

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

VIA ALTERNATIVA DE TRANSPORTE DE
ELÉTRONS EM MITOCÔNDRIAS DE *Vigna*
unguiculata (L.) Walp cv VITA 5:
MODULAÇÃO PELO pH, PELO PIRUVATO E
PELO SUCCINATO

ADEILDO ROSA DE LIMA JÚNIOR

N. Cham.: T 574.192 L696v
Autor: Lima Júnior, Adeildo Rosa d
Título: Via alternativa de transporte de



1128906 Ac. 36432

BCT

ORTALEZA - CEARÁ

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

ADEILDO ROSA DE LIMA JÚNIOR

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de pós-graduação em Bioquímica
da Universidade Federal do Ceará, para a
obtenção do Título de Doutor em
Bioquímica, área de concentração em
Bioquímica Vegetal

UFC/BU/BCT 02/07/1999



R1128906 Via alternativa de transporte de
C544132 eletron
T574.192 L696v

FORTALEZA – CEARÁ
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

ADEILDO ROSA DE LIMA JÚNIOR
ENGENHEIRO FLORESTAL

ORIENTADORA : Prof^a. Dr^a. Maria da Guia Silva Lima

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA, 1999

Cod. Cat: C544132

R1128906

T574.192

L696v

Lima Júnior, Adeildo Rosa de
L689v Via alternativa de transporte de elétrons em
1999 mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv
Vita 5: modulação pelo pH, pelo piruvato e pelo
succinato. /Adeildo Rosa de Lima Júnior. —
Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/Centro
de Ciências / Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, 1999.

93 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Ceará - Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular.

1. Mitocôndrias vegetais. 2. Via Alternativa.
3. Modulação pelo pH. 4. *Vigna unguiculata*.
I. Título.

CDD 574.192

Esta tese foi apresentada, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese será permitido desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Adeildo Rosa de Lima Júnior

TESE APROVADA EM : 10 de junho de 1999

Dr^a. Maria da Guia Silva Lima
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientadora

Dr^a Elena Graciela Orellano
Dept^o. de Ciências Biológicas
Universidade Nacional de Rosario
Conselheiro

Dr. Anibal E. Vercesi
Depto. de Patologia Clínica
Universidade Estadual de Campinas
Conselheiro

Dr^a. Dirce Fernandes de Melo
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dr. Fernando Monteiro de Paula
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

*A minha avó
Maria José de Almeida Guerra
(in memoriam).*

A Elenildes, Daniela e Cecília.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dr^ª. Maria da Guia Silva Lima, não apenas pela valiosa orientação, confiança e apoio na realização deste trabalho, mas também, e, principalmente, por possibilitar-me conviver, admirar e aprender, com a força, a garra, a coragem e a determinação de uma mulher impar.

A Prof^ª. Dr^ª. Dirce Fernandes de Melo, pela valiosa co-orientação deste trabalho expressa nas críticas, sugestões e apoio na elaboração e execução da fase experimental e durante a redação da tese.

A Prof^ª. Dr^ª. Elena Graciela Orellano, pela ajuda recebida no período de experimentação e pela cuidadosa crítica na fase de redação da tese.

Ao Dr. Francis Sluse, pela contribuição na construção do modelo de ativação da AOX.

Ao companheiro José Hélio da Costa, pela imprescindível ajuda na execução de toda parte prática deste trabalho e na análise e discussão dos resultados além da amizade e apoio constantes.

Aos camaradas Roberto Cesar Lobo da Costa, Vicente de Paulo Pinto, Dárlis Teixeira, Nádia Acioli, Hélio Cabral, Ana Maria, Ivone e Ricardo Viegas pela grande amizade e agradável convivência durante o curso.

Aos professores Benildo Cavada, Joaquim Albenísio, José Tadeu e Márcio Viana pelo apoio e amizade.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da UFPB, especialmente a Prof^ª. Sônia Correia e ao Prof. Vicente Queiroga Neto, pelo apoio para a realização desse curso.

Aos colegas de curso e de laboratório Isabel, Maria de Lourdes, Desirée, Pedro Isabela e Rosa, pelo companheirismo e amizade cultivados ao longo desse tempo.

Ao amigo de todas as horas, Marcos Vieira Nunes.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Laboratório de Oxidações Biológicas e à Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por intermédio do Programa Institucional de Capacitação de Docentes e Técnicos (PICDT), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Projeto nº 242/98-1 CAPES/COFECUB, pela oportunidade de realização de etapas experimentais desse trabalho e por ter possibilitado frutíferas discussões do tema.

À Universidade de Rosário, Argentina, na pessoa da Prof^a Dr^a Elena Graciella Orellano.

SUMÁRIO

| Conteúdo | Páginas |
|---|---------|
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | xv |
| ABREVIATURAS | xvi |
| RESUMO | xvii |
| ABSTRACT | xix |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| Genes e Expressão Genética da AOX..... | 2 |
| Estrutura da Proteína de AOX..... | 5 |
| Controle da Via Alternativa..... | 8 |
| Controle Metabólico da Atividade da AOX | 9 |
| 1 - O estado de redução do "pool" de ubiquinonas..... | 11 |
| 2 - O estado de redução da enzima AOX..... | 11 |
| 3 - Concentração de ativadores da enzima AOX..... | 13 |
| 4 - Sítio de ligação do piruvato..... | 18 |
| OBJETIVOS | 20 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 1 - Material Vegetal..... | 21 |
| 2 - Extração da Fração Mitocondrial..... | 21 |
| 3 - Determinação da Proteína Mitocondrial..... | 21 |

| | Páginas |
|--|---------|
| 4 - Ensaio Polarográfico..... | 25 |
| 4.1. - Cálculo do Consumo de Oxigênio..... | 25 |
| 4.2. - Cálculo do Controle Respiratório..... | 27 |
| 4.3. - Cálculo da Relação ADP/O | 28 |
| 4.4. - Avaliação da Integridade Mitocondrial..... | 28 |
| 5 - Avaliação da Via Insensível ao CN ⁻ | 29 |
| 6 - Avaliação do Efeito de Piruvato e Succinato..... | 30 |
| 7 - Detecção e Avaliação do Estado Redox da AOX | 30 |
| 7.1.- Eletroforese em Sistema SDS-PAGE..... | 30 |
| 7.1.1. - Preparação das Amostras..... | 30 |
| 7.1.2. - Preparação dos Géis de Poliacrilamida..... | 31 |
| 7.1.3. - Condições de Corrida das Eletroforeses..... | 32 |
| 7.2.- Preparação do "Immunoblotting"..... | 32 |
| 7.3 - Revelação dos "Immunoblotting"..... | 34 |
| RESULTADOS..... | 36 |
| 1 - Caracterização Funcional da Fração Mitocondrial. | 36 |
| 1.1 - Integridade da membrana externa, | 36 |
| 1.2 - Relações ADP/O e C.R. | 36 |
| 2 - Via Cianeto Resistente em Mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. | 42 |
| 3 - Definição do Modelo Experimental de Estudo da Respira- | |

| | |
|---|----|
| ção Resistente ao Cianeto. | 42 |
| 4 - Detecção da AOX e de seus Estados Redox. | 43 |
| 5 - Funcionamento da Via Alternativa de Consumo de Oxigênio Resistente ao Cianeto. | 45 |
| 6 - Influência do pH sobre o Consumo de Oxigênio Resistente ao Cianeto. | 45 |
| 7 - Efeito de Piruvato e Succinato sobre o Consumo de Oxigênio Resistente ao Cianeto. | 51 |
| 8 - Efeito da Reversão do pH do meio sobre o Consumo de Oxigênio Resistente ao Cianeto. | 59 |
| 9 - Efeito da Uniformização do pH do meio e do pH Mitochondrial sobre o Consumo de Oxigênio Resistente ao Cianeto. | 65 |
| DISCUSSÃO..... | 71 |
| Possibilidade de um Papel Fisiológico da Regulação da AOX pelo pH. | 76 |
| CONCLUSÕES..... | 80 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| FIGURA 1 - Esquema dos complexos mitocondriais e do transporte de elétrons em mitocôndrias vegetais. I - Complexo I, NADH desidrogenase; II - Complexo II, Succinato desidrogenase; III - Complexo III, Citocromo <i>bc₁</i> ; IV - Complexo IV, Citocromo oxidase; AOX - Oxidase Alternativa; UQ - Ubiquinona; Cit c - Citocromo <i>c</i> ; Ext - NADH desidrogenase externa; ? - NADH desidrogenase, proposta para plantas; SHAM - Ácido Salicilhidroxâmico (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997) | 3 |
| FIGURA 2 -Esquema de modelo da estrutura da oxidase alternativa na sua forma inativa com os resíduos de cisteína Cis-78 formando uma ponte dissulfeto (S – S). Os círculos vermelho nas hélices do domínio C-terminal representam os átomos de Fe ⁺⁺ . | 7 |
| FIGURA 3 - Mecanismo de regulação da atividade da oxidase alternativa. (SLUSE & JARMUSZKIEWICZ, 1998) | 10 |
| FIGURA 4 -Estimulação da AOX, de mitocôndrias de plantas, por malato e succinato através do fluxo de elétrons do "pool" de quinonas e do metabolismo do piruvato na matriz mitocondrial. SDH - Succinato desidrogenase; AOX - Oxidase alternativa; * - Ativação pelo piruvato. (MILLAR <i>et al.</i> , 1996) | 17 |
| FIGURA 5 - Esquema da ativação da oxidase alternativa por α -cetoácidos. —S—PIR indica o tiohemiacetal —S—COH(R)CO_2^- , onde R= CH ₃ , para o piruvato (RHOADS <i>et al.</i> , 1998). | 19 |
| FIGURA 6 - Esquema de extração e purificação das mitocôndrias de hipocótilos de <i>Vigna unguiculata</i> . | 24 |
| FIGURA 7 - Esquema da cuba de reação e do eletrodo para oxigênio tipo Clark. | 26 |

FIGURA 8 - Esquema da sequência de montagem do conjunto para transferência de proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose. 33

FIGURA 9 - Consumo de oxigênio dependente de ascorbato e citocromo *c* de mitocôndrias, de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 5, purificadas em gradiente de percoll a 28 % . Os números ao longo dos traçados referem-se ao consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹. Nota-se que pelo elevado consumo de O₂ pelas mitocôndrias rompidas que a integridade das mitocôndrias 37

FIGURA 10 - Oxidação do NADH por mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. nos pHs 6,25 (A), 7,25 (B) e 7,75 (C). Os números ao longo dos traçados indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹ nos 2^o e 3^o ciclos de fosforilação. 38

FIGURA 11 - Detecção, através de "immunoblotting", da oxidase alternativa de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, e de seu estado redox em diferentes pHs em ausência e presença de DTT. Mitocôndrias: 100 µg, DTT 2,5 mM. As demais condições estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS. 44

FIGURA 12 - Determinação do consumo de oxigênio resistente ao CN⁻ nos pHs 6,25, 7,25 e 7,75, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, com NADH 1 mM como substrato oxidável em presença de DTT 2,5 mM. A via citocrômica foi inibida com KCN 1 mM. A via cianeto resistente foi inibida com n-propil galato 0,1 mM. Os números ao longo dos traçados indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹. 47

FIGURA 13 - Determinação do consumo de oxigênio resistente à Antimicina A, nos pHs 6,25 , 7,25 e 7,75, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, com NADH 1 mM como substrato oxidável em presença de DTT 2,5 mM. A via citocrômica foi inibida com Antimicina A (AA) 4 μ M. O consumo de oxigênio resistente a Antimicina A foi inibido com n-propil galato 0,1 mM. Os números ao longo dos traçados indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹.

48

FIGURA 14 - Detecção, através de "immunoblotting", da oxidase alternativa de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, e de seu estado redox, com NADH 1 mM, como substrato oxidável, ADP 78 mM e KCN 1 mM, em presença e ausência de DTT 2,5 mM, em diferentes pHs,. Proteínas mitocondriais: 100 μ g. As demais condições estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.

49

FIGURA 15 - Efeito do pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN⁻ em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5. O consumo de oxigênio (nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) foi mensurado no meio de reação com diferentes valores de pHs, com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1 mM.

50

FIGURA 16 - Efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio (nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) resistente ao CN⁻, em presença de DTT, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—●— 6,25; —■—7,25 e —△— 7,75) e com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, ADP 78 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1mM.

52

FIGURA 17 - Efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min) resistente ao CN^- , em ausência de DTT, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—●— 6,25; —■— 7,25 e —△— 7,75) e com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, ADP 78 mM e KCN 1mM.

53

FIGURA 18 - Efeito de diferentes concentrações de succinato sobre o consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) resistente ao CN^- , em presença de DTT, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—●— 6,25; —■— 7,25 e —△— 7,75) e com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, ADP 78 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1mM.

56

FIGURA 19 - Efeito de diferentes concentrações de succinato sobre o consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) resistente ao CN^- , em ausência de DTT, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—●— 6,25; —■— 7,25 e —△— 7,75) e com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, ADP 78 mM, e KCN 1mM.

57

FIGURA 20 - Incremento do consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) resistente ao CN^- induzido por piruvato, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—△— 6,25; —■— 7,25 e —●— 7,75) com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1mM. O gráfico inserido corresponde ao incremento em do consumo de oxigênio resistente ao CN^- em concentrações inferiores a 50 μ M de piruvato.

60

FIGURA 21 - Efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em presença de ADP e em pH 6,25. Mitocôndrias: 1 mg de proteína, NADH 1 mM, DTT 2,5 mM, ADP 78 mM e KCN 1mM. —●— Consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹); —■— Incremento do consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) e, —△— Incremento do consumo de oxigênio em %.

61

FIGURA 22 - Efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em presença de ADP e em pH 7,25. Mitocôndrias: 1 mg de proteína, NADH 1 mM, DTT 2,5 mM, ADP 78 mM e KCN 1mM. —●— Consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹); —■— Incremento do consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) e, —△— Incremento do consumo de oxigênio em %.

62

FIGURA 23 - Efeito de diferentes concentrações piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em presença de ADP e em pH 7,75. Mitocôndrias: 1 mg de proteína, NADH 1 mM, DTT 2,5 mM, ADP 78 mM e KCN 1mM. —●— Consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹); —■— Incremento do consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) e, —△— Incremento do consumo de oxigênio em %.

63

FIGURA 24 - Efeito do pH sobre a estimulação do consumo de oxigênio resistente ao CN^- pelo piruvato 0,5 mM. Mitocôndrias: 1 mg, NADH 1 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1mM. —◆— Consumo de oxigênio resistente ao CN^- (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹); —■— Consumo de oxigênio resistente ao CN^- em presença de piruvato 0,5 mM (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹); —○— Incremento no consumo de oxigênio resistente ao CN^- provocado por piruvato 0,5 mM (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) e; —□— Incremento no consumo de oxigênio resistente ao CN^- provocado por piruvato 0,5 mM em %.

64

FIGURA 25 - Efeito da reversão do pH do meio sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- e sua estimulação por piruvato 0,5 mM. Mitocôndrias: 1 mg, NADH 1 mM e DDT 2,5 mM. A via citocrômica foi inibida com KCN 1 mM e a reversão de pH foi realizada com HCl 0,5 M ou KOH 0,5M. Os números ao longo dos traçados indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ .min⁻¹.

66

FIGURA 26 - Efeito da reversão do pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- e sua estimulação por piruvato 0,5 mM. ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM; ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM (antes da reversão do pH); ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM (após reversão do pH); ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM + PIR 0,5 mM (após reversão do pH); ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM + PIR 0,5 mM (antes da reversão do pH); ↓ - Adição de 25 μL de KOH 0,5 M e ↓ - Adição de 25 μL de HCl 0,5 M.

67

FIGURA 27 - Efeito de nigericina sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em diferentes pHs. ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM; ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM; ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + NIG 100 ng/mg de proteína e ■ - NADH 1mM + DTT 2,5 mM + NIG 100 ng/mg de proteína + KCN 1 mM.

68

FIGURA 28 - Modelo proposto para um mecanismo de ação da AOX. E - enzima de AOX desprotonada; H^+E - enzima de AOX protonada; $\text{H}^+\text{H}^+\text{E}$ - enzima de AOX mais protonada; red - forma reduzida; pir- piruvato.

77

LISTA DE TABELAS

Página

- TABELA 1 - Oxidação de diferentes substratos e via cianeto resistente em diferentes pHs em condições controle e de estresse salino em mitocôndrias de dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp, Vita 3 e Vita 5. 40
- TABELA 2 - Valores dos Controles Respiratório (C.R.) e das relações ADP/O das frações mitocondriais não purificada de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em condição controle, durante os 2º e 3º ciclos de fosforilação, em presença de NADH 1mM e sucessivas adições de ADP 78 mM, nos pHs 6,25 , 7,25 e 7,75 41
- Tabela 3 - Consumo de oxigênio insensível ao KCN e a Antimicina A (nmoles de O₂ . mg de prot⁻¹ . min⁻¹) de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, em diferentes pHs, nas condições de estado 4 e estado 3 em ausência e presença de DTT 2,5 mM, durante a oxidação de NADH 1 mM. 46
- TABELA 4 - Efeito do pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN⁻, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5. Influência da nigericina. A atividade do consumo de oxigênio resistente ao CN⁻ foi mensurada em presença de KCN 1mM com e sem 100 ng de nigericina (mg de proteína mitocondrial)⁻¹. Os valores percentuais foram calculados em relação ao consumo de O₂ em presença de NADH 1 mM, DTT 2,5 mM e ADP 78mM. 70

ABREVIATURAS

AA - Antimicina A

AOX - Oxidase Alternativa

ADP - Difosfato de Adenosina

BSA – Albumina sérica bovina

DTT - Ditioneitol

EDTA

HCl - Ácido Clorídrico

KCl - Cloreto de Potássio

KCN - Cianeto de Potássio

KH_2PO_4 - Fosfato de Potássio

KOH - Hidróxido de Potássio

MAL - Malato

MgCl_2 - Cloreto de Magnésio

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Fosfato Bibásico de Sódio Hepta hidratado

NaCl - Cloreto de Sódio

NADH - Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo Reduzido

NIG - Nigericina

n-PG - n-Propil Galato

PIR - Piruvato

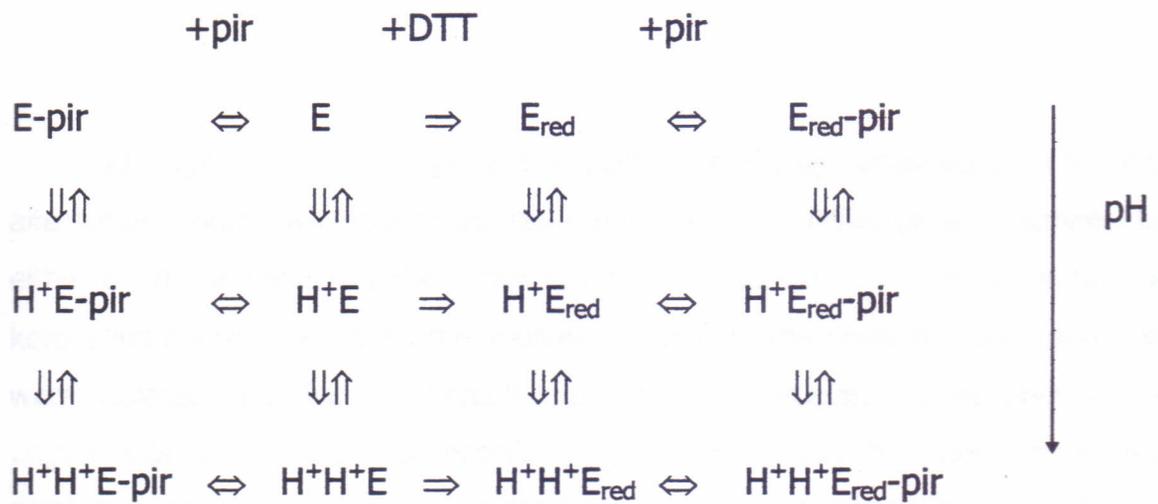
SDS – Dodecil sulfato de sódio

SUC - Succinato

RESUMO

Os vegetais superiores possuem uma via mitocondrial alternativa de transporte de elétrons, resistente ao cianeto, catalisada pela enzima oxidase alternativa, cuja papel fisiológico no metabolismo celular ainda não foi definitivamente esclarecido. Diferentes mecanismos bioquímicos, baseados ou na influência do estado redox da enzima ou na sua ativação por α -cetoácidos controlam a atividade dessa enzima. No presente trabalho mitocôndrias foram isoladas (purificadas em gradiente de Percoll) de hipocótilos estiolados de *Vigna unguiculata*, cv. Vita 5 (susceptível ao estresse salino) e a via alternativa de transporte de elétrons foi posta em evidência em presença de cianeto e de antimicina A. O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente. A presença da oxidase alternativa nas mitocôndrias foi detectada por anticorpo monoclonal contra a oxidase alternativa de *Sauromatum guttatum* tendo revelado a presença da enzima sob duas formas com massas moleculares dotadas de 35 e 70 kDa. O efeito do pH sobre a respiração resistente ao cianeto foi estudado numa faixa de pH de 5,75 a 8,25, com NADH como substrato, em presença de DTT. A mais alta taxa de respiração resistente ao cianeto foi obtida no pH 6,25. Em valores de pH acima e abaixo de 6,25 houve um progressivo decréscimo no consumo de oxigênio. Foi também demonstrado um efeito estimulador do piruvato, em concentrações aumentadas progressivamente até 500 μ M, sobre a respiração resistente ao cianeto nos pHs 6,25, 7,25 e 7,75 e o maior estímulo verificou-se no pH 7,25. O efeito exercidos pelo pH sobre a respiração resistente ao cianeto permaneceu inalterado mesmo em presença de nigericina, ionóforo conhecido por abolir o Δ pH entre a membrana mitocondrial interna e o espaço intermembranar. A reversão do pH do meio (6,25 para 7,75 e de 7,75 para 6,25) fez igualmente reverter os efeitos do pH e do piruvato sobre a respiração resistente ao cianeto. O efeito do pH sobre a atividade da oxidase alternativa foi

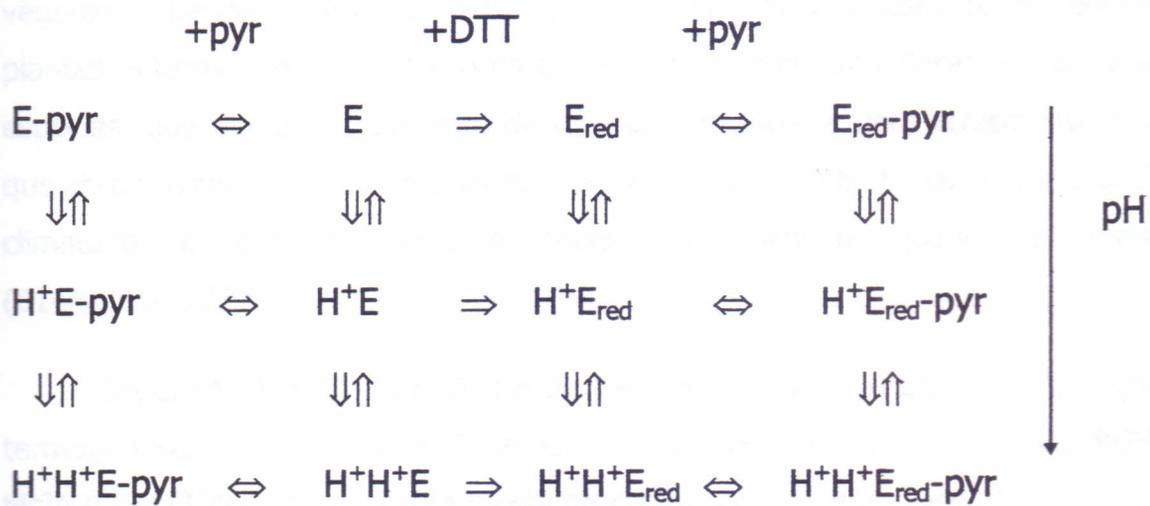
tentativamente atribuído a um novo "status" de protonação/desprotonação desta proteína de acordo com um esquema onde a forma mais ativa é H+Ered-Pir seguida da forma H+Ered.



ABSTRACT

All higher plants contain a CN-resistant pathway catalyzed by the enzyme alternative oxidase whose function still remains unclear. Different mechanisms, based either on the influence of the redox state of the enzyme or on its activation by α -keto acids control the alternative oxidase activity. In the present work, mitochondria were isolated (purified on Percoll gradient) from etiolated hypocotyls of *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 (susceptible to salt stress) and the electron alternative pathway was measured in the presence of cyanide and antimycin A. O₂ uptake was polarographically estimated. The presence of the alternative oxidase was detected by monoclonal antibodies against alternative oxidase proteins of *Sauromatum guttatum* and revealed two forms of the enzyme under 35 and 70 kDa. The effect of pH on the CN-resistant respiration was investigated in a pH range from 5.75 to 8.25 with NADH as substrate, in the presence of DTT. The highest rate of CN-resistant respiration was obtained at pH 6.25. Increase in pH over 6.25 and decrease below 6.25 resulted in progressive decrease in O₂ uptake. It has also been demonstrated the stimulatory effect of increasing concentrations of pyruvate (until 500 μ M) on the CN-resistant respiration at pH 6.25, 7.25 and 7.75. The highest stimulation of CN-resistant respiration by pyruvate was observed at pH 7.25. The pH effect on CN-resistant respiration was shown to be the same in the presence of nigericin, an ionophore known to abolish (pH between matrix and intermembrane sides). The reversion of reaction medium pH (6,25 to 7,75 and 7,75 to 6,25) also induced a reversibility in the effect of pH and pyruvate on the CN-resistant respiration. The pH effect on the alternative oxidase activity was tentatively attributed to a new status of

this protein namely a protonated/deprotonated status according to a scheme in which the most active form is H+E_{red}-Pir followed by H+E_{red}.



INTRODUÇÃO

A primeira referência, embora não de forma direta, da presença de uma via alternativa de transporte de elétrons catalisada por uma oxidase terminal em vegetais superiores surgiu a partir da observação de processos termogênicos em plantas. A termogênese é um processo bastante comum em inflorescências de várias espécies, que utilizam o aumento da temperatura interna para volatilizar compostos que atuam como atrativos de agentes polinizadores, e também ocorre por ocasião do climatério de diversos frutos e raízes, principalmente quando armazenados (DIAMOND, 1989)

Segundo MEEUSE (1975), foi de Lamark, em 1778 a primeira descrição da termogênese, ao observar a floração de espécies de *Arum*. VANLERBERGHE & McINTOSH (1997), transcreveram esta descrição nos seguintes termos:

"le gouet d'Italie acquiert à une certain époque de la floraison une chaleur considérable. ... Cette chaleur s'élève à 21,8 degrés, l'air ambiant étant à 14,9 degrés".

Em 1851, Garreau, citado por MEEUSE (1975), demonstrou a existência de uma relação íntima entre o aumento da temperatura e o consumo de oxigênio nas plantas, sendo que a hipótese da existência de uma segunda via respiratória somente foi formulada, segundo SLUSE & JARMUSKIEWICZ (1998), por Genevois em 1929, com a descoberta de uma rota de consumo de oxigênio insensível ao cianeto e ao monóxido de carbono.

De acordo com VANLERBERGHE & McINTOSH (1997), em 1937 van Herk relacionou a respiração CN^- insensível a uma rota metabólica que prescindia da citocromo oxidase e que ocorria em presença de uma flavoproteína autoxidável e essa hipótese permaneceu até metade da década de 50, quando os trabalhos de Simon, em 1957 e 1959, e de Yocum em 1955 e 1957, mostraram a presença do sistema clássico de transferência de elétrons em tecidos que apresentavam respiração CN^- insensível. Posteriormente, HACKETT *et al.* (1960a, 1960b), STOREY

& BAHR (1969), WILSON (1970) e BENDALL & BONNER (1971) demonstraram, que a insensibilidade residia nas mitocôndrias, pois estas, quando isoladas, mostravam conter dois caminhos para transferência de elétrons na cadeia respiratória: o clássico, sistema transportador de elétrons CN^- sensível que é acoplado à fosforilação oxidativa, e um caminho CN^- insensível, que se ramificava a partir do "pool" de ubiquinonas (Figura 1), sendo menos fosforilativo e sensível a compostos como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) (SCHONBAUM *et al.*, 1971 e LATIES, 1982) e n-propil galato (SIEDOW & BICKETT, 1981).

A capacidade genética que todas as angiospermas, muitas algas e alguns fungos, possuem de expressar esta via e que em plantas esta expressão depende do estágio de desenvolvimento e de fatores ambientais foi demonstrada por LATIES (1982), ORDENTLICH *et al.* (1991) e McINTOSH (1994). Até o momento não está clara a função da via alternativa nos vegetais, sabe-se que ela é induzida ou expressa por ocasião da floração (MEEUSE, 1975), por lesões em tecidos e ataque de patógenos (LATIES, 1982), pela elevação no nível de carboidratos (MOORE & SIEDOW, 1991; VANLERBERGH *et al.*, 1995), pelo abaixamento de temperatura (PURVIS & SHEWFELT, 1993), pela elevação nos níveis de ácido salicílico (ROADS & McINTOSH, 1993), durante o amadurecimento de frutos (CRUZ-HERNÁNDEZ & GÓMEZ-LIN, 1995 e SLUSE *et al.*, 1998)) e pela elevação na produção de superóxidos (PURVIS, 1997) entre outros. Devido a todos estes fatores, ainda não foi possível a formulação de uma hipótese única de uma função metabólica específica.

A via alternativa poderia ser definida como um caminho, não fosforilante, de transporte de elétrons, com origem na cadeia citocrômica ao nível do "pool" de ubiquinonas, que aparentemente reduz o oxigênio molecular à água pela simples transferência de 4 elétrons através de uma proteína oxidase terminal denominada alternativa oxidase (AOX) (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997)

Genes e Expressão Genética da AOX

ROADS & McINTOSH (1991) foram os primeiros a clonarem o gene da AOX, isolando e caracterizando um cDNA para a proteína da alternativa oxidase em

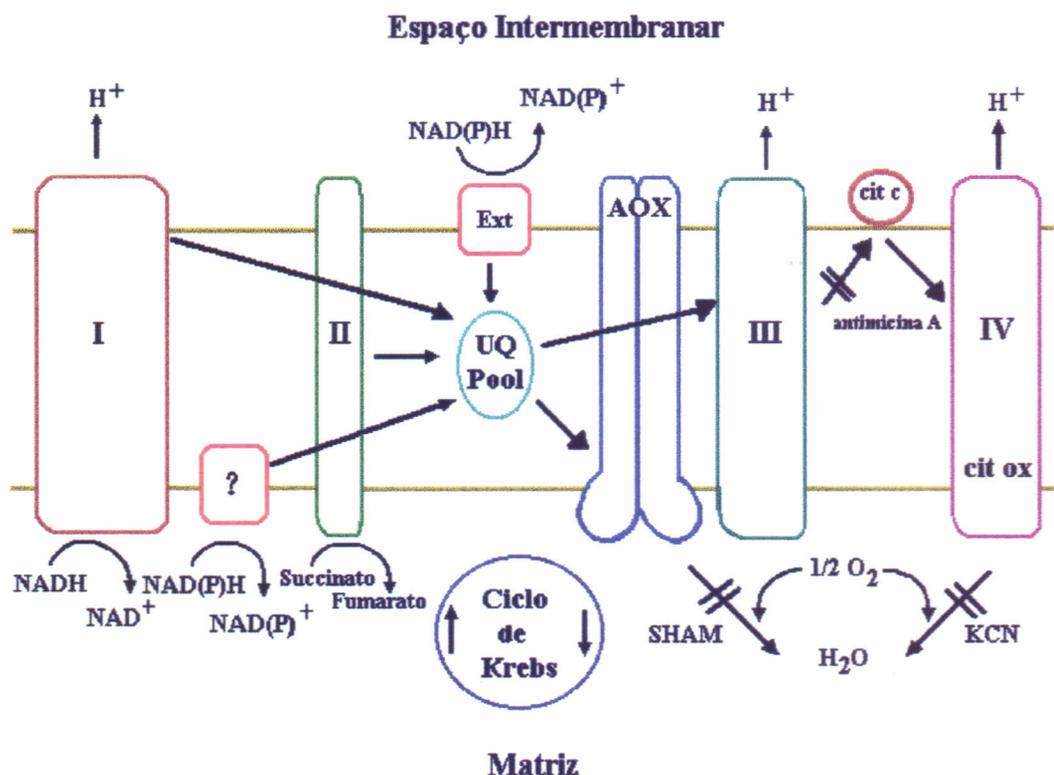


FIGURA 1 - Esquema dos complexos mitocondriais e do transporte de elétrons em mitocôndrias vegetais. I - Complexo I, NADH desidrogenase; II - Complexo II, Succinato desidrogenase; III - Complexo III, Citocromo bc_1 ; IV - Complexo IV, Citocromo oxidase; AOX - Oxidase Alternativa; UQ - Ubiquinona; Cit c - Citocromo c; Ext - NADH desidrogenase externa; ? - NADH desidrogenase, proposta para plantas; SHAM - Ácido Salicilhidroxâmico (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997)

Sauromattum guttatum. Utilizando um anticorpo monoclonal para alternativa oxidase (ELTHON *et al.* 1989), eles isolaram um clone de cDNA (*Aox 1*) que codificava um polipeptídeo com 42 kDa. Este mesmo *Aox 1* também foi isolado por SAKAJO *et al.* (1991) em *Hansenula anomala*, mostrando existir um elevado incremento de sua transcrição após a adição de KCN ou antimicina A

KUMAR & SOLL (1992), conseguiram expressar em *E. coli* a proteína da AOX, a partir a clonagem do cDNA de *Arabidopsis thaliana*, sendo esta proteína reconhecida pelo mesmo anticorpo monoclonal para alternativa oxidase que reconhecia o *Aox 1*.

Também foram isolados cDNA *Aox 1* em *Glycine max* (WHELAN *et al.*, 1993) *Nicotiana tabacum* (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1994 e WHELAN *et al.*, 1995a), e *Mangifera indica* (CRUZ-HERNANDEZ & GOMÉZ-LIN, 1995) entre outras, levando a crer, até então, que em vegetais superiores a AOX era codificada por um gene simples. Em fungos, LI *et al.* (1996) isolaram o *Aox 1* de *Neurospora crassa*. que demonstrou sequência similar aos encontrados em plantas.

Entretanto, WHELAN *et al.* (1996), com o uso de técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction), mostraram a existência de três genes codificando para oxidase alternativa em *Glycine max*: *Aox 1*, expressado nos cotilédones; *Aox 3*, expressado em cotilédones e folhas; e *Aox 2*, que embora não encontrada sua expressão em cotilédones e folhas, teve seu cDNA clonado, indicando sua possível expressão em algum nível; e evidências de pelo menos dois genes em *N. tabacum*. Em *Arabidopsis thaliana* SAISHO *et al* (1997), encontraram uma família de quatro genes que codificavam para a oxidase alternativa, que foram designados como AOX1a, AOX1b, AOX1c e AOX2, sendo que apenas AOX1a e AOX1c eram expressados em todos os tecidos estudados (flores e gemas florais, caule, "rosetas" e raízes) enquanto que a transcrição do AOX1b foi detectada apenas em flores e gemas florais a transcrição do AOX2 detectada em caule, "rosetas" e raízes. Eles afirmaram que, com base nesses e em resultados de outros autores, a transcrição dos diferentes genes da oxidase alternativa é diferentemente regulada, sendo a AOX expressão de uma família multigênica. Segundo VANLERBERGHE E McINTOSH (1997), o significado dessas famílias de genes é desconhecido sendo possível que as múltiplas isoformas da

proteína, detectadas imunologicamente, sejam produtos de genes diferentes.

Todas as seqüências de genes da oxidase alternativa codificam uma proteína altamente semelhante, conservando características como: (a) duas possíveis alfa hélices localizadas dentro da membrana interna mais ou menos no centro da oxidase, (b) uma possível alfa hélice exposta para o espaço intermembranar e (c) as regiões hidrofílicas N e C terminal expostas para a matriz mitocondrial. O resíduo de cisteína, conservado na região N terminal, provavelmente está ligado a formação de uma ligação dissulfeto intramolecular (ROADS *et al.*, 1998).

Estrutura da proteína de AOX

De acordo com MOORE & SIEDOW (1991), a via alternativa surge a partir de uma ramificação da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, ao nível do "pool" de ubiquinonas, não desenvolvendo força protomotora sendo portanto não fosforilante. A alternativa oxidase é uma proteína da membrana mitocondrial interna, com o sítio ativo, localizado no lado da matriz, catalisando a oxidação do ubiquinol à ubiquinona e a redução do oxigênio molecular à água.

Os trabalhos de MOORE & SIEDOW (1991), DAY *et al.* (1991), SIEDOW & MOORE (1993) e RIBAS-CARBO *et al.* (1997) mostraram que o engajamento da via alternativa era controlado pelo estado redox do "pool" de ubiquinonas e que o fluxo por essa via somente ocorria após o "pool" alcançar um determinado nível de redução. Mostraram, ainda, que o aumento do engajamento da via alternativa não se comportava como uma função linear do aumento do estado de redução do "pool" de ubiquinonas

Com base nesses resultados SIEDOW & MOORE (1993) sugeriram um modelo para o funcionamento da AOX, onde a redução do oxigênio molecular ocorria pela transferência de 4 elétrons da enzima reduzida. Posteriormente, RIBAS-CARBO *et al.* (1994) incorporaram a este modelo um passo inicial de ativação que implicava na redução total da enzima antes da reação com o oxigênio molecular. MOORE *et al.* (1995) afirmam que este passo inicial foi introduzido para acomodar as observações

que mostravam uma diminuição da afinidade da AOX pelo oxigênio com o aumento da redução do "pool" de ubiquinonas.

UMBACH & SIEDOW (1993) demonstraram que a proteína da AOX existia como um dímero na membrana mitocondrial interna. Esse dímero existe em dois estados: um estado oxidado, no qual o dímero é covalentemente ligado por uma ligação dissulfeto intermolecular, e um estado reduzido, onde tal ligação é reduzida a sua forma sulfidrílica e a estrutura dimérica é mantida por interações não covalentes. MOORE *et al.* (1995), mostraram que a proteína madura contém 280-290 aminoácidos e migra como uma proteína de 32-35 kDa em géis de SDS-PAGE, conforme revelação através de immunoblotting. Com base nesses resultados e nos trabalhos de RASMUSSEN & MØLLER. (1990) MOORE & SIEDOW (1991), RHOADS & MCINTOSH (1991), SAKAJO *et al.* (1991), SIEDOW *et al.* (1992), MCINTOSH (1994), e SIEDOW *et al.* (1995) foi proposto por MOORE *et al.* (1995) um modelo de estrutura para o dímero da AOX no qual a proteína de oxidase alternativa encontra-se ancorada a membrana mitocondrial interna por duas α -hélices com domínios hidrofílicos de aproximadamente 100 aminoácidos e quatro hélices ligadas por um centro binuclear de átomos de ferro que fica situado no domínio hidrofílico C-terminal da proteína, localizado na matriz mitocondrial. As α -hélices transmembranares, que apresentam uma alta conservação de resíduos dos aminoácidos Glutamina, Treonina e Tirosina, parecem ser ou estarem envolvidas com um provável sítio de ligação para a ubiquinona, enquanto as quatro hélices do domínio C-terminal, de acordo com ALBURY *et al.* (1998), devido a presença de um centro binuclear de ferro (Fe^{++}) e de um resíduo Glutamato (Glu)-270, seriam o sítio catalítico da enzima, além de propiciar a estabilização da estrutura tridimensional da proteína. Já o domínio NH_2 -terminal, de acordo com RHOADS *et al.* (1998), encontra-se envolvido com a regulação do estado redox da proteína bem como com a estimulação da atividade enzimática através de α -cetoácidos, que em ambos os casos ocorre no resíduo de cisteína Cys-78. (Figura 2).

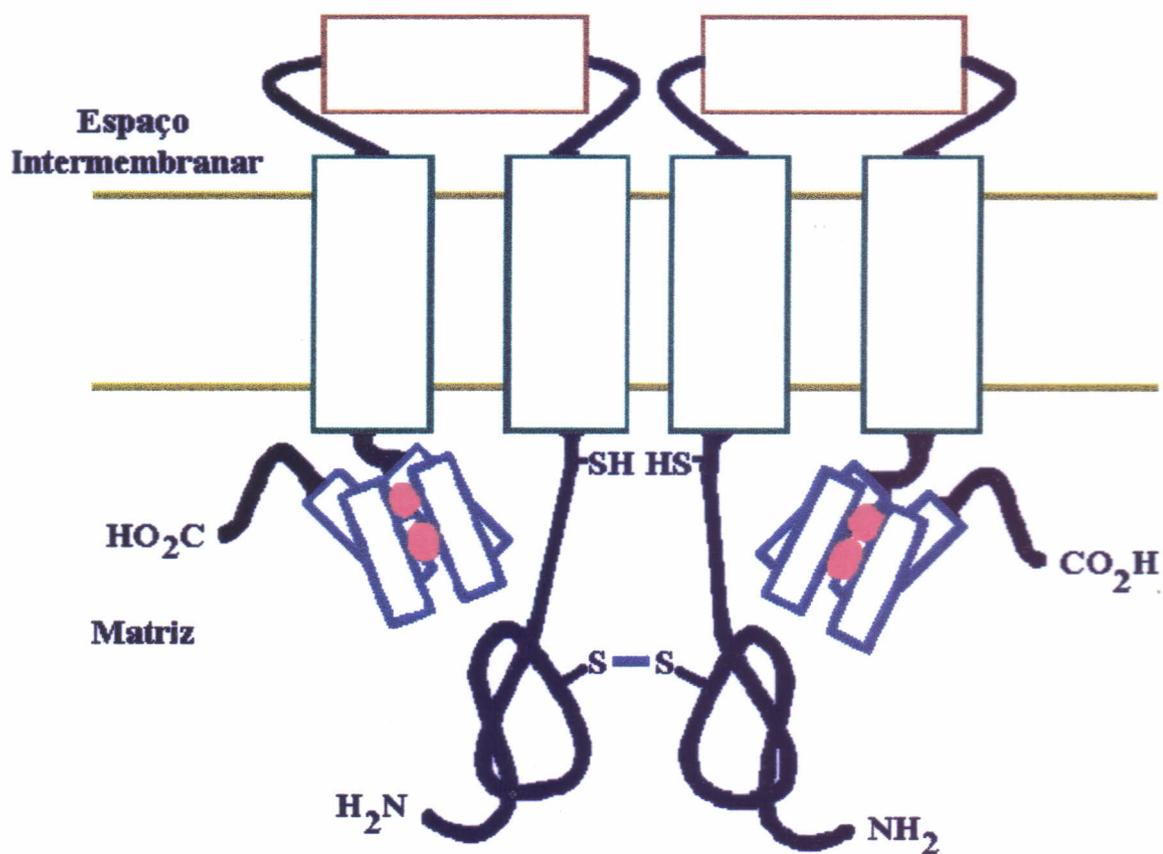


FIGURA 2 -Esquema de modelo da estrutura da oxidase alternativa na sua forma inativa com os resíduos de cisteína Cis-78 formando uma ponte dissulfeto ($S - S$). Os círculos vermelho nas hélices do domínio C-terminal representam os átomos de Fe^{++} .

Controle da Via Alternativa

Até o início da década de 90, acreditava-se que a via alternativa funcionava como um caminho alternativo para os elétrons quando a via citocrômica estivesse saturada pelo fluxo dos mesmos. As principais evidências apresentadas para sustentar esta hipótese eram a resposta não linear da AOX à variação do estado redox do "pool" de ubiquinonas e a necessidade de um nível elevado de redução do "pool" para ativação da AOX (PALMER, 1976; LAMBERS, 1980; LAMBERS, 1982; LAMBERS, 1985; MOORE *et al.*, 1988; DRY *et al.*, 1989)

Com a descoberta de dois mecanismos de controle bioquímico da AOX: a estimulação por α -ceto ácidos, especialmente o piruvato (MILLAR *et al.*, 1993 e DAY *et al.*, 1994) e a existência das formas reduzida e oxidada do dímero da AOX, sendo a primeira mais ativa (UMBACH & SIEDOW, 1993), tornou-se pouco provável que a atividade da AOX fosse modulada, apenas, por um excesso de fluxo de elétrons na via citocrômica. De fato, os trabalhos de WILSON (1988) e UMBACH *et al.* (1994) mostravam evidências de que a via alternativa competia com a via citocrômica pelo fluxo de elétrons, o que foi demonstrado por HOEFNAGEL *et al.* (1995), monitorando, simultaneamente, a atividade da via citocrômica em presença de ferricianeto e CN^- através de espectrofotometria e a via alternativa através de eletrodo de oxigênio.

De acordo com VANLERBERGHE & McINTOSH (1997), a partição de elétrons para a Via Alternativa encontra-se sob um controle primário, determinando a quantidade da enzima AOX presente além de sofrer um controle metabólico (controle fino) da atividade desta enzima. A idéia de um controle primário encontra base nos trabalhos de HISER *et al.*, (1996) e VANLERBERGHE *et al.*, (1994), que, através do uso de plantas transgênicas, observaram um aumento na capacidade da Via Alternativa associado ao aumento no nível de expressão da proteína AOX. Diversos autores já demonstraram ser possível induzir a síntese de AOX em algas, fungos e plantas, através da inibição da via citocrômica. VANLERBERGHE & McINTOSH (1994, 1992a) observaram em suspensão de células de *Nicotiana tabacum* um forte aumento no nível de mRNA da AOX e da proteína AOX quando a via citocrômica era inibida através do uso de antimicina A, o que leva a crer na existência de um

mecanismo por meio do qual a expressão do gene *Aox 1* pode responder a mudanças de atividade da via citocrômica. Como o estado de transporte mitocondrial de elétrons é percebido e transmitido para o núcleo para ativar a expressão do gene *Aox 1* e o produto mRNA é importado para a mitocôndria ainda é desconhecido. Tal mecanismo envolverá certamente sinais fisiológicos e os produtos de outros genes (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997) mas, se a quantidade de AOX é determinada, fundamentalmente, pela expressão do gene que a codifica, seria lógico pensar que todos os fatores que modularem essa expressão estarão diretamente relacionado com o nível de engajamento da via alternativa no total da respiração.

Já são conhecidos diversos fatores que parecem agir como um sinal regulatório para expressão do gene *Aox 1*. Entre eles encontram-se: inibidores da via citocrômica (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1992b; VANLERBERGHE & McINTOSH, 1994); estado redox da mitocôndria, (HAKANSSON & ALLEN, 1995); existência de formas ativas de oxigênio, como radicais hidroxilas e superóxidos (LEVINE, *et al.*, 1994; WAGNER, 1995; LONGO. *et al.*, 1996; SEN & PACKER, 1996; VANLERBERGHE & McINTOSH, 1996); nível de concentração de metabólitos (p. e. citrato)(VANLERBERGHE & McINTOSH, 1996); e, existência de múltiplos genes codificadores de AOX. (CRUZ-HERNANDEZ & GOMEZ-LIN, 1995; CONLEY & HANSON, 1994; KEARNS *et al.*, 1992; RHOADS & McINTOSH, 1992). HISER *et al.* (1996) e WHELAN *et al.* (1995b) sugerem também ser possível que a importação do precursor da AOX para a mitocôndria como também o processo subsequente ou modificação da AOX representam outros pontos para controle da quantidade de AOX.

Controle Metabólico da Atividade da AOX

Embora a quantidade de AOX presente em um tecido determine o máximo possível da partição de elétrons para a Via Alternativa, o fluxo parece estar sujeito a muitos controles metabólicos tais como: o estado de redução do "pool" de ubiquinonas, o estado de redução AOX, e a concentração de ativadores da enzima, como o piruvato (Figura 3).



FIGURA 3 - Mecanismo de regulação da atividade da oxidase alternativa. (SLUSE & JARMUSZKIEWICZ, 1998)

1 - O estado de redução do "pool" de ubiquinonas

Como demonstrado por MOORE & SIEDOW (1991) o "pool" de ubiquinonas ocupa uma posição fundamental nas cadeias transportadoras de elétrons, em mitocôndrias vegetais. VAN DEN BERGEN *et al.* (1994) afirmaram que o estado de redução do "pool" de ubiquinonas era um fator importante na regulação da atividade da AOX e que este estado seria diretamente dependente das atividades relativas das desidrogenases abastecedoras de elétrons para redução da ubiquinona e da oxidase terminal dirigida pela oxidação da ubiquinona, com base em resultados de experiências com eletrodo de quinona (Q), que mostravam como a atividade da AOX respondia à relação do "pool" de ubiquinona reduzido/oxidado. Porém, RIBAS-CARBO *et al.* (1995) mostraram ser o nível absoluto de ubiquinona reduzido que determinará a atividade da AOX e que esta atividade não só é dependente das atividades relativas das desidrogenases e da oxidases terminal mas também do nível absoluto de ubiquinona total em um tecido. Recentemente HOEFNAGEL & WISKICH (1998) propuseram um mecanismo que sugere ser a AOX inativada pelo seu produto (ubiquinona oxidada) durante a catálise, podendo esta inibição ser revertida pelo processo redutivo com elevação do nível de ubiquinona reduzida ou pela adição de DTT.

2 - O estado de redução da enzima AOX

Como foi dito anteriormente, UMBACH & SIEDOW (1993), afirmaram ser a proteína AOX um dímero, existente em dois estados: um oxidado, (covalentemente ligado por uma ligação dissulfeto intermolecular), e outro reduzido, (ligação dissulfeto reduzida à sua forma sulfidrílica) e, juntamente com UMBACH *et al.* (1994), mostraram que a atividade da oxidase alternativa era dependente do estado de redução da enzima, sendo a forma reduzida quatro a cinco vezes mais ativa que a forma oxidada. De acordo com RHOADS *et al.* (1998) somente a forma reduzida é susceptível a ativação pelo piruvato.

Baseados no fato de que todas as seqüências gênicas da proteína AOX de plantas, obtidas até o presente, apresentarem dois resíduos de cisteína completamente conservados, diversos autores sugeriram que estes resíduos estavam envolvidos no processo de formação da ligação dissulfeto do dímero da AOX (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997 e RHOADS *et al.*, 1998)

VANLERBERGHE *et al.* (1997), estudando o efeito de substratos do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos sobre a AOX, afirmaram que o estado da ligação dissulfeto parece depender do estado redox do pool mitocondrial de nucleotídeos de piridina e que a redução deste pool pela oxidação de substratos específicos do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (CAT) facilita a redução da AOX à sua forma ativa. Ainda segundo os mesmos autores é esperado que o turnover do CAT reduza rapidamente o pool de nucleotídeos de piridina se a reoxidação deste pool, através do transporte de elétrons, tornar-se limitada, conseqüentemente, a regulação da atividade da AOX pelo estado redox do pool de nucleotídeos de piridina pode representar um mecanismo potencial para acoplar o metabolismo do CAT ao transporte de elétrons. Por exemplo, a limitação do turnover do CAT através do transporte de elétrons favorecerá a redução da AOX que passa à sua forma mais ativa. Isto efetivamente aumentará a capacidade de transporte de elétrons favorecendo a oxidação do pool de nucleotídeos de piridina, permitindo o aumento do turnover no CAT.

POPOVA & CARVALHO (1998) afirmaram que experiências com mitocôndrias de folhas de plantas transgênicas de *N. tabacum* mostraram que redução de AOX pode ser mediada pelo poder redutor intramitocondrial gerado pela oxidação de intermediários do CAT, especialmente, citrato, isocitrato e malato e que este mecanismo pode ter um papel importante na regulação do fluxo de elétrons para a AOX, já que a proteína reduzida tem uma maior afinidade pela ubiquinona. Assim esses autores especulam que o nível de oxidação de isocitrato e de citrato em mitocôndrias de planta pode ser um sinal regulador para a operação do sistema de transporte de elétrons da oxidase alternativa e que, eventualmente, isto poderia promover uma coordenação efetiva entre processos catabólicos e anabólicos em células de plantas.

3 - Concentração de Ativadores da AOX

WAGNER *et al.* (1989), mostraram que a combinação de NADH e succinato exógeno resultaram em níveis respiratórios da via citocrômica mais altos que os níveis alcançados com um único substrato, porém inferior a soma dos níveis induzidos separadamente por esses substratos. Em combinação, os substratos contribuíram para o aumento do consumo do oxigênio, porém a oxidação de NADH sofreu maior inibição pelo KCN que a oxidação do succinato. Quando NADH foi combinado com succinato ou malato na presença de cianeto, os níveis de consumo de oxigênio foram superiores à soma dos níveis de consumo dos substratos determinado separadamente, aparentando haver o succinato e o malato estimulado a oxidação de NADH exógeno, através da via cianeto resistente.

Outras evidências da estimulação da via cianeto resistente por ácidos carboxílicos foram mostradas por LIDÉN & AKERLUND (1993) que verificaram uma estimulação na oxidação de análogos de quinonas por succinato e malato sugerindo uma possível estimulação da via da oxidase alternativa. MILLAR *et al.* (1993) apresentaram evidências que o piruvato provocava estimulação da via alternativa. Através de medidas do estado de redução do "pool" de ubiquinonas foi possível mostrar que o piruvato estimulava a oxidação de succinato pela respiração cianeto resistente, e que esse estímulo era acompanhado por um decréscimo nos níveis de ubiquinonas reduzidas, indicando que a oxidase alternativa poderia estar ativada. Os autores sugeriram que o piruvato atuasse como um efetor alostérico da AOX.

UMBACH *et al.* (1994) reduzindo a ligação dissulfeto do dímero da AOX através do uso de DTT conseguiram mostrar que somente a forma mais ativa da enzima (reduzida) poderia ser estimulada pelo piruvato, aparentemente pelo diminuição do K_m da enzima pela ubiquinona reduzida. DAY *et al.* (1995), estudando a regulação da atividade da AOX por piruvato, em mitocôndrias de soja, postularam ser o efeito do succinato no estímulo da atividade da AOX não um resultado da sua ação direta mas, consequência da produção de piruvato durante o seu catabolismo. WAGNER *et al.* (1995), discutiram a estimulação da oxidação de NADH, através da via cianeto resistente, pelo succinato e malato e a compararam com a estimulação obtida com piruvato. Esses autores encontraram valores de concentração da ordem

de 3 a 4 mM para a máxima estimulação da AOX por succinato e malato, contudo MILLAR *et al.* (1993) mostraram que o mesmo nível de estimulação foi obtido com o piruvato na concentração de 0,12 mM. Isso provocou uma discussão a respeito da estimulação da AOX: se ela resultava de um efeito direto do succinato e do malato ou se o efeito seria decorrente da pequena quantidade de piruvato produzido por ocasião da oxidação daqueles substratos. WAGNER *et al.* (1995) refutaram a segunda possibilidade com base em observações do efeito da fluidez da membrana mitocondrial e da variação de temperatura sobre a atividade da AOX associados com a presença de succinato e malato e formularam o conceito de "capacidade da oxidase alternativa" na respiração CN-resistente relacionado com a ativação ou estimulação da AOX por ácidos carboxílicos. Contudo, VANLERBERGHE *et al.* (1994), estudando o efeito de ácidos carboxílicos em mitocôndrias isoladas de folhas de plantas transgênicas de fumo (*Nicotiana tabacum*) apresentaram resultados que contrariaram àqueles de WAGNER *et al.* (1995). Os autores realizaram ensaios alternando a adição de piruvato e DTT e mostraram que a adição de piruvato provocou um ligeiro estímulo da atividade da AOX, abaixo do esperado, devido aos baixos níveis existentes de AOX reduzida. Porém a adição subsequente de DTT causou um grande aumento no consumo de O₂ pela via alternativa. Quando o DTT foi adicionado em primeiro lugar houve um leve estímulo respiratório e a subsequente adição de piruvato mostrou um rápido incremento no consumo de O₂ pela AOX. Segundo os autores, esses resultados mostraram ser a atividade da AOX dependente da redução da enzima e sua ativação subsequente dependente de piruvato concordando com a existência de um mecanismo de regulação alostérica conforme fora proposto por MILLAR *et al.* (1996). Os resultados de ensaios realizados, pelos mesmos autores, com outros ácidos carboxílicos (citrato, isocitrato, malato e succinato) levaram-os a afirmar que estes ácidos tinham efeito apenas sobre o estado de redução da enzima e não sobre sua ativação. Utilizando-se da variação do pH foi possível demonstrar o efeito do malato. Como se sabe em pH alcalino (7,8) a enzima malato desidrogenase é favorecida na oxidação enquanto em pH ácido (6,5) a oxidação do malato é realizada pela enzima málica. Os ensaios mostraram que quando as condições favoreciam a atividade da enzima málica observava-se um aumento nos níveis de redução da AOX além da mesma atingir um

máximo de ativação sem que fosse necessário a adição de piruvato. Essa ativação era explicada pelo fato da enzima málica ter como produto o piruvato. Quando as condições de ensaio favoreciam a malato desidrogenase foi observado uma elevação nos níveis de redução da AOX, porém a sua ativação era dependente de adição posterior de piruvato. A comparação dos resultados mostrou que a malato desidrogenase foi mais efetiva, que a enzima málica na redução da enzima. Assim, VANLERBERGHE *et al* (1997) concluíram que a redução da AOX para a sua forma mais ativa é mediada por substratos específicos do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, sendo o piruvato ineficaz em promover essa redução, e apontam como provável explicação para isso o fato que o poder redutor intramitocondrial gerado pela atividade da isocitrato desidrogenase (quando a mitocôndria encontra-se suprida com citrato e isocitrato) ou malato desidrogenase (quando as mitocôndrias encontram-se supridas com malato) poder apoiar a redução da AOX

Novas evidências que iam de encontro à proposição de WAGNER *et al*. (1995) foram apresentadas por MILLAR *et al*. (1996) trabalhando com mitocôndrias intactas e subpartículas mitocondriais de soja (*Glycine max*) e batata (*Ipomoea batatas*). Esses autores mostraram que os ácidos carboxílicos de cadeia curta, como piruvato, estimulavam a AOX em baixas concentrações (0.1 a 0.5 mM) quando comparados com os ácidos carboxílicos de cadeia longa, como oxaloacetato e α -cetogluturato, em se tratando de mitocôndrias intactas. Em subpartículas mitocondriais, onde a face interna da membrana mitocondrial interna está diretamente acessível aos ácidos orgânicos, foi observado que a metade do estímulo máximo produzido pelo piruvato foi alcançado com concentrações na faixa de 5 μ M, o que segundo os autores evidencia estar o sítio de ativação do piruvato localizado na face matricial da membrana mitocondrial interna. Concentrações desta mesma ordem de grandeza foram também requeridas por glioxilato e hidroxipiruvato enquanto que a estimulação por α -cetogluturato só foi obtida com concentrações da ordem de milimolar. Mostraram ainda ser a estimulação da AOX, por malato e succinato, dependente do pH. Em mitocôndrias intactas ambos estimulavam o consumo de oxigênio em pH ácido (6,5) e apenas o L-malato era capaz de provocar estímulo em pH alcalino (7,5) porém, não apresentaram nenhum efeito em subpartículas mitocondriais sendo concluído que malato e succinato não são ativadores diretos da

AOX e que os estímulos encontrados em mitocôndrias intactas provavelmente resultava das suas conversões em piruvato, conforme é mostrado na Figura 4. Fica reconhecida assim, a necessidade de serem tais ácidos metabolizados para produzirem um efeito estimulatório na AOX.

Outro ponto de confronto com WAGNER *et al.* (1995) foi o fato de não ter sido encontrada, por MILLAR *et al.* (1996), uma estimulação da AOX dependente de temperatura, em mitocôndrias de cotilédones de soja, do mesmo modo que em mitocôndrias de tubérculos de batata (WAGNER *et al.*, 1995), associado a isto o fato de ZANG *et al.* (1996). ter encontrado estimulação da AOX parcialmente purificada de *Arum maculatum* pelo piruvato. MILLAR *et al.* (1996) consideram improvável que mudanças na fluidez da membrana, devido a variações de temperatura, pudessem afetar a ativação da AOX por um α -cetoácido, conforme proposto por WAGNER *et al.* (1995).

HOEFNAGEL & WISKISH (1996), utilizando mitocôndrias de inflorescência de *Arum maculatum* (tecido termogênico) e de cotilédones de soja (*Glycine max*) (tecido não termogênico), estudaram a dependência da atividade da AOX do nível de redução do pool de ubiquinonas, tendo NADH e succinato como substratos. Os resultados mostraram que, quando a enzima foi ativada através de piruvato, a relação entre a atividade da AOX e o estado de redução do pool de ubiquinonas era o mesmo para as oxidações de NADH e do succinato. Na ausência de piruvato a AOX apresentou uma aparente diminuição na afinidade pela ubiquinona reduzida e isto era mais evidente com a oxidação de NADH do que com succinato, possivelmente devido à produção de piruvato durante oxidação do succinato ou pela ativação da AOX diretamente pelo succinato. Foi mostrado também que, em mitocôndrias de *Arum*, durante a oxidação de succinato, a AOX manteve o pool de ubiquinonas parcialmente reduzido (60%), enquanto que durante a oxidação de NADH o pool manteve-se quase que completamente reduzido e que quando o pool de ubiquinonas encontra-se completamente reduzido e a AOX completamente ativada o comportamento do consumo de oxigênio nos tecidos (termogênico e não termogênico) era semelhante.

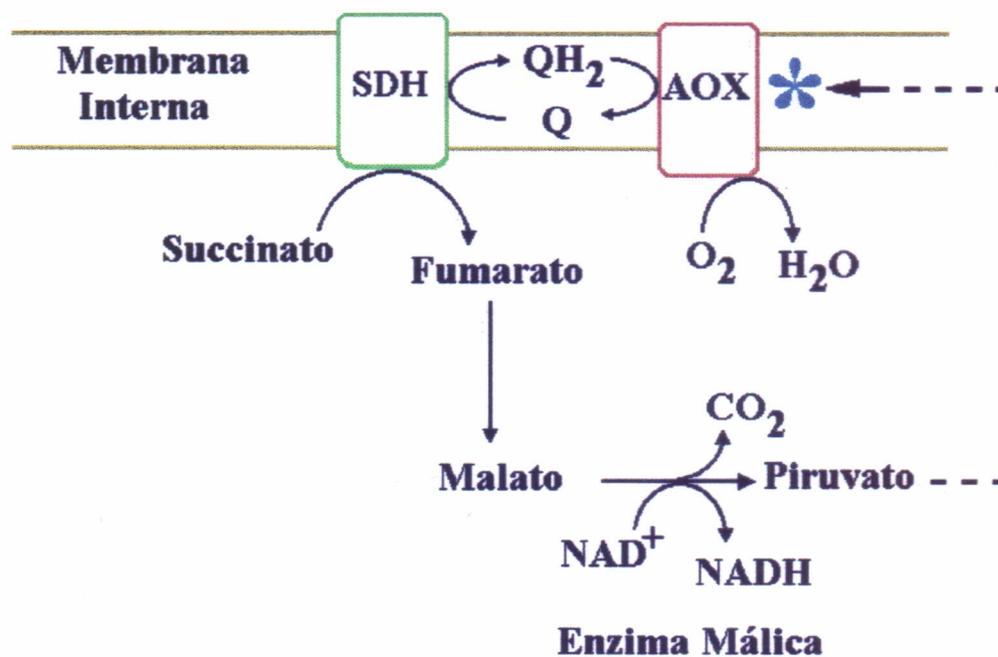


FIGURA 4 -Estimulação da AOX, de mitocôndrias de plantas, por malato e succinato através do fluxo de elétrons do "pool" de quinonas e do metabolismo do piruvato na matriz mitocondrial. SDH - Succinato desidrogenase; AOX - Oxidase alternativa; * - Ativação pelo piruvato. (MILLAR *et al.*, 1996)

4- Sítio de Ligação do Piruvato

UMBACH E SIEDOW (1996) afirmaram, utilizando mitocôndrias isoladas de cotilédones de soja (*Glycine max*) e de inflorescências de *Arum maculatum*, que o sítio de ligação do piruvato à AOX era um grupo sulfidrilas diferente daquele responsável pela ligação dissulfeto envolvido com o estado de redução da enzima. Através do uso de reativos sulfidrilas (iodoacetato e N-etilmaleimida) eles demonstraram que a ativação da AOX por α -ceto ácidos parece envolver a formação de um thiohemiacetal. Segundo os mesmos autores, os dois resíduos de cisteína conservados na proteína da AOX seriam suficientes para responderem as condições já conhecidas de atividade da AOX: o estado reduzido do dímero e a presença de piruvato, postulando ser o resíduo de cisteína localizado mais próximo da membrana (Cys-128) responsável pela formação do thiohemiacetal e o resíduo mais próximo ao NH_2 - terminal (Cys-78) responsável pelo estado de redução da enzima. Porém RHOADS *et al.* (1998), utilizando mutantes para os resíduos de cisteína Cys-78 e Cys-128, em oxidase alternativa de *Arabidopsis*, demonstraram que apenas o resíduo Cys-78 estava envolvido com a produção das formas reduzida (ativa) e oxidada (inativa) da AOX e que este mesmo resíduo era o sítio de ativação por α -cetoácidos pela formação de um thiohemiacetal, enquanto que o resíduo Cys-128, localizado mais próximo a membrana mitocondrial interna, não pareceu estar diretamente envolvido em nenhum destes processos regulatórios. Eles afirmaram que no estado oxidado o dímero da oxidase alternativa mantém suas subunidades unidas através de uma ligação dissulfeto que bloqueia a ação de α -cetoácidos no seu sítio de atuação: o resíduo de cisteína Cys-78. Esta ligação dissulfeto pode ser reduzida pela adição de uma agente redutor ou possivelmente por uma tioredoxina redutora endógena. A sulfidrilas livre do resíduo Cys-78 pode então reagir com o piruvato ou outro α -cetoácido formando um thiohemiacetal, o que resulta no aumento da atividade da enzima. (Figura 5)

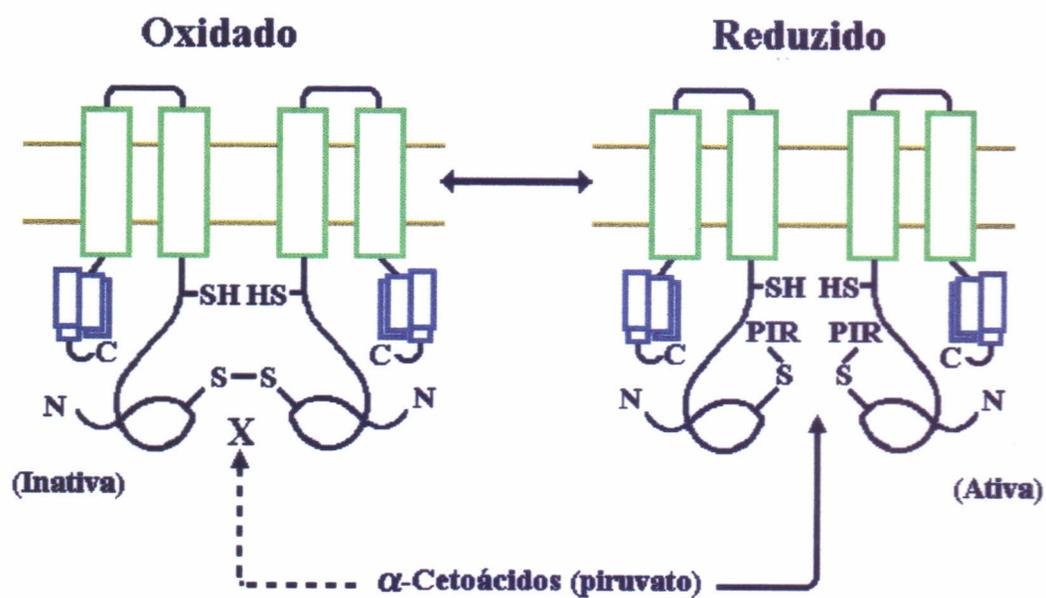


FIGURA 5 - Esquema da ativação da oxidase alternativa por α -cetoácidos. --S--PIR indica o tiohemiacetal --S--COH(R)CO_2^- , onde $\text{R} = \text{CH}_3$, para o piruvato (RHOADS *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- a) caracterizar e quantificar a atividade da oxidase alternativa através da avaliação do transporte de elétrons resistente ao CN^- e a antimicina A;
- b) estudar o efeito do pH sobre a respiração resistente ao CN^- , como meio de determinar o pH ótimo de ação da oxidase alternativa;
- c) determinar o efeito de succinato e piruvato na modulação da respiração resistente ao CN^- ;
- d) estudar o efeito do pH sobre a respiração resistente ao CN^- por succinato e piruvato.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - MATERIAL VEGETAL

O feijão de corda foi classificado por Verdcourt, em 1970, como uma dicotiledônea, pertencente a ordem *Fabales*, Família *Fabaceae*, sub-família *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, sub-tribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. As cultivares utilizados neste trabalho foram escolhidos devido a suas diferentes tolerâncias ao estresse salino, sendo a cultivar Vita 3 menos sensível do que a cultivar Vita 5.

Sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Vita 5, fornecidas pelo Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, foram imersas, por 10 minutos, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%, para remoção de possíveis esporos de fungos presentes no tegumento das sementes, sendo em seguida lavadas exaustivamente em água corrente para remoção do NaOCl. Após este tratamento as sementes foram imersas em água milli-Q, por um período de 3-4 horas, até que atingissem, aproximadamente, o dobro do tamanho inicial sendo então incubadas em câmara fria por aproximadamente 18 horas. Esses tratamentos visaram possibilitar uma germinação mais uniforme.

A germinação das sementes foi feita em papel de filtro (ver necessidade de referência), de 25 a 30 sementes por 1/4 de folha, embebido com água milli-Q (controle) e com uma solução de NaCl 100 mM (estresse), no escuro à temperatura ambiente (± 25 °C), por sete dias quando as plântulas eram colhidas e os hipocótilos separados dos epicótilo e raízes para proceder-se o isolamento e purificação da fração mitocondrial.

2 - EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO MITOCONDRIAL

As mitocôndrias foram isoladas dos hipocótilos das plantas estioladas pelo método de IKUMA, 1970, modificado por SILVA LIMA *et al.* (1977). Os hipocótilos (800 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 (2500 ml), previamente resfriado, contendo: Manitol 0,35 M, EDTA 1,0 mM, L-Cisteína 4,0 mM, BSA 0,1 % (p/v) em tampão TRIS-HCl 6,0 mM sendo o pH ajustado com HCl 0.1 M para 8,0. Os hipocótilos foram separados em 4 porções de 200 g. que eram trituradas com \pm 300 ml de meio utilizando-se 4 pulsos de 1 segundo em velocidade mínima, sendo o homogenato obtido filtrado em tela de nylon com malha de 150 μ m. A seguir os hipocótilos macerados eram submetidos a nova trituração, procurando-se manter as proporções iniciais (200 g/ 300 ml do meio de extração), com 4 pulsos de 1 segundo na velocidade mínima e 1 pulso de 3 segundos na velocidade máxima. O novo homogenato resultante era filtrado na mesma tela. Os resíduos dos hipocótilos eram então descartados e o homogenato resultante das triturações era submetido a centrifugação diferencial, conforme o esquema da figura 6. Todo o processo de obtenção do homogenato foi feito em baixa temperatura e o pH do mesmo, quando necessário foi mantido em torno de 7 com KOH 0,1 M.

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 rotor IEC CAT-877 por 10 minutos, o precipitado obtido era descartado e o sobrenadante submetido a nova centrifugação a 9500xg, no mesmo rotor, por 20 minutos. O sobrenadante obtido era descartado e o precipitado, onde se encontrava a fração mitocondrial era ressuspensão em meio de lavagem, contendo Manitol 35 mM, e BSA 0,1 % (p/v) em tampão TRIS-HCl 25 mM, com pH ajustado para 7,2. Essa ressuspensão era feita 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. Os precipitados ressuspensos eram transferidos para um único tubo de centrífuga que tinha seu volume completado com meio de lavagem e submetidos a centrifugação a 900xg com rotor IEC CAT-875 por 10 minutos, sendo o precipitado obtido descartado e o sobrenadante centrifugado no mesmo rotor a 7500xg por 20 minutos. O precipitado obtido nesta última centrifugação, continha a fração mitocondrial bruta, que seria então purificada. A purificação da fração mitocondrial era feita em gradiente de Percoll a 28 % formado em uma solução contendo Sacarose 0,3 M, EDTA 1 mM e BSA 0,1 % (p/v) em tampão TRIS-HCl 10 mM pH 7.2, conforme descrito por JOLIVET *et al.* (1990).

A fração mitocondrial, aproximadamente 1,0 ml era colocada sobre o gradiente de Percoll a 28% e submetida a centrifugação a 30000xg em rotor IEC CAT-875 por 45 minutos, resultando uma separação como está esquematizado na Figura 6. A fração mitocondrial era removida com auxílio de uma pipeta, diluída 10 vezes em meio de lavagem e recentrifugada a 12500xg em rotor IEC CAT-875 por 15 minutos. O precipitado obtido era ressuspensado em aproximadamente 20 ml de meio de lavagem e submetido a nova centrifugação com 12500xg, no mesmo rotor por 10 minutos, obtendo-se um precipitado que continha as mitocôndrias purificadas. As mitocôndrias purificadas eram ressuspensas em 0,5 ml de meio de lavagem (resultando num volume final de ± 1 ml), mantido em gelo durante a realização dos ensaios.

3 - DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA MITOCONDRIAL

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

Os reagentes foram adicionados na seguinte sequência: colato de sódio, em concentração final de 0,25 %. hidróxido de sódio, em concentração final de 8,0 %, alíquota de 50 μ l 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 era feitas em espectrofotômetro marca PHARMACIA BIOTECH, modelo ULTROSPEC 2000, em 540 nm. A leitura da absorbância da amostra foi feita contra um padrão branco composto dos reagentes supracitados com exceção da alíquota da fração mitocondrial. A concentração de proteína foi determinada em relação a uma curva padrão de BSA.

Em média partindo-se de 800 g de hipocótilos eram obtidas de 40 a 60 mg de proteína mitocondrial/ml.

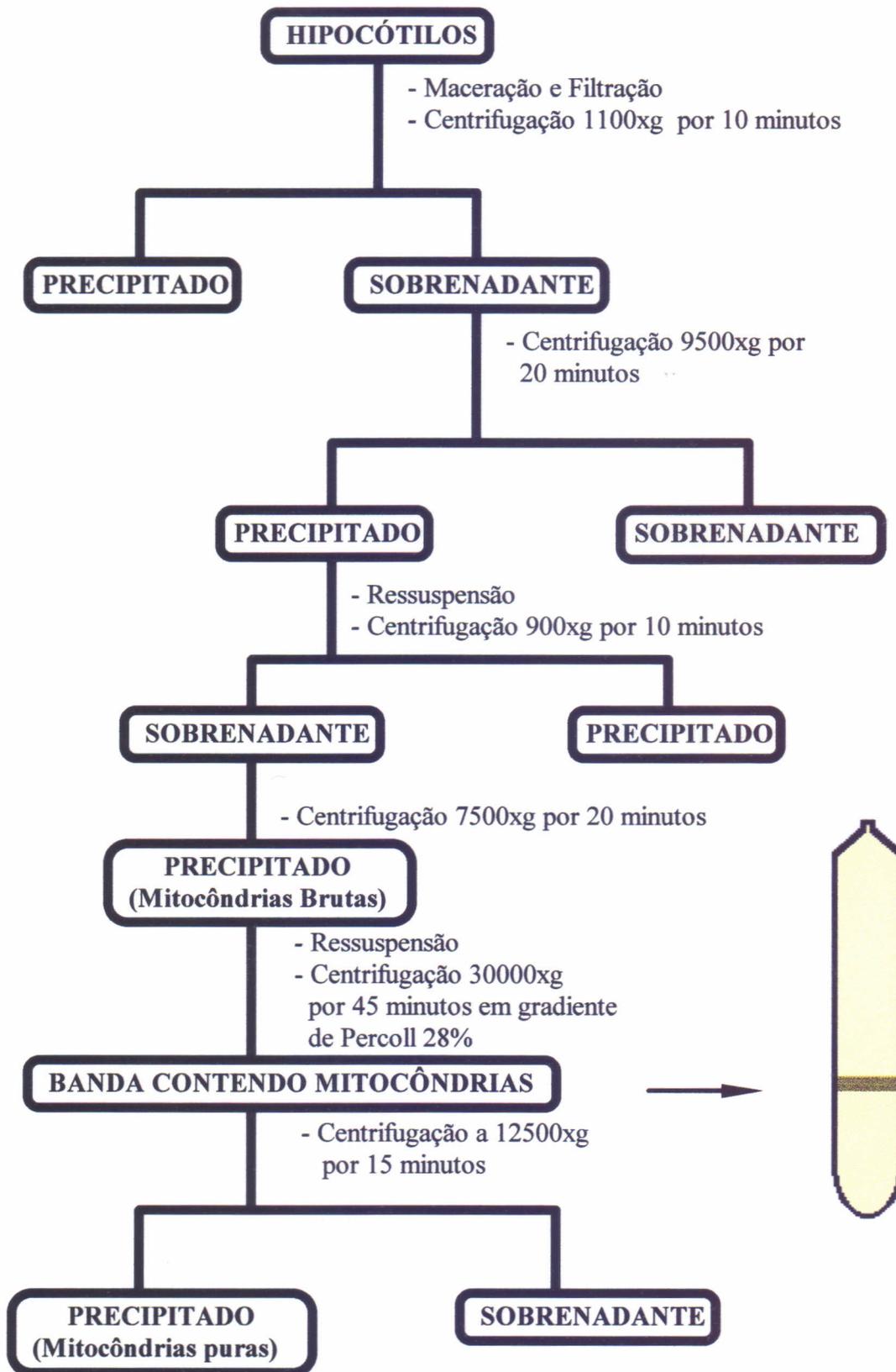


FIGURA 6 - Esquema de extração e purificação das mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata*.

4 - ENSAIOS POLAROGRÁFICOS

Os ensaios polarográficos, visando medir o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foram realizados em um oxígrafo marca GILSON, modelo K-CI, polarizado com 0,8 V, utilizando-se um eletrodo de oxigênio tipo Clark acoplado a uma câmara de reação de volume igual a 1.9 ml. Este eletrodo é constituído por um catodo de platina e um anodo de prata unidos por uma ponte de KCl 2 M isolada do meio por uma membrana de polietileno, conforme esquema mostrado na figura 7. O oxigênio atravessa a membrana sofrendo redução na superfície do catodo que se encontra polarizada; a despolarização resultante desse processo de oxidação do catodo gera uma corrente que é estequiometricamente relacionada com a quantidade de oxigênio reduzido. Esta corrente é 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, sendo, assim, uma medida direta da concentração de oxigênio presente no meio. Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (± 25 °C). O meio de fosforilação consistia de: Manitol 0,35 M, $MgCl_2$ 6,0mM, KCl 10 mM, BSA 0,1% e KH_2PO_4 10mM. O pH do meio variou de acordo com o tipo e a necessidade do ensaio e o volume final da cubeta foi sempre 1,9 ml, sendo a homogeneização garantida por um pequeno agitador magnético anexado à câmara de reação.

4.1. CÁLCULO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

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

No presente trabalho, realizado a 25 °C, o consumo de oxigênio foi em presença de manitol, sendo a concentração de O_2 dissolvido no meio de fosforilação, segundo FERNANDES DE MELO (1978), igual a 222 μM , portanto a concentração de oxigênio na câmara de reação era de 421 nmoles/1,9 ml o que equivale a 842 nátomos de oxigênio/1,9 ml.

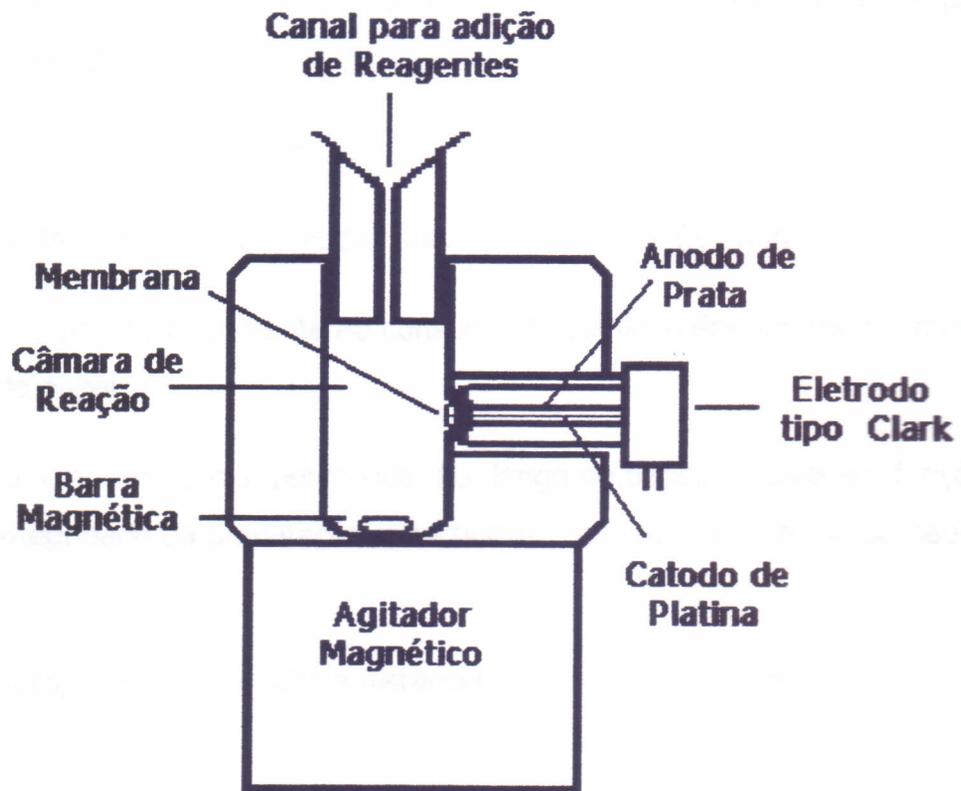


FIGURA 7 - Esquema da cuba de reação e do eletrodo para oxigênio tipo Clark.

Partindo-se da altura do papel do registrador, 185 mm, determinou-se que cada milímetro correspondia ao consumo de 2,3 nmoles de O₂ ou 4,6 nátomos de oxigênio, sendo a velocidade de consumo de oxigênio determinada a partir da seguinte expressão:

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

V = velocidade de consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . min⁻¹ ;

C = 2,3 - constante equivalente ao consumo de oxigênio em nmoles 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 a distância horizontal de 12 mm.

4.2 CÁLCULO DO CONTROLE REPIRATÓRIO

O Controle Respiratório foi determinado sempre no pH 7,25 e em ensaios específicos nos pHs 6,25 e 7,75, utilizando-se como substrato NADH (1.0 mM) e adições sucessivas de ADP (78 μM), e mensurados segundo CHANCE & WILLIAMS (1956) a partir da seguinte expressão:

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

C. R. = Controle respiratório (coeficiente);

V₃ = velocidade do consumo de oxigênio no estado 3, em presença de substrato e ADP;

V₄ = velocidade do consumo de oxigênio no estado 4, em presença apenas do substrato.

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

4.3 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 e a adição de ADP provoca um aumento imediato na taxa de utilização de oxigênio. A duração do aumento de taxa de consumo do oxigênio é dependente da concentração de ADP adicionada meio de reação, sendo que a quantidade de oxigênio utilizado é proporcional à quantidade de ADP fosforilado a ATP e pode ser calculada diretamente dos traçados polarográficos.

Partindo-se da premissa de que a preparação mitocondrial esteja íntegra, essa relação 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:

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

ADP = nmoles de ADP adicionados ao meio de reação;

h = 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 do papel.

4.4 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA EXTERNA

A integridade da membrana mitocondrial externa foi avaliada comparando-se a oxidação de citocromo *c* pelo ascorbato, em presença de meio isotônico e meio hipotônico, conforme descrito por NEUBURGER *et al.* (1982), em pH 7,25. 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 percentagem.

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 1,9 ml.

No ensaio em meio hipotônico inicialmente 1 mg de proteína mitocondrial era adicionada a 0,9 ml de água milli-Q e a mistura homogeneizada, a alta velocidade, por 3 minutos. Em seguida eram adicionados 0,9 ml de meio de fosforilação, ascorbato 5 mM, citocromo *c* 8 mM e KCN 1 mM, em um volume final de 1,9 ml.

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

5 - AVALIAÇÃO DA VIA INSENSÍVEL AO CN⁻

A via insensível ao KCN foi estudada em uma faixa de pH de 5.50 a 8.25 com intervalos de 0.25, sendo este pH calibrado no meio de reação.

Nos ensaios destinados a estudar o comportamento da via insensível ao KCN, em estado 4, o substrato utilizado foi NADH (1 mM) em presença e ausência de DTT (2.5 mM) sendo adicionado posteriormente 1 mg de proteína mitocondrial. A via citocrômica era então inibida com adição de KCN (1 mM) ou Antimicina A 4 μM e o consumo de O₂ observado foi atribuído a respiração insensível ao CN⁻, sendo esta inibida pela adição de n-propil galato. Nos ensaios para avaliação da via insensível ao KCN no estado 3, em presença e ausência de DTT 2,5 mM após a adição da proteína mitocondrial (1 mg) era adicionado ADP 78 mM e em seguida era feita a inibição da via citocrômica e da respiração insensível ao CN⁻ como descrito anteriormente.

6 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PIRUVATO E SUCCINATO

Os ensaios destinados a estudar a modulação (estimulação) da AOX foram realizados nos pH 6.25, 7.25 e 7.75 utilizando-se como substrato NADH (1 mM) em presença e ausência de DTT (2.5 mM) tendo sido mensurado o efeito de piruvato nas seguintes concentrações: 5, 10, 50, 100, 250 e 500 μ M, e 1, 5, 10, 15, 20 e 25 M. Para o succinato foram utilizadas as concentrações de: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 mM. Essas concentrações foram adicionadas (de forma não acumulativa) após a inibição da via citocrômica pelo KCN, conforme descrito anteriormente.

7 - DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX DA AOX

O princípio da técnica de immunoblotting é a detecção de proteínas depois da imobilização delas em membranas com ajuda de anticorpos como marcadores das enzimas. O método consiste imobilizar as proteínas em uma membrana seguida da incubação com anticorpos específicos, que são posteriormente marcados com uma enzima que revelará sua atividade através do uso de técnicas imunoquímicas.

O método implica em 3 etapas: a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida; a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose; e a identificação das proteínas com o uso de anticorpos específicos.

Esta avaliação foi conduzida para verificar o estado redox da oxidase alternativa na ausência e presença de DTT e assegurar que a concentração de DTT utilizada era suficiente para deixar a AOX na sua forma mais ativa, a forma reduzida.

7.1. ELETROFORESE EM SISTEMA SDS-PAGE

7.1.1. - Preparação das amostras

Duas amostras de proteína mitocondrial (0.5 mg) foram incubadas em 0.95 ml meio de reação, nos pH 6,25, 7.25 e 7,75, em presença e ausência de DTT (2.5 mM), em tubos de eppendorf por 10 minutos, seguindo-se uma centrifugação a 10000 rpm

a 4 °C em centrífuga refrigerada marca ICIBRAS. modelo SPIN VI. O precipitado obtido foi ressuspense em 80 µl de tampão Tris pH 7,2 e adicionado 20 µl do corante da amostra composto de Azul de Bromofenol (2 %) e Glicerol (25 %) em tampão TRIS pH 7,0. Após agitação as amostras eram aquecidas ate 100 °C e permaneciam por 2 minutos nesta temperatura, quando era desligado o aquecimento, permanecendo por mais 15 minutos sob alta temperatura

7.1.2. - Preparação dos géis de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida foram preparados de acordo com método de LAEMMLI (1970) em presença de SDS, conforme o seguinte protocolo:

a) Main gel (12 %):

Tris - HCl 1,5 M, pH 8,8 - 2,5ml

SDS 10 % (p/v) - 100 µl

bis-acrilamida 30 % - 4 ml

TEMED - 8,5 µl

Persulfato de Amônia 15 % - 85 µl

Água milli-Q - 3,3 ml

b) Stacking gel (4 %)

Tris - HCl 1,0 M, pH 6,8 - 0,63 ml

SDS 10 % (p/v) - 50 µl

bis-acrilamida 30 % - 0,65 ml

TEMED - 5 µl

Persulfato de Amônia 15 % - 25 μ l

Água milli-Q - 3,7 ml

Este protocolo permitia a confecção de dois géis com as seguintes dimensões: largura 8,0 cm, altura 6,0 cm e espessura de 1 mm.

7.1.3 - Condições de corrida das eletroforeses

Alíquotas de 20 μ l das amostras, correspondendo a 100 μ g de proteína mitocondrial foram aplicadas nos géis de poliacrilamida e submetidas a eletroforese sob 40 mA por aproximadamente 75 minutos. No mesmo gel foi aplicado uma solução de marcadores de peso molecular variando de 16 a 90 kDa

7.2. PREPARAÇÃO DO IMMUNOBLOTTING

A técnica de immunoblotting consiste na transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitocelulose. O esquema de montagem do conjunto de transferência é mostrado na Figura 8. No presente caso a transferência foi realizada para uma membrana de nitrocelulose, marca SIGMA, com poros de 0.2 μ m em uma cuba de eletrotransferência vertical marca HÖEFFER com uma solução tampão de transferência composta de glicina 39 mM, SDS 0,0375 % (m/v) e metanol 20 % (v/v) em tampão TRIS 48 mM pH 7,2, em um volume final de 1500 ml, sob as condições de amperagem constante de 200 mA fornecida por uma fonte marca PHARMACIA BIOTECH, modelo EPS-600. O tempo de transferência foi função do número de géis que foram transferidos, sendo necessário 2 horas por gel na cuba de transferência. Todo o processo ocorreu em câmara fria, sendo a agitação do tampão de transferência realizada por um agitador magnético

Após a transferência as membranas eram imersas numa solução corante de Ponceau a 0,5% (0,5 g do corante de Ponceau, 1,0 ml de ácido acético glacial e 100 ml de água milli-Q q.s.p.) por 10 minutos seguida de lavagem com água destilada

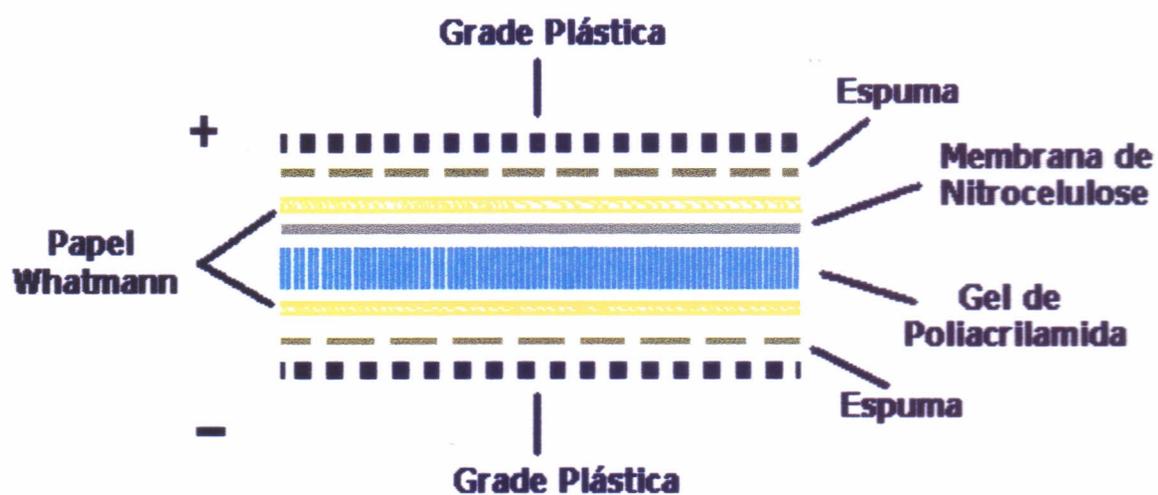


FIGURA 8 - Esquema da sequência de montagem do conjunto para transferência de proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose

para remoção do excesso de corante, quando então era visualizada a presença das proteínas na membranas e marcadas (com caneta esferográfica) a posição dos marcadores de peso molecular). Em seguida, os géis foram incubados, em geladeira, por aproximadamente 18 horas, com uma solução tampão de PBS com 2 % de leite desnatado marca MOLICO (NESTLÉ), para bloquear dos sítios ativos livres da membrana.

O tampão PBS era constituído por:

NaCl - 40,0 g

KCl - 1,0 g

Na₂HPO₄ . 7H₂O - 5,75 g

KH₂PO₄ - 1.0 g

H₂O milli-Q q.s.p. - 500 ml

Essa solução tinha o pH ajustado para 6,5 e era considerada estoque sendo diluída 10 vezes por ocasião de seu uso.

7.3. REVELAÇÃO DO IMMUNOBLOTTING

Após a incubação as membranas eram lavadas, 2 vezes por 15 minutos, com o mesmo tampão acrescido de TWEEN-20 (20% v/v), sob agitação. A membrana lavada era imersa em tampão PBS contendo o anticorpo monoclonal PM 043 isotipo G1, fornecido pela GT Monoclonal Antibodies (Lincoln, USA) específico para AOX desenvolvido em camundongo, dirigido contra AOX de *Sauromatum guttatum*, (denominado anticorpo primário) numa diluição de 1/1000. Esta imersão foi mantida sob agitação durante 2 horas, em placa de petri, a temperatura ambiente (± 25 °C). Seguiu-se 2 lavagens das membranas, por 15 minutos, com tampão PBS acrescido

do TWEEN-20 (20% v/v). Em seguida, as membranas eram transferidas para placas de petri contendo a um anticorpo com peroxidase conjugada (anticorpo secundário) desenvolvido em ovelha contra imunoglobulina de camundongo (NXH 931 fornecido pela LIFE SCIENCE), ficando sob agitação por 2 horas a mesma temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas nas mesmas condições e foram colocadas em uma solução reveladora, com substrato para peroxidase, composta de diaminabenzidina (DAB) 0,1g/ml e Cloreto de Níquel (NiCl_2) 0,4 g/ml em tampão TRIS-HCl 100 mM pH 7,2, sendo adicionado 12,5 μl de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 30 v 5 % (v/v) sendo mantidas no escuro à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), por aproximadamente 30 minutos, quando então a reação era interrompida com a lavagem da membrana em água destilada. As membranas eram secas, envolvidas em filme de PVC e posteriormente fotografadas.

RESULTADOS

1 - CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA FRAÇÃO MITOCONDRIAL

Para avaliação da fração mitocondrial foram considerados os seguintes parâmetros: a integridade da membrana externa, a relação ADP/O e o controle respiratório (CR)

1.1- Integridade da Membrana Externa

A Figura 9 mostra uma avaliação da integridade das mitocôndrias purificadas 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 5 mM, Citocromo *c* 8 mM e KCN 1 mM em pH 7,25. 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 13,8 nmoles de O₂ . 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 isolamento mitocondrial. Já em meio hipotônico (B) onde as mitocôndrias estariam submetida a um grau máximo de disrupção, o consumo de oxigênio foi de 82,8 nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹, isto é, 6 vezes mais elevado do que o observado com as mitocôndrias em meio isotônico. Estes resultados permitem estimar, conforme está descrito em Material e Métodos, a integridade mitocondrial que foi de 83,3%. Em todos os ensaios realizados o grau de integridade da membrana externa foi superior a 80 %

1.2 - Relações ADP/O e C.R.

A Figura 10 apresenta o consumo de oxigênio da fração mitocondrial purificada de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5 tendo NADH como substrato oxidável seguido de sucessivas adições da ADP, nos pH 6.25 (A), 7.25 (B) e 7.75 (C). Após as adições de ADP foram medidos o consumo de oxigênio nos estados

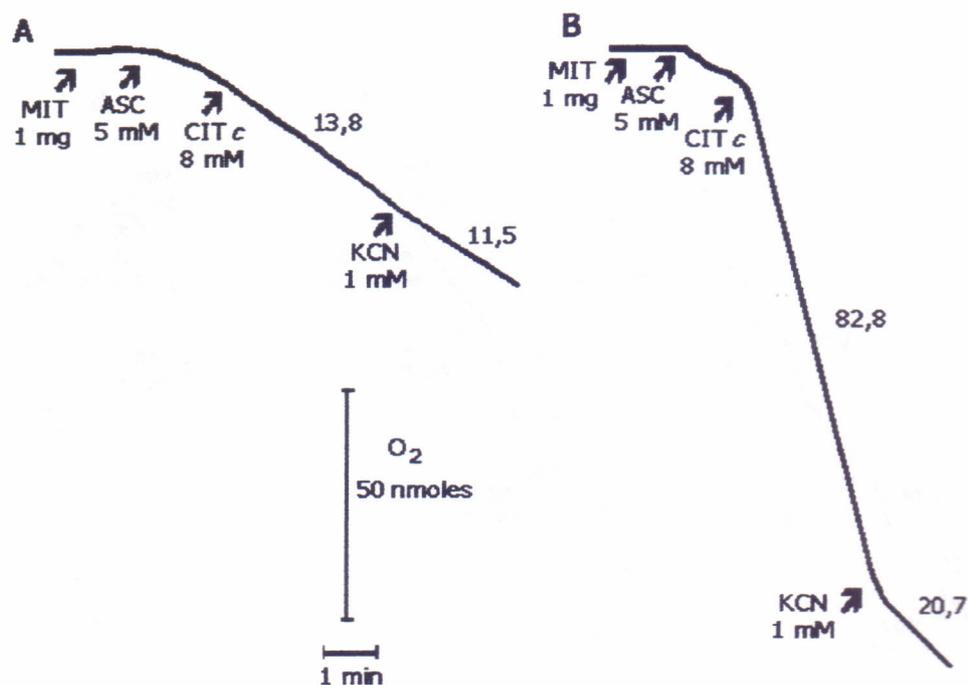


FIGURA 9 - Consumo de oxigênio dependente de ascorbato e citocromo *c* de mitocôndrias, de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 5, purificadas em gradiente de percoll a 28 %. Os números ao longo dos traçados referem-se ao consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹. Nota-se que pelo elevado consumo de O₂ pelas mitocôndrias rompidas que a integridade das mitocôndrias

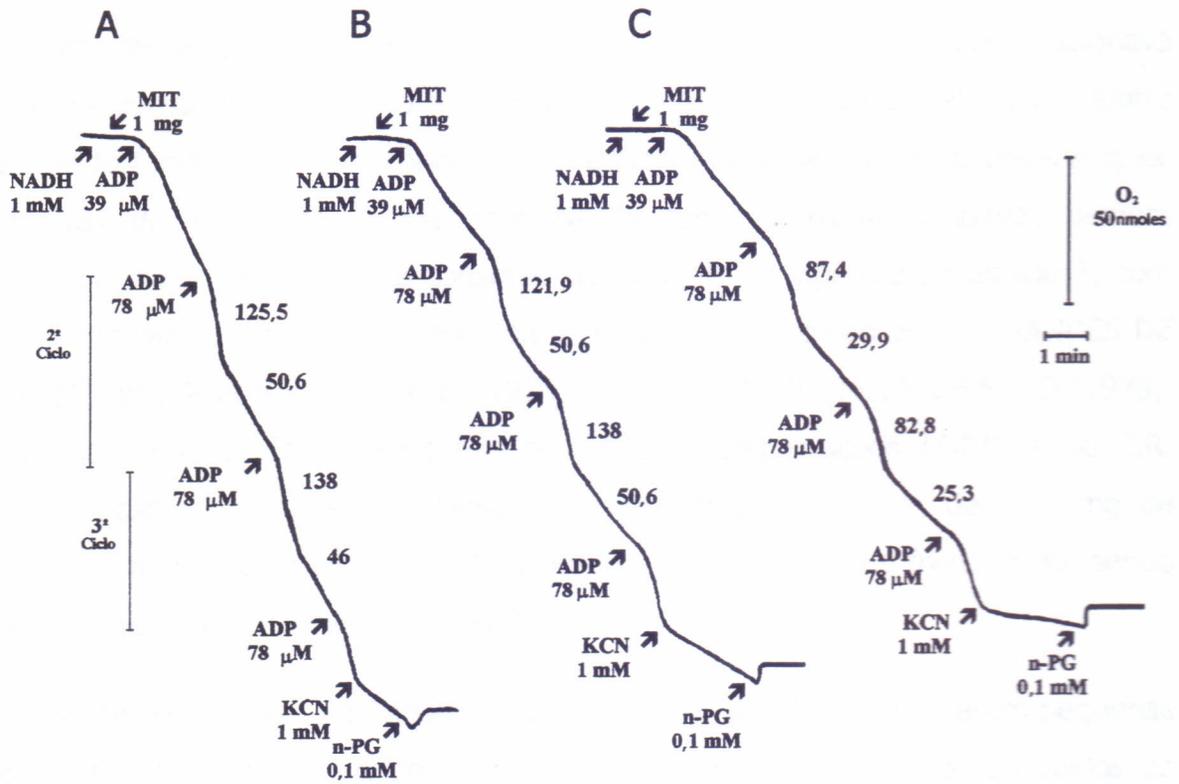


FIGURA 10 - Oxidação do NADH por mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. nos pHs 6,25 (A), 7,25 (B) e 7,75 (C). Os números ao longo dos traçados indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹ nos 2º e 3º ciclos de fosforilação.

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 10, tomados como padrão. A escolha do NADH como substrato oxidável para os estudos com as mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L) Walp cv Vita 5, deveu-se ao fato de ser esse substrato, dentre os previamente testados, o que ocasionava valores de consumo de oxigênio mais elevados pelas mitocôndrias (Tabela 1). Quatro ciclos de fosforilação nas mitocôndria purificadas foram desencadeados pelas adições sucessivas de ADP, em 3 pHs com NADH como substrato oxidável, sempre mostrando maior velocidade de consumo de oxigênio na vigência do estado 3, com valores comparáveis aos encontrados em mitocôndrias de sorgo por FERNANDES DE MELO (1978) E POR Bowman *et al.* (1976), citado por FERNANDES DE MELO (1978), em mitocôndrias de feijão. Para fins de avaliação das relações ADP/O e do 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, sendo esses valores apresentados na Tabela 2.

Pode-se observar, na Tabela 2 que as relações ADP/O apresentaram pequenas diferenças em si, porém, sendo compatíveis com os valores teóricos atribuídos ao sistema da desidrogenase do NADH exógeno, encontrado em mitocôndrias vegetais. Os valores obtidos para os CR, mostrados na mesma Tabela 2, tiveram uma maior variação entre os pH e entre os dois ciclos dentro de um mesmo pH, porém todos os valores obtidos foram compatíveis e comparáveis com os valores existentes na literatura para oxidação de NADH.

Alguns autores afirmam que o controle 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 portanto comum que os valores encontrados para os parâmetros de avaliação da fração mitocondrial sejam inferiores aos obtidos com frações mitocondriais de células animais, não indicando, porém, uma baixa qualidade da fração obtida (FERNANDES DE MELO, 1978). Os resultados obtidos nos ensaios para caracterização da fração mitocondrial mostraram que as mesmas estavam em conformidade com aquelas

TABELA 1 - Oxidação de diferentes substratos e via cianeto resistente em diferentes pHs em condições controle e de estresse salino em mitocôndrias de dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp, Vita 3 e Vita 5.

| pH | 6,25 | | | | | | 7,25 | | | | | | 7,75 | | | | | |
|----------|-------|------|-------|------|-------|------|-----------|------|-------|------|-------|------|-----------|------|-------|------|-------|-----|
| | MAL | | SUC | | NADH | | MAL + GLU | | SUC | | NADH | | MAL + GLU | | SUC | | NADH | |
| SUBST | EST 3 | KCN | EST 3 | KCN | EST 3 | KCN | EST 3 | KCN | EST 3 | KCN | EST 3 | KCN | EST 3 | KCN | EST 3 | KCN | EST 3 | KCN |
| VITA 3 C | 128,6 | 30,2 | 134,7 | 78,3 | 168,2 | 18,6 | 92,3 | 22,6 | 144,8 | 48,2 | 168,0 | 10,4 | 124,8 | 17,2 | 131,3 | 24,2 | 141,9 | 7,1 |
| VITA 3 E | 126,3 | 32,3 | 138,9 | 81,2 | 170,6 | 19,2 | 90,7 | 21,4 | 142,7 | 50,3 | 170,6 | 11,3 | 122,6 | 19,4 | 132,7 | 26,7 | 146,7 | 7,9 |
| VITA 5 C | 131,9 | 91,7 | 142,6 | 85,9 | 172,0 | 19,8 | 93,0 | 20,7 | 154,9 | 53,7 | 172,5 | 10,2 | 119,2 | 18,9 | 134,9 | 25,1 | 145,2 | 6,4 |
| VITA 5 E | 129,2 | 30,2 | 132,6 | 83,2 | 165,9 | 18,6 | 96,4 | 22,7 | 148,3 | 47,9 | 161,5 | 10,2 | 121,2 | 19,1 | 137,1 | 25,8 | 142,4 | 6,4 |

Consumo de oxigênio (nmoles O₂ . mg de prot⁻¹ . min⁻¹) da fração mitocondrial não purificada dos cultivares VITA 3 e VITA 5 em condição controle (C) e em presença de 100 mM de NaCl (E), durante a oxidação dos substratos: malato 13 mM (MAL), malato 13 mM + glutamato 3 mM (MAL + GLU), succinato 8 mM (SUC) e NADH 1 mM.

TABELA 2 - Valores dos Controles Respiratório (C.R.) e das relações ADP/O das frações mitocondriais não purificada de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em condição controle, durante os 2º e 3º ciclos de fosforilação, em presença de NADH 1mM e sucessivas adições de ADP 78 mM, nos pHs 6,25 , 7,25 e 7,75

| pH | 2º Ciclo | | 3º Ciclo | | Média ($\bar{\mu}$)* | |
|------|----------|-------|----------|-------|------------------------|-------|
| | C.R. | ADP/O | C.R. | ADP/O | C.R. | ADP/O |
| 6,25 | 2,5 | 1,6 | 3,0 | 1,8 | 2,7 | 1,7 |
| 7,25 | 2,4 | 1,9 | 2,0 | 1,7 | 2,2 | 1,8 |
| 7,75 | 2,9 | 1,7 | 3,3 | 1,7 | 3,1 | 1,7 |

* média dos valores do C.R. e das relações ADP/O calculadas a partir dos valores do 2º e do 3º ciclo de fosforilação em cada pH.

encontradas na literatura: BONNER, 1967; IKUMA & BONNER, 1967; KOEPPE & MILLER, 1972. DOUCE et al. 1973; DAY & WISKICH, 1974; PALMER, 1976 e FERNANDES DE MELO, 1978.

2- VIA CIANETO RESISTENTE EM MITOCÔNDRIAS DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP. cv VITA 5

DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO RESISTENTE AO CIANETO

O consumo de oxigênio resistente ao CN^- , corresponde à atividade da via alternativa de transporte de elétrons, resulta da agregação de KCN, reconhecido inibidor da via citocrômica. Esse consumo de oxigênio foi medido em ausência e presença de ADP 78 mM e foi posteriormente inibido pela adição de n-propil galato ao meio. A Figura 10 mostra a via cianeto resistente nos 3 pHs bem como sua inibição por n-propil galato.

3 - DEFINIÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE ESTUDO DA RESPIRAÇÃO RESISTENTE AO CIANETO

Visando determinar as melhores condições para pôr em evidência a atividade da oxidase alternativa dos dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. com diferentes susceptibilidade ao estresse salino, foram realizados ensaios onde os cultivares Vita 3 e Vita 5 foram avaliados em 3 pHs diferentes (6,25 , 7,52 e 7,75) com 4 diferentes substratos (malato (pH 6,25), malato + glutamato (pHs 7,25 e 7,75), succinato e NADH nas condições controle e de estresse (100 mM).

Os resultados expressos na Tabela 1, mostraram não existir diferenças marcantes no consumo de oxigênio, de mitocôndrias não purificadas dos cultivares Vita 3 e Vita 5 de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., entre os 2 cultivares independente do tratamento aplicado e do substrato oxidável. Dentre os substratos, NADH foi o que ocasionou um maior consumo de oxigênio, independentemente do pH. O consumo de oxigênio resistente ao CN^- mostrou-se não depender do cultivar nem do

tratamento, mas pareceu estar diretamente ligado ao substrato oxidável e ao pH. No pH 6,25 foram observados os maiores valores de consumo de oxigênio para os 3 substratos seguido dos pH 7,25 e 7,85. O succinato e o NADH foram os substratos que ocasionaram os maiores e menores valores de consumo de oxigênio resistente ao CN^- respectivamente. Esses resultados indicaram que a atividade da via resistente ao CN^- parece não estar relacionada com o estresse salino, porém ser diretamente influenciada pelo pH. A grande diferença, de consumo de oxigênio por esta via, relacionada aos substratos succinato e NADH, talvez estivesse associada ao metabolismo do primeiro, que além de servir como substrato poderia estar agindo como efector positivo da atividade da oxidase alternativa (WAGNER *et al.*, 1995 e MILLAR *et al.*, 1996). Diante disso os efeitos do pH sobre a via resistente ao CN^- e sua estimulação por piruvato foram estudados tendo como substrato oxidável o NADH, que embora apresentasse menores níveis de atividade da oxidase alternativa, seguramente não estava envolvido na modulação de sua atividade. O cultivar Vita 5 em condição controle, por apresentar os maiores valores de consumo de oxigênio quando o NADH era utilizado como substrato oxidável, foi escolhido para a elaboração do modelo experimental.

4 - DETECÇÃO DA AOX E DE SEUS ESTADOS REDOX

A detecção da oxidase alternativa (AOX) e da alteração de seu estado redox provocada pela adição de DTT, foi realizada através de "immunoblotting" (ver Material e Métodos) visando: (1) detectar a presença da enzima na preparação mitocondrial e (2) o seu estado redox, na ausência de substrato oxidável exógeno. A Figura 11 mostra que, em condição nativa (- DTT), a AOX encontrava-se quase que totalmente, na sua forma oxidada (monômero com 35 kDa), nos pHs 6,25, 7,25 e 7,75. Para assegurar que os ensaios com a oxidase alternativa fossem realizados com a enzima na sua forma mais ativa (reduzida) foi utilizado DTT 2,5 mM, concentração que se mostrou suficiente para manter todo o "pool" da oxidase alternativa na sua forma reduzida (dímero com 70 kDa), nos 3 pH testados, o que pode ser visto na mesma figura (+ DTT).

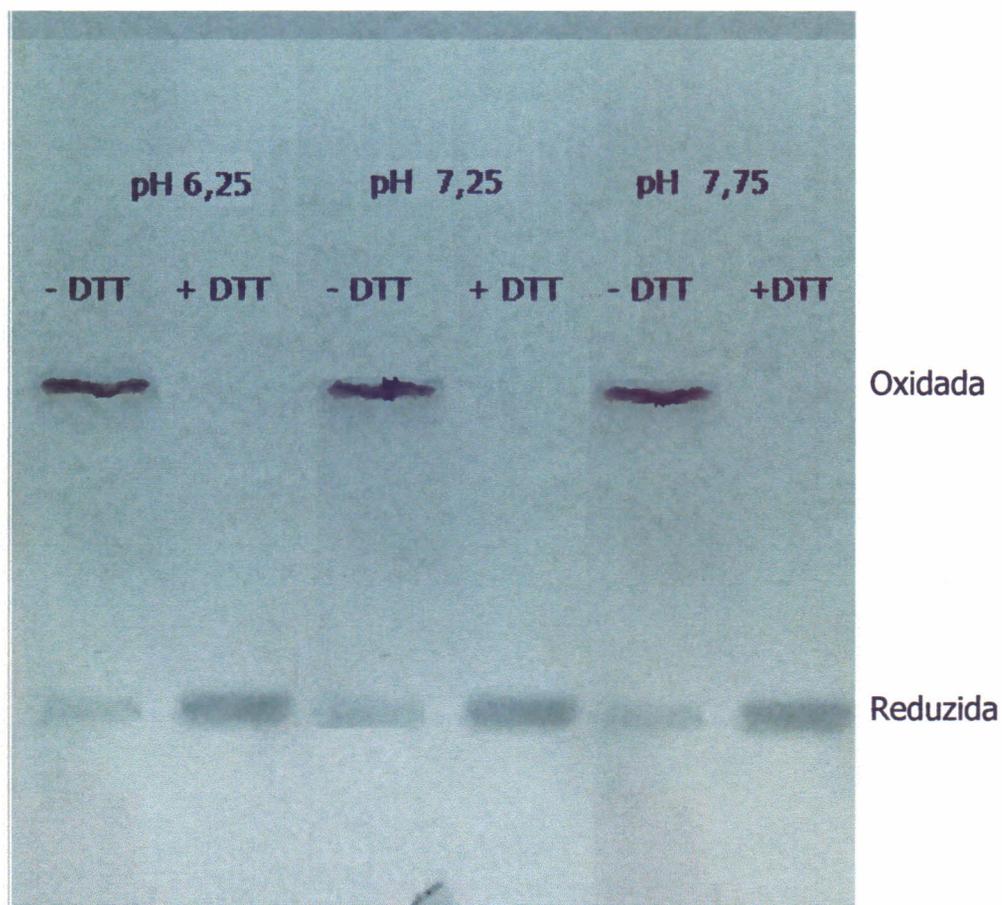


FIGURA 11 - Detecção, através de "immunoblotting", da oxidase alternativa de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, e de seu estado redox em diferentes pHs em ausência e presença de DTT. Mitocôndrias: 100 μ g, DTT 2,5 mM. As demais condições estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.

5 - FUNCIONAMENTO DA VIA ALTERNATIVA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO INSENSÍVEL AO CIANETO

A determinação do consumo de oxigênio pela via alternativa, catalisada pela AOX foi realizada polarograficamente nos estados 3 e 4 com NADH 1 mM como substrato oxidável, em presença e ausência de DTT 2,5 mM utilizando-se como inibidores da via citocrômica KCN e Antimicina A (valores de consumo oxigênio apresentados na Tabela 3). A análise destes resultados mostrou que o consumo de oxigênio da via resistente ao CN^- sempre foi mais elevado em presença de DTT, provavelmente por que o DTT aumentou a quantidade da forma reduzida (ativa) da oxidase alternativa. As Figuras 12 e 13 apresentam um exemplo da medida polarográfica de consumo de oxigênio insensível ao KCN (Figura 12) e a Antimicina A (Figura 13) nos pHs 6,25 , 7,25 e 7,75. A Figura 14 evidencia, através de "immunoblotting" a presença da AOX quando a preparação mitocondrial foi previamente incubada com NADH 1 mM, ADP 78 mM e KCN 1 mM, em 3 diferentes pHs, em presença e ausência de DTT, onde uma maior quantidade da forma reduzida da oxidase alternativa é revelada em presença de DTT.

6 - INFLUÊNCIA DO pH SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO RESISTENTE AO CIANETO

Com o objetivo de determinar o efeito do pH sobre comportamento do consumo de oxigênio resistente ao CN^- , foi feita uma curva em que o pH foi aumentado de 0,25 unidades, partindo-se do pH 5,75 até 8,25. A Figura 15, mostra a curva obtida e pode-se observar que o consumo de oxigênio resistente ao CN^- foi maior em pH ácido, atingindo um máximo no pH 6,25, decrescendo com a alcalinização do meio. Os resultados da curva confirmaram aqueles obtidos anteriormente quando se trabalhava com 3 valores de pH, isto é 6,25 , 7,25 e 7,75 (Figuras 10 e 12, Tabelas 1 e 2) e vê-se que o ótimo de consumo de oxigênio foi obtido no pH 6,25 , cerca de 2 vezes o consumo de oxigênio no pH 7,25 e 3 vezes o consumo no pH 7,75.

Tabela 3 - Consumo de oxigênio insensível ao KCN e a Antimicina A (nmoles de O₂ . mg de prot⁻¹ . min⁻¹) de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, em diferentes pHs, nas condições de estado 4 e estado 3 em ausência e presença de DTT 2,5 mM, durante a oxidação de NADH 1 mM.

| pH | 6,25 | | | | 7,25 | | | | 7,75 | | | |
|--|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | EST 4 | | EST 3 | | EST 4 | | EST 3 | | EST 4 | | EST 3 | |
| | -DTT | +DTT |
| Consumo de Oxigênio (nmoles de O ₂ . mg de proteína ⁻¹ . min ⁻¹) | | | | | | | | | | | | |
| TOTAL | 156 | 168 | 173 | 182 | 175 | 174 | 173 | 185 | 180 | 187 | 145 | 176 |
| Insensível a KCN | 78 | 81 | 11 | 32 | 25 | 37 | 5 | 16 | 14 | 13 | 5 | 13 |
| Insensível a Antimicina A | 76 | 81 | 9 | 29 | 21 | 29 | 5 | 14 | 12 | 14 | 4 | 13 |

Os valores representam médias de, no mínimo, 3 repetições.

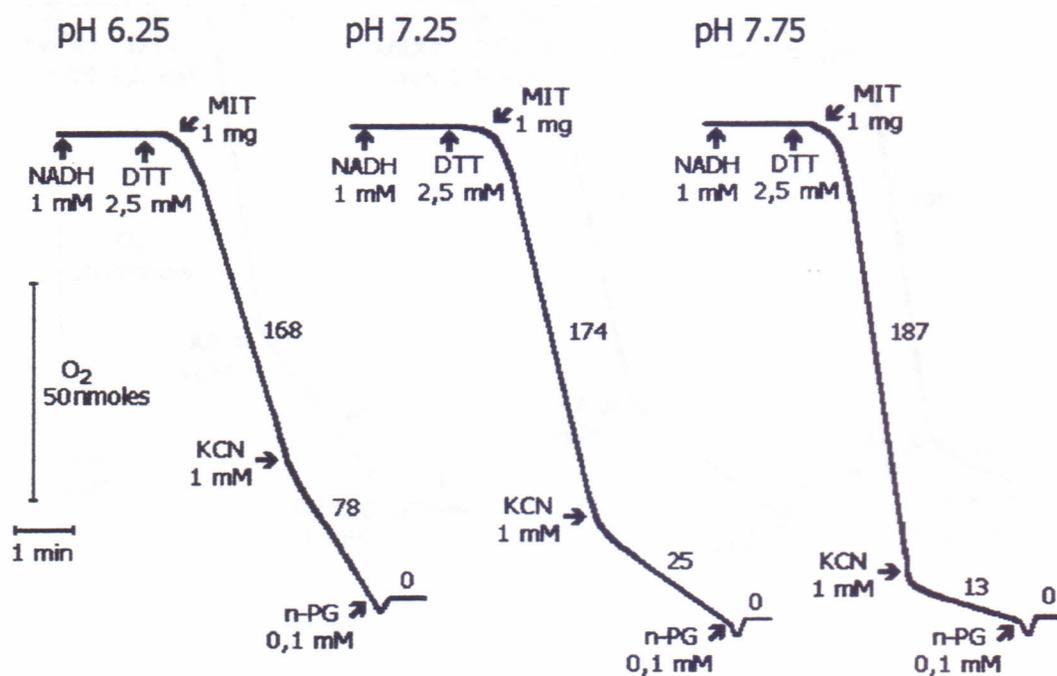


FIGURA 12 - Determinação do consumo de oxigênio resistente ao CN⁻ nos pHs 6,25, 7,25 e 7,75, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, com NADH 1 mM como substrato oxidável em presença de DTT 2,5 mM. A via citocrômica foi inibida com KCN 1 mM. A via cianeto resistente foi inibida com n-propil galato 0,1 mM. Os números ao longo dos traçados indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ · mg de proteína⁻¹ · min⁻¹.

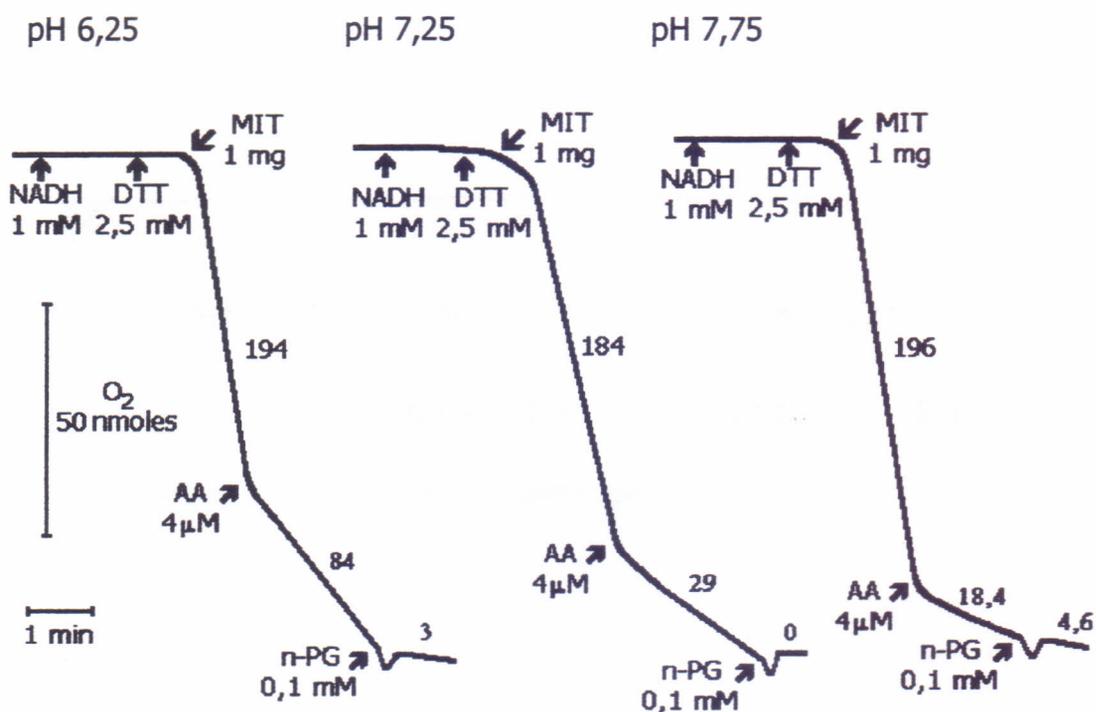


FIGURA 13 - Determinação do consumo de oxigênio resistente à Antimicina A, nos pHs 6,25 , 7,25 e 7,75, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, com NADH 1 mM como substrato oxidável em presença de DTT 2,5 mM. A via citocrômica foi inibida com Antimicina A (AA) 4 μM. O consumo de oxigênio resistente a Antimicina A foi inibido com n-propil galato 0,1 mM. Os números ao longo dos traçados indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ · mg de proteína⁻¹ · min⁻¹.

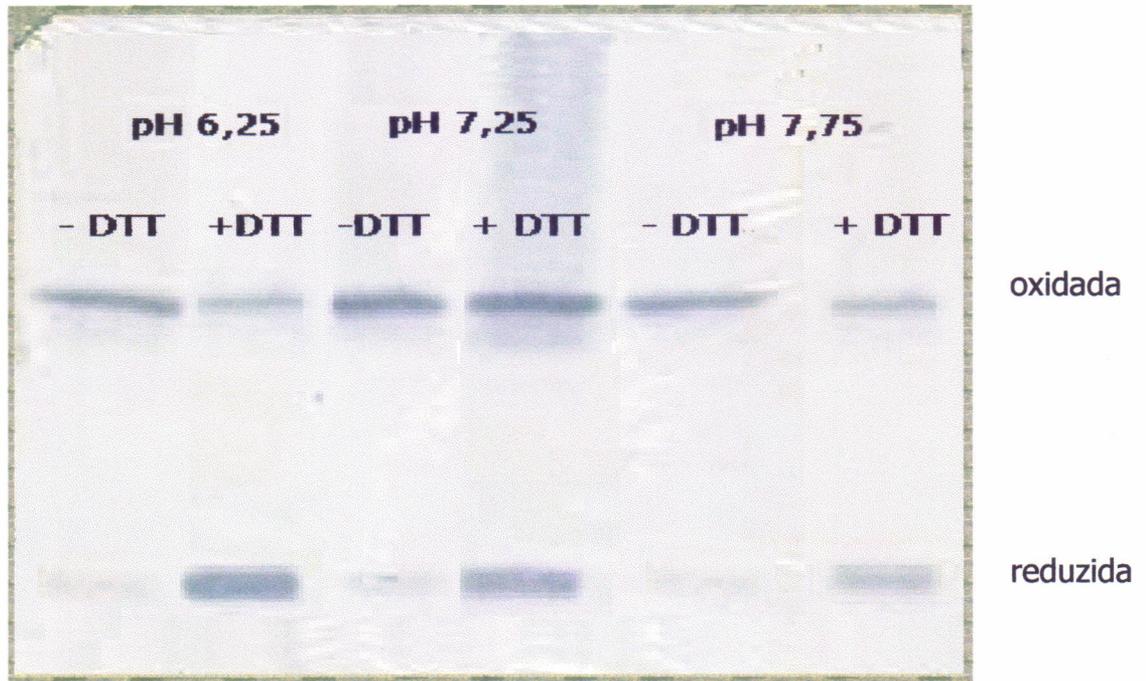


FIGURA 14 - Detecção, através de "immunoblotting", da oxidase alternativa de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, e de seu estado redox, com NADH 1 mM, como substrato oxidável, ADP 78 mM e KCN 1 mM, em presença e ausência de DTT 2,5 mM, em diferentes pHs,. Proteínas mitocondriais: 100 µg. As demais condições estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.

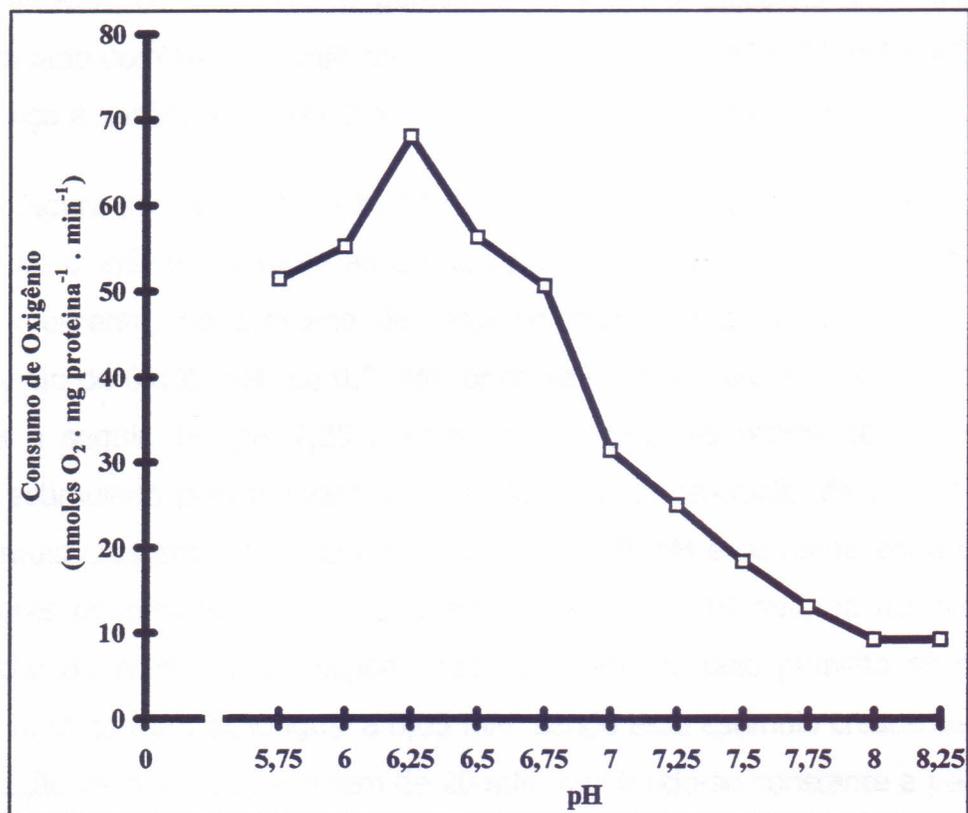


FIGURA 15 - Efeito do pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN⁻ em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5. O consumo de oxigênio (nmoles de O₂ . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) foi mensurado no meio de reação com diferentes valores de pHs, com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1 mM.

7 - EFEITO DE PIRUVATO E SUCCINATO SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO RESISTENTE AO CIANETO.

Um possível efeito modulador do piruvato e do succinato sobre o consumo de oxigênio ao KCN, de mitocôndrias purificada de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, foi estudado com NADH 1 mM como substrato oxidável, ADP 78 mM e KCN 1 mM, em presença e ausência de DTT 2,5 mM nos pHs 6,25 , 7,25 e 7,75.

A Figura 16 mostra o efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- em presença de DTT. No pH 6,25 houve um estímulo crescente, no consumo de oxigênio resistente ao CN^- , a partir de uma concentração de 0,005 mM até 0,5 mM, onde se registrou um estímulo máximo, que decrescia a seguir. No pH 7,25 o consumo de oxigênio resistente ao CN^- só se mostrou estimulado pelo piruvato a partir de uma concentração de 0,01 mM sendo esse estímulo crescente até uma concentração de 10 mM e permanecendo constante para valores de concentração de piruvato superiores a 10 mM. Já no pH 7,75 a estimulação do consumo de oxigênio resistente ao CN^- pelo piruvato só ocorreu a partir de uma concentração igual a 0,05 mM, sendo esse estímulo crescente até uma concentração de piruvato da ordem de 20 mM, mantendo-se constante a partir dessa concentração.

A Figura 17 mostra o efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , de mitocôndrias purificada de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, em ausência de DTT. No pH 6,25 o piruvato induziu um estímulo crescente no consumo de oxigênio resistente ao CN^- a partir de uma concentração de 0,005 mM até 0,5 mM, a partir da qual permanecia estável até uma concentração da ordem de 5 mM decrescendo com concentrações de piruvato superiores a 5 mM. No pH 7,25 o consumo de oxigênio resistente ao CN^- só se mostrou estimulado pelo piruvato a partir de uma concentração de 0,5 mM sendo esse estímulo crescente até uma concentração de 15 mM e permanecendo constante para valores de concentração de piruvato superiores a 15 mM. Já no pH 7,75 a estimulação do consumo de oxigênio resistente ao CN^- pelo piruvato só ocorreu a partir de uma concentração igual a 1 mM, sendo esse estímulo crescente até uma concentração de piruvato da ordem de 20 mM.

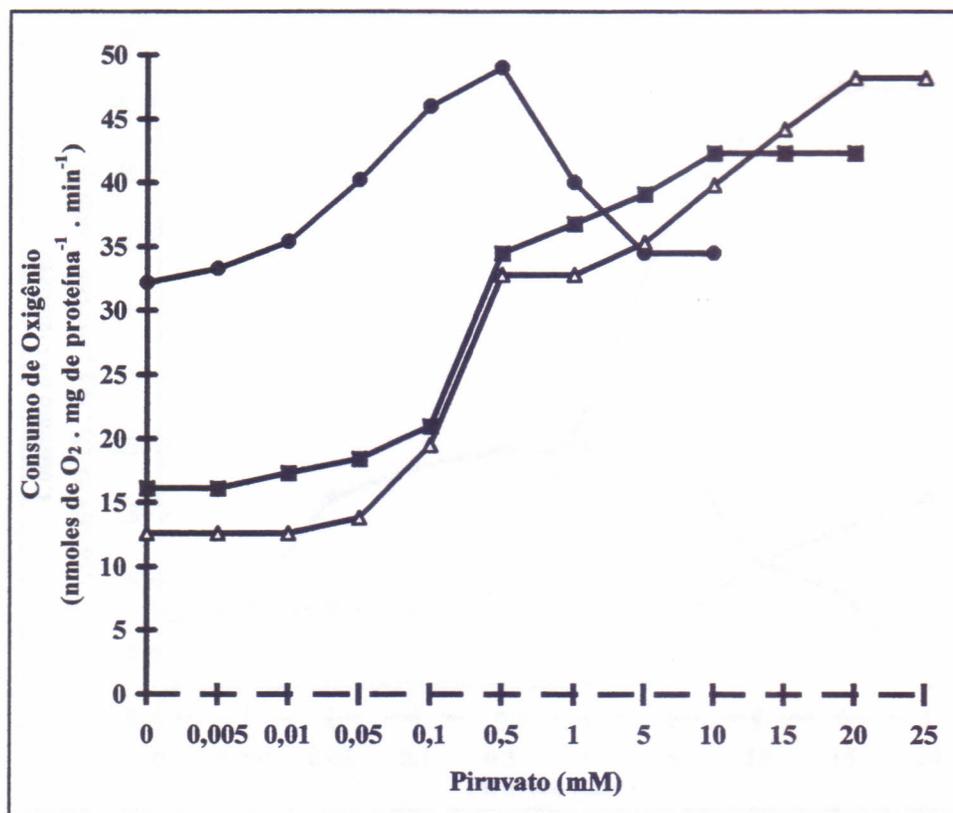


FIGURA 16 - Efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio ($\text{nmoles de O}_2 \cdot \text{mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) resistente ao CN^- , em presença de DTT, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—●— 6,25; —■— 7,25 e —△— 7,75) e com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, ADP 78 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1mM.

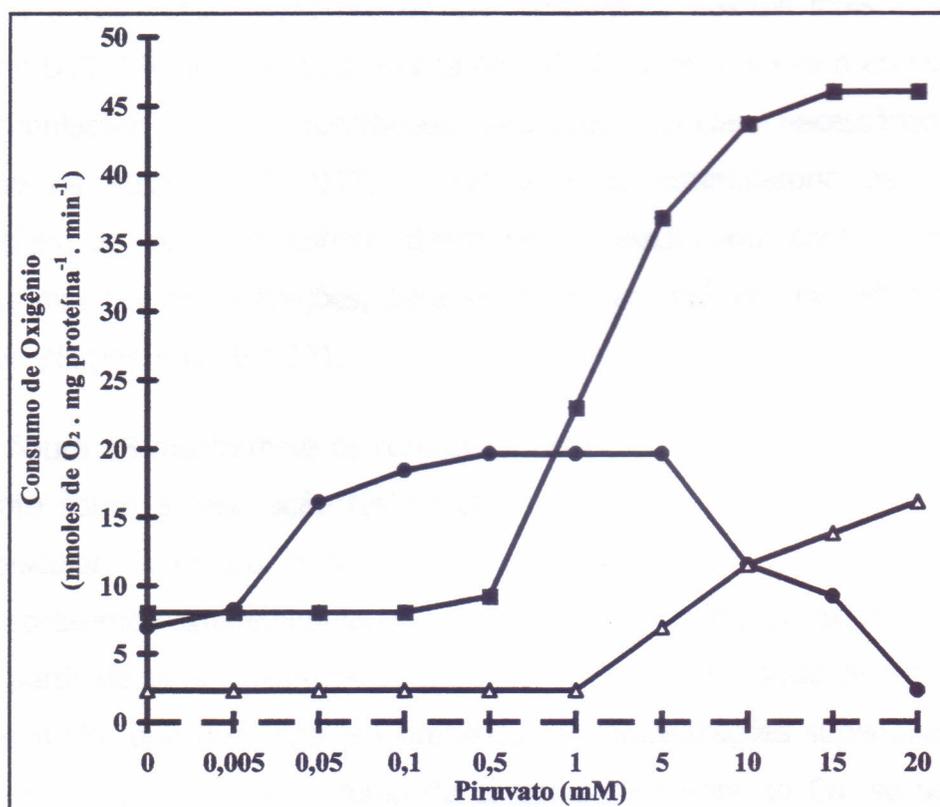


FIGURA 17 - Efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min) resistente ao CN^- , em ausência de DTT, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (● 6,25; ■ 7,25 e △ 7,75) e com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, ADP 78 mM e KCN 1mM.

A comparação dos efeitos de diferentes concentrações de piruvato, em presença e ausência de DTT, sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, permitiu observar-se que: (a) a respiração resistente ao CN^- apresentou valores mais elevados em presença de DTT 2,5 mM, (b) na presença de DTT 2,5 mM o piruvato apresentou um efeito estimulatório em concentrações inferiores às necessárias para a estimulação na ausência de DTT, e; (c) o efeito estimulatório das diferentes concentrações do piruvato esteve diretamente relacionado com o pH, sendo necessárias maiores concentrações, para se atingir um máximo de estímulo, com a elevação do pH (Figuras 16 e 17).

Na figura 18 mostram-se os resultados obtidos com diferentes concentrações de succinato sobre a respiração resistente ao CN^- , de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, em presença de DTT 2,5 mM No pH 6,25 o succinato apresentou uma estimulação crescente, no consumo de oxigênio resistente ao CN^- , a partir de uma concentração de 0,5 mM até 5 mM, onde se registrava um máximo estímulo, que decrescia em presença de concentrações superiores a 5 mM de succinato. No pH 7,25 o consumo de oxigênio resistente ao CN^- só se mostrou estimulado pelo succinato, a partir de uma concentração de 1 mM sendo esse estímulo crescente até uma concentração de 8 mM decrescendo com valores superiores a essa concentração de succinato. No pH 7,75 a estimulação do consumo de oxigênio resistente ao CN^- pelo succinato só foi observada a partir de uma concentração de 5 mM, sendo esse estímulo crescente até a concentração de 16 mM, decrescendo com concentrações de succinato superiores a esse valor. Observa-se ainda que, os máximos valores de estimulação no consumo de oxigênio resistente ao CN^- nos 3 pHs apresentaram-se muito próximos

A Figura 19 mostra o efeito de diferentes concentrações de succinato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , de mitocôndrias purificada de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, em ausência de DTT. No pH 6,25 o succinato apresentou um estímulo crescente, no consumo de oxigênio resistente ao CN^- , a partir de uma concentração de 4 mM até 8 mM, onde se registrava um estímulo máximo, que permanecia constante até a concentração de 12 mM e decrescia em

presença de concentrações superiores a 12 mM de succinato, chegando a provocar uma inibição no consumo de oxigênio resistente ao CN^- . No pH 7,25 o consumo de oxigênio resistente ao CN^- mostrou-se estimulado pelo succinato a partir de uma concentração de 4 mM sendo esse estímulo crescente até uma concentração de 20 mM, permanecendo constante até a concentração de 28 mM, a partir da qual observava-se um decréscimo no estímulo do consumo de oxigênio resistente ao CN^- produzido pelo succinato. No pH 7,75 a estimulação do consumo de oxigênio resistente ao CN^- pelo succinato só ocorreu a partir de uma concentração igual a 4 mM, sendo esse estímulo crescente até uma concentração de succinato da ordem de 24 mM, mantendo-se constante até a concentração de 32 mM, decrescendo com o aumento da concentração de succinato. (Figuras 18 e 19).

A comparação dos efeitos de diferentes concentrações de succinato, em presença e ausência de DTT, sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, permitiu observar-se que: (a) a respiração resistente ao CN^- apresentou valores mais elevados em presença de DTT 2,5 mM; (b) na presença de DTT 2,5 mM o succinato apresentou um efeito estimulatório em concentrações inferiores às necessárias para a estimulação na ausência de DTT, exceção feita ao pH 7,75 onde o estímulo ao consumo de oxigênio pelo succinato foi observado em uma concentração de 4 mM, na ausência de DTT enquanto foi necessária uma concentração de succinato igual a 5 mM, em presença de DTT, para que fosse observado estímulo no consumo de oxigênio resistente ao CN^- e; (c) o efeito estimulatório das diferentes concentrações do succinato esteve diretamente relacionado com o pH, sendo necessárias maiores concentrações, para se atingir um máximo de estímulo, com a elevação do pH.

Na comparação dos resultados dos efeitos de diferentes concentrações de piruvato e succinato, em presença e ausência de DTT, sobre a respiração resistente ao CN^- , em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, observa-se que esses α -cetoácidos apresentaram efeitos semelhantes, diferindo apenas na concentração necessária para induzir estímulo no consumo de oxigênio resistente ao CN^- , sendo sempre necessário uma concentração muito mais elevada de succinato para se obter o mesmo estímulo alcançado por uma dada concentração de

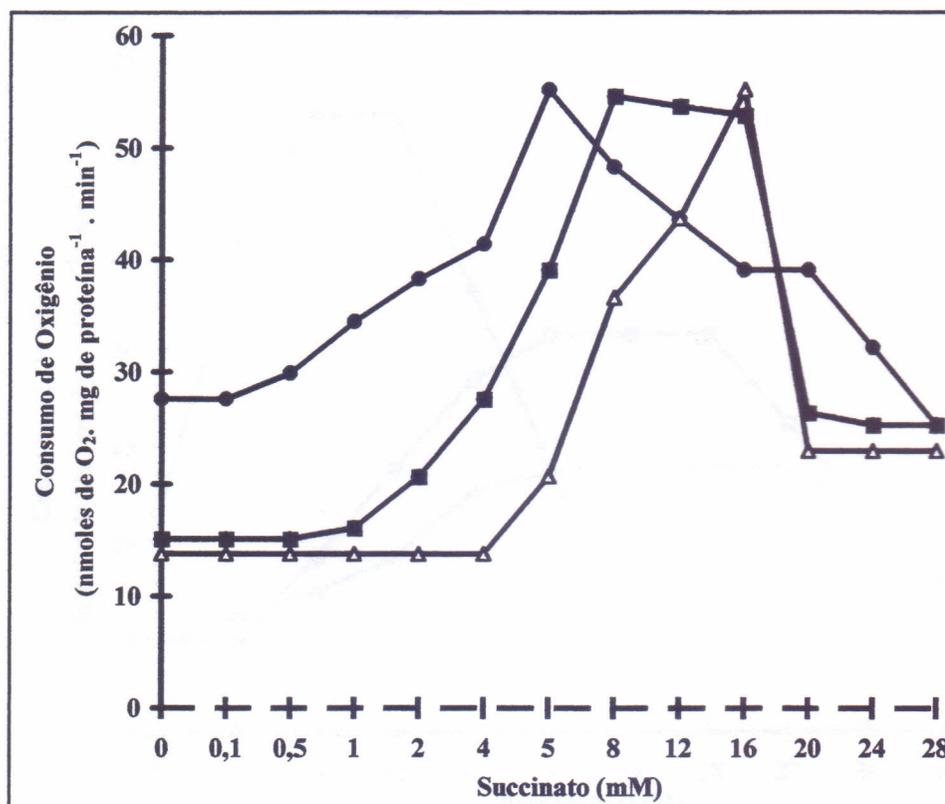


FIGURA 18 - Efeito de diferentes concentrações de succinato sobre o consumo de oxigênio ($\text{nmoles de O}_2 \cdot \text{mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) resistente ao CN^- , em presença de DTT, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—●— 6,25; —■— 7,25 e —△— 7,75) e com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, ADP 78 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1mM.

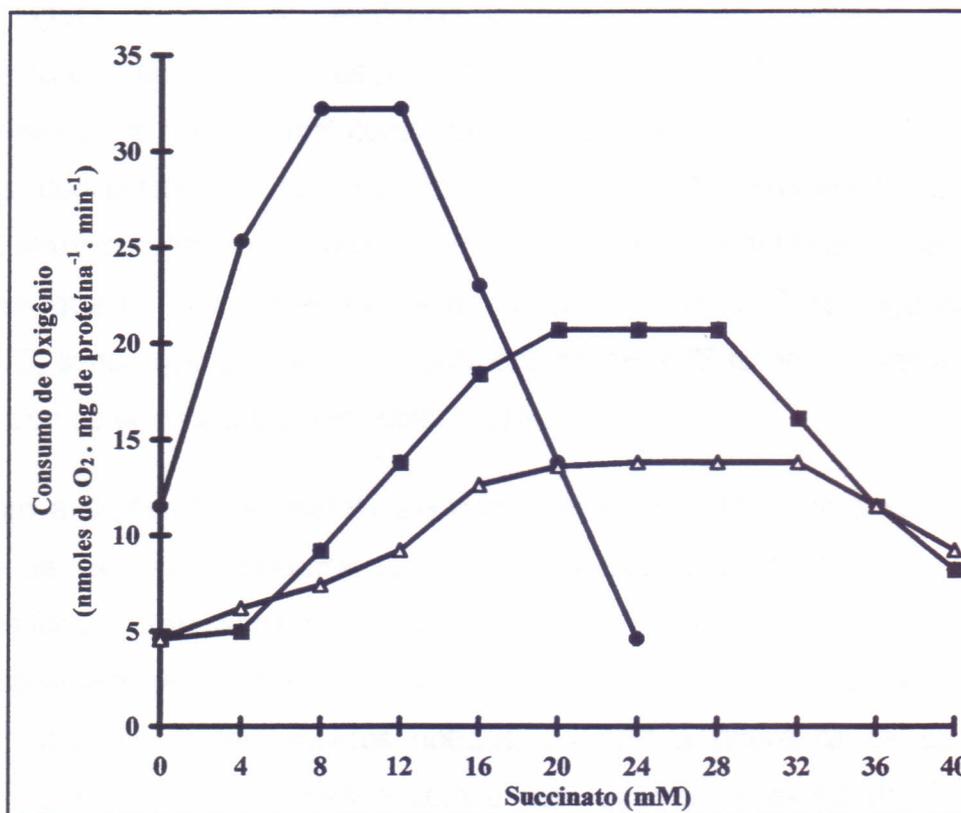


FIGURA 19 - Efeito de diferentes concentrações de succinato sobre o consumo de oxigênio ($\text{nmoles de O}_2 \cdot \text{mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) resistente ao CN^- , em ausência de DTT, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—●— 6,25; —■— 7,25 e —△— 7,75) e com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, ADP 78 mM, e KCN 1mM.

piruvato. Esses resultados sugerem efeitos diferentes para succinato e piruvato sobre a oxidase alternativa.

A Figura 20 põe em evidência o incremento do consumo de oxigênio resistente ao CN^- , de mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, em presença de NADH 1 mM como substrato oxidável e DTT 2,5 mM induzido por diferentes concentrações, de piruvato nos 3 pHs. O incremento representa a diferença entre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- medida com e sem piruvato. Observa-se que os maiores estímulos foram obtidos no pH 7,25 seguido dos pHs 6,25 e 7,75, sendo que os valores encontrados no pH 7,75 foram, no mínimo 5 vezes menores que os encontrados nos outros 2 pHs.

Com a finalidade de melhor explorar o efeito do pH sobre a estimulação do consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em presença de ADP, pelo piruvato os resultados foram expressos em: valores absolutos do consumo de oxigênio resistente ao CN^- estimulado por diferentes concentrações de piruvato (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹); em incrementos obtidos, ou seja a diferença de consumo de oxigênio resistente ao CN^- medida com e sem piruvato (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) e, em valores relativos (%) desses incrementos sobre a respiração CN^- , ou seja, o valor percentual que os incrementos obtidos, com as diferentes concentrações de piruvato, representavam sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- antes da adição dessas concentrações de piruvato.

A Figura 21 mostra no pH 6,25, o efeito de concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em valores absolutos (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹), os incrementos obtidos (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) e o valor percentual desses incrementos, podendo-se observar que o piruvato promoveu o maior incremento (16,8 nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) com uma concentração de 0,5 mM e que esse incremento correspondeu a um acréscimo, em termos percentuais de 53 % no consumo de oxigênio. Na Figura 22 onde o efeito de concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , no pH 7,25, é mostrado da mesma forma que na Figura 21, nota-se que o maior estímulo do consumo de oxigênio resistente ao CN^- foi alcançado com 10 mM de piruvato e que essa concentração promovia, em termos percentuais, um acréscimo

superior aos 160% ao consumo de oxigênio resistente ao CN^- . Da mesma forma que a figura anterior o efeito de concentrações de piruvato no pH 7,75 é mostrado na Figura 23, observando-se que o máximo incremento no consumo de oxigênio resistente ao CN^- foi obtido com uma concentração de 20 mM de piruvato (aproximadamente 40 nmoles de O_2 , mg de proteína $^{-1}$. min $^{-1}$) o que representou um acréscimo superior a 250 % no consumo de oxigênio resistente ao CN^-

O efeito de uma única concentração de piruvato (0,5 mM) sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv Vita 5, em presença de NADH 1 mM como substrato oxidável, DTT 2,5 mM e KCN 1 mM, foi estudado em uma faixa de pH, aumentada de 0,25, unidades, iniciando-se no pH 6,0 até 8,25. Esses resultados são apresentados na Figura 24, onde encontramos as curvas do consumo de oxigênio resistente ao CN^- (nmoles de O_2 . mg de proteína $^{-1}$. min $^{-1}$), dos valores absolutos (ver descrição anterior) do efeito de 0,5 mM de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- (nmoles de O_2 . mg de proteína $^{-1}$. min $^{-1}$) e dos incrementos no consumo de oxigênio resistente ao CN^- (ver definição anterior) resultantes da adição de piruvato 0,5 mM, em nmoles de O_2 . mg de proteína $^{-1}$. min $^{-1}$ e em termos percentuais (ver descrição anterior). Pode-se observar, na Figura 24, que a curva de valores absolutos do efeito de 0,5 mM de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- tem o mesmo perfil que a curva de consumo de oxigênio resistente ao CN^- . Nota-se também que o incremento no consumo de oxigênio resistente ao CN^- (nmoles de O_2 . mg de proteína $^{-1}$. min $^{-1}$) provocado por 0,5 mM de piruvato, foi crescente do pH 6,0 até o pH 6,5, a partir do qual decresceu suavemente até o pH 7,5 e mostrou um decréscimo mais acentuado a partir desse pH, enquanto que em termos percentuais esse mesmo incremento mostrou-se crescente até o pH 7,5, decrescendo a partir desse ponto, porém com valores superiores aos encontrados nos pHs mais ácidos.

8 - EFEITO DA REVERSÃO DO pH DO MEIO SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO RESISTENTE AO CIANETO.

O efeito da reversão do pH do meio sobre o consumo de oxigênio resistente

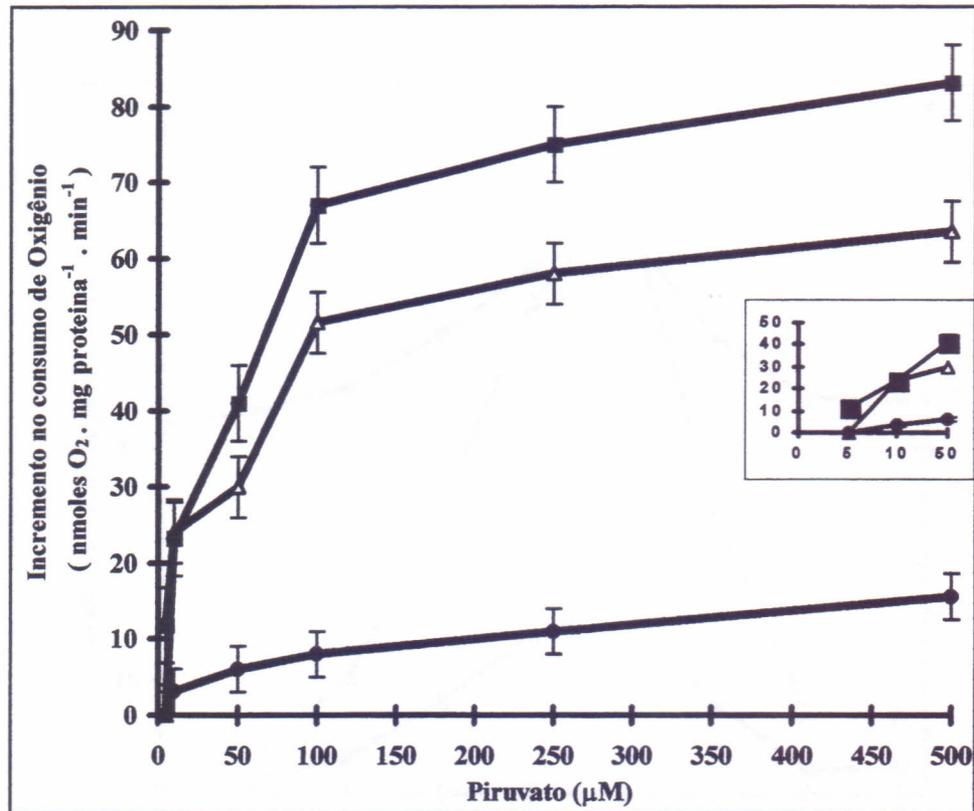


FIGURA 20 - Incremento do consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) resistente ao CN^- induzido por piruvato, em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em meio de reação com diferentes pHs (—Δ— 6,25; —■— 7,25 e —●— 7,75) com 1 mg de proteína mitocondrial em presença de NADH 1 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1mM. O gráfico inserido corresponde ao incremento em do consumo de oxigênio resistente ao CN^- em concentrações inferiores a 50 μ M de piruvato.

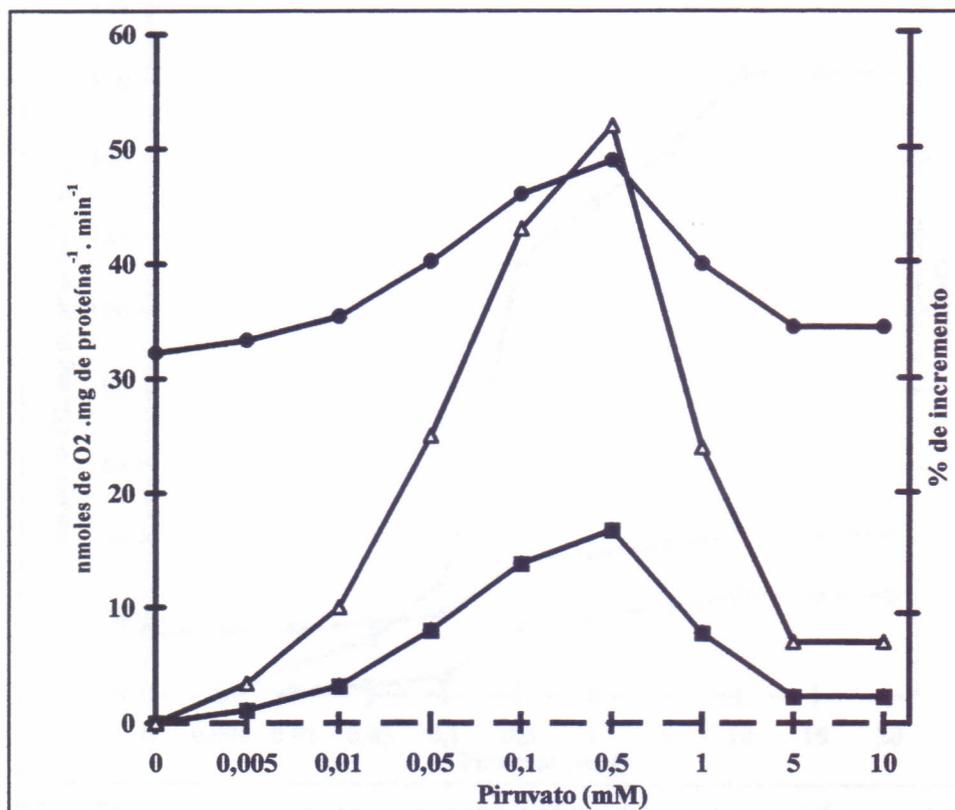


FIGURA 21 - Efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em presença de ADP e em pH 6,25. Mitocôndrias: 1 mg de proteína, NADH 1 mM, DTT 2,5 mM, ADP 78 mM e KCN 1mM. —●— Consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹); —■— Incremento do consumo de oxigênio (nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹) e, —△— Incremento do consumo de oxigênio em %.

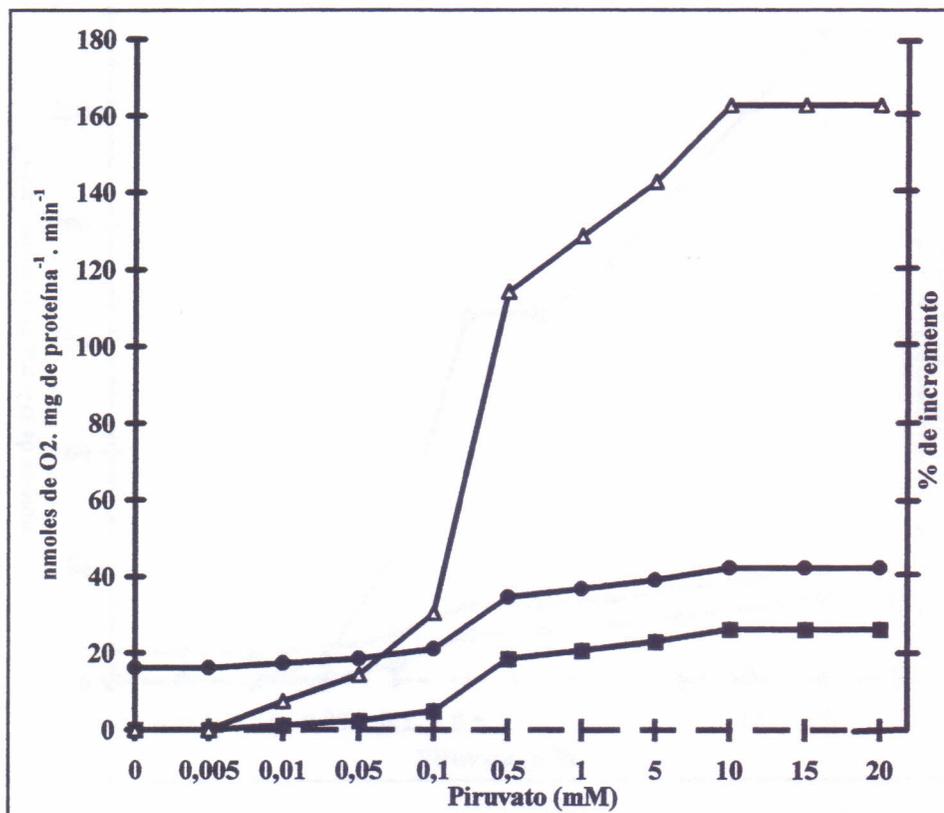


FIGURA 22 - Efeito de diferentes concentrações de piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN⁻, em presença de ADP e em pH 7,25. Mitocôndrias: 1 mg de proteína, NADH 1 mM, DTT 2,5 mM, ADP 78 mM e KCN 1mM. —●— Consumo de oxigênio (nmoles de O₂ · mg de proteína⁻¹ · min⁻¹); —■— Incremento do consumo de oxigênio (nmoles de O₂ · mg de proteína⁻¹ · min⁻¹) e, —Δ— Incremento do consumo de oxigênio em %.

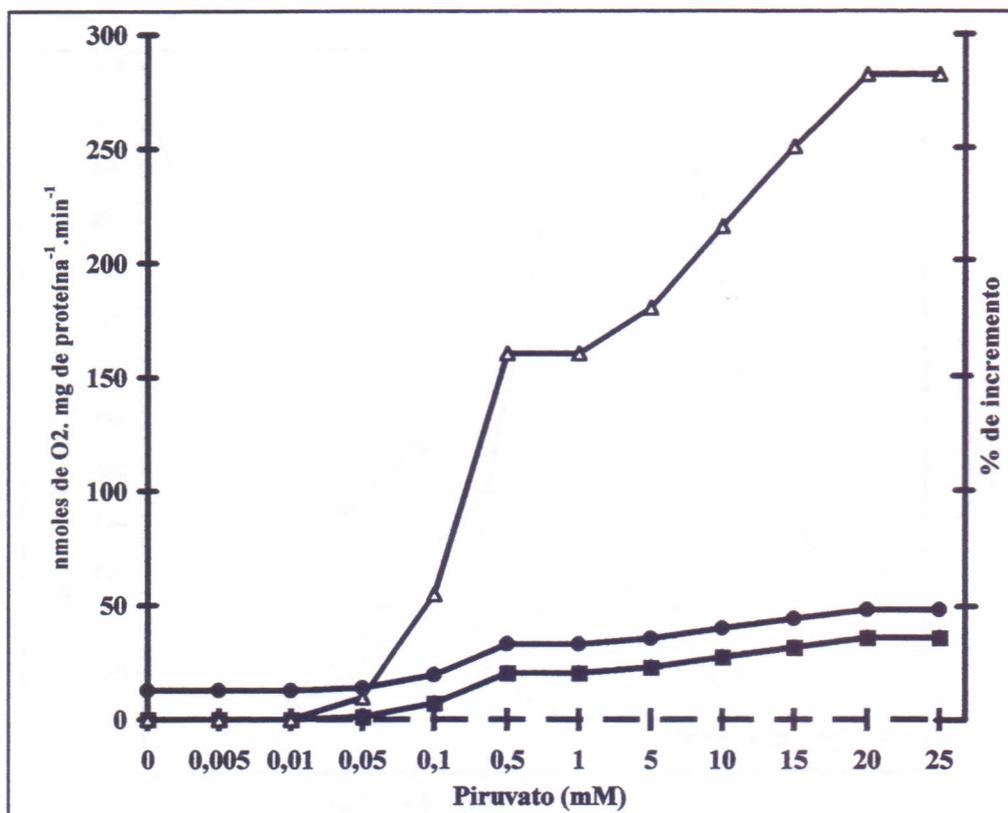


FIGURA 23 - Efeito de diferentes concentrações piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em presença de ADP e em pH 7,75. Mitocôndrias: 1 mg de proteína, NADH 1 mM, DTT 2,5 mM, ADP 78 mM e KCN 1mM. —●— Consumo de oxigênio ($\text{nmoles de O}_2 \cdot \text{mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$); —■— Incremento do consumo de oxigênio ($\text{nmoles de O}_2 \cdot \text{mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e, —△— Incremento do consumo de oxigênio em %.

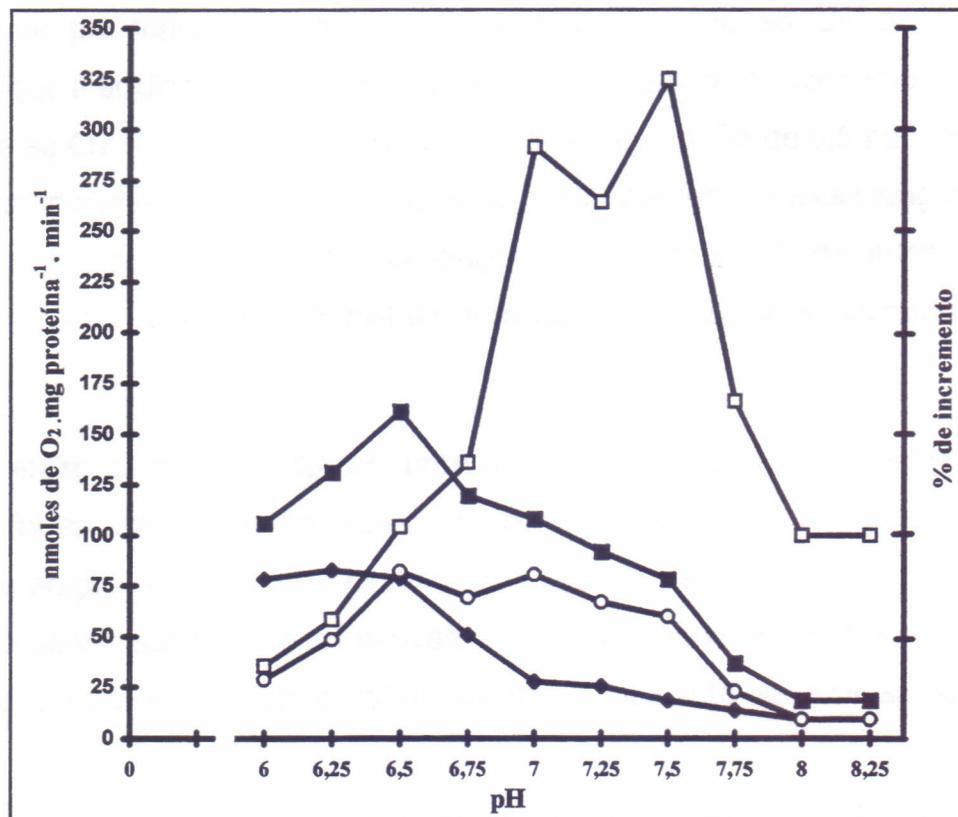


FIGURA 24 - Efeito do pH sobre a estimulação do consumo de oxigênio resistente ao CN^- pelo piruvato 0,5 mM. Mitocôndrias: 1 mg, NADH 1 mM, DTT 2,5 mM e KCN 1mM. —◆— Consumo de oxigênio resistente ao CN^- (nmoles de O_2 . mg de proteína $^{-1}$. min $^{-1}$); —■— Consumo de oxigênio resistente ao CN^- em presença de piruvato 0,5 mM (nmoles de O_2 . mg de proteína $^{-1}$. min $^{-1}$); —○— Incremento no consumo de oxigênio resistente ao CN^- provocado por piruvato 0,5 mM (nmoles de O_2 . mg de proteína $^{-1}$. min $^{-1}$) e; —□— Incremento no consumo de oxigênio resistente ao CN^- provocado por piruvato 0,5 mM em %.

ao CN^- e sua estimulação pelo piruvato, foi estudado alterando-se o pH do meio quando este apresentava apenas o consumo de oxigênio resistente ao CN^- . O pH 7,75 era acidificado até 6,25, com 25 μL de HCl 0,5 M enquanto o pH 6,25 era alcalinizado até 7,75, com 25 μL de KOH 0,5 M. A Figura 25, mostra o efeito dessa reversão de pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- onde se pode observar que a acidificação do meio provocou uma elevação do consumo de oxigênio resistente ao CN^- da ordem de 60 %. Com a posterior adição de 0,5 mM de piruvato houve um incremento nesse consumo de 62,5 %. Quando da alcalinização do meio houve um decréscimo do consumo de oxigênio resistente ao CN^- da ordem de 60 %, e com a posterior adição de 0,5 mM de piruvato esse consumo foi incrementado em 125 %.

O efeito da reversão do pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , também foi estudado revertendo-se o pH, como foi descrito anteriormente, antes e depois da adição de 0,5 mM de piruvato ao meio. O gráfico mostrado na Figura 26, permite observar que o efeito do piruvato sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- mostrou-se o mesmo, isto é, independente do momento de reversão do pH.

9 - EFEITO DA UNIFORMIZAÇÃO DO pH DO MEIO E DO pH MITOCONDRIAL SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO RESISTENTE AO CIANETO.

Com a finalidade de verificar o efeito do pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- quando o pH mitocondrial era idêntico ao pH do meio externo as mitocôndrias foram incubadas em 3 pHs com NADH 1mM e DTT 2,5 mM, em ausência e presença de nigericina. A nigericina é um composto ionóforo que desfaz o ΔpH entre o meio externo e a matriz mitocondrial, permitindo a entrada de íons H^+ e a saída de íons K^+ em um processo do tipo "antiport". A Figura 27 mostra os consumos de oxigênio, total e resistente ao CN^- (observado após a adição de KCN 1 mM), na ausência e presença de nigericina 100 ng/mg de proteína, nos pHs 6,25, 7,25 e 7,75. Pode-se observar que, com exceção do pH 6,25, o consumo de oxigênio total foi sempre maior na ausência de nigericina, entretanto o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em nmoles de O_2 . mg de proteína⁻¹ . min⁻¹, foi menor na presença

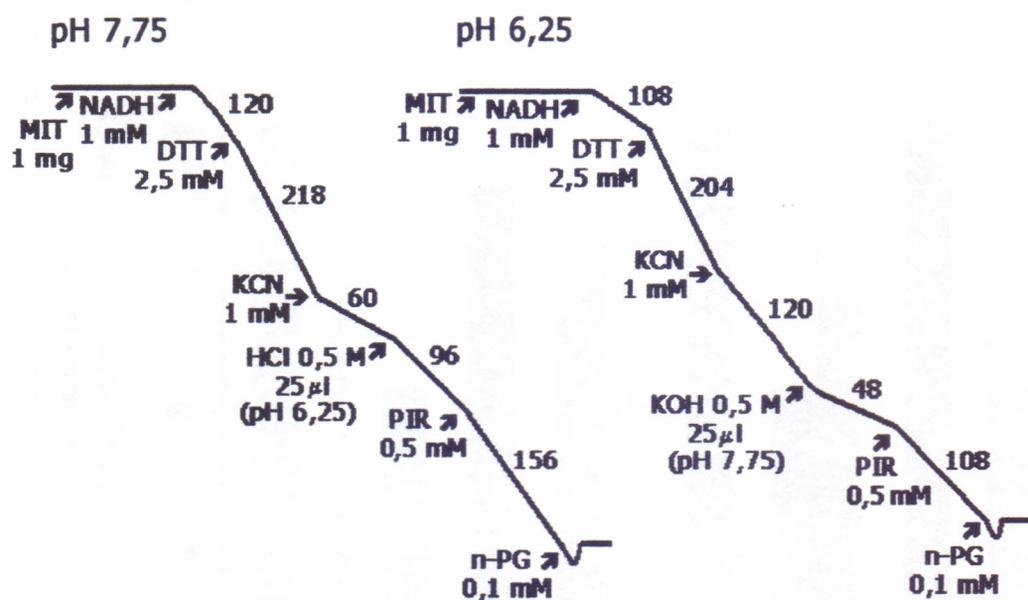


FIGURA 25 - Efeito da reversão do pH do meio sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN⁻ e sua estimulação por piruvato 0,5 mM. Mitocôndrias: 1 mg, NADH 1 mM e DDT 2,5 mM. A via citocrômica foi inibida com KCN 1 mM e a reversão de pH foi realizada com HCl 0,5 M ou KOH 0,5M. Os números ao longo dos traçados indicam o consumo de oxigênio em nmoles de O₂ · mg de proteína⁻¹ · min⁻¹.

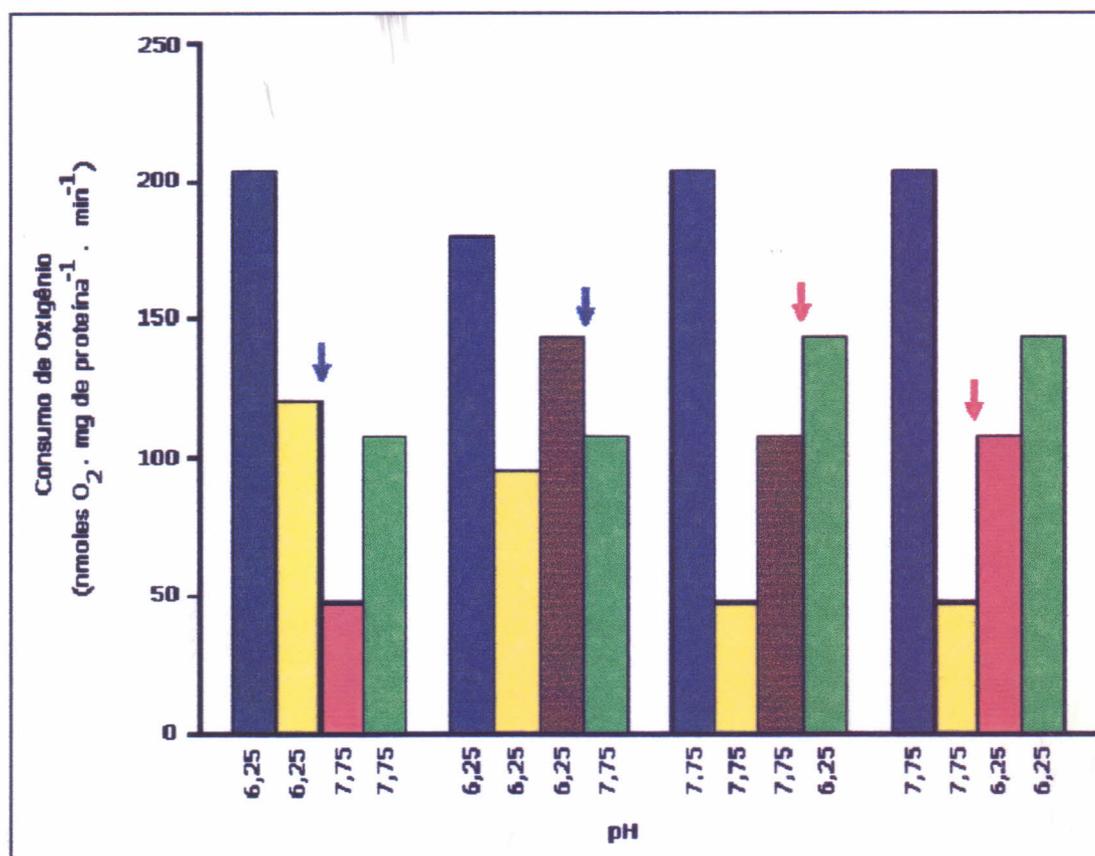


FIGURA 26 - Efeito da reversão do pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN⁻ e sua estimulação por piruvato 0,5 mM. ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM; ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM (antes da reversão do pH); ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM (após reversão do pH); ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM + PIR 0,5 mM (após reversão do pH); ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM + PIR 0,5 mM (antes da reversão do pH); ↓ - Adição de 25 μL de KOH 0,5 M e ↓ - Adição de 25 μL de HCl 0,5 M.

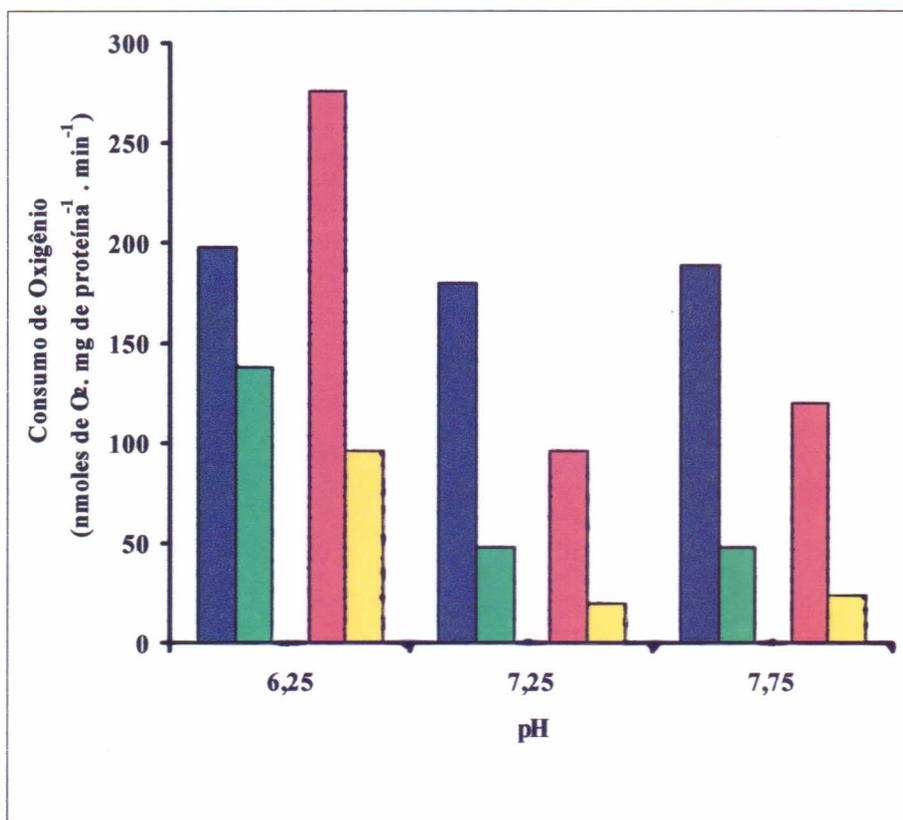


FIGURA 27 - Efeito de nigericina sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, em diferentes pHs.

■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM; ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + KCN 1 mM;

■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + NIG 100 ng/mg de proteína e ■ - NADH 1 mM + DTT 2,5 mM + NIG 100 ng/mg de proteína + KCN 1 mM.

de nigericina em todos os pHs, porém em termos percentuais em relação ao consumo de oxigênio total, não foi verificada diferença entre a presença e ausência de nigericina (Tabela 4).

TABELA 4 - Efeito do pH sobre o consumo de oxigênio resistente ao CN^- , em mitocôndrias purificadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5. Influência da nigericina. A atividade do consumo de oxigênio resistente ao CN^- foi mensurada em presença de KCN 1mM com e sem 100 ng de nigericina (mg de proteína mitocondrial)⁻¹. Os valores percentuais foram calculados em relação ao consumo de O_2 em presença de NADH 1 mM, DTT 2,5 mM e ADP 78mM.

| | pH 6,25 | | pH 7,25 | | pH 7,75 | |
|---|---------|----|---------|----|---------|---|
| | + | - | + | - | + | - |
| Nigericina | | | | | | |
| % de respiração resistente ao CN^- | 53 | 46 | 13 | 14 | 7 | 7 |

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 próprias 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 mitocondriais, 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 9) e o grau acoplamento do transporte de elétrons com o processo de fosforilação e os valores dos controles respiratórios (Figura 10 e Tabela 2). De acordo com FERNANDES DE MELO (1978), é comum que os valores dos parâmetros de 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 acima de 80%, e as relações ADP/O, mostradas na Tabela 2. foram compatíveis com aquelas apresentadas para tecidos vegetais compiadas por DOUCE (1985).

A metodologia utilizadas no estudo da contribuição individual da via citocrômica e a da oxidase alternativa, no total da respiração mitocondrial, está diretamente ligada ao uso de inibidores dessas vias, já que a contribuição de cada uma é determinada pela diferença entre o consumo total de oxigênio na ausência e na presença de seu inibidor específico. MILLAR *et al.* (1995) mostraram que os

resultados poderiam ser influenciados pelo tipo de inibidor utilizado. Diante do questionamento do tipo de inibidor da via citocrômica para por em evidência a via alternativa, outros inibidores passaram a ser utilizados, como foi o caso do mixotiazol que, por inibir a cadeia citocrômica em sítio anterior ao da antimicina A e do KCN, seria o inibidor ideal da via citocrômica para por em evidência a via alternativa, uma vez que não haveria uma volta longa no transporte de elétrons para o "pool" de quinonas diminuindo sua redução o que refletiria na atividade da AOX (BROWNLEADER *et al.*, 1997). Apesar disso, nossos resultados usando KCN e antimicina A não mostraram diferenças quando comparados aos que usaram mixotiazol. A utilização dos inibidores da via citocrômica transportadora de elétrons, KCN e Antimicina A, mostrou a existência de um consumo de oxigênio insensível a esses inibidores (Figuras 12 e 13) e esse consumo constitui a via alternativa de transporte de elétrons catalizada pela enzima oxidase alternativa (AOX), cuja presença na preparação foi detectada através de "immunoblotting" (Figura 11)

Embora a literatura tenha mostrado o envolvimento da via alternativa com diferentes tipos de estresse, a análise da Tabela 1 não nos permite afirmar que exista uma participação ativa da via alternativa durante o estresse salino, nas condições estudadas pois essa via avaliada em diferentes pHs (6,25, 7,25 e 7,75) apresentou valores de consumo de oxigênio semelhantes para as condições de controle e de estresse salino, em presença dos vários substratos oxidáveis testados (malato, malato + glutamato, succinato e NADH). Porém, devemos considerar que a literatura afirma apenas que os cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp Vita 3 e Vita 5 apresentam diferentes níveis de sensibilidade à salinidade entre si, o que não necessariamente significa que o cultivar Vita 3, apontado como menos sensível à salinidade, possa ser considerado como um cultivar tolerante a salinidade.

ELTHON *et al* (1989) identificaram em *Sauromatum guttatum* 3 formas de AOX com 37, 36 e 35 kDa de massa molecular e prepararam anticorpos monoclonais, desenvolvidos em camundongos, para cada uma das formas designadas de AOU, AOL e AOA respectivamente, sendo o epítipo AOA o que apresentou melhores resultados no reconhecimento da AOX. Como em diversos outros trabalhos o epítipo AOA reconheceu a AOX de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, nas formas

oxidada e reduzida (Figura 11). Essa detecção pode ser mais uma evidência do alto grau de conservação dessa proteína nos vegetais, já que a mesma vem sendo detectada com esse mesmo anticorpo em diferentes tecidos e espécies de plantas, o que sugere que ela pode ter um papel fisiológico no metabolismo energético. Quando comparamos essa detecção na ausência (Figura 11) e na presença (Figura 14) de um substrato oxidável (NADH 1 mM) podemos observar para os 3 pHs que, mesmo na presença de DTT 2,5 mM, concentração suficiente para reduzir todo o "pool" de AOX (Figura 11), na presença de um substrato oxidável parte desse "pool" ainda se encontra na forma oxidada o que pode ser devido à atividade da enzima no transporte dos elétrons do "pool" de ubiquinonas até o oxigênio, ou seja o fluxo de elétrons na via alternativa pode provocar a oxidação da enzima, o que justificaria a detecção das duas formas em presença de DTT. Vale ressaltar que, em nossas preparações em ausência de substrato, a forma oxidada foi predominante (Figura 11), o que também foi observado por VANLERBERGHE *et al.* (1995)

A literatura não apresenta referências a estudos sistemáticos do efeito do pH sobre a atividade da oxidase alternativa. ELTHON & MCINTOSH (1986) mostraram, com AOX solubilizada de *S. guttatum*, que a maior atividade era conseguida com pH 6,8. ELTHON *et al.* (1986) observaram também um leve efeito do pH, com um ótimo entre 6,4 e 6,8, sobre a oxidase alternativa extraída de mitocôndrias de hipocótilos de *V. radiata*. HOEFNAGEL *et al.* (1997) afirmaram que a maior atividade da AOX solubilizada de *Arum italicum*, era alcançada em pH 7,0. VANLERBERGH *et al.* (1995) mostraram, em mitocôndrias de plantas transgênica de *Nicotiana tabacum* contendo altos níveis da AOX, que, durante a oxidação de malato o piruvato apresentava maior estímulo da AOX em pH 7,8 enquanto MILLAR *et al.* (1996), mostraram que a oxidação de NADH em presença de ácidos orgânicos, em mitocôndrias intactas de *Ipomoea batatas*, era mais elevada em pH 6,5 quando comparada com a que ocorria em pH 7,5. Porém, quando se utilizava sub-partículas mitocondriais esta diferença tornava-se menos evidente, e no pH 6,5 a AOX ainda apresentava maior atividade. Os autores, entretanto, não associaram estes resultados com um possível efeito direto do pH sobre a atividade da oxidase alternativa. Em nossos dados (Figura 15) podemos observar que a atividade da AOX é influenciada pelo pH e atinge valor máximo no pH 6,25, na ausência de α -cetoácidos, e que essa atividade decresce, de

forma acentuada, com a alcalinização do meio. Essa característica da enzima (ativação em pH ácido) constitui o fundamento de uma explicação para seu mecanismo de ação intracelular (ver Figura 28).

Os resultados obtidos com ensaios que avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de piruvato e succinato em presença e ausência de DTT em diferentes pHs, mostraram-se em concordância com os apresentados por MILLAR *et al.* (1996). O piruvato foi capaz de estimular a atividade da AOX em baixas concentrações, dependendo do estado de redução da AOX e do pH do meio. A análise das Figuras 16 e 17 nos mostra que o piruvato, na ausência de DTT, em concentrações até 0,5 mM não foi capaz de provocar um consumo de oxigênio equivalente àquele observado na sua ausência, em presença DTT, e que concentrações acima de 1 mM só foram capazes de elevar o consumo de oxigênio a níveis superiores aos observados na sua ausência, em presença de DTT, nos pHs 7,25 e 7,75. Por outro lado, em presença de DTT concentrações de piruvato até 0,05 mM foram capazes de elevar o consumo de oxigênio, nos 3 pHs, sendo necessária um menor concentração de piruvato quanto menor o pH para a observação dessa elevação do consumo de oxigênio. Essas observações estão em concordância com VANLERBERGH *et al.* (1997) pois parece evidente que o piruvato não é capaz de promover a redução da AOX e que seu efeito estimulatório é dependente do pH e do nível redução do "pool" de AOX.

Com relação ao efeito do succinato sobre a AOX, Figuras 18 e 19, os resultados mostraram-se consistentes com as proposições de MILLAR *et al.* (1996) e VANLERBERGHE *et al.* (1997). O succinato só foi capaz de estimular a AOX, na ausência de DTT, em concentrações superiores a 4 mM sendo esse estímulo dependente do pH. Além disso o consumo de oxigênio máximo alcançado foi muito próximo daquele observado na ausência de succinato em presença de DTT, o que se torna mais uma evidência na proposição de que intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos possam mediar a redução da AOX (VANLERBERGHE, *et al.*, 1997). Na presença de DTT o succinato AOX em concentrações inferiores a 5 mM elevou a atividade da AOX, dependendo do pH. Porém ao compararmos esses efeitos com os obtidos com o piruvato em presença de DTT (Figura 16), notamos que para alcançar

o mesmo nível de ativação foram necessárias menores concentrações de piruvato. A análise dessas observações reforçam a proposta de que o succinato não age diretamente sobre a estimulação da AOX, mas é o próprio piruvato formado a partir do metabolismo do succinato (MILLAR *et al.*, 1996 e Figura 4).

Os resultados apresentados indicam que a modulação da AOX pelo piruvato mostra-se dependente do pH. Embora a enzima apresente uma atividade ótima em pH 6,25 o maior incremento em termos absolutos, ou seja a diferença entre o consumo de oxigênio em presença e ausência de uma dada concentração de piruvato, é alcançado com o pH 7,25. Já o maior efeito relativo, ou seja o valor percentual do incremento absoluto do consumo de oxigênio em relação ao consumo na ausência de piruvato, foi observado no pH 7,75 (Figuras 20, 21, 22 e 23). Esses resultados estão em consonância com os descritos por ELTHON & McINTOSH (1986), ELTHON *et al.* (1986), MILLAR *et al.*(1996) e HOEFNAGEL *et al.* (1997), respeitadas as diferenças existentes entre as origens da AOX e das faixas de pH estudadas. Nossos resultados permitem especular que tanto a atividade da AOX como o efeito modulador do piruvato sobre a enzima são fortemente influenciados pelo pH. Além disso a AOX mostra maior atividade em pH ácidos mas a modulação pelo piruvato mostrou maior eficiência com pH em torno da neutralidade (Figura 24). Essa influência torna-se mais evidente quando observamos o efeito da reversibilidade do pH (Figuras 25 e 26), onde se percebe que a alteração de pH, por si só, é capaz de alterar tanto a atividade da AOX quanto o efeito estimulatório provocado pelo piruvato.

Por inexistência de equipamentos adequados, não foi possível determinar de forma direta se a variação do pH externo influenciava o pH da matriz mitocondrial, embora na literatura já se registra que em mitocôndrias de hipocótilos estiolados de *Vigna radiata* o pH da matriz mitocondrial mostrava-se dependente do pH do meio (NEUBURGER & DOUCE, 1980). Segundo esses autores o pH matricial comportou-se da seguinte forma:

| pH do meio | pH da matriz | |
|------------|--------------|----------|
| | Estado 3 | Estado 4 |
| 6,5 | 6,7 | 6,9 |
| 7,2 | 7,3 | 7,6 |
| 7,5 | 7,65 | 7,9 |

Diante desses dados, utilizamos a nigericina, um ionóforo com reconhecida capacidade de abolir o Δ pH existente entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranar, para tornar uniforme o pH do meio de reação e o pH mitocondrial. Os resultados obtidos confirmaram o efeito do pH sobre a atividade da AOX (Figura 27 e Tabela 4).

Nossos resultados levam-nos a proposição de que a AOX, tanto na sua forma oxidada como na sua forma reduzida pode assumir, dependendo do pH, 3 níveis de protonação: a) "desprotonada" em pH alcalino; b) "protonada" em pH neutro e; c) "mais protonada" em pH ácido, sendo todas essas formas estimuladas pelo piruvato. A Figura 28 propõe um mecanismo de ação da AOX baseado nessa proposição. Nossos resultados sugerem ainda que na ausência de piruvato a forma "mais protonada" é aquela que permite uma maior atividade da enzima e que o piruvato apresenta maior capacidade de estimulação quando ligado à forma "protonada".

POSSIBILIDADE DE UM PAPEL FISIOLÓGICO DA REGULAÇÃO DA AOX PELO pH

Não existe na literatura um papel proposto para a ativação da AOX em pH ácido. Contudo é bastante conhecido que numerosos processos celulares promovem a acidificação do citoplasma. LATIES (1982) observou um incremento na atividade da AOX durante ataque de patógenos. É sabido que uma grande parte das bactérias fitopatogênicas acidificam o meio para obter melhores condições de desenvolvimento (FILHO *et al.*, 1995). Já a acidificação do meio extracelular, provocada por fungos durante a infestação tissular, provoca um decréscimo no pH

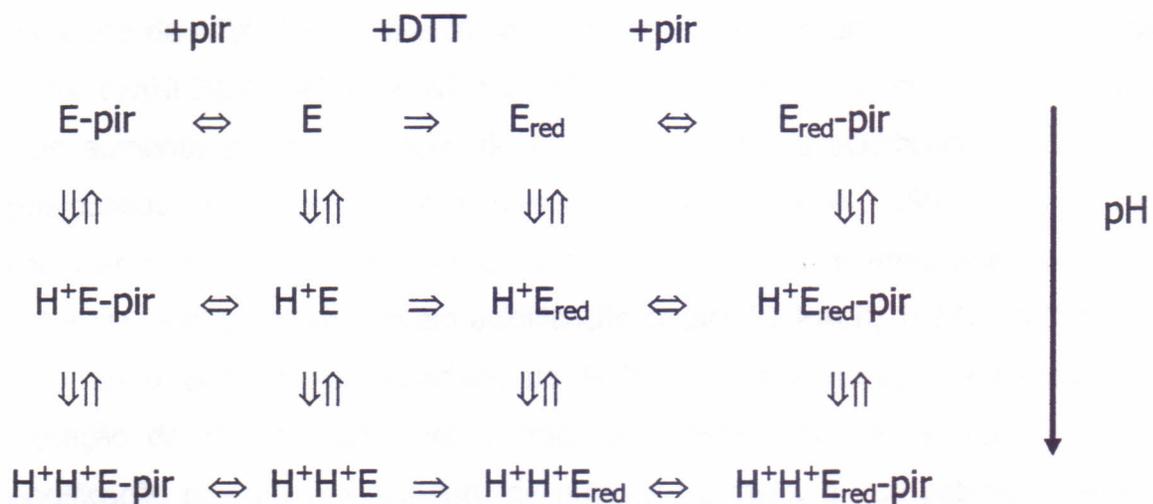


FIGURA 28 - Modelo proposto para um mecanismo de ação da AOX.

E - enzima de AOX desprotonada; H⁺E - enzima de AOX protonada; H⁺ H⁺ E - enzima de AOX mais protonada; red - forma reduzida; pir - piruvato.

citoplasmático (DIXON *et al.*, 1994). A elevação nos níveis de ácido salicílico, mostrada como capaz de elevar a atividade da AOX (RHOADS & McINTOSH, 1993), encontra-se associada à indução de resistência a viroses e outros patógenos (MURPHY *et al.*, 1999). Outra condição onde se observou uma elevação da atividade da AOX foi na fase climatérica que precede o amadurecimento de alguns frutos (VANLERBERGH & McINTOSH, 1997). Nos frutos o climatério é desencadeado pelo aumento da concentração de CO₂ que, produz a acidificação do citoplasma, provocando uma elevação nos níveis de etileno (WINK, 1997). A maioria dos compostos utilizados pelas plantas como atrativo para agentes polinizadores é de natureza fenólica e promovem acidificação celular (STRACK, 1997). MEEUSE (1995) associou o aumento da atividade da AOX durante a floração à necessidade de elevação da temperatura para volatilização desses compostos. Por outro lado a acidificação provoca um aumento de prótons no meio, o que potencialmente pode provocar um incremento nas formas ativas de oxigênio, levando a célula a uma condição de estresse oxidativo. Além disso já foi demonstrado que não só atividade da AOX foi elevada pela produção de superóxidos (PURVIS, 1997) como também ocorreu um incremento na produção de peróxido de hidrogênio por ocasião da inibição da AOX (POPOV *et al.*, 1997) o que sugeriu que a enzima poderia operar no mecanismo de defesa da planta contra as formas ativas do oxigênio.

Dentro desse contexto seria permitido especular que a atividade da AOX estaria respondendo à variação do pH (acidificação) do citoplasma provocada pelas condições anteriormente citadas, já que o pH mitocondrial sofre influência do pH citoplasmático (pH do meio) conforme demonstrado por NEUBURGER & DOUCE (1980). Não seria pois ilógico considerar que o pH citoplasmático não apenas influenciaria a atividade da AOX mas também seria um sinalizador comum de diversos processos que exigiriam da célula respostas para evitar um potencial estresse oxidativo. Assim, a maior atividade da AOX em pH ácido estaria diretamente ligado ao seu papel fisiológico dentro dos mecanismos de contraposição ou ajustamento ao estresse oxidativo. Além disso, com a retomada dos níveis normais de pH citoplasmático a AOX continuaria ativa pela modulação exercida pelo piruvato, evitando a formação de formas ativas de oxigênio no meio.

Acreditamos que, o papel fisiológico da ativação da AOX em pH ácido possa ser melhor explorado relacionando-o diretamente às diferentes condições de estresse. Até agora o relacionamento com esses processos foi estabelecido de maneira indireta. Além disso, os detalhes da modulação desse efeito quantificando-se as concentrações de piruvato extra e intramitocondrias contribuirão para o esclarecimento da real dimensão do papel fisiológico da oxidase alternativa.

CONCLUSÕES

Nossos estudos permitem concluir que, a via alternativa de transporte mitocondrial de elétrons é muito mais que uma via dissipadora de calor. Ela é um eficiente componente dos mecanismos de defesa da planta contra o estresse oxidativo, provocado por diversos fatores bióticos e abióticos. A atividade de AOX é posta em evidência em diferentes condições de variação do pH citoplasmático provocado por tais fatores. Essa característica da AOX pode ser um dos motivos evolutivos de sua alta conservação nos vegetais, mesmo naqueles onde não se justificaria sua presença devido a sua propriedade de dissipar calor. Efetivamente, um eficiente mecanismo de defesa ativado por um sinal comum de diversos fatores que provocam desequilíbrio na homeostase celular, seria bem menos complexo e mais adaptativo do que um mecanismo que reconhecesse apenas sinais específicos de cada um dos fatores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBURY, M.S.; AFFOURTIT, C. & MOORE, A.L. (1998) A highly conserved glutamate residue (Glu-270) is essential for plant alternative oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 273:30301-30305.
- BENDALL, D.S. & BONNER JR., W.D. (1971) Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. *Plant Physiol.* 47:236-245.
- BONNER, W.D.Jr. (1967) A general method for the preparation of plant mitochondria. In: *Methods in Enzymology*. vol 10. ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E., eds. Academic Press, New York. pp. 126-133.
- BROWNLEADER, M.D.; HARBONE, J.B. & DEY, P.M. (1997) Carbohydrate metabolism: Primary metabolism of monosaccharides. In: *Plant Biochemistry*. DEY, P.M. & HARBONE, J.B. eds. Academic Press. London, UK. pp 111-140.
- CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. (1956) The respiratory chain oxidative phosphorylation. In: *Advances in Enzymology* Nord, F.F. ed. Interscience. New York. 77:65-134.
- CONLEY, C.A. & HANSON, M.R. (1994) Tissue-specific protein expression in plant mitochondria. *Plant Cell* 6:85-91.
- CRUZ-HERNANDEZ, A. & GOMEZ-LIN, M. A. (1995) Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta*. 197(4):569-576.
- DAY, D.A & WISKICH, J.T. (1995) Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J. Bioenerg, Biomemb.* 27(4):379-385.

- DAY, D.A.; MILLAR, A.H.; WISKICH, J.T. & WHELEAN, J. (1994) Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. *Plant Physiol* 106:1421-1427.
- DAY, D.A.; DRY, I.B.; SOOLE, K.L.; WISKICH, J.T. & MOORE, A.L. (1991) Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: deviations from Q-pool behavior during oxidation of NADH and quinols. *Plant Physiol.* 95:948-953.
- DAY, D.A. & WISKICH, J.T. (1974) The oxidation of malate and exogenous reduced nicotinamide adenine dinucleotide by isolated plant mitochondria. *Plant Physiol.* 53:104-108.
- DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. & LAMB, C.J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:479-501.
- DOUCE, R. (1985) *Mitochondria in higher plants: structure, function and biogenesis.* Ed. Academic Press. London, U.K. 327p.
- DOUCE, R.; MANNELA, C. A. & BONNER, W.D. Jr. (1973) The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 292:105-116.
- DRY, I.B.; MOORE, A.L.; DAY, D.A. & WISKICH, J.T. (1989) Regulation of alternative oxidase pathway activity in plant mitochondria nonlinear relationship between electron flux and redox poise of the quinone pool. *Arch. Biochim. Biophys.* 273:148-157.
- ELTHON, T.E.; NICKELS, R.L. & McINTOSH, L. (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 89:1311-1317.
- ELTHON, T.E. & McINTOSH, L. (1986) Characterization and solubilization of the alternative oxidase from *Sauromatum guttatum* mitochondria. *Plant Physiol.* 82:1-6.

- ELTHON, T.E.; STEWART, C.R.; McCOY, C.A. & BONNER JR., W.D. (1986) Alternative respiratory path capacity in plant mitochondria: effect of growth temperature, the electrochemical gradient, and assay pH. *Plant Physiol.* 80:378-383.
- FERNANDES DE MELO, D. (1978) Estudo da atividade respiratória, da fosforilação oxidativa e da translocação de nucleotídeos da adedina em mitocôndrias de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza-CE, 73 p.
- FILHO, A. B.; KIWATI, H & AMORIM, L. (1995) Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Ed. Agronômica Ceres. São Paulo. 3ª ed. vol. 1 919p.
- GORNAL, A.G.; BARDAWILL, C.J. & DAVID, M. (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reagent. *J. Biol. Chem.* 177:751-766
- HACKETT, D.P.; HASS, D.W.; GRIFFITHS, S.K. & NIEDERPRUEM, D.J. (1960a) Studies on development of cyanide-resistant respiration in potato tuber slices. *Plant Physiol.* 35:8-19.
- HACKETT, D.P.; RICE, B. & SCHMID, C. (1960b) The partial dissociation of phosphorylation from oxidation in plant mitochondria by respiratory chain inhibitors. *J. Biol. Chem.* 235:2140-2144.
- HAKANSSON G. & ALLEN, F. (1995) Histidine and tyrosine phosphorylation in pea mitochondria: evidence for protein phosphorylation in respiratory redox signalling. *FEBS Lett.* 372:238-242.
- HISER, C.; KAPRANOV, P. & McINTOSH, L. (1996) Genetic modification of respiratory capacity in potato. *Plant Physiol.* 110:277-286.

- HOEFNAGEL, H.N. & WISKICH, J.T. (1998) Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of Q-pool and pyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 355:162-170.
- HOEFNAGEL, M.H.N.; RICH, P.R.; ZHANG, Q. & WISKICH, J.T. (1997) Substrate kinetics of the plant mitochondrial alternative oxidase and effects of pyruvate. *Plant Physiol.* 115:1145-1153.
- HOEFNAGEL, M.H.N. & WISKICH, J.T. (1996) Alternative oxidase activity and the ubiquinone redox level in soybean cotyledon and *Arum* spadix mitochondria during NADH and succinate oxidation. *Plant Physiol.* 110:1329-1335.
- HOEFNAGEL, M.H.N.; MILLAR, A.H.; WISKICH, J.T. & DAY, D.A. (1995) Cytochrome and alternative respiratory pathway compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 318:394-400.
- IKUMA, H. (1970) Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 45:773-781.
- IKUMA, H. & BONNER, W. D. Jr. (1967) properties of higher plant mitochondria. I. Isolation and some characteristics of tightly-coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotils. *Plant. Physiol.* 42:67-75.
- JOLIVET, Y.; PIREAUX, J.C. & DIZENGREMEL, P. (1990) Changes in properties of barley leaf mitochondria isolated from NaCl-treated plants. *Plant Physiol.* 94:641-646.
- KEARNS, A.; WHELAN, J.; YOUNG, S.; ELTHON, T.E. & DAY, D.A. (1992) Tissue-specific expression of the alternative oxidase in soybean and siratro. *Plant Physiol.* 99:712-717.

- KOEPPE, D.E. & MILLER, R.J. (1972) Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by isolated corn mitochondria. *Plant Physiol.* 49:353-357.
- KUMAR, A.M. & SOLL, D. (1992) *Aradopsis* alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10842-10846.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during assembly bacteriophage T₄. *Nature.* 227:680-685,
- LAMBERS, H. (1985) Respiration in intact plants and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. IN. *Encyclopedia of plant physiology higher plant cell respiration.* R DOUCE & D.A. DAY eds. New York, Springer-Verlag 18:418-473.
- LAMBERS, H. (1982) Cyanide-resistant respiration: a nonphosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiol. Plant.* 55:478-485.
- LAMBERS, H. (1980) The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant Cell Environ.* 3:293-302.
- LATIES G.G. (1982) The cyanide-resistant alternative pathway in higher plant respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:519-555.
- LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R. & LAMB, C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- LI, Q.; RITZEL, R.G.; McLEAN, L.L.T. McINTOSH, L. KO, T. *et al.* (1996) Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics* 142:129-40.

- LIDEN, A. C. & AKERLUND, H. E. (1993) Induction and activation of the alternative oxidase of potato tuber mitochondria. *Physiol. Plant.* 87:134-141..
- LONGO, V.D.; GRALLA, E.B. & VALENTINE, J.S. (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*: mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J. Biol. Chem.* 271:12275-12280.
- McINTOSH, L. (1994) Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* 105:781-786.
- MEEUSE, B.J.D. (1975) Thermogenic respiration in Aroid. *Ann. Rev. Plant Physiol* 26:117-126.
- MILLAR, A.H.; HOEFNAGEL, M.H.N.; DAY, D.A. & WISKICH, J.T. (1996) Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria. *Plant Physiol.* 111:613-618.
- MILLAR, A.H.; ATKIN, O. K.; LAMBERS, H.; WISKICH, J.T. & DAY, D.A. (1995) A critique of the use of inhibitors to estimate partitioning of electrons between mitochondrial respiratory pathways in plants. *Physiol. Plant.* 95:523-532.
- MILLAR, A.H.; WISKICH, J.T.; WHELAN, J. & DAY, D.A. (1993) Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 329(3): 259-262.
- MOORE, A.L.; UMBACH, A.L. & SIEDOW, J.N. (1995) Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. *J. Bioenerg. Biomemb.* 27(4):367-377.
- MOORE, A.L. & SIEDOW, J.N. (1991) The regulation and nature of cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1059:121-140.

- MOORE A.L.; DRY, I.B. & WISKICH, J.T. (1988) Measurement of the redox state of the ubiquinone pool in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 235:76-80.
- MURPHY, A.M.; CHIVASA, S.; SINGH, D.P. & CARR, J.P. (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways. *Trens Plant Science.* 4:155-160.
- NEUBURGER, M.; JOURNET, E.P.; BLIGNY, R.; CARDE, J.P. & DOUCE, R. (1982) Purification of plant mitochondria by isotropic centrifugation in density gradients of percol. *Arch. Biochem.* 217:312-323.
- NEUBURGER, M. & DOUCE, R. (1980) Effect of bicarbonate and oxaloacetate on malate oxidation by spinach leaf mitochondria. *Bioch. Biophys. Acta* 589:176-189.
- ORDENTLICH, A.; LINGER, R.A. & RASKIN, I. (1991) Alternative respiration and heat evolution in plants. *Plant Physiol.* 97:1545-1550.
- PALMER, J.M. (1976) The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27:133-157.
- POPOV, V.N.; SIMONIAN, R.A.; SKULACHEV, V.P. & STARKOV, A.A. (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Letters* 415:87-90.
- POPOVA, T.T. & CARVALHO, M.Â.A.P. (1998) Citrate and isocitrate in plant metabolism. *Bioch. Biophys. Acta* 1364:307-325.
- PURVIS, A.C. (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 100:165-170.
- PURVIS, A.C. & SHEWFELT, R.L. (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol. Plant.* 88:712-718.

- RASMUSSEN, A.G. & MØLLER, J.M. (1990) NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 94:1012-1018.
- RHOADS, D.M.; UMBACH, A.L.; SWEET, C.R.; LENNON, A.M.; RAUCH, G.S. & SIEDOW, J.N. (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273:30750-30756.
- RHOADS, D.M. & McINTOSH, L. (1993) The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis – related proteins share regions of sequence similarity in their promoters. *Plant Mol. Biol.* 21:615-624.
- RHOADS, D.M. & McINTOSH, L. (1992) Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell.* 4:1131-1139.
- RHOADS, D.M. & McINTOSH, L. (1991) Isolation and characterization of cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Shott.) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2122-2126.
- RIBAS-CARBO, M.; LENNON, A.M.; ROBINSON, S.A.; GILES, L.; BERRY, J.A. & SIEDOW, J.N. (1997) The regulation of electron partitioning between the cytochrome and pathways in soybean cotyledon and root mitochondria. *Plant Physiol.* 113:903-911.
- RIBAS-CARBO, M.; WISKICH, J.T.; BERRY, J.A. & SIEDOW, J.N. (1995) Ubiquinone redox behavior in plant mitochondria during electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 317:156-160.
- RIBAS-CARBO, M.; BERRY, J.A.; ASCON-BIETO, J. & SIEDOW, J.N. (1994) The reaction of the plant mitochondrial cyanide-resistant alternative oxidase with oxygen. *Biochim. Biophys. Acta* 1188:205-212.

- SAISHO, D.; NAMBARA, E.; NAITO, S.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A. & NAKAZONO, M. (1997) Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 35:585-596.
- SAKAJO, S.; MINAGAWA, N. KOMIYAMA, T. & YOSHIMOTO, A. (1991) Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *Biochim. Biophys. Acta* 1092:102-108.
- SEN, C.K. & PACKER, L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene-transcription. *FASEB J.* 10:709-720.
- SHONBAUM, G.R.; BONNER, W.; STOREY, B.T. & BAHR, J.T. (1971) Specific inhibition of cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.* 47:124-128.
- SIEDOW, J.N.; UMBACH, A.L. & MOORE, A.L. (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidation from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett.* 362:10-14.
- SIEDOW, J.N. & MOORE, A.L. (1993) A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1142:165-174.
- SIEDOW, J.N.; WHELAN, J.; KEARNS, A.; WISKICH, J.T. & DAY, D.A. (1992) Topology of the alternative oxidase in soybean mitochondria. In: *Molecular biochemical and physiological aspects of plant respiration*. LAMBERS, H. and van der PLAS, L.H.W. eds. Amsterdam. Academic Press
- SIEDOW, J.N. & BICKETT, D.M. (1981) Structural features required for inhibition of cyanide-insensitive electron transfer by propyl gallate. *Arch. Biochem. Biophys.* 207:32-39

- SILVA LIMA, M.; DENSLow, N.D. & MELO, D.F. (1977) Atractyloside in mitochondria from hypocotyls of *Vigna sinensis* cv. seridó. *Physiol. Plant.* 41:193-195.
- SLUSE, F.E. & JARMUSZKIEWICZ, W. (1998) Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:733-747
- SLUSE, F.E.; ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W. & VERCESI, A.E. (1998) Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Letters* 433:237-240.
- STOREY, B.T. & BAHR, J.T. (1969) The respiratory chain of plant mitochondria. II. Oxidative phosphorylation in skunk cabbage mitochondria. *Plant. Physiol.* 44:126-124.
- STRACK, D. (1997) Phenolic metabolism. In: *Plant Biochemistry*. DEY, P.M. & HARBONE, J.B. eds. Academic Press. London, UK. pp 387-416.
- UMBACH A.L. & SIEDOW, J.N. (1996) The reaction of the soybean cotyledon mitochondrial cyanide-resistant oxidase with sulfhydryl reagents suggests that α -keto acid activation involves the formation of a thiohemiacetal. *J. Biol. Chemis.* 271(40):25019-25066.
- UMBACH, A.L.; WISKICH, J.T. & SIEDOW, J.N. (1994) Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett.* 348:181-184.
- UMBACH, A.L. & SIEDOW, J.N. (1993) Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.* 103:845-854.

- VAN DEN BERGEN, C.W.M.; WAGNER, A.M.; KRAB, K. & MOORE, A.L. (1994) The relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria. Interplay between quinol-oxidizing and quinone reducing pathways. *Eur. J. Biochem.* 226:1071-1078.
- VANLERBERGHE, G.C. & McINTOSH, L. (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:703-734.
- VANLERBERGHE, G.C.; VANLERBERGH, A. E. & McINTOSH, L. (1997) Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism. *Plant Physiol.* 113:657-661.
- VANLERBERGHE, G.C.; DAY, D.A.; WISKICH, J.T.; VANLERBERGHE, A.E. & McINTOSH, L. (1995) Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria. Dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. *Plant Physiol.* 109:353-361.
- VANLERBERGHE, G.C. & McINTOSH, L. (1996) Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 111:589-595.
- VANLERBERGHE, G.C. & McINTOSH, L. (1994) Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression: studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant Physiol.* 105:867-874.
- VANLERBERGHE, G.C.; VANLERBERGH, A.E. & McINTOSH, L. (1994) Molecular genetic alteration of plant respiration. Silencing and overexpression of alternative oxidase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 106:1503-1510.
- VANLERBERGHE, G.C. & McINTOSH, L. (1992a) Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol.* 100:115-119.

- VANLERBERGHE, G.C. & McINTOSH, L. (1992b) Coordinate regulation of cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. *Plant Physiol.* 100: 1846-1851.
- WAGNER, A.M.; VAN DEN BERGEN, C.W.M. & WINCENCJUSZ, H. (1995) Stimulation of the alternative pathway by succinate and malate. *Plant Physiol.* 108:1035-1042.
- WAGNER, A.M. (1995) A role active active oxygen species as second messenger in the induction on alternative oxidase gene expression in petunia hybrid cells. *FEBS Lett.* 368:339-342.
- WAGNER, A.M.; KRAAB, M.H.S.; van EMMERIK, W.A.M. & van der PLAS, L.H.W. (1989) Respiration of plant mitochondria with various substrates: alternative pathway with NADH and TCA cycles derived substrates. *Plant Physiol. Biochem.* 27:837-845.
- WHELAN, J.; MILLAR, A.H. & DAY, D.A. (1996) The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta* 198(2):197-201.
- WHELAN, J.; SMITH, M. K.; MEIJER, M; YU, J.; BADGER, M.R.; PRICE, G.D. & DAY, D.A. (1995a) Cloning of an additional cDNA for the alternative oxidase in tobacco. *Plant Physiol.* 107:1469-1470.
- WHELAN, J.; HUGOSSON, M.; GLASER, E. & DAY, D.A. (1995b) Studies on the import and processing of the alternative oxidase precursor by isolated soybean mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 27(4):769-778.
- WHELAN, J.; McINTOSH, L. & DAY, D.A. (1993) Sequencing of soybean alternative oxidase cDNA clone. *Plant Physiol.* 102:1481.
- WILSON, S.B. (1970) Energy conservation associated with cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 223:383-87.

WILSON, S.B. (1988) The switching of electron flux from the cyanide-insensitive oxidase to the cytochrome pathway in mung-bean (*Phaseolus aureus* L.) mitochondria. *Biochem. J.* 249:301-303.

WINK, M. (1997) Special nitrogen metabolism. In: *Plant Biochemistry*. DEY, P.M. & HARBONE, J.B. eds. Academic Press. London, UK. pp 439-485.

ZHANG, Q.; HOEFNAGEL, M.H.N. & WISKICH, J.T. (1996) Alternative oxidase from *Arum* and soybean its stabilization during purification. *Physiol. Plant.* 96:551.