura 18 – Oxidação do malato/glutamato em presença de ácido linoléico (LA) por mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata*, em pH 6,5 (A), 7,2 (B) e 7,8 (C). Os números ao longo do traçado indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ · mg de proteína⁻¹ · min⁻¹.

equivalendo a um estímulo de 50%. Já em pH 7,8 (C), o consumo de oxigênio passou de 12,7 para 18,4 nmoles de O_2 .mg de proteína⁻¹. min⁻¹ correspondendo a um aumento de 45% na respiração mitocondrial. A adição de BSA 0,5% inibiu o consumo de O_2 em 27%, 27% e 14% nos pHs 6,5, 7,2 e 7,8, respectivamente. A adição subsequente de cianeto de potássio (KCN) inibiu completamente a respiração mitocondrial.

A ativação da pUCP por AL 10 μ M em diferentes pHs (6,5, 7,2 e 7,8), usando succinato e malato como substratos, foi avaliada através de uma média representativa de 3 experimentos independentes (Figura 19). Essa avaliação revelou até inibição do consumo de O_2 em pH 6,5 enquanto que nos pHs mais alcalinos (7,2 e 7,8) a adição de AL estimulou a respiração. Os maiores estímulos foram observados usando-se succinato como substrato apresentando estímulos de aproximadamente 60% em pH 7,2 e 50% em pH 7,8. Usando-se malato como substrato, os estímulos foram em torno de 40% em ambos os pHs.

A Figura 20 mostra o percentual de estímulo de consumo de oxigênio usando-se malato (13 mM) como substrato oxidável após a adição de diferentes ácidos graxos (linoléico, palmítico, mirístico e láurico), na concentração de 10 μ M, em diferentes pHs (6,5, 7,2, 7,8). Os maiores estímulos de consumo de O_2 foram observados em pHs 7,2 e 7,8 usando ácido linoléico e corresponderam a aproximadamente 40%. Em pH 6,5 nenhum estímulo foi observado usando esse ácido graxo. O ácido palmítico apresentou um percentual de estímulo equiparável entre os 3 pHs variando entre 7 e 11%. Já o ácido mirístico revelou um estímulo crescente com o pH, apresentando percentuais de 6, 11 e 22 % nos pHs 6,5, 7,2 e 7,8, respectivamente. Por outro lado, o ácido láurico mostrou estímulo apenas em pH 7,8 correspondendo a aproximadamente 16%.

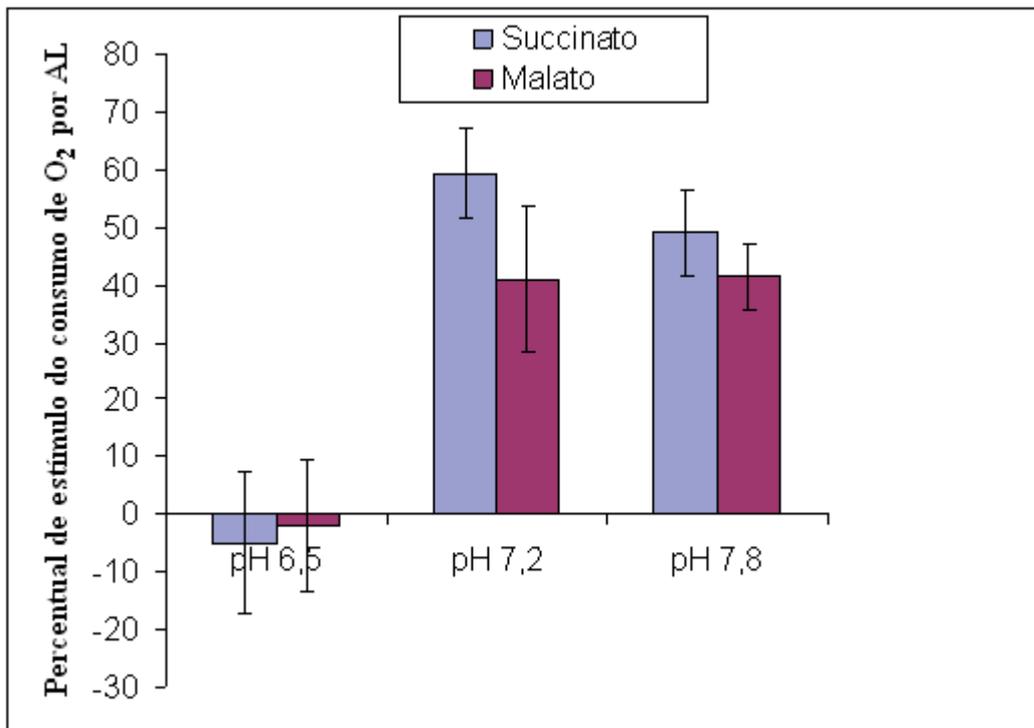


Figura 19 – Percentual de estímulo do consumo de oxigênio por ácido linoléico em mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata*, em diferentes pHs, tendo succinato ou malato como substratos correspondendo a média de três experimentos independentes.

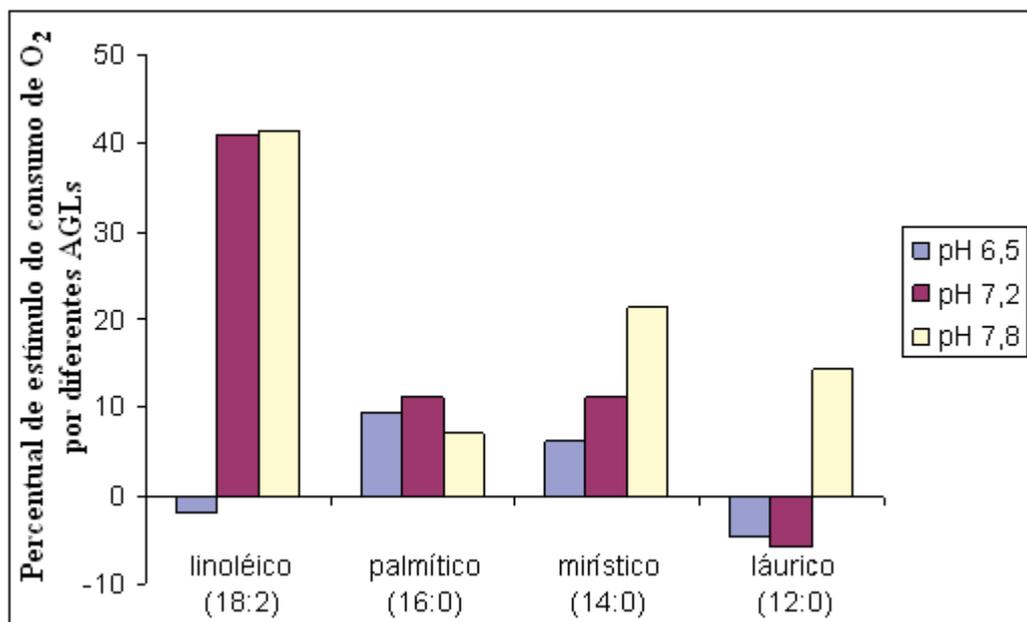


Figura 20 – Percentual de estímulo do consumo de oxigênio por ácido linoléico, palmítico, mirístico e láurico em mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata*, em diferentes pHs, tendo malato como substrato correspondendo a média de três experimentos independentes.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA pUCP DE *Vigna unguiculata*

Aplicação de estresse abiótico em plântulas de *Vigna unguiculata*

Para avaliar a expressão gênica da pUCP em folhas de *Vigna unguiculata*, cultivar Vita 5, diferentes estresses abióticos (NaCl 100mM, H₂O₂ 1mM e PEG 200,67g/L) foram aplicados em plântulas após 3 dias de germinação e deixadas durante 4 dias quando as folhas foram coletadas para a extração de RNA total.

O perfil de crescimento das plântulas variou conforme os diferentes estresses aplicados em comparação às plantas controle (Figura 21). Em condição de NaCl 100 mM, observou-se uma significativa redução da área foliar e do epicótilo. As raízes e hipocótilos também apresentaram redução no tamanho, entretanto foi menos evidente do que em folhas e epicótilos.

O estresse causado por H₂O₂ 1 mM, aparentemente, provocou uma redução mais uniforme em todas as partes da plântula. Um detalhe marcante nessas plântulas foi a ausência de desenvolvimento de raízes secundárias.

A condição PEG 200,67 g/L proporcionou redução do crescimento das plântulas semelhante às estressadas por H₂O₂ 1 mM, exceto pelo desenvolvimento de algumas raízes secundárias.

Extração de RNA total

A Figura 22 mostra a eletroforese de RNA total extraído de folhas de plântulas de *Vigna unguiculata* submetidas a diferentes condições de estresses: (1) controle, (2) NaCl 100 mM, (3) H₂O₂ 1 mM e (4) PEG 200,67 g/L.

A eletroforese do RNA total de folhas revelou a presença de três bandas principais correspondendo aos RNAs ribossômicos (rRNAs) 25S, 18S e 16S. A relação de absorbância A_{260}/A_{280} , que avalia a pureza do ácido nucléico isolado, apresentou valores entre 1,8 e 2,0 para todos os RNAs extraídos (dados não mostrados).

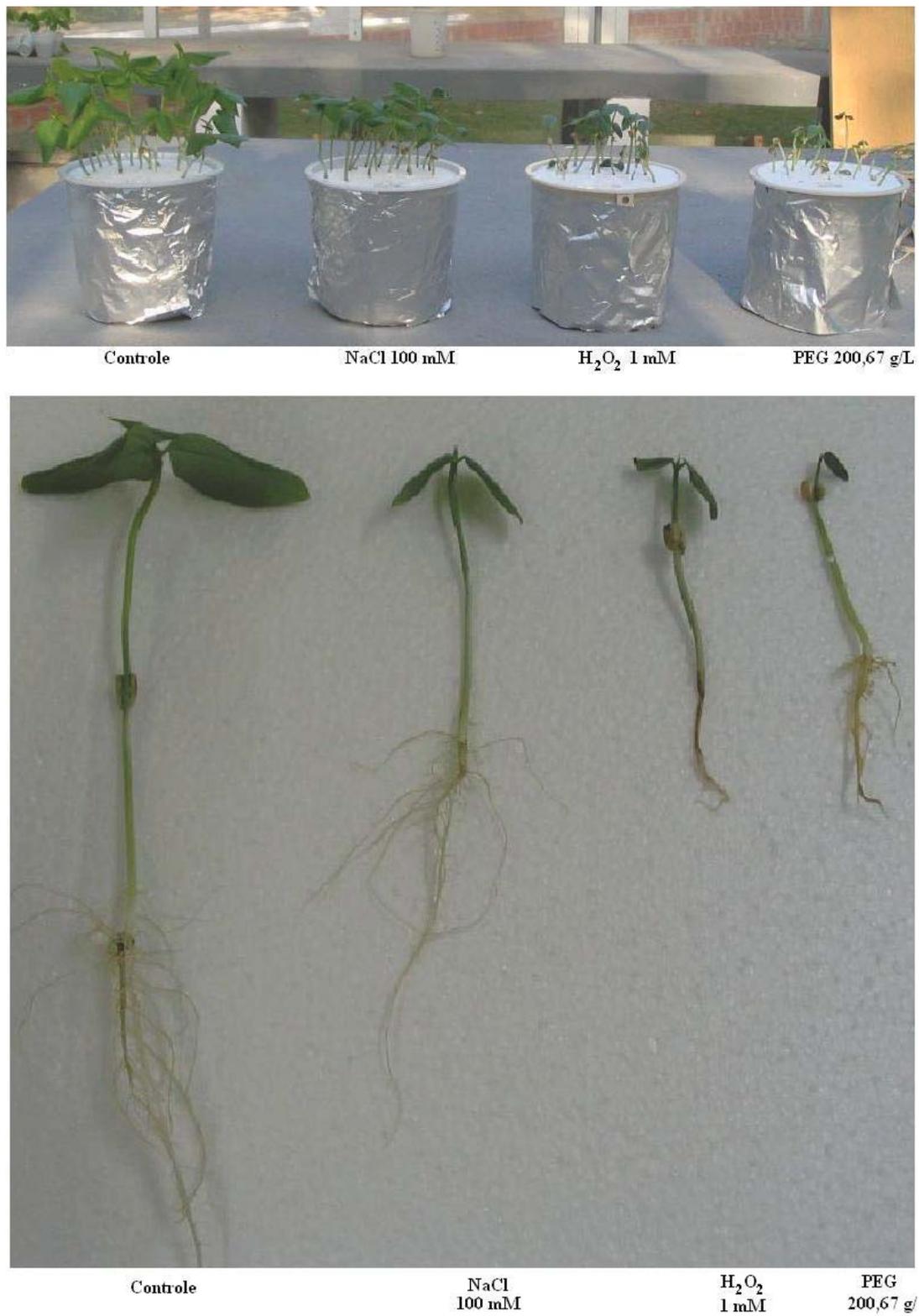


Figura 21 – Plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 submetidas a diferentes estresses abióticos após 3 dias de germinação e 7 dias de desenvolvimento.

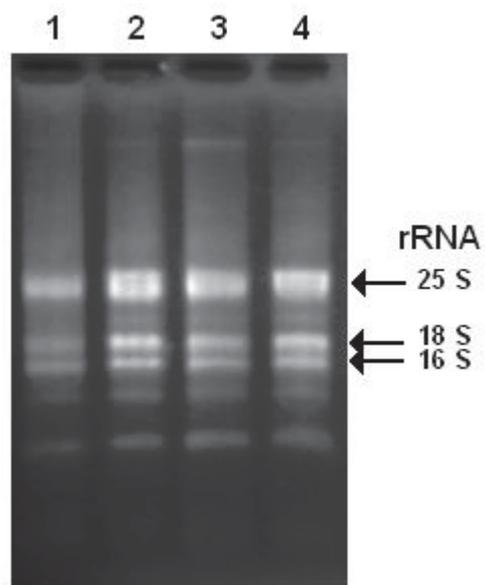


Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de RNA total isolado de folhas de *Vigna unguiculata* nas condições: 1) controle, (2) NaCl 100 mM, (3) H₂O₂ 1 mM e (4) PEG 200,67 g/L .

Expressão de gene(s) da pUCP em folhas de *Vigna unguiculata*

Empregando os primers degenerados, a acumulação de transcritos da *pUCP* foi analisada em *V. unguiculata* cv. Vita 5, através de RT-PCR (Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da DNA Polimerase) usando-se primers degenerados da pUCP (pump1/pump2) e RNA total extraído de folhas nas condições controle (1), NaCl 100 mM (2), H₂O₂ 1mM (3) e PEG 200,67 g/L (4). Os ensaios foram realizados usando-se Actina como controle constitutivo a fim de obter uma análise semiquantitativa de transcritos da pUCP (Figura 23).

Os resultados de RT-PCR revelaram a amplificação de um fragmento de cDNA de tamanho molecular esperado de 760 pb em todas as condições testadas. Conforme pode ser observado na Figura 23, não houve diferença aparente nas quantidades de transcritos de folhas estressadas por H₂O₂ 1 mM (3) e PEG 200,67 g/L (4) em relação à condição controle (1). Por outro lado, a condição NaCl 100 mM (2) apresentou leve aumento no nível de transcritos.

Clonagem e sequenciamento de gene (s) da pUCP de folhas de *Vigna unguiculata*

Purificação do produto de RT-PCR

O produto de RT-PCR obtido da condição de estresse oxidativo (H₂O₂ 1mM) foi escolhido para clonagem e seqüenciamento a fim de se verificar se o mesmo codificava pUCP em *V. unguiculata*. O fragmento foi purificado do gel de agarose usando-se QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) (Figura 24).

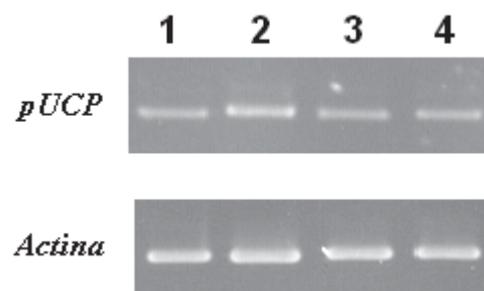


Figura 23 – Análise dos transcritos da pUCP em folhas de *Vigna unguiculata* sob condições de estresses abióticos: 1 - controle; 2 - NaCl 100 mM; 3 - H₂O₂ 1 mM e 4 - PEG 200,67 g/L. Actina foi utilizada como controle constitutivo.

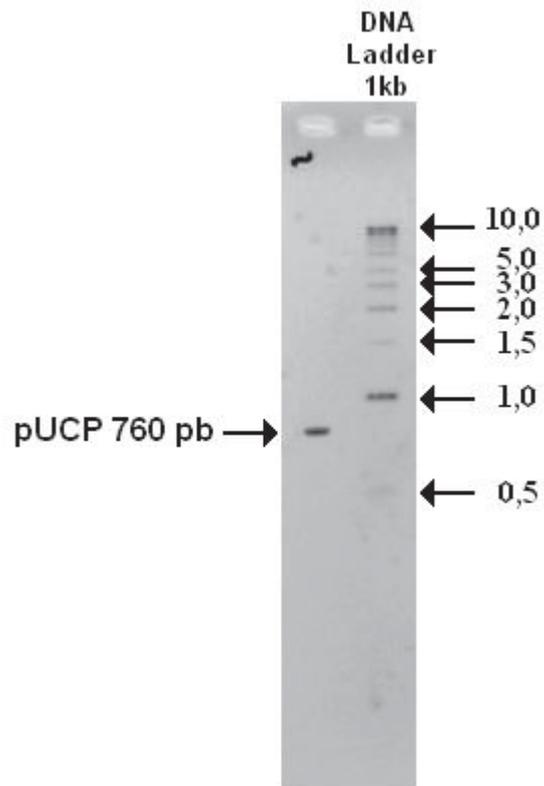


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 1,5 % do produto de amplificação da pUCP purificado.

PCR em colônia

O fragmento de cDNA purificado foi clonado no vetor plasmídeo pCR®4-TOPO® (Invitrogen) e os clones positivos foram identificados através de PCR em colônia usando-se os primers pump1/pump2.

A Figura 25 mostra os sete clones positivos que foram revelados dentre 15 clones testados correspondendo aos poços 4, 5, 6, 11, 12, 13 e 14. Após purificação dos plasmídios e sequenciamento, os referidos clones revelaram um cDNA de 760 bp, com 100% de identidade entre si.

Alinhamento de seqüências e análise filogenética

A Figura 26 mostra um alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos das pUCPs de soja GmUCP1a (AF452027), GmUCP1b (AF452028) com a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA de *Vigna unguiculata* (VuUCP) obtido através do programa Clustal X (Thompson et al. 1997). A seqüência deduzida de aminoácidos da VuUCP apresentou 94% de identidade com a correspondente seqüência de UCP1a e 90% de identidade com UCP1b de soja.

O alinhamento das diferentes seqüências mostra 12 regiões consensuais com pelo menos 6 aminoácidos dispostos nessa ordem: LQLQKQA, TIAREEC, SALWKGIVPGLHRQC, DHVGDVPLSKKILA, ALAVANPTDLVKVRLQAEGKL, PGVPRRYS, GSLNAYSTIVRQEGVGALWTG, GPQIARNGIQAELASYDQVKQTILKIPGETDNVV-THLLAGLGAGFFAVC, GSPVLVVKSRMMGDSSY, KTLKNDGP, AFYKGF, PNFGRL. Nas zonas de consenso estão destacados por barras os 3 sinais de proteínas de transferência de energia (SPTE) (Figura 26).

Usando-se a seqüência de aminoácidos deduzidos, identificada em *V. unguiculata*, bem como de outras 20 proteínas pUCPs, incluindo pUCPs do tipo 1 ao tipo 6, construiu-se uma árvore filogenética da pUCP (Figura 27). Nessa árvore, observa-se que a VuUCP apresenta maior proximidade filogenética com a GmUCP1a do que com a GmUCP1b e também revela que essa proteína está agrupada no mesmo ramo filogenético da AtUCP1 (ou AtPUMP1) de *Arabidopsis*.

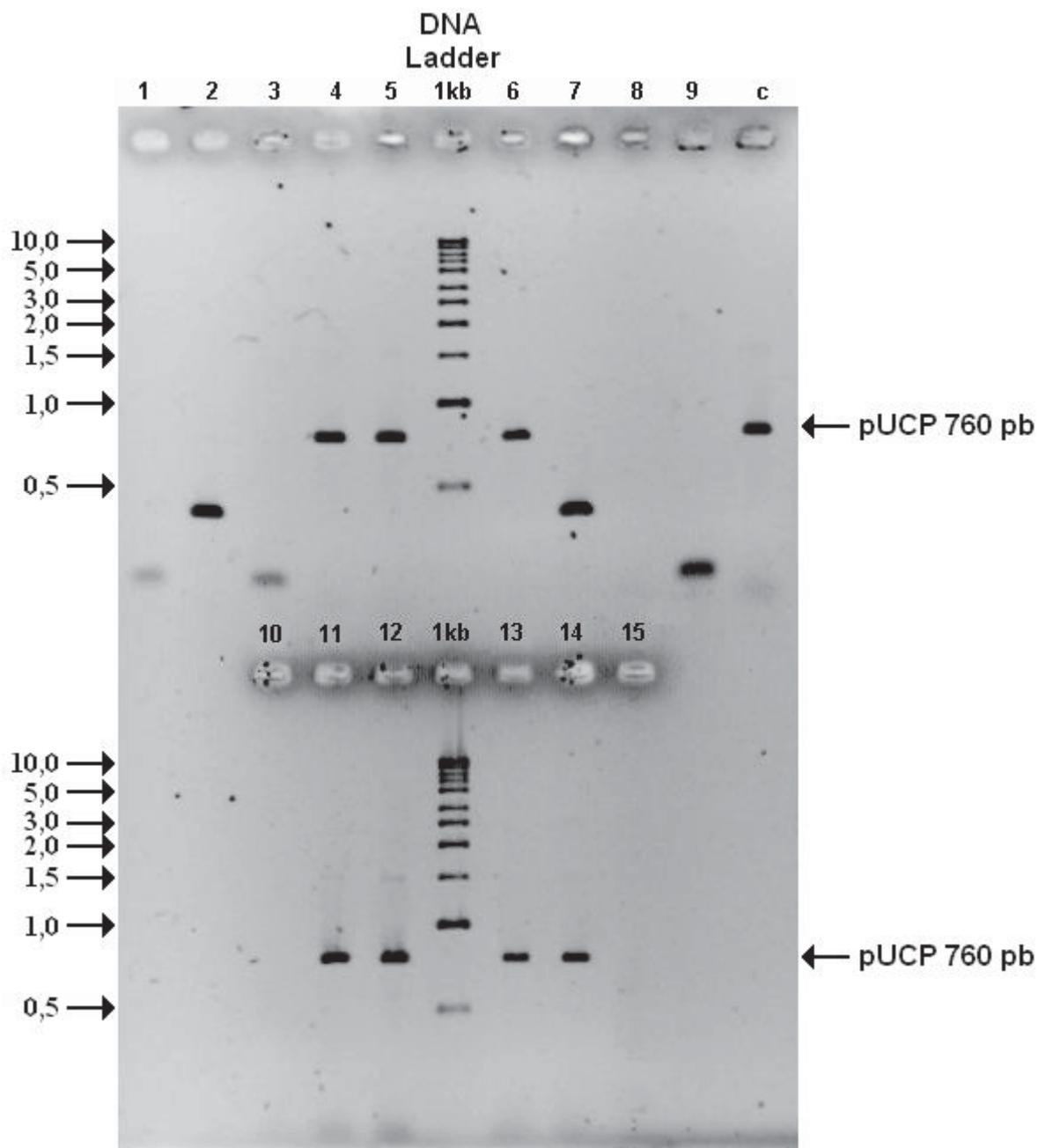


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos clones recombinantes contendo o cDNA amplificado com os primers degenerados Pump1/Pump2 através de PCR em colônia.

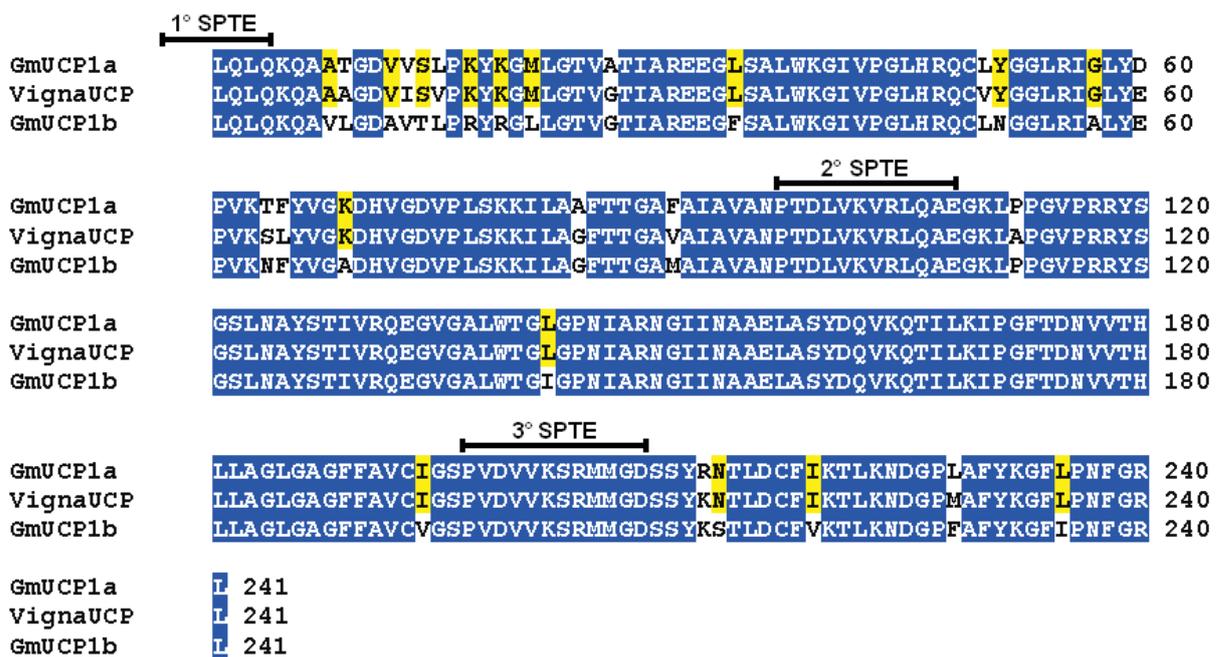


Figura 26 – Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos deduzidos de cDNAs codificando a pUCP de *V. unguiculata* (*VuUCP*) e soja (*GmUCP1a* e *GmUCP1b*) obtido através do programa Clustal X (Thompson *et al.* 1997).

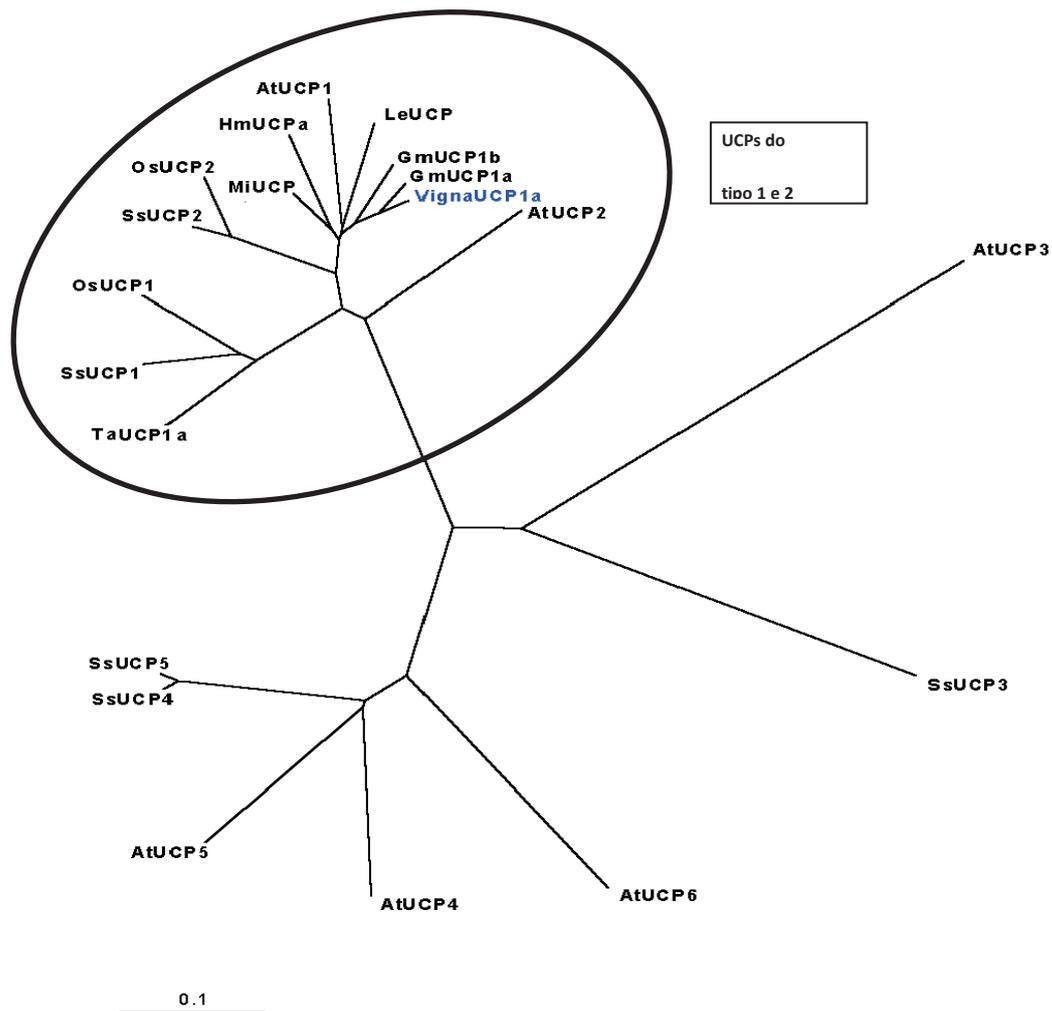


Figura 27 - Árvore filogenética de 19 proteínas deduzidas de seqüências completas de cDNAs alinhadas com a seqüência da *VuUCP1a* construída através do método neighbor-joining do programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). As ramificações estão desenhadas de forma proporcional à distância genética. Os números de acesso às seqüências publicadas no GenBank são mostrados a seguir: *Arabidopsis* AtUCP1 (AJ223983), AtUCP2 (AB021706), AtUCP3 (AK117673), AtUCP4 (NM118590), AtUCP5 (NM_127816), AtUCP6 (NM120984); *Saccharum spp.* SsUCP1 (AY644460), SsUCP2 (AY644461), SsUCP3 (AY644462), SsUCP4 (AY644463), SsUCP5 (AY644464); Arroz OsUCP1 (AB049997), OsUCP2 (AB049998); Tomate LeUCP (AF472619), Soja GmUCP1a (AF452027), GmUCP1b (AF452028); Manga MiUCP (AF329899), HmUCP1a (AB088762) e Trigo TaUCP1a (AB042428).

A pUCP de *Vigna unguiculata* é codificada por uma família multigênica?

A capacidade dos primers pump1/pump2 de amplificar mais de um gene da pUCP foi avaliada através de PCR a partir do DNA genômico.

Isolamento do DNA genômico de *Vigna unguiculata*

A Figura 28 mostra uma eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA genômico extraído de folhas de plantas jovens (4 dias) de *Vigna unguiculata*. A eletroforese revelou uma banda de tamanho molecular aproximado de 23 kpb, calculado em relação ao fragmento do DNA do bacteriófago λ , digerido com a enzima de restrição *Hind* III.

O grau de pureza do DNA foi avaliado através da relação de absorbância A_{260}/A_{280} nm mostrando um valor entre 1,7 e 2,0, indicando DNA de boa qualidade para ser utilizado em reações de PCR (Sambrook *et al.*,1989).

Amplificação dos fragmentos genômicos da pUCP

A Figura 29 mostra a amplificação dos fragmentos genômicos possivelmente codificando pUCP em *Vigna unguiculata*, através de PCR em função de seis diferentes temperaturas de anelamento dos “primers”, que variaram de 38 a 62° C. O perfil eletroforético dos fragmentos amplificados revelou um maior número de bandas nas temperaturas mais baixas (38, 44,5 e 47,9° C) e esse número diminuiu à medida que a temperatura foi aumentada até 62° C. Assim, duas bandas específicas de aproximadamente 1700 e 1900pb foram reveladas nas temperaturas de anelamento de 51,9 e 55,3° C.

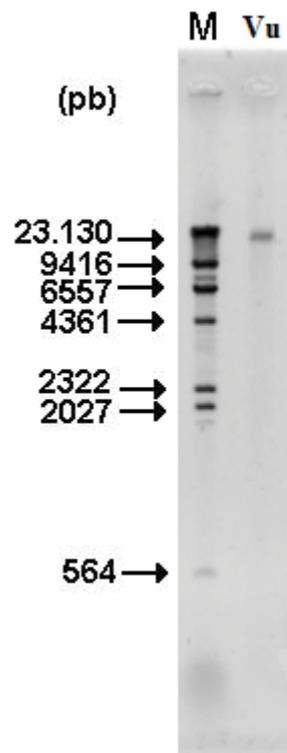


Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose 0,7% do DNA genômico de *V. unguiculata* (Vu). M - DNA do bacteriófago λ digerido com a enzima de restrição *Hind* III.

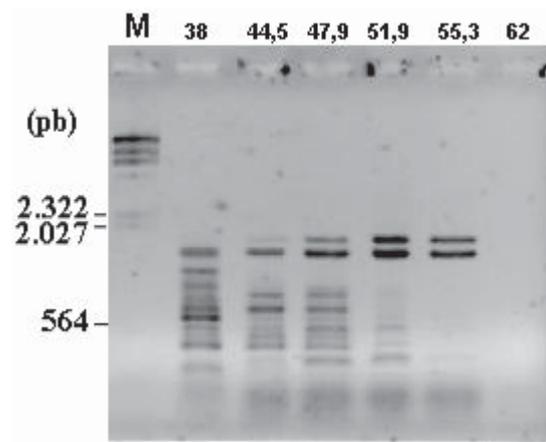


Figura 29 - Eletroforeses em gel de agarose 1,5% dos fragmentos gênicos amplificados usando-se diferentes temperaturas de anelamento (38 a 62° C). M - DNA do bacteriófago λ digerido com a enzima de restrição *Hind* III.

DISCUSSÃO

Um dos principais problemas no estudo das mitocôndrias de plantas é a dificuldade de obtenção de preparações onde as mitocôndrias mantenham suas características morfológicas e bioquímicas após o processo de isolamento. É largamente sabido que o tecido de origem vegetal ao ser homogeneizado para o isolamento das mitocôndrias libera no meio de preparação produtos secundários, na sua maioria, armazenados nos vacúolos, que provocam um considerável efeito sobre a integridade e o funcionamento das mitocôndrias, dependendo do tecido e da metodologia empregada no isolamento (Douce, 1985). Alguns autores afirmam que a variação do pH, a ruptura celular e o acúmulo de compostos danosos são dificuldades apresentadas nos métodos de isolamento da fração mitocondrial de células vegetais (Ikuma, 1970 e Palmer, 1976), sendo muito difícil, se não impossível, que a preparação apresente 100% das mitocôndrias intactas e plenamente funcionais (Douce, 1985). O método empregado no isolamento da fração mitocondrial, conforme descrito em Material e Métodos, mostrou-se, contudo, eficiente, o que pode ser comprovado com o rendimento em proteína mitocondrial, com a qualidade da preparação, avaliada pela integridade da membrana mitocondrial externa (Figura 15) e o grau de acoplamento do transporte de elétrons com o processo de fosforilação e os valores dos controles respiratórios (Figura 16). De acordo com Lima-Júnior (1999), é comum que os valores dos parâmetros da avaliação da preparação mitocondrial de células vegetais sejam inferiores aos obtidos com preparações de células animais, não indicando, porém uma baixa qualidade da fração obtida. A integridade mitocondrial, avaliada pela permeabilidade da membrana ao citocromo c, obtida nas preparações, esteve sempre em torno de 78% e as relações ADP/O foram compatíveis com aquelas apresentadas para tecidos vegetais (Douce, 1985).

A dissipação de energia em mitocôndrias de planta pode ser mediada por dois processos: um sistema dissipador do potencial redox (AOX) e outro dissipador do potencial eletroquímico de prótons (pUCP) (Sluse & Jarmuszkiewicz, 2000; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001; Calegario *et al.*, 2003; Malgorzata & Jarmuszkiewicz, 2005; Borecký & Vercesi, 2005).

Para o estudo da contribuição individual da pUCP no total da respiração mitocondrial é importante entender os diferentes componentes mediadores do fluxo de energia na cadeia transportadora de elétrons em plantas, tais como a via citocrômica, a via alternativa e a própria pUCP (Figura 6). Uma maneira de se estudar cada um desses componentes individualmente é com o uso de inibidores, uma vez que a contribuição de cada um é determinado pela diferença entre o consumo total de oxigênio na ausência e na presença de seus inibidores específicos.

A AOX é insensível aos inibidores da via citocrômica, tais como cianeto, antimicina A e mixotiazol, enquanto é inibida por ácidos hidroxâmicos (como por exemplo o ácido benzohidroxâmico - BHAM) (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001), propil-galato (PG) (Lima-Júnior *et al.*, 2000) e por ácidos graxos (Sluse & Jarmuszkiewicz, 2000).

A pUCP é inibida por nucleotídeos purina, como ATP e GTP (Brand *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2006; Sluse *et al.*, 2006) e pela proteína BSA (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001), sendo ativada por ácidos graxos livres (Ježek *et al.*, 1996; Hourton-Cabassa *et al.*, 2004).

A respiração mitocondrial também é sensível a oligomicina e rotenona que inibem sítios específicos da porção F_0 da F_0F_1 ATP Sintase e complexo I, respectivamente (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001).

A atividade enzimática da pUCP caracterizada em mitocôndrias isoladas de hipocótilos de *Vigna unguiculata*, foi estudada em presença de Propil-galato 0,1 mM, ATP 170 μ M, rotenona 5 μ M (succinato como substrato) e oligomicina 2,5 μ M/mg de proteína. Portanto, o bloqueio de diferentes componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais por inibidores específicos, possibilita a avaliação da pUCP pela estimulação por diferentes ácidos graxos e inibição por BSA.

As Figuras 17 e 18 mostram um aumento na atividade enzimática da pUCP, medida através do consumo de oxigênio, após a adição de ácido linoléico 10 μ M. Essa ativação, por parte da adição de um ácido graxo livre, chegou a representar 54% de estímulo tendo succinato como substrato, ou de 50% com malato/glutamato como substrato, estando esses dados em concordância com trabalhos de diversos autores, que

observaram uma atividade mais eficiente da pUCP por ácidos graxos insaturados, dentre eles o ácido linoléico (Borecký *et al.*, 2001a; Borecký & Vercesi, 2005).

A pUCP mostrou ser ativada por ácido linoléico em estudos com mitocôndrias de tubérculos de batata (Vercesi *et al.*, 2001, 2006), fruto verde de tomate (Sluse *et al.*, 1998; Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998 e 2001), bem como em outras espécies incluindo protozoários (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999) e fungos (Tudella *et al.*, 2003; Cavalheiro *et al.*, 2004).

A adição de BSA após a de ácido linoléico, produziu uma inibição da atividade da pUCP em pH 7,2, alcançando-se um valor de 13% com succinato como substrato e 27% de inibição com malato como substrato. Segundo Jarmuszkiewicz *et al.*, (1998), mitocôndrias isoladas cujo propósito é estabelecer a contribuição individual da pUCP na respiração mitocondrial, devem apresentar capacidade de restabelecer os valores da taxa respiratória original após a adição de BSA 0,5% evidenciando uma preparação mitocondrial livre de ácidos graxos livres. Portanto, as taxas de consumo de oxigênio semelhantes antes da adição de ácido linoléico e após a adição de BSA confirmam a ausência de ácidos graxos livres endógenos na suspensão mitocondrial. Visto que a adição de ácido linoléico estimulou o consumo de oxigênio, podemos inferir uma suspensão mitocondrial parcialmente livre de ácidos graxos livres. Isso pode ser constatado devido à inibição após a adição de BSA ter sido em média menor que o estímulo prévio por adição de ácido linoléico. A adição subsequente de cianeto de potássio (KCN) bloqueou a respiração. Nenhuma respiração residual foi observada na presença de ambos, propil-galato e KCN (Figuras 17, 18 e 19).

Comparando-se a ativação da pUCP por diferentes ácidos graxos, dentre eles ácido palmítico, ácido mirístico, ácido láurico, além do ácido linoléico (Figura 20), constata-se que a maior atividade foi evidenciada para o ácido linoléico. Esses dados encontram-se em concordância com os trabalhos de Vercesi *et al.*, (2006), que mostraram maior atividade desse ácido graxo devido sua natureza insaturada, em comparação aos outros ácidos graxos, que são saturados.

Os valores de estímulo por ácido linoléico variaram em função do substrato utilizado e do pH do meio de reação (Figura 19)

Em relação aos diferentes pHs testados, tendo tanto succinato como malato como substratos oxidáveis, não houve estímulo da atividade enzimática da pUCP em pH 6,5. Segundo Lima Júnior *et al.* (2000), com base em levantamento de dados realizados por Elthon & McIntosh (1986), mostraram que a AOX solubilizada de *S. guttatum* apresentava maior atividade em pH 6,8 e Elthon *et al.*, (1986) observaram também um leve efeito, com pH ótimo entre 6,4 e 6,8, sobre a AOX extraída de *V. radiata*. Segundo dados do próprio Lima Júnior *et al.*, (2000), observou-se que a atividade da AOX era influenciada pelo pH atingindo valor máximo no pH 6,25, na ausência de α -cetoácidos, decrescendo de modo acentuado com a alcalinização do meio. Por outro lado, Vercesi *et al.* (2006) afirmam que a pUCP apresenta atividade máxima em pH próximo da neutralidade. Como esses dois sistemas dissipadores de energia (AOX e pUCP) atuam levando ao mesmo efeito final, isto é, diminuição da síntese de ATP (Sluse & Jarmuszkiewicz, 2000; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2001; Borecký & Vercesi, 2005), elaborase um questionamento: Por que as plantas necessitam de dois sistemas dissipadores de energia com funções fisiológicas aparentemente similares?

De acordo com Jarmuszkiewicz *et al.* (2001) estes sistemas não trabalham nas suas capacidades máximas simultaneamente, desde que um aumento na concentração do ácido linoléico bloqueia a atividade da AOX, enquanto que ativa a pUCP. Além disso, estudos de expressão da AOX e pUCP relacionados à ativação desses sistemas desacopladores durante os processos de amadurecimento de frutos de tomate (Sluse & Jarmuszkiewicz, 2000; Almeida *et al.*, 2002) ou manga (Considine *et al.*, 2001), mostraram que AOX e pUCP podem trabalhar seqüencialmente durante os estágios de amadurecimento. Portanto, considerando a regulação existente entre os dois sistemas dissipadores de energia, AOX e pUCP, a melhor ativação da pUCP de hipocótilos de *Vigna unguiculata* em pH 7,2-7,8, em comparação com a ausência de estímulo em pH 6,5, onde a AOX é mais ativa, está de acordo com o fato de que ambos os sistemas não trabalham com suas capacidades máximas simultaneamente (Figuras 17, 18 e 19).

A segunda parte do trabalho consistiu em uma abordagem molecular da pUCP de *V. unguiculata* compreendendo a identificação de genes e análise de expressão em condições de estresses abióticos. Essa abordagem teve como etapa essencial o desenho de primers degenerados que foi fundamentado nas regiões conservadas de aminoácidos “PLDTAKVRLQLQ (N-terminal)” e “IMFLTLEQ (Carboxila terminal)” de 10 diferentes pUCPs dos tipos 1 e 2. Embora a região PLDTAKVRLQLQ, seja

reconhecidamente, uma das variantes dos três sinais SPTE (Sinal Protéico de Transferência de Energia) presentes em todas as proteínas desacopladoras (Borecký *et al.*, 2006), a região IMFLTLEQ é encontrada apenas nas pUCPs dos tipos 1 e 2 sugerindo que os referidos primers apresentam especificidade para reconhecer apenas pUCPs dos tipos 1 e 2 em *Vigna unguiculata*.

A expressão gênica de VuUCP1a analisada através de RT-PCR semiquantitativa não revelou diferenças entre as condições H₂O₂ 1 mM e PEG 200,67 g/L em comparação com a condição controle, contrastando com um aumento na quantidade de transcritos na condição de NaCl 100 mM (Figura 23).

Apesar da expressão de VuUCP1a não ter sido induzida pelos estresses causados por H₂O₂ e PEG, trabalhos realizados com *Arabidopsis*, a partir de perfil de expressão em larga escala, revelaram que a expressão de algumas isoformas da pUCP é modulada por diferentes estímulos ambientais, com regulação dependente de estresse (Desikan *et al.*, 2001; Kowaltowski & Vercesi, 1999; Seki *et al.*, 2002a, 2002b). Vercesi *et al.*, (2006), afirmam que alguns genes PUMP (pUCP) apresentam regulação positiva quando as plantas ficam expostas aos agentes geradores de estresse oxidativo, assim como, H₂O₂ ou menadiona”. Em estudos com milho, a expressão do gene *ZmPUMP* permanece inalterada quando expostas ao frio, mas é aumentada em resposta a estresses oxidativos (Brandalise *et al.*, 2003a). Estudos com um desses genes em *Arabidopsis*, o *AtPUMPI* (AtUCP1) revelaram indução por vários estresses abióticos, dentre eles estresse hídrico (seca) e salino (Kreps *et al.*, 2002). Diante desses perfis de expressão da pUCP, a seguinte hipótese pode ser levantada para explicar o fato da expressão da pUCP não ter sido alterada em folhas de *V. unguiculata*: Apenas um gene *UCP* foi detectado em folhas usando os primers degenerados pump1/pump2 e, portanto, esse gene pode não ser induzido por esses estresses, contudo será ainda necessário avaliar diferentes tempos de expressão e ou concentrações dos agentes causadores dos estresses para confirmar essa hipótese.

A expressão da pUCP em condições de estresse salino mostrou-se discretamente mais elevada em comparação aos outros tipos de estresses abióticos estudados estando em concordância com a expressão do gene *AtUCP1* em *Arabidopsis* que é induzida pelo estresse salino (Seki *et al.*, 2002b). Esse resultado também corrobora com a indução do

gene *VuAox2b* sob estresse salino que demonstrou ter uma expressão retardada no cultivar Vita 5 em relação ao cultivar Vita 3 (Costa *et al.* 2006).

Os resultados de expressão de RT-PCR foram validados, em relação à especificidade dos primers para genes *UCP*, após clonagem e seqüenciamento do fragmento de cDNA obtido da condição de estresse oxidativo (H_2O_2 1mM). Sete clones positivos para pUCP apresentaram um cDNA de 760 bp que foram 100% idênticos entre si, sugerindo que os primers foram capazes de reconhecer pelo menos um gene *UCP* em folhas de *V. unguiculata* sob estresse oxidativo. A seqüência de aminoácidos deduzidos do fragmento de cDNA revelou 94% de identidade com a seqüência de GmUCP1a (AF452027) e 90% de identidade com GmUCP1b (AF452028) de soja (Figura 26). A alta identidade com as proteínas UCP de soja foi confirmada através da árvore filogenética da pUCP contendo 20 outras proteínas de várias espécies (Figura 27). A proteína deduzida de *V. unguiculata* apresentou maior proximidade filogenética com a proteína GmUCP1a de soja sugerindo que o gene codante dessa proteína em *V. unguiculata* seja ortólogo ao gene *GmUCP1a* em soja.

Soja e *V. unguiculata* são plantas proximamente relacionadas pertencentes à ordem Fabales e a família Fabaceae justificando, assim, a alta identidade entre os genes podendo inclusive haver conservação no número de genes de uma família multigênica entre as duas espécies. Nesse contexto, Costa *et al.* (2004) identificaram em *Vigna unguiculata* dois genes AOX do tipo 2 (*VuAox2a* e *VuAox2b*), que foram ortólogos aos genes AOX do tipo 2 de soja (*GmAox2a* e *GmAox2b*). Posteriormente, um gene Aox do tipo 1 (*VuAox1*) em *V. unguiculata* também revelou ser ortólogo ao gene Aox1 (*GmAox1*) em soja (Costa *et al.*, 2004). Assim, o cDNA identificado em *Vigna unguiculata*, por ser ortólogo ao gene *GmUCP1a* será denominado de *VuUCP1a*.

Considerando que os genes parálogos da UCP, isto é, genes da UCP dentro de uma mesma espécie, geralmente apresentam variação no tamanho de íntrons (Figura 9) verificou-se a capacidade dos primers degenerados pump1/pump2 de amplificar diferentes fragmentos gênicos através de PCR. Os primers pump1 e pump2 se anelam em seqüências dos exons 2 e 8, respectivamente, envolvendo 6 íntrons em relação aos genes *pUCP* dos tipos 1 e 2 (Figura 30). Assim, duas bandas específicas referentes a dois fragmentos gênicos de tamanhos diferentes (aproximadamente 1700 e 1900 pb) foram amplificadas (Figura 29), sugerindo a existência de pelo menos 2 genes da pUCP

em *V. unguiculata*. Curiosamente esses fragmentos foram muito semelhantes em tamanho aos fragmentos gênicos *GmUCP1a* (1888 pb) e *GmUCP1b* (2082 pb) de soja encontrados no Genbank sob números de acesso, AF452027 , AF452028, respectivamente.

Várias espécies de plantas mostraram a existência de famílias multigênicas de até 6 membros revelando 5 genes em arroz (*OsPUMP1-5*), 6 genes em *Arabidopsis* (*AtPUMP1-6*) e 5 genes em cana-de-açúcar (*SsPUMP1-5*) (Nogueira et al., 2005; Vercesi et al., 2006; Borecký & Vercesi et al., 2006). Em outras espécies, apenas 2 ou 3 genes foram caracterizados (Hourton-Cabassa *et al.*, 2004).

A divergência entre os diferentes grupos de pUCPs (Figura 27) deve necessitar de diferentes primers degenerados para a identificação de cada grupo por PCR. A caracterização da família multigênica da pUCP em *V. unguiculata* ajudará a esclarecer a função dessa proteína desacopladora, tornando possível estabelecer correlações com a expressão da família multigênica da AOX, já caracterizada em *V. unguiculata*.

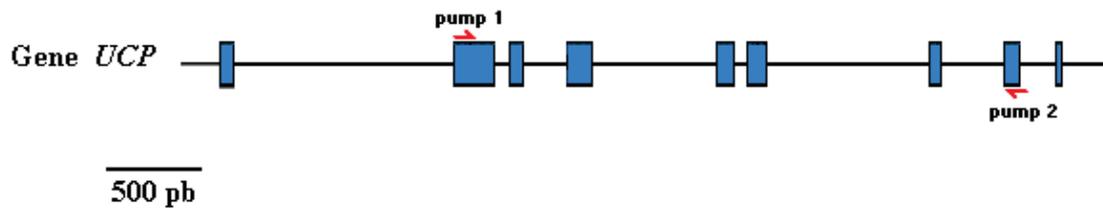


Figura 30 - Esquema representativo da estrutura gênica de VuUCP1a mostrando as posições dos oligonucleotídeos deduzidos. Os retângulos em azul indicam os éxons e os espaços entre esses retângulos representam os íntrons. A posição dos oligonucleotídeos da PUMP (pUCP) foi estimada em relação aos genes de *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis* e Arroz pUCP1 e 2 (AJ002586, Y18291; AB49997, AB49998).

CONCLUSÃO

- Uma caracterização parcial da atividade enzimática da pUCP foi realizada em mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata*, através do estímulo do consumo de oxigênio, em nátomos de $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, tendo ácido linoléico como ativador e BSA como inibidor dessa atividade;

- O ácido linoléico foi o ácido graxo livre que apresentou os maiores estímulos nas taxas de consumo de O_2 , como consequência da ativação da pUCP de hipocótilos de *Vigna unguiculata*;

-As maiores atividades da pUCP de *V. unguiculata*, através do consumo de O_2 , foram verificadas em pHs 7,2 e pH 7,8, observando-se que em pH 6,5, uma fraca ou inexistente atividade foi detectada;

- Um cDNA denominado VuUCP1a de aproximadamente 760 pb foi amplificado por RT-PCR, clonado e seqüenciado, apresentando 94% de homologia com o gene UCP1a e 90% de homologia com o gene UCP1b de soja, sugerindo que o gene VuUCP1a é ortólogo ao gene GmUCP1a de soja.

-Dois fragmentos de tamanhos diferentes, 1700 e 1900 pb foram amplificados por PCR de DNA genômico, sugerindo a existência de pelo menos dois genes pUCPs em *Vigna unguiculata* e que a pUCP é possivelmente codificada por uma família multigênica nessa espécie;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ARGYROPOULOS, G.; HARPER, M.E. Invited review: uncoupling proteins and thermoregulation. *A. Appl.Physiol.* vol. 92, p. 2187-98, 2002;

BORECKÝ, J., MAIA, I.G., ARRUDA, P. Mitochondrial Uncoupling in Mammals and Plants. *Biosc. Rep.*, vol. 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.

BOUILLAUD, F.; Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein *Proc Natl Acad Sci* v. 82(2), p. 445-8, 1985.

BOUILLAUD, F.; COUPLAN, E.; PECQUEUR, C.; RICQUIER, D. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1504: p. 107-119, 2001.

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.

CALEGARIO, F.F.; COSSO, R.G.; FAGIAN, M.M.; ALMEIDA, F.V.; JARDIM, W. F.; Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and Alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* v. 35, p. 211-20, 2003.

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

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.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain oxidase phosphorylation. *Adv. Enz. Nord. F.F. Interscience*, v. 77, p. 65-134, 1956.

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.

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.* In Press, 2006.

CROFTS, A. R. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* v. 66, p 689-733, 2004.

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.

DOUCE, R. Mitochondria in higher plants. *Structure, function and biogenesis*. New York. Academic, 1985.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* v. 19, p. 11-15, 1987.

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.; 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.; 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.; 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.

ELMOUALIJ, B.; DUYCKAERTS, C.; LAMOTTE-BRAUSSEUR, J.; SLUSE, F.E. Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. v. 13, p. 573-581, 1997.

ELTHON, T.E. STEWART, C.R.; McCOY, C.A. BONNER, J.R., W.D. Alternative respiratory path capacity in plant mitochondria: effect of growth temperature, the electrochemical gradient, and assay pH. *Plant Physiol.* v. 80, pp. 378-383, 1986.

ELTHON, T.E.; McINTOSH, L. Characterization and solubilization of the alternative oxidase from *Sauromatum guttatum* mitochondria. *Plant Physiol.* v. 82, p. 1-6, 1986.

FERNANDES DE MELO, D. Estudo da atividade respiratória, da fosforilação oxidativa e da translocação de nucleotídeos da adenina em mitocôndrias de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Dissertação de mestrado em Bioquímica, Depto Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, Ceará, 1978.

GARLID, K.D.; OROSZ, D.E., MODRIANSKÝ, M. VASSANELLI, S.; JEŽEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* v. 270, p. 2615-20, 1996.

GOGLIA, F.; & SKULACHEV, V.P. A function for novel uncoupling protein antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.* v. 17, p. 1585-91, 2003.

GORNALL, A.G. BARDAWILL, C.J.; DAVID, M. Determination of serum proteins by means of biuret reagent. *J. Biol. Chem.* v. 177, p. 751-766, 1949.

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. 827-34, 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.

IKUMA, H. Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. *Plant. Physiol.* v. 45, p. 773-781, 1970.

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. Exop. Bot.* v. 54, p. 1113-14, 2003.

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 sketetal 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.; ALMEIDA, A.M.; SLUDE-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.; 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. Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* v. 31, p. 457-466, 1999.

JEŽEK, P. GARLID, K.D. New substrates and competitive inhibitors of the Cl⁻ translocating pathway of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *J. Biol. Chem.* v.. 265, p. 19303-11, 1990.

JEZEK, P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins —UCPn. *The intern. J. Biochem. & Cell Biol.*, v. 34, p. 1190-1206, 2002.

JEZEK, P., BORECKÝ, J., ZÁCKOVÁ, M., COSTA, A.D.T., ARRUDA, P. Possible Basic and specific Functions of Plant Uncoupling Proteins (pUCP). *Biosc. Rep.*, v. 21, n° 2, 2001.

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.

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

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

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* v. 26, p. 463-71, 1999.

KREPS, J. A.; WU, Y.; CHANG, H.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J. F. Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stres. *Plant Physiology*, v. 130, pp. 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.

LEACH, G.R. KRAB, K.; WHITEHOUSE, D.G.; MOORE, A.L. Kinetic analysis of the mitochondrial quinol-oxidizing enzymes during development of thermogenesis in *Arum maculatum L.* *Biochem. J.* v. 317, p. 313-19, 1996.

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

LIMA-JUNIOR, 1999. Via alternativa de transporte de elétrons em mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5: modulação pelo pH, pelo piruvato e pelo succinato. Tese de Doutorado, Depto Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, Ceará, 1999.

LIMA-JÚNIOR, A.; FERNANDES DE MELO, D.; COSTA, J. H. ; ORELLANO, E. G.; JOLIVET, Y.; JARMUSZKIEWICZ, W. SLUSE, F.; DIZENGREMELC, P.; SILVA LIMA, M. G. Effect of pH on CN-resistant respiratory activity and regulation on *Vigna unguiculata* mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* V. 38, pp. 765–771, 2000.

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.

MALGORZATA, C.; JARMUSZKIEWICZ, W. Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria *FEBS Lett.* v.579, 3136-3140, 2005.

McINTOSH, L. Molecular Biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* v. 105, p. 781-6, 1994.

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

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.

NEUBURGER, M.; JOURNET, E.P.; BLIGNY, R.; CARDE, J.P.; DOUCE, R. Purification of plant mitochondria by isotropic centrifugation in density gradients of percol. *Arch. Biochem.* v. 217, p. 312-323, 1982.

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.

PALMER, J.M. The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Ann. rev. Plant. Physiol.* v. 27, p. 133-57, 1976.

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. Commum.* v. 73, p. 577-83, 1976.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SAVIANI, E.E.; DA SILVA, A. Jr.; MARTINS, I.S. Photoaffinity labelling of the uncoupling protein from potato tuber mitochondria. *Plant. Physiol. Biochem.* v. 35, p. 701-3, 1997.

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.

SILVA LIMA, M.; DENSLOW, N.D.; MELO, D.F. Atractyloside in mitochondria from hypocotyls of *Vigna sinensis* cv. seridó. *Physiol. Plant.* v. 41, p. 193-195, 1977.

SKULACHEV, V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS. Lett.* V. 294, p. 158-62, 1991.

SLUSE, F.E., JARMUSZKIEWICZ, 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., 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.

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.

SWEETLOVE, L. J.; LYTOVCHENKO, A.; MORGAN, M. ; NUNES-NESI, 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 genes expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. J.* v. 30, p. 431-46, 2002.

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.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analyses tools. *Nucleic Acids Res.* v.. 25, p. 4876-4882, 1997.

TUDELLA, V.G.; CURTI, C.; SORIANI, F.M.; SANTOS, A.C.; UYEMURA, S.A. In situ evidence of na alternative oxidase and and uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biochem. Cel. Biol.* v. 36, p. 132-72, 2003.

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.

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.; 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.

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.; The Discovery of an Uncoupling Mitochondrial Protein in Plants. *Bioscience Reports*, v. 21, p. 195-200, 2001.

VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae Papilionoideae for the Flora of Tropical East Africa. IV. *Kew Bulletin*, v. 24, p. 507-569, 1970.

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.

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 thaliana* plants. *Plant J.* v. 33, pp. 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. 2508-15, 1994.

YU, X.X., MAO, W., ZHONG, A., SCHOW, P. BRUSH, J., SHERWOOD, S.W. ADAMS, S.H., PAN, G. Characterization de uma isoforma de UCP/BMUCP1 e regulação diferencial de expressão da UCP4 e UCP5 através de manipulação por dieta ou manipulação da temperatura. *FASEB J.*, v. 14, p. 1611-1618, 2000.

