UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão e caracterização de metacaspases e estudos
mitocondriais em plantas superiores**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientado: Wagner Rodrigo de Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carem Gledes Vargas-
Rechia

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

FICHA CATALOGRÁFICA

de Souza, Wagner Rodrigo

Expressão e caracterização de metacaspases e estudos mitocondriais em plantas superiores.

Ribeirão Preto, 2009.

170 p.; il.; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Vargas-Rechia, C. G.

1. Plantas superiores. 2. Mitocôndrias. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Ácido salicílico. 5. Cálcio. 6. Metacaspases. 7. Morte celular programada.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Wagner Rodrigo de Souza

Expressão e caracterização de metacaspases e estudos mitocondriais em plantas superiores.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Carem Gledes Vargas-Rechia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

A morte celular programada (PCD) é um processo vital que ocorre em todos os eucariotos. Em plantas, os mecanismos básicos que governam a PCD não estão esclarecidos. Sabe-se que a PCD em plantas é ativada pelo acúmulo de ácido salicílico e influxo de íons cálcio, bem como pela geração de ERO que ocorre nos cloroplastos e nas mitocôndrias. Além disso, as plantas possuem um grupo de proteases denominadas metacaspases, que assemelham-se estruturalmente com as caspases, proteínas que executam PCD em animais. Apesar destes conhecimentos, os mecanismos que governam a ativação da PCD são desconhecidos. Nesse contexto, o presente trabalho procurou investigar alguns fatores possivelmente envolvidos em PCD vegetal. Com esse objetivo, foram isoladas e caracterizadas mitocôndrias de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*. Foram avaliados os efeitos do Ca^{2+} e do AS sobre as funções mitocondriais, dentre elas a geração de ERO, diminuída pelo AS, porém aumentada por Ca^{2+} . Um mecanismo foi proposto para explicar a diminuição de ERO pelo AS e as respostas observadas para AS e Ca^{2+} sobre as mitocôndrias são discutidas com base no possível envolvimento na PCD vegetal. A segunda parte do trabalho envolveu a expressão e caracterização de metacaspases (AtMCPs) em *Arabidopsis thaliana*. As proteases demonstraram autoprocessamento quando superexpressas *in planta*, assim como ocorre com as caspases em animais. A expressão de AtMCPs nesse modelo não produziu nenhum fenótipo de morte celular, sugerindo que o fenômeno ocorra por meio da integração de duas ou mais metacaspases. Foram estudadas também as propriedades biológicas de AtMCPs recombinantes em *E. coli*, demonstrando-se diferentes efeitos. Nossos estudos visam contribuir para a melhor compreensão de mecanismos básicos possivelmente envolvidos na PCD em plantas superiores.

ABSTRACT

Programmed cell death (PCD) is a fundamental process that occurs in all eukaryotes. In plants, such phenomenon is not well understood. It is known that PCD in plants is activated through salicylic acid (SA) accumulation, Ca^{2+} ion fluxes, as well as reactive oxygen species (ROS) generation, which occurs mainly in chloroplasts and mitochondria. Besides, plants have a family of proteases, named metacaspases, which are proteases structurally similar to the caspases, members of proteins involved in animal PCD execution. In despite of this knowledge, the mechanism by which plant PCD is activated remains elusive. In this context, the aim of this work was to investigate some factors potentially involved in plant PCD. To this purpose, mitochondria from cell suspension cultures of *Rubus fruticosus* were isolated and characterized. It was investigated the effects of SA and Ca^{2+} on mitochondrial functions, as well. We have focused on ROS generation, which are important signals involved in plant PCD. It was shown that Ca^{2+} increased ROS generation, while SA decreases such production. A mechanism was proposed to explain the SA effects on isolated mitochondria, and the responses obtained from Ca^{2+} and SA addition on the organelle are discussed, based on the possible involvement of these effects in plant PCD.

In the second part of this work, it was investigated the expression of metacaspases (AtMCPs) in the model plant *Arabidopsis thaliana*. The proteases have demonstrated self-processing when expressed *in planta*, similar to the animal caspases. Such expression did not cause any cell death phenotype, suggesting that PCD could be activated through the integration of two or more MCPs, if they are involved. It was investigated the effects of recombinant AtMCPs in *E. coli*, as well, demonstrating different responses. Our work contributes to a better understanding of factors potentially involved in plant PCD.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	antimicina A
ADP	adenosina difosfato
AG	ácido graxo
AL-PCD	<i>apoptosis-like programmed cell death</i>
AOX	oxidase alternativa
AS	ácido salicílico
AtMCP	metacaspases de <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosina trifosfato
AtSerp1	serpina de <i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	albumina soro bovina
CaMV35S	promotor 35S do vírus mosaico do tabaco
CLP	<i>caspase-like proteases</i>
Col-0	ecotipo Columbia-0
CTE	cadeia transportadora de elétrons
D.O.	densidade óptica
DCPIP	2,6-dicloro-fenolindofenol
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPI	difenil-eneiodônio
DTT	ditiotreitól
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
EST	sequências codificadoras
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo, forma reduzida
FB1	fumonisina B1
FCCP	carbonil-cianeto- <i>p</i> -trifluorometoxifenil-hidrazona
FR	fenilalanina-arginina
GDP	guanosina difosfato
Glu	glutamato

GRR	glicina-arginina-arginina
GTP	guanosina trifosfato
H ₂ DCFDA	diacetato de 2,7-dicloro-di-hidrofluoresceína
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	imunoglobulina G
IMAC	canal aniônico da membrana interna
IPTG	isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo
ISP	proteína ferro-enxofre de Rieske
Kan ^R	resistência à kanamicina
Mal	malato
MCA	metil cumarina
mcII-Pa	metacaspase do tipo II de <i>Picea abies</i>
MCP	metacaspases
<i>mcp2d-1</i>	<i>Arabidopsis</i> nocauteada no locus do gene <i>AtMCP2d</i>
MDA	malondialdeído
MME	membrana mitocondrial externa
MMI	membrana mitocondrial interna
MS	meio de cultura de Murashige e Skoog
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NAO	laranja de 10- <i>N</i> -nonil acridina
NCCD	Comissão de Nomenclatura em Morte Celular
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PCD	morte celular programada
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pi	fosfato inorgânico
Pir	piruvato
PUCP	proteína desacopladora de plantas
Q ou UQ	ubiquinona
Q• ou UQ•	radical ubisemiquinona ou radical semiquinona
QH ₂	ubiquinol, ubiquinona reduzida

<i>Rboh</i>	<i>respiratory burst oxidase homolog</i>
RCR	razão do controle respiratório
RE	retículo endoplasmático
RH	resposta de hipersensibilidade
Rot	rotenona
RSA	resistência sistêmica adquirida
SCCR	succinato citocromo <i>c</i> redutase
SDS	dodecil sulfato de sódio
SHAM	ácido salicil-hidroxâmico
Succ	succinato
T ₁	sementes transgênicas de primeira geração
T ₂	sementes transgênicas de segunda geração
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido barbitúrico
tNOS	terminador NOS
UAF	unidades arbitrárias de fluorescência
UCP	proteína desacopladora
UV	ultravioleta
WT	plantas selvagens
YCA1	metacaspase de levedura 1
$\Delta\Psi$	potencial eletroquímico

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Organização da cadeia transportadora de elétrons (CTE) na membrana interna das mitocôndrias de plantas	24
Figura 2.	Estrutura do complexo citocromo <i>bc</i> ₁ (Complexo III)	39
Figura 3.	Estados redox da ubiquinona (Q)	40
Figura 4.	O Ciclo da Ubiquinona	42
Figura 5.	Efeitos de substratos/inibidores sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de cultura de células de <i>Rubus fruticosus</i>	61
Figura 6.	Efeito do AS sobre a taxa de respiração em mitocôndrias isoladas de <i>Rubus fruticosus</i>	62
Figura 7.	Determinação do potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$)	65
Figura 8.	Efeitos do Ca^{2+} e do AS sobre o potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) em mitocôndrias isoladas de <i>Rubus fruticosus</i>	66
Figura 9.	Expressão da AOX em sua forma monomérica em mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de <i>Rubus fruticosus</i>	67
Figura 10.	Grau de inchamento das mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de <i>Rubus fruticosus</i>	69
Figura 11.	Produção de ERO pelas mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de <i>Rubus fruticosus</i>	73
Figura 12.	Efeitos do Ca^{2+} , AS e AA sobre a produção de ERO pelas mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de <i>Rubus fruticosus</i>	74
Figura 13.	Atividades enzimáticas de complexos da CTE de mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de <i>Rubus fruticosus</i>	76
Figura 14.	Estudos computacionais para interação de AS e UQ	78
Figura 15.	Lipoperoxidação em mitocôndrias isoladas de <i>Rubus fruticosus</i>	81
Figura 16.	Determinação do conteúdo de cardiolipina em mitocôndrias isoladas de <i>Rubus fruticosus</i>	82

CAPÍTULO II

Figura 1.	Representação esquemática das estruturas sugeridas para as metacaspases de <i>Arabidopsis thaliana</i>	102
Figura 2.	Esquema de geração das plantas transgênicas	116
Figura 3.	Estrutura do vetor binário para expressão em plantas EL103	121
Figura 4.	Produtos da reação de digestão do vetor EL103 com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Xba</i> I	121
Figura 5.	Comparação entre plantas transgênicas (linhagens CCT, Kan ^R) e WT crescidas em meio MS suplementado com antibióticos, ágar ou phytigel	123
Figura 6.	Western blot de plantas transgênicas expressando metacaspases do tipo I	126
Figura 7.	Western blot de plantas transgênicas expressando metacaspases do tipo II, AtMCP2b-V ₅ His ₆ e AtMCP2b(C139A)-V ₅ His ₆ (2b ^m)	127
Figura 8.	Genotipagem de linhagens transgênicas positivas e produtos da digestão com a enzima Tsp45I	130
Figura 9.	Genotipagem das plantas WT e <i>mcp2d-1</i>	131
Figura 10.	Western blot de plantas transgênicas expressando a metacaspase do tipo II AtMCP2f-V ₅ His ₆ e AtMCP2f(C139A)-V ₅ His ₆ (2b ^m)	132
Figura 11.	Plantas transgênicas superexpressando metacaspases em diferentes estágios de desenvolvimento	135
Figura 12.	Análise de linhagens transgênicas supostamente expressando o gene <i>AtMCP1b</i> em plantas WT e <i>mcp2d-1</i> durante a segunda geração (T ₂)	137
Figura 13.	Western blot de plantas transgênicas expressando a metacaspase AtMCP1b-V ₅ His ₆ e AtMCP1b(C220A)-V ₅ His ₆ (2b ^m) na geração T ₂	139
Figura 14.	Western blot de metacaspases recombinantes expressas em <i>E. coli</i> .	140
Figura 15.	Curva de crescimento de cultura de <i>E. coli</i> após indução de expressão das metacaspases do tipo II	142
Figura 16.	Análise em SDS-PAGE de proteínas totais após expressão de AtMCPs recombinantes em <i>E. coli</i>	143
Figura 17.	Atividade proteolítica das metacaspases recombinantes	145

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA	7
LISTA DE FIGURAS	10
 INTRODUÇÃO	 16
 CAPÍTULO I - Isolamento e caracterização funcional de mitocôndrias obtidas de culturas de células em suspensão de <i>Rubus fruticosus</i>	 19
 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	 20
1.1 A mitocôndria vegetal	21
1.1.1. Cadeia transportadora de elétrons (CTE)	21
1.1.2. NAD(P)H desidrogenases alternativas em mitocôndrias de plantas	23
1.1.3. Oxidase alternativa em mitocôndrias de plantas superiores	28
1.1.4. Proteínas desaclopadoras em mitocôndrias de plantas	30
1.2. Espécies reativas de oxigênio (ERO)	32
1.2.1. Sítios de produção de ERO nas mitocôndrias	34
1.2.2. O complexo citocromo <i>bc_L</i> , o ciclo da ubiquinona e a produção de ERO	37
1.2.3. Envolvimento das ERO na morte celular programada em plantas	43
1.3. Ácido salicílico, espécies reativas de oxigênio e morte celular programada em plantas	44
1.4. O papel do cálcio na morte celular programada em plantas	46
 2. OBJETIVOS	 47
2.1. Objetivo geral	47
2.2. Objetivos específico.....	47
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 48

3.1.	Cultivo de células de <i>Rubus fruticosus</i>	48
3.2.	Protocolo de isolamento de mitocôndrias de cultura de células em suspensão de <i>Rubus fruticosus</i>	49
3.3.	Determinação da velocidade de consumo do oxigênio	50
3.4.	Determinação do potencial eletroquímico de membrana	51
3.5.	Imunodeteção da oxidase alternativa (AOX)	51
3.6.	Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio	52
3.6.1.	Determinação de ERO pela sonda H ₂ DCFDA	52
3.6.2.	Determinação de H ₂ O ₂ pelo sistema Amplex Red/HRP	53
3.7.	Determinação do grau de inchamento mitocondrial	54
3.8.	Medidas das atividades enzimáticas de complexos de cadeia respiratória	54
3.8.1.	Medida da atividade enzimática do Complexo II	54
3.8.2.	Medida da atividade da succinato citocromo <i>c</i> redutase	55
3.9.	Avaliação da lipoperoxidação	55
3.10.	Determinação da cardiolipina	56
3.11.	Estudos computacionais	57
3.12.	Análise estatística	57
4.	RESULTADOS	58
4.1.	Consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de <i>Rubus fruticosus</i>	58
4.2.	Potencial eletroquímico da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)	63
4.3.	Expressão da oxidase alternativa (AOX)	67
4.4.	Grau de inchamento da mitocondrial	68
4.5.	Geração de ERO	70
4.6.	Atividade enzimática de complexos da CTE	75
4.7.	Estudos computacionais de interação de AS e UQ	77
4.8.	Lipoperoxidação e conteúdo de cardiolipina nas mitocôndrias de <i>Rubus fruticosus</i>	79
5.	DISCUSSÃO	83
5.1.	Caracterização funcional das mitocôndrias isoladas de cultura de células em	84

	suspensão de <i>Rubus fruticosus</i>	
5.2.	Produção de ERO nas mitocôndrias de <i>Rubus fruticosus</i>	87
5.3.	Efeitos do AS e do Ca^{2+} sobre mitocôndrias de <i>Rubus fruticosus</i>	90
5.3.1.	Ácido Salicílico (AS)	91
5.3.2.	Efeito do íon cálcio	94
6.	CONCLUSÕES	97

CAPÍTULO II - Expressão e caracterização de metacaspases de *Arabidopsis thaliana*..... 98

1.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	99
1.1.	Metacaspases	101
1.1.1.	Propriedades catalíticas das metacaspases	103
1.1.2.	Propriedades biológicas das metacaspases	104
2.	OBJETIVOS	108
3.	MATERIAL E MÉTODOS	109
3.1.	Construção dos vetores binários de expressão	109
3.1.1.	Clonagem dos genes <i>AtMCPs 1b</i> , <i>1b^m</i> , <i>1c</i> , <i>2b</i> e <i>2b^m</i>	109
3.1.2.	Clonagem dos genes <i>AtMCPs 1c^m</i> , <i>2f</i> e <i>2f^m</i>	110
3.2.	Material vegetal e condições de crescimento	111
3.3.	Geração das plantas transgênicas	112
3.3.1.	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	112
3.3.2.	Transformação de plantas selvagens (WT) e mutantes (<i>mcp2d-1</i>)	113
3.3.3.	Seleção dos transformantes com marcador antibiótico	113
3.4.	Análise da expressão gênica	114
3.5.	Genotipagem das plantas transgênicas	117
3.6.	Estudo das Proteínas Recombinantes	118

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
4.1.	Clonagem das metacaspases em vetor binário de expressão	120
4.2.	Geração das plantas transgênicas	122
4.2.1.	Seleção dos transformantes	122
4.3.	Análise da geração T ₁	124
4.3.1.	Análise da expressão das metacaspases do tipo I	124
4.3.2.	Análise das metacaspases do tipo II: expressão da AtMCP2b	126
4.3.2.1.	Genotipagem das plantas transgênicas	128
4.3.3.	Análise das metacaspases do tipo II: Expressão da AtMCP2f	132
4.4.	Análise da Geração T ₂	136
4.5.	Estudo das proteínas recombinantes	139
4.5.1.	Expressão em <i>E. coli</i>	139
4.5.2.	Atividade biológica das metacaspases recombinantes	141
5.	CONCLUSÕES	148
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

INTRODUÇÃO

O termo apoptose, uma palavra grega utilizada para descrever a queda de folhas e pétalas das plantas, foi introduzido no meio acadêmico originalmente por Kerr, Wyllie e Currie para designar a então denominada “necrose celular programada” observada quando células animais apresentavam morte celular após trauma (KERR et al., 1972). A apoptose é o tipo de morte celular programada (PCD, do inglês *programmed cell death*) mais bem compreendida em animais, graças ao avanço de técnicas que combinam genética, bioquímica e biologia molecular. Apesar do termo apoptose possuir origem botânica, ironicamente a compreensão dos mecanismos que controlam a morte celular programada em plantas está muito distante se comparada ao grau de evolução observado nos estudos em animais.

Desde os meados da década de 90, os estudos dos mecanismos envolvidos na PCD em plantas foram realizados perante a observação de morte celular que ocorria durante interações planta-patógeno e a formação de elementos de traquearia no xilema (LAM et al., 2001; FUKUDA, 2004). Recentemente, outros modelos experimentais contribuíram de maneira significativa para a compreensão da PCD em plantas, dentre os quais podemos citar o choque térmico em cultura de células de *Arabidopsis*, a desintegração do pólen durante interações não-compatíveis e a morte programada de células embriogênicas da espécie *Norway spruce* (WATANABE e LAM, 2009). Um fator comum entre todos os tipos de PCD, descritos anteriormente, é o envolvimento de proteases semelhantes às caspases animais (CLP, *caspase-like proteases*) no processo de morte celular, com exceção da formação dos elementos de traquearia, onde aparentemente as CLP não estão envolvidas. Além das CLP, o inchamento celular, a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA são outros fatores normalmente

observados durante PCD em plantas, todos eles relacionados a apoptose animal, sendo distintos da morte celular por necrose.

Apesar das semelhanças bioquímicas e estruturais observadas entre PCD animal e vegetal, genomas sequenciados de plantas demonstraram que estas não possuem reguladores de morte celular homólogos aos animais, sugerindo que a PCD em plantas ocorre por meio de reguladores distintos, porém com funções semelhantes.

A comparação entre PCD animal e vegetal se faz importante para uma melhor compreensão dos mecanismos evolutivos da morte celular. Blackstone e Green (1999) sugeriram que a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir da mitocôndria poderia ser um fator comum pelo qual a morte celular poderia ser ativada em diferentes eucariotos, fortalecendo a teoria da relação simbiótica entre a pró-mitocôndria e a célula progenitora de eucariotos que a teria fagocitado. Embora o envolvimento direto do citocromo *c* na ativação de PCD não tenha sido demonstrado em plantas, até o momento, a transição de permeabilidade mitocondrial já foi observada durante o fenômeno (SCOTT e LOGAN, 2008). Além disso, a expressão heteróloga de Bax, uma proteína da família BCL2, reguladora de PCD em mamíferos e localizada na membrana mitocondrial interna, foi capaz de ativar PCD tanto em plantas quanto em leveduras (LACOMME e SANTA CRUZ, 1999; JIN e REED, 2002).

As observações descritas anteriormente sugerem que a mitocôndria possa ser a organela envolvida na evolução do processo de morte celular em eucariotos, principalmente por meio da produção de ERO como sinalizadores iniciais para ativação da PCD.

Outra vertente para avaliação dos mecanismos envolvidos durante PCD em plantas é o estudo de proteases estruturalmente relacionadas às caspases animais, estas

últimas proteases reconhecidamente envolvidas na PCD em mamíferos. Nesse contexto, foram identificadas, por meio de buscas interativas baseadas em estrutura e através de genomas sequenciados, uma nova classe de proteases estruturalmente semelhantes às caspases, denominadas metacaspases (UREN et al., 2000). Estas proteases foram encontradas nos genomas de fungos, leveduras e plantas, porém, apesar da semelhança estrutural, tais proteases não demonstraram atividades proteolíticas comuns às caspases (atividade CLP, *caspase-like proteases*) até o presente momento. Em contrapartida, o envolvimento das metacaspases durante PCD já foi observado em sistemas de leveduras e plantas (VERCAMMEN et al., 2004; WATANABE e LAM, 2005; HE et al., 2008).

Tendo em vista as observações discutidas anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de mecanismos potencialmente envolvidos durante morte celular programada em plantas. O trabalho foi dividido em duas partes, sendo que a primeira envolve estudos mitocondriais, principalmente no que concerne ao mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio, através de organelas isoladas de cultura de células em suspensão de amora preta (*Rubus fruticosus*). A segunda parte, realizada na Rutgers University (New Jersey, EUA), sob orientação do Dr. Eric Lam, teve seu foco centrado na caracterização funcional das metacaspases de *Arabidopsis thaliana*.

O presente estudo procurou fornecer informações básicas que poderão contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos possivelmente envolvidos durante morte celular programada em plantas. A elucidação dos mecanismos de PCD vegetal poderá culminar com o desenvolvimento de novas técnicas para aumentar a resistência das plantas a fatores bióticos (tais como fungos ou insetos) e abióticos (tais como estresse hídrico ou luz UV), bem como o aumento da produtividade vegetal por meio da biomassa e até mesmo promover novas estratégias para a manipulação da morte celular em animais.

CAPÍTULO I

Isolamento e caracterização funcional de mitocôndrias obtidas de culturas de células em suspensão de *Rubus fruticosus*

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Durante os últimos 20 anos, as investigações envolvendo as mitocôndrias de plantas superiores têm demonstrado a grande variação que ocorre nestas organelas quando comparadas àquelas pertencentes a outras espécies existentes no planeta Terra.

As mitocôndrias vegetais desenvolveram estratégias distintas para a manutenção e codificação genômica, regulação gênica e segregação organelar, assim como suas funções bioquímicas e fisiológicas evoluíram para suprir a demanda de organismos fotossintéticos e sésseis, características do reino vegetal.

O genoma mitocondrial das plantas codifica apenas uma pequena porção da informação genética necessária para sua manutenção e biogênese, sendo que a maior parte da informação genética mitocondrial encontra-se no núcleo celular. Assim, podemos assumir que as características particulares encontradas nas mitocôndrias das plantas originaram-se da coevolução entre o núcleo e a mitocôndria dessas espécies.

Apesar da grande diferença existente entre mitocôndrias vegetais e de outras espécies, a maquinaria para o exercício da função básica mitocondrial, ou seja, a geração de energia em forma de ATP para as células, é muito semelhante àquela existente em outros organismos. Durante a presente introdução, serão considerados os aspectos comuns e particulares das mitocôndrias de plantas superiores, bem como serão discutidos fatores pertinentes às funções mitocondriais que estão além da geração de energia celular, tal como seu grau de envolvimento na morte celular programada em plantas.

1.1 A Mitocôndria Vegetal

1.1.1. Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE)

Mitocôndrias são organelas essenciais encontradas em todas as células eucariotas. Estas organelas possuem toda a maquinaria necessária para a respiração celular, que produz ATP por meio da integração das vias metabólicas com a **cadeia transportadora de elétrons (CTE)** presente nas mitocôndrias. São responsáveis também pelo suprimento de vários compostos para as células, tais como ácidos orgânicos e aminoácidos, responsáveis por diversas reações anabólicas que ocorrem nos organismos. Atualmente, sabe-se que as mitocôndrias possuem funções muito mais diversificadas, além das expostas acima, como por exemplo na morte celular programada, em que participa ativamente para sua regulação (FERRI e KROEMER, 2001).

A mitocôndria é formada por duas membranas, a **membrana mitocondrial interna (MMI)** e a **membrana mitocondrial externa (MME)**. A MMI é muito maior em área em relação a MME, pois dobra-se em cristas que se estendem profundamente através da **matriz mitocondrial**. O espaço aquoso entre as duas membranas é chamado de **espaço intermembranas**. A MME é permeável, já a MMI é impermeável à grande maioria das moléculas e solutos. As mitocôndrias são semi-autônomas e possuem DNA próprio, embora as enzimas responsáveis pela replicação deste DNA sejam codificadas pelo núcleo celular. Apesar das mitocôndrias vegetais serem semelhantes às animais, algumas particularidades as diferenciam, como será visto adiante.

A adenosina trifosfato (ATP) é a molécula responsável por fornecer energia para a maioria das funções celulares, sendo que a maior parte do ATP é sintetizada por meio da **fosforilação oxidativa**, que ocorre nas mitocôndrias.

A fosforilação oxidativa ocorre via interação de complexos lipoprotéicos que fazem parte da CTE e de carreadores móveis de elétrons encontrados na MMI. Os elétrons têm acesso nas mitocôndrias por meio de carreadores de elétrons presentes nas células, dentre os quais podemos citar NADH, NADPH e FADH₂. As mitocôndrias possuem basicamente 4 complexos protéicos responsáveis pelo transporte de elétrons (complexos I-IV). A coenzima NADH é oxidada pelo complexo I (NADH: ubiquinona oxidorreductase), responsável por doar elétrons a um carreador lipofílico de elétrons, a ubiquinona (Q). O complexo II (succinato desidrogenase) também doa elétrons ao “pool” de Q. A ubiquinona reduzida (QH₂, ubiquinol) é então oxidada pelo complexo III (ubiquinona: citocromo *c* oxidorreductase ou complexo citocromo *bc*₁), que por sua vez reduz uma proteína periférica móvel, o citocromo *c*. Por meio da interação com o complexo IV (citocromo oxidase), os elétrons pertencentes ao citocromo *c* são doados para o oxigênio, acceptor final de elétrons.

Durante esta sequência de transferência de elétrons, prótons (H⁺) são translocados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos I, III e IV, criando assim um **potencial eletroquímico** ($\Delta\mu^+$), formado por dois componentes: a **energia potencial química**, referente à diferença de concentração das espécies H⁺ que estão separadas pela MMI (ΔpH) e o **potencial elétrico** gerado por meio da separação de cargas gerada quando um próton move-se através da membrana sem um contra-íon para acompanhá-lo ($\Delta\psi$). Portanto, a energia liberada pela transferência de elétrons é conservada por meio deste gradiente de prótons (MITCHELL, 1975). Se ADP estiver ligado a FoF₁ – ATP sintetase presente na MMI, prótons passam através deste complexo (muitas vezes denominado complexo V) e a energia criada pela força próton motora é utilizada para a síntese de ATP. O ATP sintetizado é então exportado através da adenina nucleotídeo translocase, que o troca por ADP. Desta maneira, o fluxo de elétrons e o

consumo de oxigênio são regulados pelos níveis celulares de ADP (SOOLE & MENZ, 2004).

Em mitocôndrias de plantas, complexos protéicos adicionais estão associados com a CTE e são distintos dos complexos I-IV, uma vez que participam da transferência de elétrons, porém sem o bombeamento direto de prótons da matriz para o espaço intermembranas. Fazem parte destas enzimas as **NAD(P)H desidrogenases alternativas (internas e externas)**, que doam elétrons ao “pool” de ubiquinona; a **oxidase alternativa (AOX)**, enzima que recebe elétrons do ubiquinol doando-os diretamente para o oxigênio e uma proteína desacopladora, a **PUCP**, que distribui prótons na matriz mitocondrial sem o envolvimento da ATP sintetase. A seguir serão discutidos brevemente alguns aspectos relacionados às proteínas adicionais presentes nas mitocôndrias de plantas superiores. Um esquema ilustrativo da cadeia transportadora de elétrons em plantas pode ser observado na **Fig. 1**.

1.1.2. NAD(P)H desidrogenases alternativas em mitocôndrias de plantas

Como discutido anteriormente, as mitocôndrias de eucariotos possuem uma NADH: ubiquinona oxidoreductase capaz de oxidar NADH proveniente do metabolismo primário, na matriz mitocondrial. Este complexo enzimático é prontamente inibido por rotenona, sendo denominado NADH desidrogenase sensível a rotenona. Estudos realizados com mitocôndrias vegetais demonstraram que estas diferenciam-se das mitocôndrias de mamíferos por serem capazes de oxidar NADH adicionado externamente, sendo insensíveis à inibição por rotenona (HONDA et al., 1957; ARRON e EDWARDS, 1980).

Fig. 1. Organização da cadeia transportadora de elétrons (CTE) na membrana interna das mitocôndrias de plantas. Os elétrons fluem através dos complexos enzimáticos, gerando um potencial eletroquímico que conserva a energia por meio da liberação de prótons (H^+) da matriz para o espaço intermembranas. Os prótons voltam à matriz através da FoF1-ATP sintetase, que sofre alterações conformacionais para sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. Além dos complexos enzimáticos clássicos inerentes das mitocôndrias de todos os eucariotos, em plantas existem ainda enzimas adicionais não bombeadoras de prótons: as NAD(P)H desidrogenases alternativas externas e internas (em verde, à esquerda) que doam seus elétrons diretamente para a molécula lipofílica móvel ubiquinona (UQ), a oxidase alternativa (AOX, em verde, à direita), que recebe os elétrons da UQ e os doa para o oxigênio sem o envolvimento do Complexo III ou IV e a PUCP (UCP), proteína desacopladora que transloca prótons da matriz para o espaço intermembranas sem o envolvimento da FoF1-ATP sintetase. Alguns inibidores específicos de componentes da CTE são rotenona (Complexo I), malonato (Complexo II), antimicina A (Complexo III), KCN (Complexo IV), oligomicina (FoF1-ATP sintetase), ácido salicilhidroxâmico (AOX), flavona (NADH desidrogenase alternativa externa) e GTP (PUCP) (Adaptada de TAIZ e ZEIGER, 2006).

Uma caracterização cuidadosa da oxidação de NADH externo por mitocôndrias isoladas de soja demonstrou que duas NADH desidrogenases estavam presentes fora da barreira da MMI (DOUCE et al., 1973). Uma enzima estava localizada na MME e utilizou especificamente o hidrogênio α do NADH para oxidação, porém não oxidou NADPH. A segunda enzima observada possuía atividade de NADH desidrogenase, sendo esta atividade específica para o hidrogênio 4- β do NADH. Foi proposto que esta segunda atividade era responsável pela oxidação externa de NADH. Os estudos demonstraram ainda que esta enzima possuía uma flavoproteína.

As primeiras observações sobre a oxidação externa de NADH por mitocôndrias isoladas de plantas indicaram que as enzimas possuíam um pH ótimo em torno de 7,0 e tiveram suas atividades inibidas por EDTA, além de fornecer uma razão ADP:O entre 1,2 e 1,4 (WILSON e HANSON, 1969). A razão ADP:O reflete diretamente a quantidade de prótons bombeados e o fluxo eletrônico pela CTE. Assim, razões de ADP:O maiores que 2,0 indicam que elétrons estão penetrando na CTE através do complexo I. Razões na faixa de 1,2 a 1,6 indicam que os elétrons estão entrando na CTE pouco antes do complexo III. Assim, de acordo com os resultados dos estudos mencionados anteriormente, as NADH desidrogenases fornecem elétrons diretamente para a ubiquinona (RASMUSSEN et al., 2004). Posteriormente, foi demonstrado que a atividade das NADH desidrogenases externas eram dependentes de cálcio (MOORE e AKERMAN, 1982).

O consumo de oxigênio dependente de NADPH externo demonstrou várias similaridades com a oxidação externa de NADH. A oxidação de NADPH externo por mitocôndrias isoladas de milho foi estimulada por cálcio, fornecendo razões de ADP:O similares às aquelas fornecidas pela oxidação de NADH externo. Além disso, estudos com inibidores demonstraram que de fato os elétrons provenientes de NADPH externo eram

doados diretamente para a ubiquinona (ARRON e EDWARDS, 1979; 1980). Apesar das aparentes similaridades, a oxidação de NADPH externo difere da oxidação de NADH externo em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata. Nesse modelo, a oxidação de NADH externo ocorreu em ambiente extremamente alcalino, onde a oxidação de NADPH foi mínima. Essa última também foi muito mais sensível à inibição por EDTA, sendo especificamente inibida por reagentes contendo grupamento sulfidril (ARRON e EDWARDS, 1980). Estes resultados forneceram as evidências iniciais de que a oxidação de NADH e NADPH ocorriam por meio de enzimas diferentes. De fato, atualmente sabe-se que existem diversos subtipos de NAD(P)H desidrogenases externas nas mitocôndrias vegetais, expressas de acordo com o estado fisiológico e com o tecido vegetal (RASMUSSEN et al., 2004).

Um outro aspecto particular das mitocôndrias vegetais é que o consumo de oxigênio dependente de substratos relacionados ao NAD (*NAD-linked substrates*), provenientes do ciclo do ácido cítrico, é inibido fracamente por rotenona (IKUMA e BONNER, 1967). A rotenona é conhecida por inibir completamente o complexo I em mitocôndrias de mamíferos e inicialmente não estava claro o porquê deste inibidor não atuar tão eficientemente em mitocôndrias de plantas.

Estudos pioneiros demonstraram que a razão ADP:O em mitocôndrias vegetais atingia valores de aproximadamente 1,5 após adição de rotenona, o que poderia indicar que o bombeamento de prótons através do complexo I havia sido abolido (BRUNTON e PALMER, 1973; DAY et al., 1974; MARX e BRINKMAN, 1978). De fato, por meio da utilização de subpartículas mitocondriais, vesículas mitocondriais invertidas, formadas após ruptura da mitocôndria por sonicação em condições especiais, foi demonstrado que a adição de NAD(P)H ao meio contendo tais subpartículas promoveu

a oxidação dos mesmos, inferindo, assim, a existência de enzimas voltadas para a matriz mitocondrial capazes de oxidar NAD(P)H.

Atualmente acredita-se que as mitocôndrias de plantas possuem duas NAD(P)H desidrogenases internas, não bombeadoras de prótons, em adição ao complexo I. Tal fato é baseado em estudos envolvendo o consumo de oxigênio dependente de NAD(P)H em partículas submitocondriais, que foi caracterizado por meio da utilização de inibidores (rotenona e difenileneiodônio, DPI), estímulo por cálcio, pH e uso de análogos deaminados de NAD(P)H (RASMUSSEN et al., 2004).

Utilizando-se análogos deaminados de NAD(P)H foi demonstrado que apenas o complexo I (que possui maior afinidade por NADH em relação ao NADPH) foi capaz de oxidar os análogos sob determinadas condições, sendo que rotenona suprimiu completamente o consumo de oxigênio nestas condições. Adições subsequentes de NADH e NADPH aminados resultou no retorno do consumo de oxigênio, devido obviamente às atividades das NAD(P)H desidrogenases internas (RASMUSSEN e MØLLER, 1991a; MENZ et al., 1996b). Nestas mesmas condições, o consumo de oxigênio dependente de NADPH foi estimulado por cálcio (RASMUSSEN e MØLLER, 1991a) e inibido por DPI (AGIUS et al., 1998; MELO et al., 1996).

Em contrapartida, o consumo de oxigênio dependente de NADH, sob as mesmas condições, não foi afetado por cálcio ou DPI. Estes experimentos forneceram evidências conclusivas a respeito da existência de duas NAD(P)H desidrogenases internas, uma específica para NADH, outra para oxidação de NADPH (RASMUSSEN et al., 2004).

Embora as NAD(P)H desidrogenases alternativas sejam conhecidas há algum tempo, suas funções fisiológicas ainda são alvo de intenso debate na literatura. As NAD(P)H desidrogenases alternativas doam os elétrons recebidos de NAD(P)H

diretamente à ubiquinona, sendo que não ocorre bombeamento de prótons durante o processo.

Potencialmente, as NAD(P)H desidrogenases externas poderiam regular o estado redox do pool citoplasmático de NADH e NADPH, principalmente em resposta a variações na concentração de cálcio. Este fato poderia então influenciar os fluxos através do metabolismo primário do carbono, a assimilação de nitrogênio, respostas de defesa contra patógenos dependentes de NADPH, vias biossintéticas e estados redox intracelulares (KROMER, 1995; HOEFNAGEL et al., 1998).

A ativação das NAD(P)H desidrogenases alternativas acarreta um fluxo de elétrons para o oxigênio na CTE mitocondrial sem o bombeamento direto de prótons e consequentemente menor produção de ATP. Muitas hipóteses já foram levantadas sobre as funções fisiológicas das NAD(P)H desidrogenases alternativas sob essas condições, tais como envolvimento na termogênese, oxidação do excesso de carboidratos, resistência ao frio e diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (RASMUSSEN et al., 2004). Porém, estudos mais profundos são necessários para atribuir quaisquer destas funções às NAD(P)H desidrogenases alternativas encontradas nas mitocôndrias de plantas.

1.1.3. Oxidase alternativa em mitocôndrias de plantas superiores

A transferência de elétrons na CTE para o aceptor final, o oxigênio, é realizada através do complexo IV (citocromo oxidase) nas mitocôndrias de eucariotos, liberando 4 H⁺ da matriz para o espaço intermembranas. Em mitocôndrias de plantas, porém, uma oxidase terminal é responsável pela captura dos elétrons da ubiquinona, transferindo-os diretamente para o oxigênio sem a participação dos complexos III e IV. Esta enzima é comumente chamada de oxidase alternativa (AOX), sendo que a transferência de

elétrons da AOX para o oxigênio acontece sem a ocorrência do bombeamento de prótons e a energia livre liberada entre a reação do ubiquinol com o oxigênio é dissipada principalmente na forma de calor (VANLERBERGHE e MCINTOSH, 1997).

O consumo de oxigênio referente à oxidação do ubiquinol pela AOX é comumente denominada respiração resistente ao cianeto, o inibidor clássico da citocromo oxidase.

A oxidase alternativa de plantas é uma proteína homodimérica associada à membrana mitocondrial interna e voltada para a matriz (SIEDOW e UMBACH, 2000). Estudos *in vitro* demonstraram que a AOX tem sua atividade aumentada por meio da redução de pontes dissulfeto entre as subunidades monoméricas, fornecendo assim a proteína homodimérica ligada não covalentemente (UMBACH e SIEDOW, 1993; UMBACH et al., 1994).

A enzima no estado reduzido pode ainda ser ativada por α -ceto ácidos, particularmente piruvato, que forma um grupamento tiohemiacetal com o grupamento sulfidril da proteína (JUSZCZUK e RYCHTER, 2003). AOX em plantas superiores é codificada pelo genoma nuclear (ELTHON et al., 1989), por meio de uma pequena família de genes nucleares (subfamílias *AOX1*, *AOX2a* e *AOX2b*), em uma grande variedade de mono e eudicotiledôneas (CONSIDINE et al., 2002).

Embora as funções fisiológicas da AOX não estejam completamente esclarecidas, a expressão gênica da enzima foi verificada em uma série de estados fisiológicos que envolvem tanto a expressão constitutiva da AOX quanto a expressão induzida por estresse. Dentre as condições onde foi verificado aumento da expressão da AOX pode-se destacar infecções patogênicas (SIMONS et al., 1999; MAXWELL et al., 2002), choque térmico, especialmente frio (VANLERBERGHE e MCINTOSH, 1992; PURVIS e SHEWFET, 1993), mudanças na concentração de oxigênio (SZAL et al.,

2003), florescimento (RASKIN et al., 1987), envelhecimento (MAXWELL et al., 2002) e abscisão de frutos (CONSIDINE et al., 2001).

Apesar da observação da expressão da AOX em todas as condições citadas anteriormente, talvez a condição mais bem estudada durante expressão da AOX seja mediante a produção de espécies reativas de oxigênio, onde sua expressão favoreceu a diminuição da geração de ERO (PURVIS e SHEWFET, 1993; MAXWELL et al., 1999; PARSONS et al., 1999; MØLLER, 2001; YIP e VANLERBERGHE, 2001; ROBSON e VANLERBERGHE, 2002).

A grande maioria das observações relacionadas a AOX são provenientes de estudos realizados *in vitro*. Estudos futuros poderão verificar se os mecanismos de regulação da AOX são os mesmos *in vivo*. Plantas transgênicas com níveis de expressão de AOX alterados e estudos detalhados de interações entre organelas tais como cloroplastos e mitocôndria poderão auxiliar para uma melhor compreensão das funções fisiológicas relacionadas a oxidase alternativa de plantas.

1.1.4. Proteínas desacopladoras em mitocôndrias de plantas

As proteínas desacopladoras (UCP, do inglês *uncoupling proteins*), encontradas em mamíferos, dissipam, na forma de calor, o potencial eletroquímico de membrana produzido pela respiração, assim como ocorre com a AOX em plantas. Na presença de ácidos graxos (AG), as UCP facilitam a entrada de prótons novamente para a matriz mitocondrial, sem a participação da ATP-sintetase (NICHOLLS e LOCKE, 1984). A observação de que a taxa de respiração não-fosforilativa encontrada em mitocôndrias de tubérculos de batata, na ausência de albumina soro bovina (BSA), era muito menor após o período de fosforilação do ADP ou após adição de ATP sugeriu que estas

mitocôndrias talvez possuíssem um canal aniônico na membrana interna (IMAC, *inner membrane anion channel*), uma UCP, ou ambos (VERCESI et al., 1995).

Vercesi e colaboradores de fato demonstraram a presença de um canal aniônico nas mitocôndrias de batata, denominado PIMAC (BEAVIS e VERCESI, 1992). Enquanto os pesquisadores estudavam as propriedades do PIMAC, foi verificado que o inchamento de mitocôndrias de batata induzido por nigericina, quando suspensas em meio contendo KCl, foi inibido por BSA. É bem conhecido da literatura que BSA eficientemente complexa ácidos graxos (SPECTOR et al., 1969). As evidências sugeriram que mitocôndrias de tubérculos de batata poderiam ter um protonóforo endógeno, com propriedades similares às UCP1 de mamíferos. Estudos subsequentes demonstraram que um estado totalmente acoplado em mitocôndrias de batata somente poderia ser alcançado com a presença simultânea de nucleotídeos de purina como ATP ou guanosina difosfato (GDP) e ausência de AG (VERCESI et al., 1995). A hipótese de que mitocôndrias de batata possuíam uma UCP foi confirmada por meio do isolamento de uma proteína hidrofóbica de 32 kDa destas mitocôndrias, denominada PUCP (*plant uncoupling mitochondrial protein*) que, quando incorporada a proteolipossomos exibiu propriedades similares as UCP. A prova final de que a PUCP era realmente uma UCP foi obtida após a identificação de genes que codificavam as PUCP em batata e *Arabidopsis* (LALOI et al., 1997; MAIA et al., 1998).

Além da ativação por ácidos graxos, as UCP, assim como a PUCP encontrada em mitocôndrias de batata, são ativadas pelo radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (ECHTAY et al., 2002; CONSIDINE et al., 2003). O mecanismo proposto envolve a ativação da UCP pelo superóxido no lado matricial da membrana mitocondrial interna, onde $O_2^{\cdot-}$ interage com íons ferro provenientes de proteínas contendo centros ferro-enxofre (Fe-S), tal como aconitase (ECHTAY et al., 2002). Os íons de ferro reagem com superóxido para

formação do radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) que, por sua vez, promove a geração de radicais de carbono responsáveis por lipoperoxidação, liberando assim produtos tais como 4-hidroxi-2-*trans*-nonenal. Estes produtos podem então promover a ativação das UCP e da PUCP, cujos mecanismos de ativação, por serem semelhantes, sugerem uma conservação evolucionária dos mecanismos que governam as proteínas desacopladoras (VERCESI et al., 2006).

As funções fisiológicas da PUCP, assim como ocorre com a AOX, ainda são especulativas. Estudos demonstraram que a PUCP pode ser expressa em diversas condições, dependendo da célula, tecido ou órgão, bem como do estado metabólico e/ou fisiológico em que estes se encontram. Evidências sugerem o envolvimento da PUCP na termogênese, no controle das espécies reativas de oxigênio, em respostas ao estresse e no direcionamento apropriado do fluxo energético (VERCESI et al., 2006).

1.2. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Espécies reativas de oxigênio (ERO) é uma expressão comumente utilizada para descrever uma variedade de moléculas e radicais livres (espécies químicas com um elétron desemparelhado), derivados do oxigênio molecular (O_2). O oxigênio molecular em seu estado fundamental é um birradical, ou seja, contém dois elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, porém em orbitais diferentes, estado também conhecido como triplete. Devido a esses dois elétrons possuírem o mesmo spin, o oxigênio molecular pode reagir apenas com um elétron de cada vez, sendo que o elétron a ser recebido necessita estar com spin contrário ao do oxigênio molecular.

Assim, a molécula reagente necessita ter as mesmas características do O_2 e por isso, o O_2 não é uma espécie altamente reativa, visto que raramente as moléculas

possuem a requerida característica eletrônica. Por outro lado, se um dos dois elétrons desemparelhados for excitado e mudar o seu spin, a espécie resultante, conhecida por oxigênio singlete, torna-se um poderoso oxidante, a medida que os dois elétrons com spins opostos podem prontamente reagir com outros pares de elétrons, especialmente com duplas ligações (TURRENS, 2003).

A redução do oxigênio por um elétron de cada vez produz intermediários reativos. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), produto da redução do oxigênio por meio de um elétron, é o precursor da maioria das ERO e mediador das reações em cadeia destas espécies. A dismutação do $O_2^{\cdot-}$, tanto espontânea quanto por meio de reação catalisada pela enzima superóxido dismutase, produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez pode ser completamente reduzido a água ou parcialmente reduzido a radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), um dos mais fortes oxidantes conhecidos na natureza. A formação de $OH^{\cdot}$ é catalisada por metais de transição no estado reduzido (LIOCHEV e FRIDOVICH, 1999). Além disso, $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com outros radicais, incluindo óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) e o produto, peroxinitrito, é um poderoso oxidante (RADI et al., 2002a). Os oxidantes derivados de $NO^{\cdot}$ são conhecidos como espécies reativas de nitrogênio (ERN).

A expressão estresse oxidativo é comumente utilizada para descrever vários processos prejudiciais para as células, sendo resultado de um desequilíbrio entre a excessiva formação de ERO ou ERN e sistemas antioxidantes. Enquanto pequenas flutuações na concentração basal de ERO e/ou ERN podem atuar como sinalizadores intracelulares em diversos processos fisiológicos (MØLLER, 2001; DROGE, 2002), aumentos descontrolados destes oxidantes levam a reações radicalares em cadeia, sendo que os produtos destas reações podem indiscriminadamente reagir com proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (MØLLER et al., 2007).

A formação do primeiro intermediário reativo, $O_2^{\cdot-}$, pode ocorrer quando um elétron é diretamente transferido ao oxigênio molecular por coenzimas ou grupos prostéticos (por exemplo, flavinas ou grupamentos de ferro-enzofre) no estado reduzido ou por xenobióticos previamente reduzidos por certas enzimas (por exemplo, o herbicida paraquat). Nesse contexto, as mitocôndrias e os cloroplastos contêm uma série de centros redox que podem ser responsáveis pelo vazamento de um elétron ao oxigênio molecular, constituindo a fonte primária de $O_2^{\cdot-}$ na maioria dos tecidos.

1.2.1. Sítios de produção de ERO nas mitocôndrias

Devido as mitocôndrias possuírem ambiente altamente reduzido, diversos componentes respiratórios, incluindo flavoproteínas, grupamentos ferro-enzofre (Fe-S) e ubisemiquinona são termodinamicamente capazes de transferir um elétron ao oxigênio. Muitas reações químicas na CTE mitocondrial envolvem a transferência de apenas um elétron, favorecendo assim a redução monovalente do O_2 (TURRENS, 2003). Os locais por onde ERO podem ser geradas são alvo de intenso debate na literatura, embora algumas conclusões gerais possam ser observadas principalmente no que concerne às mitocôndrias de mamíferos.

A formação de superóxido pode ocorrer na membrana mitocondrial externa, na matriz ou em ambos os lados da membrana mitocondrial interna. Enquanto $O_2^{\cdot-}$ produzido na matriz é eliminado neste mesmo compartimento por meio das defesas antioxidantes, o $O_2^{\cdot-}$ produzido no espaço intermembranas pode ser transportado para o citoplasma através de canais aniônicos voltagem-dependente (HAN et al., 2003).

Em mitocôndrias de mamíferos, a contribuição relativa de cada sítio mitocondrial para a produção de $O_2^{\cdot-}$ varia de acordo com o órgão ou tecido onde se encontram as

mitocôndrias, dependendo também se a organela está ativamente respirando (estado 3) ou se a CTE está em seu estado altamente reduzido (estado 4) (BARJA, 1999). Embora o complexo III seja responsável pela maioria do $O_2^{\cdot-}$ produzido em mitocôndrias de coração e pulmões (TURRENS e BOVERIS, 1980; TURRENS et al., 1982), a formação do $O_2^{\cdot-}$ pelo cérebro em situações normais ocorre principalmente pelo complexo I (BARJA e HERRERO, 1998; BARJA, 1999). Recentemente, Tahara e colaboradores realizaram um estudo sistemático da geração de ERO e demonstraram que de fato a produção destas espécies em mitocôndrias de mamíferos é complexa, dependendo de uma série de fatores tais como substrato respiratório, tecido, estado respiratório e potencial eletroquímico (TAHARA et al., 2009).

A taxa da velocidade de formação de $O_2^{\cdot-}$ pela cadeia respiratória é controlada primariamente pela lei da ação das massas, aumentando quando o fluxo eletrônico diminui, aumentando assim a concentração de doadores de elétrons, $R^{\cdot}$, e quando a concentração de oxigênio aumenta, como representado na equação 1 (TURRENS, 2003).

$$d[O_2]/dt = k [O_2] [R^{\cdot}] \quad (1)$$

Um dos fatores responsáveis pelo aumento da taxa de produção de $O_2^{\cdot-}$ é a diminuição do fluxo de elétrons decorrente do baixo potencial eletroquímico adquirido pelas mitocôndrias durante a respiração basal, ou seja, na ausência de ADP (estado 4). Durante o estado 4, com a diminuição do fluxo eletrônico, a cadeia respiratória torna-se mais reduzida, tendo como resultado uma produção maior de $O_2^{\cdot-}$ (BOVERIS et al., 1972). A formação de $O_2^{\cdot-}$ pode ainda ser aumentada na presença de certos inibidores da cadeia respiratória, por exemplo, rotenona, inibidor do complexo I ou antimicina, inibidor do complexo III, que causam uma redução completa dos componentes da CTE

presentes antes do sítio de inibição. Assim, o uso de inibidores é de grande importância para a compreensão dos locais de formação de ERO nas mitocôndrias.

No complexo I, a fonte primária de $O_2^{\cdot-}$ parece ser um dos grupamentos Fe-S (GENOVA et al., 2001; KUSHNAREVA et al., 2002). No complexo III, a maior parte do $O_2^{\cdot-}$ é aparentemente formado como resultado da autooxidação da ubisemiquinona, tanto do lado interno quanto externo da membrana mitocondrial interna (TURRENS, 2003).

Embora a produção de $O_2^{\cdot-}$ aumente a medida que a cadeia respiratória torna-se cada vez mais reduzida, nem todos os inibidores da CTE possuem tal efeito. Na verdade, a maior parte da produção de $O_2^{\cdot-}$ no complexo III é inibido se o fluxo de elétrons entre a proteína Fe-S de Rieske e o oxigênio for bloqueado, por exemplo, com mixotiazol, cianeto ou depleção do citocromo *c* (TURRENS et al., 1985). Este efeito inibitório indica que $O_2^{\cdot-}$ deve ser produzido como resultado da autooxidação da ubisemiquinona ($UQ^{\cdot}$), um intermediário produzido no complexo III durante o ciclo da ubiquinona, denominado também de ciclo Q (TRUMPOWER, 1990). Devido à importância do ciclo Q para a compreensão do mecanismo de formação de $O_2^{\cdot-}$, este será detalhado em uma outra seção, separadamente.

As observações feitas nos parágrafos anteriores referentes à formação de ERO são relacionadas principalmente com as mitocôndrias de mamíferos, onde a maior parte dos estudos foram realizados. Em plantas, poucos estudos sobre os mecanismos de produção de espécies reativas foram realizados até o momento, apesar do conhecimento de que tais espécies sejam fundamentais para diversos processos fisiológicos que ocorrem nos vegetais.

Em plantas, as principais organelas responsáveis pela produção de ERO são os cloroplastos, as mitocôndrias e os peroxissomos (MØLLER, 2001). Os cloroplastos são os responsáveis pela maior produção de ERO em tecidos fotossintetizantes, enquanto as mitocôndrias respondem pela maior parte da produção de espécies reativas nos outros tecidos. Os peroxissomos, como o próprio nome sugere, são responsáveis principalmente pela geração de peróxido de hidrogênio. Apesar destas observações, os mecanismos pelos quais são geradas ERO em plantas não foram elucidados, principalmente porque os estudos sistemáticos de geração de ERO pelas mitocôndrias vegetais são mais complexos se comparados aos realizados com mamíferos, principalmente pela presença, nas mitocôndrias de plantas, das enzimas adicionais da CTE tais como as NAD(P)H desidrogenases alternativas, a AOX e a PUCP, que podem estar relacionadas com a regulação da produção de espécies reativas de oxigênio (MØLLER, 2001).

1.2.2. O Complexo citocromo bc_1 , o ciclo da ubiquinona e a produção de ERO

O Complexo III, ou complexo citocromo bc_1 , como também é conhecido, é encontrado em mitocôndrias de eucariotos e, como já mencionado nos parágrafos anteriores, é responsável pela catálise da transferência de elétrons entre o ubiquinol (QH_2) para o citocromo c com o transporte vetorial de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. A compreensão da estrutura e função do complexo bc_1 foi um grande passo para o estudo da transferência de elétrons que ocorre na CTE mitocondrial, bem como para um melhor entendimento dos mecanismos que levam à formação de espécies reativas de oxigênio nesses complexos.

Este enorme complexo é na verdade um dímero de monômeros idênticos, cada um com 11 subunidades diferentes. A funcionalidade do complexo reside principalmente em três subunidades: o **citocromo *b*** com seus dois grupamentos heme, b_H e b_L , assim denominados de acordo com seus potenciais de redução, alto e baixo potenciais, respectivamente; a **proteína Fe-S de Rieske** (ISP, *iron sulfur protein*), com seus dois centros de ferro-enxofre (2Fe-2S) e **citocromo c_1** , com seu grupamento heme. A estrutura básica do Complexo citocromo bc_1 pode ser observada na **Fig. 2**.

O citocromo c_1 e a ISP projetam-se da MMI para o espaço intermembranas, comumente chamado lado P, positivamente carregado, podendo assim interagir com o citocromo *c*, que não faz parte do complexo bc_1 funcional.

O complexo possui ainda dois sítios distintos para a ligação da ubiquinona, denominados Q_N (lado interno da membrana mitocondrial, próximo à matriz) e Q_P (lado externo da MMI, próximo ao espaço intermembranas), que são os sítios de inibição correspondentes a duas drogas clássicas que bloqueiam a fosforilação oxidativa.

A **antimicina A**, que bloqueia o fluxo de elétrons do heme b_H para a ubiquinona (Q), liga-se a Q_N , bem próximo ao heme b_H no lado N (matriz) da MMI. O **mixotiazol**, que previne o fluxo de elétrons do ubiquinol (QH_2) para a ISP, liga-se a Q_P , próximo ao centro 2Fe-2S da ISP e do grupamento heme b_L , do lado P da MMI. (NELSON e COX, 2005).

Fig. 2. Estrutura do complexo citocromo bc_1 (Complexo III). O complexo funcional é composto por um dímero de monômeros idênticos. A Fig. mostra as 3 subunidades funcionais: citocromo b (verde), com seus dois grupamentos heme (b_H e b_L , vermelho), a proteína ferro-enxofre de Rieske (púrpura), com seus dois centros Fe-S (amarelo/vermelho) e o citocromo c_1 (azul) com seu grupamento heme (vermelho). O complexo possui 2 sítios distintos de ligação para a ubiquinona, Q_N e Q_P (voltados para a matriz e espaço intermembranas, respectivamente), que correspondem também aos sítios de inibição pela antimicina A, que liga-se a Q_N (bloqueando o fluxo de elétrons do heme b_H para Q) e mixotiazol, que liga-se a Q_P (bloqueando o fluxo de elétrons de QH_2 para a proteína Fe-S de Rieske) (Adaptado de NELSON e COX, 2005).

Baseado na estrutura do Complexo III e estudos bioquímicos detalhados das reações redox, um modelo bem aceito foi proposto para explicar a passagem de elétrons e prótons através do complexo, já explicado brevemente na seção 1.1.1. Este modelo ficou conhecido como o **ciclo da ubiquinona (ciclo Q)**. Os três estados redox mais conhecidos da ubiquinona estão mostrados na **Fig. 3**.

Fig. 3. Estados redox da ubiquinona (Q). A ubiquinona é um carreador de elétrons lipofílico que move-se através da membrana mitocondrial interna com a finalidade de doar seus elétrons para enzimas da cadeia respiratória. A ubiquinona (forma oxidada) recebe um elétron (e um próton), tornando-se o intermediário radical ubisemiquinona (Q•). Em condições de homeostase celular, a ubisemiquinona recebe mais um elétron para a formação do ubiquinol (forma completamente reduzida). Em ocasiões especiais, este radical pode doar seu elétron para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas (ERO).

A ubiquinona (Q), também conhecida por coenzima Q, é um carreador lipofílico móvel de elétrons e prótons, presente na MMI, sendo estruturalmente e funcionalmente similar à plastoquinona presente nos tilacóides dos plastídeos. A habilidade da Q em carregar prótons e elétrons e o fato de poder doá-los ou aceitá-los em passos subsequentes torna a ubiquinona uma molécula prontamente utilizável no transporte de elétrons e no bombeamento de prótons (NICHOLLS e FERGUSON, 2002). Para ser reduzida, a ubiquinona necessita receber dois elétrons do Complexo I, do Complexo II,

ou das NAD(P)H desidrogenases alternativas. Durante esse processo de redução dois prótons são retirados da matriz mitocondrial para gerar QH₂ (ubiquinol).

A QH₂ liga-se então a Q_P no complexo *bc*₁, onde pode ocorrer tanto redução quanto oxidação de QH₂. Durante o ciclo, duas moléculas de QH₂ são envolvidas. A primeira molécula, ligada a Q_P, é oxidada a Q, liberando dois elétrons, sendo gerado como intermediário de reação o primeiro radical semiquinona (Q•). Um desses elétrons é doado ao citocromo *c*, enquanto o outro elétron é reciclado através dos citocromos *b* para oxidar uma molécula de Q ligada ao sítio Q_N, formando novamente o radical intermediário (Q•). A segunda molécula de QH₂ é então oxidada em Q_P e a semiquinona em Q_N recebe um segundo elétron, formando novamente QH₂.

Assim, a partir de duas moléculas de QH₂, são formadas uma molécula de Q e uma de QH₂, que pode novamente ser oxidada. Em cada ciclo (para cada elétron passando ao citocromo *c*), dois prótons são retirados da matriz mitocondrial e dois prótons são liberados no espaço intermembranas. Portanto, o ciclo Q promove o bombeamento de um próton extra por elétron transportado, aumentando a conservação de energia. O ciclo Q pode ser visto esquematicamente na **Fig. 4**.

Durante a formação da semiquinona, eventualmente alguns elétrons podem escapar da reação e reagir com o oxigênio diretamente, produzindo O₂•⁻. A antimicina, ligando-se ao citocromo *b*, aumenta a produção da semiquinona formada no sítio Q_P, aumentando assim a produção de O₂•⁻. O mixotiazol (inibidor da proteína Fe-S de Rieske), cianeto (KCN) ou depleção de citocromo *c*, fatores que podem prevenir a transferência de elétrons ao oxigênio, inibem a produção de O₂•⁻ promovida pelo aumento de Q•, uma vez que tal espécie não pode ser formada a menos que um elétron atinja o oxigênio molecular (TURRENS et al., 1985).

Primeira

Segunda

Fig. 4. O Ciclo da Ubiquinona. O Complexo III e a ubiquinona são responsáveis pelo bombeamento de 4 prótons da matriz para o espaço intermembranas. O esquema apresenta também o Complexo II para visualização de um processo mais completo. O ciclo Q se processa em duas etapas (duas moléculas de QH₂ são oxidadas) e os reagentes de cada etapa estão mostrados em azul, os produtos em vermelho e os intermediários em preto. Em cada etapa, 1 elétron é transportado da succinato desidrogenase para o citocromo *c*, com o bombeamento de dois prótons para o espaço intermembranas. No Complexo III, um elétron proveniente de QH₂ é transferido para o citocromo *c* através da proteína Fe-S de Rieske e citocromo *c*₁. O elétron que restou é transferido para o sítio Q_N via citocromo *b* (*b*_H e *b*_L), onde é então doado a Q (etapa 1) ou a semiquinona formada no sítio Q_p (etapa 2), regenerando QH₂ (Adaptado de RASMUSSEN, 2006).

1.2.3. Envolvimento das ERO na morte celular programada em plantas

Em plantas, diversos estudos já demonstraram o envolvimento de espécies reativas de oxigênio na ativação de morte celular, sendo que estas espécies atuam como intermediários nos processos de sinalização que ocorrem durante estresses bióticos e abióticos (VAN BREUSEGEM e DAT, 2006, LAM, 2008). As formas mais comuns de ERO que atuam como sinalizadores são o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. Mais de 150 genes envolvidos no controle da produção de espécies reativas foram identificados em plantas, atuando em diversos compartimentos celulares (MITTLER et al., 2004; GADJEV et al., 2006). Os fenômenos que originam-se da geração de ERO dependem da concentração destas espécies, que por sua vez são dependentes da severidade do estresse observado. Por exemplo, o fenótipo de morte celular por necrose pode ser observado na presença de altas concentrações de H_2O_2 , porém, em baixas doses, o peróxido atua como sinalizador para a morte celular vegetal relacionada à apoptose, AL-PCD, *apoptosis like-programmed cell death* (LAM, 2008).

A resposta de hipersensibilidade (RH) é o sistema mais bem caracterizado envolvendo ERO e morte celular. A RH consiste na morte geneticamente programada (MUR et al., 2007) de células vizinhas ao sítio de infecção por um patógeno, com a finalidade de restringir o invasor neste local, sem que este possa invadir outras partes da planta. Um estresse oxidativo provocado pelo acúmulo de H_2O_2 é rapidamente induzido de maneira bifásica antes da morte celular na RH (LAM, 2004). Os mecanismos pelos quais H_2O_2 é produzido e a natureza bifásica de indução, com rápidos aumentos de H_2O_2 seguidos por uma diminuição progressiva e novo aumento, ainda não foram elucidados, porém acredita-se que proteínas de plantas codificadas por genes homólogos a uma subunidade glicoprotéica de uma NADPH oxidase de membrana de mamíferos

(genes *Rboh*, de *respiratory burst oxidase homolog*), estejam envolvidas (TORRES et al., 2002).

Além disso, alterações na expressão gênica de enzimas capazes de detoxificar ERO, tais como AOX, PUCP, catalase, ascorbato peroxidase, entre outras, estão implicadas na morte celular por RH, regulando-a tanto positiva quanto negativamente, dependendo do nível de expressão. Apesar dos diversos estudos, a elucidação dos mecanismos de ativação de PCD por ERO estão ainda no início. Cerca de 26.000 genes já se mostraram expressos somente em *Arabidopsis* em resposta a sinais gerados por ERO, demonstrando a complexidade da rede de sinalização induzida por estas espécies, bem como a necessidade de estudos mais profundos e em outros modelos experimentais (LAM, 2008).

1.3. Ácido salicílico, espécies reativas de oxigênio e morte celular programada em plantas

O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico sintetizado pelas plantas por meio de reações enzimáticas relacionadas ao metabolismo secundário vegetal. O AS é reconhecidamente um sinalizador para diversos processos fisiológicos desencadeados nas plantas. Em resposta ao ataque de fitopatógenos, por exemplo, o AS acumula-se em grandes concentrações, que chegam a ser 1.000 vezes maior que a concentração basal (ALVAREZ, 2000). Nesse contexto, o AS é responsável tanto pelo desenvolvimento de resposta de hipersensibilidade quanto pela ocorrência de resistência sistêmica adquirida (RSA), um tipo de defesa vegetal que ocorre sistematicamente nas plantas após ataque patogênico, persistindo por algum tempo e protegendo o vegetal contra ataques subsequentes (RYALS et al., 1996).

A inibição do acúmulo de AS nas plantas, realizada por meio da expressão da enzima AS-hidroxilase ou por mutantes de perda-de-função em *NPRI*, um sinalizador essencial que ocorre após acúmulo de AS, mostrou que o AS é fundamental para a ativação de morte celular em alguns mutantes, contribuindo também para a amplificação de sinais ou até mesmo reprimindo a morte celular em outros mutantes (DURRANT e DONG, 2004). Estas observações sugerem que o AS pode atuar tanto antes quanto depois da ativação de morte celular, podendo funcionar como fator de morte ou de sobrevivência das células, dependendo da sua concentração e contexto celular.

Diversos estudos demonstram que o AS e ERO atuam em conjunto para desencadear a ativação de morte celular, uma vez que H_2O_2 aplicado exogenamente estimula a síntese de AS e a produção de ERO, por vezes, depende da síntese de AS (SHIRASU et al., 1997). O AS pode regular negativamente a expressão de enzimas responsáveis pela detoxificação de ERO, aumentando assim a concentração destas espécies, principalmente durante RH ocasionada por infecção patogênica (KLESSIG et al., 2000).

Em alguns casos, o acúmulo de AS pode também diminuir a produção de ERO, com o intuito de conter as lesões causadas pela reação de hipersensibilidade, delimitando o local da morte celular. Os mecanismos que levam à produção de ERO por AS e vice-versa ainda não foram completamente elucidados e um dos fenômenos mais intrigantes envolvendo a ativação de RH é o mecanismo pelo qual o AS pode conter a morte celular durante o processo.

1.4. O papel do cálcio na morte celular programada em plantas

O íon cálcio (Ca^{2+}) é universalmente reconhecido como um mensageiro intracelular que controla uma série de processos fisiológicos em eucariotos. Entretanto, à medida que plantas e animais evoluíram, os sistemas de sinalização envolvendo Ca^{2+} divergiram e tornaram-se cada vez mais complexos. Em plantas, a sinalização por Ca^{2+} está envolvida em muitos aspectos relacionados ao crescimento e desenvolvimento do vegetal, assim como em respostas a estresses bióticos e abióticos (HETHERINGTON e BROWNLEE, 2004).

Níveis elevados de Ca^{2+} foram observados durante PCD relacionada a diferenciação dos elementos de traquearia, senescência das folhas e RH (WATANABE e LAM, 2009). Estudos demonstraram que cloreto de lítio (LiCl_3), um conhecido inibidor do transporte de cálcio, pode bloquear a formação de H_2O_2 e subsequente morte celular em diversos modelos experimentais (LAM, 2004) e diversas proteínas implicadas em morte celular estão de alguma maneira relacionadas ao cálcio (CLOUGH et al., 2000; HUA et al., 2001; TOMSIG e CREUTZ, 2002; YOSHIOKA et al., 2006; ALI et al., 2007; URQUHART et al., 2007).

Em células de animais, os níveis intracelulares de cálcio desempenham papel fundamental durante a apoptose. A concentração de Ca^{2+} estocada no retículo endoplasmático (RE) determina a sensibilidade das células ao estímulo apoptótico (SCORRANO et al., 2003; PITTON e RIZZUTO, 2006).

A translocação de íons cálcio do RE para as mitocôndrias parece ser necessária para a indução de morte celular por apoptose (DEMAUREX e DISTELHORST, 2003), sugerindo a existência de vias de sinalização cruzadas entre o RE e a mitocôndria, para a ativação da morte celular. Estudos recentes sugerem o envolvimento do Ca^{2+} durante

ativação de morte celular em plantas, porém não existe nenhuma evidência satisfatória para o envolvimento do Ca^{2+} , retículo endoplasmático ou mitocôndria nos processos de sinalização que levam à morte celular vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho visou o estudo de alguns mecanismos potencialmente envolvidos na morte celular programada em plantas. A primeira parte do estudo foi centralizada em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus* (amora preta).

2.2. Objetivos específicos

- i) Padronizar o isolamento das mitocôndrias de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*;
- ii) Caracterizar funcionalmente as mitocôndrias isoladas de células de *Rubus fruticosus*;
- iii) Estudar o efeito do ácido salicílico e do cálcio sobre o consumo de oxigênio e o potencial de membrana mitocondrial, bem como sobre a produção de espécies reativas de oxigênio;
- iv) Estudar os sítios de produção de ERO nas mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*;

v) Estudar indicadores de estresse oxidativo mitocondrial: lipoperoxidação e conteúdo de cardiolipina.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo de células de *Rubus fruticosus*

As células de *Rubus fruticosus* foram cultivadas *in vitro*, em meio semi-sólido e mantidas em sala de cultivo, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP). As culturas foram preparadas a partir de calos cedidos pelo Dr. Paul Joseleau do Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), Grenoble, França. As células foram crescidas em meio de Heller (1953) segundo a padronização realizada por Hustache et al. (1975). Esse meio consiste de macroelementos, ou seja, elementos que vão em grande quantidade no meio (cálcio, potássio, magnésio, sódio e fósforo) e microelementos, que vão em pequenas quantidades (alumínio, cobre, boro, manganês, níquel e zinco), ambos na forma de sais (**Tabela 1**), além de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), vitamina B12 (cloridrato de tiamina $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e glucose $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ como fonte de carbono. Utilizou-se como suporte sólido ágar $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Após fundir-se o ágar, o meio foi distribuído em frascos (40 mL/frascos), que foram resfriados para inoculação das células, em capela de fluxo laminar. Os frascos com os inóculos foram mantidos a 25°C , sob fotoperíodo de 12 h, sendo as células repicadas a cada 6 semanas. Para estabelecimento da cultura de células em suspensão, os calos foram transferidos para frascos de 500 mL contendo 250 mL de meio de Heller líquido (ausência de ágar).

Tabela 1. Quantidades de macro e microelementos utilizados para preparação do meio de cultura de *Rubus fruticosus*.

Macroelementos	Quantidade (mg.L ⁻¹)	Microelementos	Quantidade (mg.L ⁻¹)
CaCl ₂	56,52	AlCl ₃ . 6H ₂ O	0,054
KCl	750,00	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,030
MgSO ₄	121,56	H ₃ BO ₃	1,00
NaNO ₃	600,00	KI	0,01
NaH ₂ PO ₄	108,70	MnSO ₄ . H ₂ O	0,075
		NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,03
		ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,00

3.2. Protocolo de isolamento de mitocôndrias de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*

As mitocôndrias de células de *Rubus* foram isoladas por meio de centrifugações diferenciais baseadas em uma técnica de isolamento de mitocôndrias de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (MARIANO et al., 2004), com algumas

modificações. Células na fase exponencial de crescimento (17-21 dias) foram pesadas (aproximadamente 30 g), filtradas e transferidas para um béquer na presença do **meio de extração** gelado contendo sacarose 250 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,6), EGTA 2 mM, cisteína 3 mM e BSA 0,2 g % (100 mL). As células foram então homogeneizadas utilizando-se homogeneizador van Potter-Elvehjem (5 vezes com o pistilo apertado, com repouso de 1 minuto entre um ciclo e outro). O homogenato foi filtrado através de membrana de 100 µm e logo após centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi então centrifugado a 15.000 x g por 10 minutos e o precipitado resultante foi ressuspensão em **meio de isolamento** gelado, composto por sacarose 250 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), EGTA 0,25 mM e BSA 0,2 g %, sendo então centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado pela última vez a 15.000 x g por 10 minutos e o precipitado resultante, contendo a fração mitocondrial, foi ressuspensa em 1 mL do meio de isolamento. O teor de proteína mitocondrial foi determinado pelo método de Lowry (1951).

3.3. Determinação da velocidade de consumo do oxigênio

A velocidade de consumo de O₂ pelas mitocôndrias isoladas de células de *Rubus fruticosus* foi determinada a uma temperatura de 28 °C com eletrodo do tipo Clark, em oxígrafo. O **meio reacional** constituiu-se por sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), MgCl₂ 1 mM, fosfato inorgânico 1 mM (Pi, KH₂PO₄), BSA 0,2 g % e 1 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial. As reações foram realizadas em câmara de 1,8 mL. O meio reacional foi suplementado com diferentes substratos e os desacopladores e inibidores foram adicionados ao meio reacional de acordo com os parâmetros que pretendia-se verificar.

As velocidades respiratórias foram expressas em ng de átomos de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, considerando-se que a solubilidade do oxigênio na água a 28 °C e 1 atm é de 235 μM (ESTABROOK, 1967). A razão do controle respiratório, RCR, foi calculada pelas velocidades de consumo de O_2 no Estado 3, onde há ocorrência de fosforilação do ADP, pelo Estado 4, ou seja, estado de repouso.

3.4. Determinação do potencial eletroquímico de membrana

O potencial eletroquímico de membrana foi acompanhado por meio de alterações no espectro de fluorescência da safranina *O*, utilizando-se os comprimentos de onda de 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão), em fluorímetro Hitachi F-4500. O meio de incubação foi o mesmo utilizado para os ensaios de consumo de oxigênio (meio reacional), suplementado com safranina 5 μM e 1 mg.mL^{-1} de proteína mitocondrial, em um volume final de 2 mL, a 28 °C. A medida do potencial de membrana foi iniciada com succinato 10 mM e rotenona 2 μM . Foi verificado pela medida de potencial a capacidade das mitocôndrias isoladas em fosforilar ADP; para tanto adicionou-se ADP na concentração de 400 nM. Por meio desta técnica também foi possível analisar a presença da proteína desacopladora, PUCP, pela presença ou ausência de seu inibidor no sistema, o nucleotídeo GTP na concentração de 1 μM .

3.5. Imunodeteção da oxidase alternativa (AOX)

A presença da AOX em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus* foi verificada por imunodeteção. A fração protéica mitocondrial foi misturada com tampão SDS contendo Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), glicerol 20 % (v/v), 8 % SDS (m/v), 0,004 % de

azul de bromofenol (m/v) e DTT 100 mM. Essa mistura foi fervida por 5 minutos e as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemli (1970). Após, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foram posteriormente incubadas com anticorpo primário diluído 1:300, anticorpo monoclonal de rato específico para AOX produzido a partir de *Sauromatum guttatum* (ELTHON et al., 1989). Para permitir a detecção, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário diluído 1:1000 (anti-mouse IgG conjugada com HRP), sendo que as proteínas reativas foram visualizadas utilizando-se o kit ECL (Amersham Biosciences).

3.6. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio

3.6.1. Determinação de ERO pela sonda H₂DCFDA

A produção de ERO foi determinada monitorando-se as alterações na fluorescência do composto 2,7-dicloro-di-hidrofluoresceína (H₂DCFDA), segundo o método de McLennan e Esposti (2000). A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro Hitachi F-4500, operando em comprimentos de onda de 503 nm (excitação) e 529 nm (emissão) e abertura de fenda de 5 nm (excitação e emissão).

As mitocôndrias isoladas foram incubadas em meio reacional contendo sacarose 250 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), MgCl₂ 1 mM, KCl 2 mM e 0,05 g% de BSA, suplementado com H₂DCFDA 2 µM e 1 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial, em um volume final de 2 mL. As reações foram iniciadas com a adição de succinato 10 mM, monitorando-se a fluorescência por 10 minutos, a 28 °C. Os controles apropriados foram utilizados, com o intuito de verificar a fluorescência dos inibidores ou efetores utilizados na presença e ausência do H₂DCFDA. Os resultados foram expressos em

unidades arbitrárias de fluorescência (UAF), proporcional à quantidade de ERO formada.

3.6.2. Determinação de H₂O₂ pelo sistema Amplex Red/HRP

Com a finalidade de confirmar os sítios de formação de ERO nas mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*, um segundo método de detecção, específico para H₂O₂, foi empregado. O sistema consiste na utilização da sonda Amplex Red que, uma vez oxidada pelo H₂O₂ em reação catalisada pela enzima peroxidase (HRP, horseradish peroxidase), torna-se fluorescente. Foram utilizados nesse ensaio apenas os inibidores antimicina A, rotenona e mixotiazol, que reconhecidamente não interferem no sistema enzimático nas concentrações utilizadas. Ca²⁺, KCN e AS, por sua vez, não puderam ser utilizados nas concentrações de interesse por atuarem como interferentes.

As mitocôndrias isoladas foram incubadas em meio reacional contendo sacarose 250 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), MgCl₂ 1 mM e KCl 2 mM, suplementado com 1 U/mL de peroxidase (HRP), Amplex Red 50 µM e 1 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial, em um volume final de 2 mL. As reações foram iniciadas com a adição de succinato 10 mM. O Amplex Red é oxidado na presença de HRP extramitocondrial ligada a H₂O₂, formando resorufina, que pode ser detectada espectrofluorimetricamente, por meio de excitação a 563 nm e emissão a 587 nm. A fluorescência foi monitorada durante 10 minutos em espectrofluorímetro Hitachi F-4500 a 28 °C. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF), proporcional à quantidade de H₂O₂ formada.

3.7. Determinação do grau de inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi monitorado pela diminuição da absorbância aparente, em 540 nm, da suspensão de mitocôndrias em meio reacional, utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU-70 (Fullerton, CA, USA). Foram utilizados dois meios reacionais, o meio hipertônico (sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, MgCl₂ 1 mM, Pi 1 mM e BSA 0,2 g %) e um meio hipotônico (KCl 200 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, MgCl₂ 1 mM, Pi 1 mM e BSA 0,2 g %), na presença de 1 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial, em um volume final de 2 mL. Diversos inibidores e/ou efetores do inchamento mitocondrial foram utilizados em concentrações apropriadas. A turbidez apresentada pela suspensão mitocondrial foi monitorada por meio de medida da absorbância aparente, a 28 °C. O inchamento mitocondrial é acompanhado de diminuição na turbidez da suspensão e, portanto, da diminuição proporcional na absorbância.

3.8. Medida das atividades enzimáticas de complexos da cadeia respiratória

3.8. 1. Medida da atividade enzimática do Complexo II

O ensaio para determinação da atividade enzimática da succinato decilubiquinona redutase (Complexo II) foi realizada monitorando-se o decréscimo da absorbância a 600 nm resultante da redução do composto 2,6-dicloro-fenolindofenol (DCPIP) (BARRIENTOS, 2002). Em 1 mL de meio contendo KH₂PO₄ 10 mM (pH 7,8), EDTA 2 mM e BSA 1 mg.mL⁻¹, adicionou-se a suspensão mitocondrial (50 µg de proteína), rotenona 4 µM, ATP 0,2 mM e DCPIP 80 µM como aceptor de elétrons. Após, foi adicionado succinato 10 mM como doador de elétrons e a mistura reacional foi incubada por 10 minutos a 30 °C para ativação completa do Complexo II. A reação enzimática foi iniciada pela adição de decilubiquinona 80 µM, sendo a atividade medida

durante 5 minutos. A adição de malonato 10 mM inibiu a reação enzimática em 95%, servindo como controle negativo. Como a atividade do Complexo II só pode ser determinada mediante a ruptura da membrana mitocondrial interna, as mitocôndrias foram submetidas a ciclos de congelamento/descongelamento (3 vezes) em uma mistura contendo gelo seco e etanol.

3.8.2. Medida da atividade da succinato citocromo *c* redutase

A determinação da atividade da succinato citocromo *c* redutase (ou Complexos II + III) foi realizada monitorando-se o aumento da absorbância a 550 nm resultante da redução do citocromo *c* (BARRIENTOS, 2002). Em 1 mL de meio contendo KH_2PO_4 10 mM (pH 7,8), EDTA 2 mM e BSA 1 mg.mL^{-1} , adicionou-se a suspensão mitocondrial (50 μg de proteína), KCN 240 μM , rotenona 4 μM e ATP 0,2 mM. Após, foi adicionado succinato 10 mM como doador de elétrons e a mistura reacional foi incubada por 10 minutos a 30 °C. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 40 μM de citocromo *c* oxidado, sendo a atividade medida durante 5 minutos. A adição de malonato 10 mM inibiu a oxidação do succinato.

3.9. Avaliação da lipoperoxidação

A determinação da lipoperoxidação foi realizada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, *tiobarbituric acid reactive substances*). A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína. mL^{-1}) foi incubada em meio de reação idêntico ao utilizado para determinação da geração de ERO (sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, MgCl_2 1 mM e BSA 0,05 g %), suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 μM , citrato de sódio 2 mM e quando pertinente, com o composto a

ser testado, Ca^{2+} , em várias concentrações, a 28 °C. O controle negativo foi realizado na ausência de ferro e citrato. Após 30 minutos foi acrescentado 1 mL de ácido tiobarbitúrico 1 g % (preparado em NaOH 50 mM), seguido de 0,1 mL de NaOH 10 M e 0,5 mL de ácido fosfórico 20%. Essa reação foi incubada durante 20 minutos, a 85 °C. O complexo formado de malondialdeído (MDA)-TBA foi extraído com 2 mL de *n*-butanol e a absorbância do complexo, de coloração avermelhada, foi determinada em 535 nm. A concentração de MDA é expressa em nmoles.mg^{-1} de proteína e calculada a partir de uma absorvidade molar, ϵ , de $1,56 \times 10^5 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.10. Determinação de cardiolipina

A determinação de cardiolipina na membrana mitocondrial interna foi realizada por meio do composto fluorescente laranja de 10-*N*-nonil acridina, que altera seu espectro de emissão de fluorescência após a ligação com as moléculas de cardiolipina. Esta ligação é específica e pode ser medida em espectrofluorímetro operando em 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão).

A suspensão mitocondrial (1 mg.mL^{-1}) foi incubada durante 45 minutos em meio reacional, meio idêntico ao utilizado para determinação de ERO, na presença de cálcio, a temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a $5.000 \times g$ por 10 minutos, sendo que o pellet foi ressuspenso em 1 mL do meio reacional. Após, a suspensão mitocondrial foi incubada na presença de 10-*N*-nonil acridina $5 \mu\text{M}$ (dissolvida em etanol: água, 1:1 v/v) por 45 minutos a 30 °C. O excesso de corante foi retirado por lavagem com meio reacional, seguida por centrifugação (2 vezes), sendo o pellet ressuspenso no mesmo meio. Com a finalidade de validar o método para as mitocôndrias de plantas, concentrações crescentes de suspensão mitocondrial foram

submetidas ao mesmo protocolo e a presença de cardiolipina determinada pela observação da mudança do espectro de fluorescência da 10-*N*-nonil acridina.

3.11. Estudos computacionais

Os estudos de interação AS – UQ foram realizados com estudos de bioinformática empregando-se o modelo B3LYP/6-31+G(d,p), sendo que a influência do sistema solvente (pH fisiológico) foi estimada pelo Modelo Contínuo de Polarizabilidade (PCM). Estes estudos foram realizados em parceria com o Dr. Ricardo Vessecchi (FCFRP-USP).

3.12. Análise estatística

Os dados são representativos de repetições utilizando-se diversas preparações mitocondrias distintas. Comparações múltiplas foram realizadas empregando-se ANOVA (one-way), seguidas de pós-teste de Tukey (comparações múltiplas) ou teste de Dunnett (comparações de amostras versus controle). A estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*

O primeiro passo para a caracterização das mitocôndrias isoladas de culturas de células em suspensão de *Rubus fruticosus* consistiu na padronização para o método de isolamento da organela. O protocolo foi baseado em estudos anteriores que empregaram o método da centrifugação diferencial para a obtenção de mitocôndrias de outras culturas de células (MARIANO et al., 2004; 2008; PETRUSSA et al., 2008). As células de *Rubus fruticosus* são não-fotossintetizantes, assim a purificação da suspensão mitocondrial por gradiente de Percoll, normalmente utilizada para isolamento mitocondrial de tecidos vegetais, devido ao alto grau de contaminação por plastídeos, não se fez necessária em nosso protocolo. Foram obtidas mitocôndrias bem acopladas e com capacidade respiratória satisfatória, permitindo a caracterização da organela e a determinação de vários parâmetros mitocondriais, como será descrito a seguir.

Inicialmente, foi determinada a capacidade respiratória das mitocôndrias isoladas na presença de diversos substratos oxidáveis. Assim, o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi determinado, por meio de um oxígrafo acoplado a eletrodo de Clark. Foram utilizados vários substratos: substratos relacionados ao NAD (NAD-linked), NADH, NADPH e um coquetel de glutamato/malato/piruvato, bem como substrato relacionado ao FAD (FAD-linked), succinato. A **Tab. 2** mostra os substratos, as respirações de Estado 3 (presença de ADP) e Estado 4 (ausência de ADP), bem como a razão do controle respiratório, RCR, e seus respectivos desvios padrão. Como podemos observar, a média das RCR para as mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus* ficou em torno de 1,50, sendo que os substratos que promoveram as melhores RCR foram NADH e NADPH exógenos (1,82 e 1,81, respectivamente), oxidados provavelmente pelas

NAD(P)H desidrogenases alternativas externas. A adição de flavona, inibidor da NADH desidrogenase alternativa externa, diminuiu as velocidades de consumo de O_2 dos Estados 3 e 4, bem como da RCR. O Ca^{2+} , por outro lado, aumentou os mesmos parâmetros, sugerindo a afinidade destas enzimas pelo íon. A maior taxa de velocidade de consumo de O_2 no Estado 3 foi obtida quando utilizou-se o coquetel de substratos relacionados ao NAD, composto por glutamato/malato/piruvato (151,6 ng átomos $O \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$), sendo que tais substratos produzem NADH, que poderia estar sendo oxidado tanto pelo Complexo I quanto pelas NADH desidrogenases alternativas internas. O succinato, testado na presença do inibidor do Complexo I, rotenona, forneceu uma taxa respiratória de 68,3 ng átomos $O \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$ no Estado 3, apresentando RCR de 1,34.

A **Fig. 5** mostra um esquema representativo da velocidade de consumo de O_2 pelas mitocôndrias oxidando NADH (**Fig. 5A**) e succinato (**Fig. 5B**). Em ambas as figuras podemos notar o grande aumento da taxa respiratória após adição de ADP, devido à respiração de Estado 3. O aumento da velocidade de consumo do O_2 ocorre também na presença do desacoplador FCCP (**Fig. 5A**), demonstrando o acoplamento das mitocôndrias isoladas. A adição de ácido salicílico-hidroxâmico (SHAM, inibidor da AOX) inibe o consumo de O_2 , evidenciando a presença de oxidase alternativa em mitocôndrias de *Rubus fruticosus*. A presença de SHAM não inibe completamente o consumo de oxigênio, que atinge 100% de inibição somente na presença de cianeto (KCN), inibidor do Complexo IV.

A velocidade de consumo de O_2 no Estado 3 foi determinada também na presença de ácido salicílico (AS) utilizando-se NADH ou succinato como substratos respiratórios (**Fig. 6**). O AS teve efeitos diferentes frente a esses dois substratos. Quando NADH foi utilizado, AS, de maneira dose-dependente (0,5 a 5,0 mM), aumentou a velocidade de

consumo de O₂, quando adicionado à respiração de Estado 4 (**Fig. 6A**). Por outro lado, quando se utilizou succinato como substrato respiratório, o AS (0,5 a 5,0 mM) atuou como inibidor do consumo de O₂, sendo que o efeito foi mais pronunciado quando o composto foi adicionado na respiração de Estado 3 (**Fig. 6B**).

Tabela 2. Efeitos de substratos e inibidores respiratórios na velocidade de consumo de O₂ pelas mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*.

Substratos	Estado 3 ^a	Estado 4 ^a	RCR ^a
NADH	113,30±35,00	61,60±11,50	1,82±0,32
NADH/Flavona	43,30±7,60	38,30±10,40	1,13±0,15
NADH/Ca ²⁺	101,60±7,60	63,30±2,80	1,60±0,15
NADPH	60,00±17,30	33,30±10,40	1,81±0,17
NADPH/Ca ²⁺	98,30±2,80	60,00±8,60	1,65±0,19
Glu/Mal/Pir	151,60±28,80	101,60±37,50	1,57±0,23
Succ/Rot	68,30±10,40	51,60±10,40	1,34±0,15

O meio reacional está descrito em Material e Métodos (seção 3.3). As concentrações utilizadas foram NADH e NADPH 2 mM, flavona 0,5 mM, Succ (succinato), Glu (glutamato) e Pir (piruvato) 5 mM, Ca²⁺ 1 mM e Rot (rotenona) 2 µM.

^a Consumo de O₂ (ng átomos de O.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína) ± desvio padrão

RCR, razão do controle respiratório

Figura 5. Efeitos de substratos/inibidores sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de cultura de células de *Rubus fruticosus*. O meio reacional consistiu de sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), BSA livre de ácidos graxos 0,2 g%, Pi 2 mM, GTP 1 μ M, EGTA 500 μ M, MgCl₂ 1 mM e 1 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial, em uma câmara de reação de volume 1,8 mL a 28 °C. NADH 2 mM, Succinato 5 mM, FCCP 1 μ M, SHAM e KCN 1 mM e ADP 400 nM foram adicionados conforme indicado. **A.** Consumo de O₂ pelas mitocôndrias oxidando NADH. **B.** Consumo de O₂ pelas mitocôndrias oxidando succinato. A velocidade de consumo do O₂ está representado em ng de átomos de O.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, entre parênteses. As figuras são representativas de 5 experimentos independentes.

Figura 6. Efeito do AS sobre a taxa de respiração em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*. O meio de reação utilizado está descrito na legenda da Fig. 5. **A.** Efeito de AS durante a respiração de Estado 4, com NADH 2 mM como substrato respiratório; **B.** Efeito de AS durante a respiração de Estado 3, com succinato 5 mM como substrato respiratório. Em **A**,* refere-se a $p < 0,001$ (Estado 4 versus [AS]). Em **B**,* representa $p < 0,01$ (Estado 3 versus AS 0,5 e 1,0 mM), \$ $p < 0,001$ (Estado 3 versus AS 2,5 e 5,0 mM) e # $p < 0,01$ (AS 0,5 e 1,0 mM versus AS 2,5 e 5,0 mM). A figura é representativa de 5 experimentos independentes e a análise estatística foi realizada pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.2. Potencial eletroquímico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

Para determinação do potencial eletroquímico de membrana foi utilizado o marcador safranina *O*, um corante que é distribuído eletroforéticamente na mitocôndria. Essa distribuição é devida à ligação da safranina a grupos hidrofóbicos carregados negativamente, presentes na membrana mitocondrial interna, após energização da mitocôndria. Quando a organela está oxidando substrato e consequentemente gerando potencial elétrico, ocorre uma mudança no espectro de absorção da safranina. Portanto, a fluorescência do marcador diminui à medida que tal potencial é gerado, devido à distribuição eletroforética do corante à membrana mitocondrial (AKERMAN e WIKSTRÖM, 1976).

A **Fig. 7** mostra o monitoramento da fluorescência (em unidades arbitrárias) decorrente da geração ou dissipação do potencial eletroquímico de membrana. A oxidação de NADH ou succinato pelas mitocôndrias gerou um potencial elétrico, evidenciado pela diminuição da fluorescência da safranina (**Fig. 7A**). A adição do desacoplador FCCP dissipou completamente o potencial de membrana das mitocôndrias energizadas com NADH ou succinato, suportando a evidência do acoplamento das organelas isoladas.

A capacidade fosforilativa das mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus* foi confirmada analisando-se $\Delta\Psi$. A adição de ADP ao meio reacional durante a oxidação de succinato pelas mitocôndrias foi seguida por uma pequena dissipação do $\Delta\Psi$, compatível com a utilização do gradiente eletroquímico de prótons pelas mitocôndrias para dirigir a formação de ATP, através da atividade da ATP sintetase (AKERMAN E WIKSTRÖM, 1976). Esse resultado foi revertido por oligomicina, um inibidor clássico

da ATP sintetase, uma vez que sua adição recuperou o potencial elétrico original (**Fig. 7B**).

As medidas do potencial elétrico de membrana foram realizadas em meio reacional contendo BSA, para garantir um acoplamento satisfatório das organelas em virtude da possível presença da proteína desacopladora (PUCP). De fato, quando retiramos do meio reacional a BSA, o potencial elétrico adquirido pelas mitocôndrias energizadas foi menor, aumentando de maneira crescente logo após a adição de BSA e de um inibidor da PUCP, o GTP (**Fig 7C**). Estes resultados evidenciam a presença de uma PUCP nas mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*.

O potencial elétrico de membrana das mitocôndrias energizadas com succinato foi determinado também na presença de AS ou Ca^{2+} (0,25 - 2,5 mM). Como observado na **Fig. 8**, os dois compostos dissiparam o $\Delta\psi$ de maneira dose-dependente, sendo que o potencial mostrou-se mais sensível ao ácido salicílico (**Fig. 8A**), que na concentração de 2,5 mM dissipou completamente $\Delta\psi$. O Ca^{2+} , por sua vez, também atuou para dissipação do potencial, porém em menor intensidade se comparado ao AS (**Fig. 8B**).

Figura 7. Determinação do potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$). A suspensão mitocondrial (1 mg.mL^{-1}) foi incubada a 28°C em meio reacional (sacarose 250 mM , KCl 2 mM , HEPES-KOH 10 mM ($\text{pH } 7,2$), BSA $0,2 \text{ g } \%$, Pi 2 mM , GTP $1 \text{ }\mu\text{M}$, EGTA $500 \text{ }\mu\text{M}$, MgCl_2 1 mM). **A.** Geração do $\Delta\Psi$ por mitocôndrias energizadas com succinato (5 mM) ou NADH (2 mM). **B.** Monitoramento do $\Delta\Psi$ após adição de ADP 400 nM e oligomicina $2,5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. **C.** Monitoramento do $\Delta\Psi$ em meio reacional sem BSA e GTP e subsequente adição dos mesmos. FCCP $1 \text{ }\mu\text{M}$ foi adicionado conforme indicado. Os valores foram representados em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) e os esquemas são representativos de 5 experimentos independentes.

Figura 8. Efeitos do Ca^{2+} e do AS sobre o potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*. A suspensão mitocondrial ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi incubada a 28°C em meio reacional (sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), BSA 0,2 g %, Pi 2 mM, GTP 1 μM , EGTA 500 μM , MgCl_2 1 mM). A geração do $\Delta\Psi$ foi iniciada pela adição de succinato 5 mM. **A.** Monitoramento do $\Delta\Psi$ após adição de diferentes concentrações de AS. **B.** Monitoramento do $\Delta\Psi$ após adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} . Durante estas medidas, EGTA foi excluído do meio reacional. FCCP 1 μM foi adicionado conforme indicado. Os valores foram representados em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) e os esquemas são representativos de 5 experimentos independentes.

4.3. Expressão da oxidase alternativa (AOX)

A presença da AOX em mitocôndrias de *Rubus fruticosus* foi confirmada por meio de Western blot, utilizando-se anticorpo específico para AOX. Foram utilizadas diferentes concentrações de proteína mitocondrial (50-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo verificada a expressão de uma proteína de aproximadamente 39 kDa (**Fig. 9**). A análise dos resultados demonstrou uma alta expressão da oxidase alternativa (AOX). A massa molecular apresentada pela AOX de mitocôndrias de *Rubus fruticosus* foi similar à de outras oxidases alternativas presentes em plantas (FINNEGAN et al., 2004; SLUSE e JARMUSZKIEWICZ, 2000) e fungos (MAGNANI et al., 2007), correspondendo à proteína em sua forma monomérica, uma vez que DTT (100 mM) estava presente no tampão utilizado para preparação das amostras.

Figura 9. Expressão da AOX em sua forma monomérica em mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*. As frações protéicas em diferentes concentrações foram separadas por SDS-PAGE (em tampão contendo DTT 100 mM) e transferidas para membrana de nitrocelulose que foi posteriormente incubada com anticorpo específico para AOX produzido a partir de *Sauromatum guttatum*. As proteínas reativas foram observadas após incubação das membranas com anticorpo secundário de cabra (anti-rato) conjugado com HRP. A reação foi realizada por meio do kit ECL (Amersham Biosciences) e revelada em filmes Kodak. As concentrações de proteína mitocondrial utilizadas foram: (A) 160, (B) 200, (C) 400 e (D) 500 μg de proteína.

4.4. Grau de Inchamento Mitocondrial

O grau de inchamento mitocondrial foi determinado verificando-se a mudança na absorbância a 540 nm do meio reacional contendo mitocôndrias isoladas. À medida que as mitocôndrias absorvem água do meio devido à abertura de canais presentes nas membranas, a turbidez do meio diminui, bem como a absorbância. Portanto, a diminuição da absorbância é proporcional ao grau de inchamento mitocondrial.

Primeiramente, os ensaios de inchamento mitocondrial foram realizados em meio reacional hiperosmótico, contendo sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), BSA 0,2 g % e $MgCl_2$ 1 mM. Para a indução de inchamento, o meio reacional foi suplementado com diversos indutores, isolados ou em conjunto, tais como Pi (1 a 5 mM), Ca^{2+} (0,25 a 5 mM) e atractilósídeo 0,5 μ M (indutor de inchamento mitocondrial em animais). Como observado na **Fig. 10**, em meio hiperosmótico (**a**) não foi observada nenhuma evidência de inchamento mitocondrial. Assim, um novo meio foi testado para tentar observar algum grau de inchamento nas mitocôndrias de *Rubus fruticosus*. Um novo meio contendo apenas KCl 200 mM e HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2) foi testado na presença dos mesmos indutores relacionados anteriormente. Como demonstrado na **Fig. 10, linha b**, o inchamento mitocondrial provocado na presença de Ca^{2+} 5 mM, Pi 5 mM e atractilósídeo 0,5 μ M pode ser considerado negligível frente aos tratamentos drásticos aplicados. Assim, concluímos que, em nossas condições experimentais, não verificou-se grau de inchamento significativo em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*.

Figura 10. Grau de inchamento das mitocôndrias isoladas da cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*. As mitocôndrias (1 mg.mL^{-1} de proteína) foram incubadas a 28°C em dois meios reacionais diferentes. Em **a**, o meio de reação consistiu de sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), BSA 0,2 g % e MgCl_2 1 mM, sendo suplementado com Pi 5 mM, Ca^{2+} 5 mM, e atractilósídeo $0,5 \mu\text{M}$. Em **b**, o meio reacional foi composto de KCl 200 mM e HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2) e os indutores foram os mesmos utilizados em **a**, inclusive as concentrações. O esquema é representativo de 5 experimentos independentes.

4.5. Geração de ERO

Em plantas, os cloroplastos, peroxissomos e as mitocôndrias são os principais sítios de produção de ERO. Em tecidos não-fotossintetizantes, as mitocôndrias respondem pela maior parte da formação destas espécies. Assim, observamos a capacidade de mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus* em produzir ERO, em organelas energizadas com o succinato. A escolha deste substrato foi baseada nas particularidades encontradas na CTE das mitocôndrias vegetais, tais como a capacidade de oxidar NAD(P)H por meio de diversas enzimas adicionais presentes na cadeia respiratória. Assim, devido à complexidade dos mecanismos potencialmente envolvidos na geração de ERO por meio de substratos relacionados ao NAD, a escolha do succinato (substrato relacionado ao FAD) tornou-se mais atrativa para os propósitos do presente estudo.

Outro fator importante para a detecção de ERO é a escolha do método a ser utilizado. Todos os métodos disponíveis possuem vantagens e desvantagens e a escolha vai depender do que se pretende estudar. Nesse trabalho, dois métodos bem reconhecidos pela comunidade científica foram empregados, um utilizando-se a sonda H₂DCFDA e outro o sistema Amplex Red – HRP. Ambos detectam principalmente a formação de H₂O₂ liberado pelas mitocôndrias (McLENNAN e ESPOSTI, 2000; TAHARA et al., 2009).

Inicialmente, foi observada a capacidade das mitocôndrias isoladas produzirem ERO espontaneamente, fato este que ocorreu em pequenas proporções. Por outro lado, a energização das mitocôndrias com succinato promoveu a geração de ERO de maneira substancial pelos dois métodos empregados, como observado na **Fig. 11**. O próximo passo consistiu no estudo dos efeitos de inibidores clássicos da CTE na produção de

ERO, com o intuito de evidenciar possíveis sítios de geração destas espécies. Foram utilizados os inibidores rotenona (Complexo I), mixotiazol (proteína Fe-S de Rieske, Complexo III), antimicina A (citocromo *b*, complexo III) e KCN (citocromo oxidase, Complexo IV). Os inibidores foram utilizados isoladamente ou em conjunto, de acordo com os propósitos do estudo, sendo que possíveis interferências destes inibidores com as sondas foram testadas antes do início dos experimentos com mitocôndrias. A **Fig. 11** mostra os efeitos dos inibidores na produção de ERO. Os inibidores rotenona e mixotiazol, isoladamente, não exerceram efeito sobre a geração de ERO. Por outro lado, antimicina A ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) promoveu um aumento de cerca de 50% na produção de ERO pelas mitocôndrias energizadas com succinato (**Fig. 11A e 11B**), sendo que os dois métodos empregados para detecção de ERO responderam de maneira proporcional. O inibidor KCN, ao contrário da antimicina, diminuiu a produção de ERO pelas mitocôndrias energizadas com succinato (**Fig. 11A**). Nos estudos com KCN, o sistema de detecção de ERO por Amplex Red – HRP não pôde ser empregado, uma vez que o KCN inibe a peroxidase utilizada nos ensaios.

O estudo dos inibidores utilizados em conjunto (realizados apenas pelo método do DCFDA) mostrou que o mixotiazol e o KCN diminuíram a produção de ERO induzida por antimicina, porém a inibição por mixotiazol não se mostrou estatisticamente significativa (**Fig. 11A**). Rotenona não foi utilizada no estudo por estar envolvida na geração de ERO através do Complexo I, principalmente pelo transporte reverso de elétrons do Complexo II para o Complexo I, hipótese descartada a partir da observação de que rotenona não interferiu na geração de ERO. Estes resultados sugerem fortemente que a produção de ERO nas mitocôndrias de *Rubus fruticosus* pode estar ocorrendo através do Complexo III, principalmente por meio do radical semiquinona.

Os efeitos do Ca^{2+} e do AS na produção de ERO também foram testados, apenas pelo método do DCFDA, uma vez que AS reconhecidamente inibe a peroxidase, utilizada no sistema Amplex/HRP (ALVAREZ, 2000; WATANABE e LAM, 2009). O Ca^{2+} , de maneira dose-dependente (0,25 – 2,0 mM), promoveu um grande aumento na geração de ERO (**Fig. 12A**), enquanto o AS (0,25 – 2,5 mM) mostrou efeito contrário, diminuindo em pequena proporção a produção de ERO em mitocôndrias energizadas com succinato, porém de maneira não significativa estatisticamente, não demonstrando também dose-dependência (**Fig. 12B**). Embora o AS não tenha atuado para diminuição da produção de ERO de maneira significativa quando aplicado isoladamente, assim o fez de maneira significativa quando utilizado na presença de antimicina ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Ca^{2+} (2 mM) (**Fig. 12C**). Estes resultados motivaram a procura por possíveis mecanismos pelos quais o AS atua para inibir a produção de ERO causada por Ca^{2+} e antimicina.

Figura 11. Produção de ERO pelas mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*. As mitocôndrias (1 mg.mL^{-1} de proteína) foram incubadas a 28°C em meio reacional (2 mL) contendo sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM (pH 7,2), BSA 0,05 g % e MgCl_2 1 mM. **A.** Detecção de ERO pela sonda H_2DCFDA ($5 \mu\text{M}$). A inserção mostra a taxa de produção de ERO pelas mitocôndrias. A análise estatística está representada por * ($p < 0,001$ inibidores versus succinato) e por # ($p < 0,001$ AA versus AA/KCN). **B.** Detecção de ERO pelo sistema Amplex Red – HRP. Foram utilizados Amplex Red $50 \mu\text{M}$ e peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) 1 U/mL. A estatística está representada por * ($p < 0,001$ inibidores versus succinato). Em ambos experimentos, as concentrações utilizadas foram: Succ (succinato 5 mM), AA (antimicina A $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Rot (rotenona $2 \mu\text{M}$), Mix (mixotiazol $2 \mu\text{M}$), e KCN 1 mM. Os esquemas são representativos de 10 experimentos independentes.

Figura 12. Efeitos de AS, Ca²⁺ e AA sobre a produção de ERO pelas mitocôndrias de *Rubus fruticosus*. As mitocôndrias (1 mg.mL⁻¹ de proteína) foram incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 11, energizadas com succinato 5 mM e a detecção de ERO realizada por meio da sonda H₂DCFDA. **A.** Efeitos do cálcio (0,25 – 2,0 mM) sobre a produção de ERO. A análise estatística está representada por * (p< 0,001 Ca²⁺ versus succinato) **B.** Efeitos do AS (0,25 – 2,5 mM) na produção de ERO. **C.** Efeitos do AS (2,5 mM) sobre a produção de ERO induzida por Ca²⁺ (2,0 mM) ou AA (2,0 µg.mL⁻¹). A estatística está representada por * (p< 0,001 AA ou Ca²⁺ versus succinato), # (p< 0,001 AA/AS versus AA) e \$ (p< 0,001 Ca²⁺/AS versus Ca²⁺). Os gráficos são representativos de 10 experimentos independentes e as estatísticas correspondem ao teste de comparação múltipla de Tukey.

4.6. Atividade enzimática de complexos da CTE

Como mencionado anteriormente, os resultados de inibição da cadeia respiratória e da produção de ERO (induzida por antimicina e cálcio) pelo AS, bem como do efeito do mesmo na dissipação do potencial elétrico de membrana motivou a investigação de possíveis mecanismos pelos quais o AS poderia estar atuando nas mitocôndrias isoladas. Sabe-se que o AS está possivelmente envolvido na inibição de desidrogenases da cadeia respiratória, principalmente pela interferência no pool de ubiquinona (NORMAN et al., 2004). Assim, foi avaliado inicialmente o efeito de AS sobre o Complexo II das mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*. Como observado na **Fig. 13A**, o AS, utilizado nas concentrações de 0,5 e 2,5 mM, não foi capaz de inibir a atividade do Complexo II, determinada pela ativação da succinato: ubiquinona oxidoredutase. Malonato (10 mM), inibidor clássico do Complexo II, inibiu em 95% a atividade do mesmo.

Além dos efeitos do AS sobre a succinato: ubiquinona oxidoredutase, foram avaliados também seus efeitos sobre a atividade da succinato citocromo *c* redutase (SCCR), enzima responsável pela transferência de elétrons entre o Complexo II, ubiquinona e o citocromo *c*, passando pelo Complexo III. Por tal razão essa atividade é reconhecida como atividade dos Complexos II + III. Como podemos observar na **Fig. 13B**, o AS, na concentração de 2,5 mM, foi capaz de inibir em cerca 40% a atividade da SCCR.

Malonato inibiu em 95% a atividade da enzima. A porcentagem de inibição foi proporcional à inibição pelo AS da produção de ERO induzida por antimicina A e Ca^{2+} , também da ordem de 40%. É preciso ressaltar que um controle, contendo apenas AS e

citocromo *c* oxidado, foi realizado, onde verificou-se que o AS não foi capaz de doar elétrons diretamente para este último.

Figura 13. Atividades enzimáticas de complexos da CTE de mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*. As mitocôndrias (1 mg.mL^{-1} de proteína) foram incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 11, e as atividades foram medidas como descrito em Material e Métodos (seção 3.7). **A.** Efeito do AS sobre a atividade da succinato: ubiquinona oxidoredutase, determinada pelo decréscimo da $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ resultante da redução do DCPIP. **B.** Efeito do AS sobre a atividade da succinato citocromo *c* redutase, determinada pelo aumento da $\text{Abs}_{550\text{nm}}$ resultante da redução do citocromo *c* (oxidado) adicionado exogenamente. Em ambos os casos, malonato (10 mM) foi utilizado como controle negativo da reação. A atividade está representada pela relação entre a $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ do controle positivo, considerando-se, nesse caso, $R=1.0$, pela $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ das amostras avaliadas, no tempo final de reação (5 minutos). A análise estatística, representativa de 5 experimentos independentes (* $p < 0,001$) foi realizada pelo teste de Dunnett.

4.7. Estudos computacionais de interação de AS e UQ

De acordo com nossos resultados, o AS inibe a cadeia respiratória, dissipa o potencial elétrico de membrana e diminui a produção de ERO induzida por antimicina e Ca^{2+} . Os resultados em conjunto sugerem os efeitos de AS devido a uma possível interação deste composto com a UQ. Nesse contexto, optamos por estudar a propriedade redox dos dois compostos, bem como verificar a influência da acidez do ácido salicílico em nosso modelo experimental. Assim, em parceria com o Dr. Ricardo Vessecchi (FCFRP-USP), foram empregados modelos computacionais para o estudo das afinidades eletrônicas de AS e UQ, bem como para a investigação da possibilidade de transferência de prótons do AS para a UQ.

A afinidade eletrônica (AE) pode ser computada como sendo a energia liberada pela associação de um elétron a uma molécula neutra. Essa grandeza termoquímica reflete a estabilidade do ânion formado e por sua vez, indica a facilidade de uma molécula orgânica sofrer redução. Com intuito de se compreender a reatividade do ácido salicílico e da ubiquinona frente à redução, as energias de ionização para a ubiquinona e para o AS foram obtidas, empregando-se o modelo computacional B3LYP/6-31+G(d,p), sendo a influência do sistema solvente (pH fisiológico) estimada pelo Modelo Contínuo de Polarizabilidade (PCM).

Inicialmente foram propostas duas reações de redução, envolvendo UQ e AS, sendo obtidos também os valores de afinidade eletrônica (AE) do AS e da UQ (**Fig. 14A**). Para os cálculos de energia, levou-se em consideração que 1 eV equivale a aproximadamente $23,05 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Pelos dados correspondentes às afinidades eletrônicas, a energia liberada na redução da UQ é de $47,48 \text{ kcal.mol}^{-1}$, enquanto que

para o AS é de $7,60 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Assim, a UQ se reduz mais facilmente que o AS, que possivelmente não está interferindo na transferência de elétrons para a UQ diretamente.

Desse modo, algum outro mecanismo químico estaria ocorrendo entre o AS e a UQ para que o AS fosse capaz, de alguma forma, de inativar a ubiquinona ou seus intermediários. Um dos mecanismos possíveis seria a protonação, pelo AS, do radical semiquinona. De fato, os dados obtidos mostraram que a protonação do radical semiquinona pelo AS pode ocorrer de maneira espontânea ($\Delta H_{298} = -17,23 \text{ kcal.mol}^{-1}$), sendo indício de que o ácido salicílico pode transferir seu hidrogênio ácido para o radical. Um esquema mostrando as reações químicas envolvendo AS e UQ está representado na **Fig. 14**.

Figura 14. Estudos computacionais para interação de AS e UQ. Os modelos foram obtidos empregando-se o modelo computacional B3LYP/6-31+G(d,p), sendo a influência do sistema solvente (pH fisiológico) estimada pelo Modelo do Contínuo de Polarizabilidade (PCM). **A.** Reações de redução da ubiquinona (UQ, **a**) e do ácido salicílico (AS, **b**) e respectivos valores de afinidade eletrônica (AE, em eV). A liberação de energia para as reações são de $47,48 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (**a**) e $7,60 \text{ kcal.mol}^{-1}$, considerando-se que 1 eV equivale a $23,05 \text{ kcal.mol}^{-1}$. **B.** Esquema de reação de transferência do hidrogênio ácido do AS para o radical semiquinona e o respectivo valor para variação de entalpia (ΔH , em kcal.mol^{-1}) desta reação.

4.8. Lipoperoxidação e conteúdo de cardiolipina nas mitocôndrias de *Rubus fruticosus*

Um dos marcadores biológicos que reflete a quantidade de ERO formada pelas mitocôndrias é a lipoperoxidação. A abundância de fosfolipídeos na membrana mitocondrial interna faz destas estruturas alvos fáceis das espécies reativas de oxigênio (de ZWART et al., 1999).

A cardiolipina é um dos fosfolipídeos mais abundantes presente na MMI, tendo sua concentração diminuída após reações com ERO (OTT et al., 2007). De acordo com nossos resultados, o íon cálcio foi capaz de promover a geração de ERO em mitocôndrias de *Rubus fruticosus* (**Fig 12A**). Sabe-se que o Ca^{2+} pode interagir com a cardiolipina na MMI, aumentando assim a produção de ERO que, por sua vez, podem reagir com outros lipídeos na membrana, promovendo lipoperoxidação (GRIJALBA et al., 1999). Assim, investigamos se a produção de ERO induzida por Ca^{2+} estava relacionada a estes dois parâmetros, a peroxidação lipídica e o conteúdo de cardiolipina.

O método utilizado para determinação da lipoperoxidação foi o TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Como observado na **Fig. 15**, o Ca^{2+} , nas mesmas concentrações necessárias para aumento da produção de ERO (0,5 – 2,0 mM) não alterou significativamente a lipoperoxidação, quando comparado ao controle positivo (Fe-citrato).

Para a determinação do conteúdo de cardiolipina, foi utilizado o corante fluorescente específico para o fosfolipídeo, o laranja de 10-*N*-nonil acridina (NAO) (PETIT et al., 1992). Primeiramente, o método foi validado para a nossa preparação mitocondrial. Alíquotas da suspensão mitocondrial, em diferentes concentrações (em mg.mL^{-1} de proteína mitocondrial) foram submetidas à reação com o corante, obtendo-

se assim os espectros de fluorescência resultante da ligação do NAO com a cardiolipina (**Fig. 16A**). O corante isolado possui espectro de fluorescência em torno de 530 nm, porém após interação com a cardiolipina desloca seu espectro para cerca de 500 nm. Os espectros de absorção e emissão de fluorescência do NAO variam de acordo com a concentração e solvente utilizado para preparação do corante (FERNANDEZ et al., 2004; KAEWSUYA et al., 2007).

Após a validação, as mitocôndrias foram tratadas com Ca^{2+} (até 2 mM) por 45 minutos e submetidas ao tratamento com NAO. Como demonstrado na **Fig. 16B**, o tratamento com Ca^{2+} não alterou significativamente o conteúdo de cardiolipina nas mitocôndrias de *Rubus fruticosus*. Os resultados sugerem que a quantidade de ERO gerada por meio do tratamento com Ca^{2+} não foi suficiente para causar lipoperoxidação ou alteração do conteúdo de cardiolipina, provavelmente devido aos mecanismos antioxidantes presentes nas mitocôndrias.

Figura 15. Lipoperoxidação em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*. A suspensão mitocondrial (1 mg.mL⁻¹) foi incubada a 28 °C em meio reacional contendo sacarose 250 mM, KCl 2 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, MgCl₂ 1 mM e BSA 0,2 g %, suplementado com (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ 50 μM e citrato de sódio 2 mM. O procedimento para determinação da lipoperoxidação, TBARS, está descrito em Material e Métodos (seção 3.9). O controle representa a lipoperoxidação induzida nas mitocôndrias sem tratamento pelo Ca²⁺ e o controle negativo foi realizado na ausência de ferro e citrato. A lipoperoxidação foi expressa em nmol.mL⁻¹mg⁻¹ de proteína, calculada a partir do produto de reação formado, o MDA (Abs_{535nm}, ε = 1,56 x 10⁵. mol⁻¹. L⁻¹.cm⁻¹). A figura representa 5 experimentos independentes.

Figura 16. Determinação do conteúdo de cardiolipina em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*. A suspensão mitocondrial (1 mg.mL^{-1}) foi incubada a 28°C em meio reacional contendo sacarose 250 mM , KCl 2 mM , HEPES-KOH 10 mM , $\text{pH } 7,2$, MgCl_2 1 mM e BSA $0,2 \text{ g \%}$. Após os tratamentos, o meio foi suplementado com NAO $5 \mu\text{M}$ e as leituras foram realizadas em espectrofluorímetro operando em 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão). **A.** Espectros de fluorescência do NAO determinados a partir da interação NAO – cardiolipina em concentrações crescentes de proteína mitocondrial ($0,2 - 1 \text{ mg.mL}^{-1}$). A inserção mostra a linearidade entre a fluorescência do NAO (UAF) e a concentração de proteína mitocondrial. **B.** Conteúdo de cardiolipina, determinado a partir da interação NAO – cardiolipina, em mitocôndrias na ausência (controle) ou na presença de Ca^{2+} . A inserção mostra os espectros de fluorescência do NAO nas amostras sob as mesmas condições. As figuras representam 5 experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

As mitocôndrias são organelas essenciais presentes nas células de todos os eucariotos, com a função básica de gerar energia para o funcionamento destas células. Atualmente sabe-se que as mitocôndrias, além da função bioenergética, participam de outros processos fisiológicos vitais para os organismos, tal como a morte celular programada (PCD). Em plantas, o envolvimento das mitocôndrias na PCD ainda é objeto de especulação e as evidências para a participação destas organelas ainda é indireta (WATANABE e LAM, 2009). Por exemplo, muitos estudos indicaram que células vegetais em processo de morte celular liberam citocromo *c* para o citosol, além da ocorrência de dissipação do potencial de membrana, geração de espécies reativas de oxigênio e alterações morfológicas típicas de PCD (XIE e CHEN, 2000; LAM et al., 2001; TIWARI et al., 2002; KRAUSE e DURNER, 2004; LAM, 2004; GARCÍA-HEREDIA, 2008, WATANABE e LAM, 2009).

Em animais, esses fenômenos estão intimamente ligados à apoptose que, dentre os possíveis mecanismos de ativação, possui um deles relacionado à dissipação do potencial de membrana mitocondrial, subsequente liberação de citocromo *c* para o citosol e formação do apoptossoma, complexo de proteínas responsável pela ativação das caspases, proteínas efetoras de morte celular, culminando com alterações morfológicas, inchamento celular e degradação do DNA (GREEN, 2000).

Em plantas, os mecanismos que levam à morte celular ainda estão longe de serem elucidados, uma vez que no genoma vegetal não foram encontrados genes homólogos aos das caspases animais, as proteínas efetoras de PCD neste sistema. Contudo, proteínas estruturalmente semelhantes às caspases foram identificadas, sendo denominadas metacaspases (UREN et al., 2000). Portanto, é de fundamental importância o estudo de possíveis mecanismos que possam estar envolvidos na ativação

de PCD em plantas. Assim, o presente trabalho procurou investigar alguns destes mecanismos em duas vertentes, uma relacionada principalmente com as mitocôndrias, outra relacionada às metacaspases. No presente capítulo, foram apresentados os resultados obtidos dos estudos com as mitocôndrias, que serão discutidos nos parágrafos subsequentes.

5.1. Caracterização funcional das mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*

Para a compreensão dos mecanismos que levam à morte celular em plantas, faz-se necessária a investigação deste fenômeno por meio de diversos modelos experimentais, a fim de que se chegue nos mecanismos básicos de ativação de PCD no maior número de modelos possível. O presente trabalho teve por objetivos iniciais o isolamento e a caracterização de mitocôndrias obtidas de cultura de células em suspensão de amora preta (*Rubus fruticosus*), células de cultivo fácil e que podem agora se tornar um novo modelo para os estudos de PCD em plantas superiores. Na etapa subsequente, investigamos os possíveis sítios de geração de ERO nas mitocôndrias, uma vez que estas espécies químicas estão envolvidas em diversas formas de morte celular em plantas (LAM, 2004; MITTLER et al., 2004; GADJEV et al., 2006; TORRES et al., 2006; VAN BREUSEGEM e DAT, 2006, LAM, 2008; WATANABE e LAM, 2009). Além do estudo de geração de ERO, investigamos os efeitos do ácido salicílico (AS) e do íon cálcio em mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus*, dois compostos que possivelmente participam da ativação de PCD em plantas (SHIRASU et al., 1997; ALVAREZ, 2000; CLOUGH et al., 2000; KLESSIG et al., 2000; HUA et al., 2001; TOMSIG e CREUTZ, 2002; DURRANT e DONG, 2004; HETHERINGTON e

BROWNLEE, 2004; YOSHIOKA et al., 2006; ALI et al., 2007; URQUHART et al., 2007).

A caracterização das mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus* mostrou que as organelas isoladas encontravam-se bem acopladas e respirando ativamente, na presença de diversos substratos respiratórios (**Tab. 2 e Fig. 5**). A capacidade fosforilativa das mitocôndrias pôde ser verificada por meio da adição de ADP ao meio reacional, que resultou em aumento da velocidade de consumo de O₂ pelas mitocôndrias energizadas (respiração de Estado 3), com subsequente diminuição da velocidade para níveis basais (Estado 4) (**Fig. 5**). Além disso, a fosforilação de ADP pelas mitocôndrias ficou evidente também durante os ensaios de potencial de membrana. A adição de ADP causa uma pequena dissipação do $\Delta\Psi$, compatível com a utilização do gradiente eletroquímico de prótons pelas mitocôndrias para dirigir a formação de ATP, através da atividade da ATP sintetase (AKERMAN e WIKSTRÖM, 1976). Esse resultado foi revertido por oligomicina, um inibidor clássico da ATP sintetase, uma vez que sua adição recuperou o potencial elétrico original (**Fig. 7B**).

A utilização de substratos respiratórios específicos e de inibidores possibilitou a verificação da presença das enzimas adicionais presentes nas mitocôndrias de plantas, tais como as NAD(P)H desidrogenases externas, a oxidase alternativa (AOX) e a proteína desacopladora (PUCP). A presença das NAD(P)H desidrogenases alternativas externas foi evidenciada pelo consumo de oxigênio e pela geração do potencial de membrana após adição de NAD(P)H exógeno ao meio reacional (**Tab. 2, Figs. 5 e 7A**). Além disso, a adição de flavona, inibidor da NADH desidrogenase alternativa (TUDELLA et al., 2003), às mitocôndrias respirando na presença de NADH exógeno diminuiu a velocidade de consumo de O₂, evidenciando ainda mais a presença de uma NADH desidrogenase alternativa externa nas mitocôndrias de amora preta. O íon cálcio,

adicionado juntamente com NAD(P)H exógeno, teve efeito maior durante a oxidação de NADPH, como observado pelo aumento da velocidade de consumo de O₂ por mitocôndrias oxidando NADPH exógeno (**Tab. 2**), indicando maior afinidade da NADPH desidrogenase alternativa externa pelo Ca²⁺ se comparada a NADH desidrogenase alternativa externa, resultados já observados na literatura (RASMUSSEN e MØLLER, 1991a; MØLLER, 2001; RASMUSSEN et al., 2004; RASMUSSEN et al., 2008).

A presença da oxidase alternativa foi confirmada em mitocôndrias de amora preta por meio da utilização do seu inibidor clássico, o ácido salicil-hidroxâmico (SHAM), juntamente com o inibidor do Complexo IV, KCN. A adição de KCN ou SHAM, isoladamente, ao meio reacional contendo mitocôndrias energizadas não inibiu completamente o consumo de O₂, sugerindo a presença da via respiratória insensível ao cianeto. A inibição completa do consumo de O₂ foi verificada pela adição de KCN e SHAM conjuntamente (**Fig. 5**). A confirmação da presença da AOX em mitocôndrias de *Rubus fruticosus* foi observada por meio de imunodeteção utilizando-se anticorpo específico para a oxidase (**Fig. 9**).

A presença da proteína desacopladora, PUCP, foi evidenciada pela medida de potencial elétrico gerado pelas mitocôndrias energizadas em condições experimentais pré-determinadas. As medidas do potencial elétrico de membrana foram realizadas em meio reacional contendo BSA, para garantir um acoplamento satisfatório das organelas em virtude da possível presença da PUCP. De fato, quando retiramos do meio reacional a BSA, o potencial elétrico adquirido pelas mitocôndrias energizadas foi menor, aumentando logo após a adição de BSA e de GTP, inibidor da PUCP (**Fig 7C**), sugerindo a presença da proteína desacopladora em mitocôndrias de amora-preta.

Os resultados sugerem que as mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus* são funcionais, bem acopladas e com eficiência respiratória satisfatória. Além disso, as mitocôndrias energizadas geraram um alto potencial elétrico e apresentaram capacidade fosforilativa. Como as células em suspensão de *Rubus fruticosus* não são fotossintetizantes, não houve problemas de contaminação por plastídeos, o que poderia acarretar dificuldades no momento da caracterização funcional das mitocôndrias. Assim, optamos pela utilização das mitocôndrias isoladas apenas por centrifugação diferencial, sem a necessidade da purificação por gradiente de Percoll. De fato, outros estudos, utilizando mitocôndrias isoladas de cultura de células não fotossintetizantes, apontaram que a purificação por Percoll não se faz necessária para a funcionalidade das organelas (MARIANO et al., 2004; 2008; PETRUSSA et al., 2008).

5.2. Produção de ERO nas mitocôndrias de *Rubus fruticosus*

As mitocôndrias, juntamente com os cloroplastos e peroxissomos, são os principais sítios de produção de ERO em plantas (MØLLER, 2001). Em células não fotossintetizantes, tais como as células de *Rubus fruticosus*, as mitocôndrias tornam-se as principais organelas produtoras de ERO. Um dos objetivos deste estudo consistiu na investigação dos sítios de produção de ERO pelas mitocôndrias de *Rubus fruticosus*.

Como discutido anteriormente (seção 1.2.1), em mitocôndrias de animais os principais locais de geração de ERO são o Complexo I, por meio do transporte reverso de elétrons do Complexo II ao Complexo I e o Complexo III, principalmente pelo radical ubisemiquinona, que pode reduzir monoeletronicamente o oxigênio molecular, gerando $O_2^{\cdot-}$ (MCLENNAN e ESPOSTI, 2000; MØLLER, 2001; TURRENS, 2003; ADAM-VIZI e CHINOPOULOS, 2006; CAPE et al., 2006; TAHARA et al., 2009).

Em mitocôndrias de plantas, poucos estudos foram realizados na área, principalmente devido à complexidade da produção de ERO nesse sistema, que envolve ainda os cloroplastos, peroxissomos e as enzimas adicionais presentes nas mitocôndrias vegetais, como as NAD(P)H desidrogenases alternativas, a AOX e a PUCP, que podem restringir ou mesmo aumentar a geração de ERO, dependendo das condições metabólicas. Com o intuito de investigar a produção de ERO pelas mitocôndrias de amora preta, utilizamos inibidores específicos dos Complexos I (rotenona), III (antimicina A e mixotiazol) e IV (KCN) em mitocôndrias energizadas com succinato, substrato respiratório relacionado ao FAD. A escolha deste substrato foi feita com a finalidade de diminuir os possíveis efeitos das NAD(P)H desidrogenases alternativas, que conferem maior complexidade ao sistema estudado. Além disso, optamos por diminuir a concentração de BSA do meio reacional para os estudos de geração de ERO, porque BSA é um conhecido “quencher” de fluorescência, interferindo no método experimental. Nessas condições, é possível que ocorra uma pequena atividade da PUCP, refletindo o que ocorre em situações onde essa proteína é expressa. Nesse mesmo contexto, optamos por não incluir piruvato (ativador) ou SHAM (inibidor) da AOX no sistema reacional.

Os resultados mostraram claramente que antimicina A provocou aumento significativo da produção de ERO. Em contrapartida, rotenona e mixotiazol não exerceram efeito significativo nesta resposta. Estes resultados foram coerentes nos dois métodos utilizados para detecção (**Fig. 11**). O inibidor do Complexo IV, KCN, diminuiu a produção de ERO basal (mitocôndria energizada com succinato), bem como a produção de ERO induzida por antimicina. Estes resultados sugerem fortemente que a geração de ERO pelas mitocôndrias de *Rubus fruticosus* energizadas com succinato está ocorrendo por meio do Complexo III, provavelmente pela formação do radical

ubisemiquinona ($Q^\bullet$), uma vez que antimicina A bloqueia o fluxo de elétrons do grupamento b_H (sítio Q_N) para a ubiquinona, favorecendo assim o acúmulo de $Q^\bullet$ no sítio Q_P e aumentando a probabilidade da redução monovalente do O_2 . A produção de ERO pelo transporte reverso de elétrons do Complexo II para o I foi descartado pelo uso de rotenona, que nestas condições aumentaria a geração de ERO. Porém, é preciso ressaltar que a produção de ERO pelo Complexo I pode ocorrer também pelo fluxo normal de elétrons, em um sítio localizado antes do sítio de inibição da rotenona, porém, nessas condições, o substrato respiratório precisa necessariamente estar relacionado ao NAD (LAMBERT e BRAND, 2004; TAHARA et al., 2009), o que não é o caso em nosso sistema. Nossos resultados podem ser explicados a partir da observação do ciclo Q. A ubiquinona (Q), completamente reduzida no lado interno (Q_N) da MMI (ubiquinol, QH_2), migra para o lado externo (Q_P) da membrana carregando dois prótons (**Fig. 4**). No lado externo, um elétron da QH_2 é transferido para o citocromo c_1 via proteína Fe-S de Rieske, resultando na formação do intermediário radical, $Q^\bullet$, sendo que os prótons são translocados para o espaço intermembranas. Este intermediário é altamente reativo e pode reduzir o oxigênio molecular em algumas condições especiais, produzindo $O_2^{\bullet-}$.

Em condições normais, $Q^\bullet$ reduz o citocromo b , entretanto a antimicina, ligando-se ao citocromo b , aumenta a concentração de $Q^\bullet$ gerada em Q_P , aumentando a probabilidade de formação de $O_2^{\bullet-}$. Mixotiazol (inibidor da proteína Fe-S de Rieske), cianeto (KCN) ou depleção de citocromo c , ambos por prevenir os elétrons de alcançarem o oxigênio molecular, inibem a produção de $O_2^{\bullet-}$ observada na presença de antimicina (TURRENS et al., 1985), pois previnem a formação do intermediário $Q^\bullet$ em Q_P .

Nossos estudos demonstraram que mixotiazol não interferiu nessa resposta, sugerindo que existam sítios adicionais no Complexo III responsáveis pela formação de ERO, por exemplo o sítio Q_N , onde também pode ser formado o radical $Q^\bullet$, ou mesmo por meio do ubiquinol, que pode sofrer autooxidação para formar o radical intermediário $Q^\bullet$ (TAHARA et al., 2009).

Em conjunto, nossos resultados sugerem fortemente que a geração de ERO em mitocôndrias de *Rubus fruticosus* é realizada pelo complexo citocromo bc_1 (Complexo III), por meio do ciclo redox da ubiquinona. É preciso ressaltar que os mecanismos de produção de ERO pelo Complexo III mencionados anteriormente são verificados para a formação de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), porém nossos métodos experimentais detectam a liberação de H_2O_2 . Por isso, temos medidas apenas qualitativas e indiretas da geração de $O_2^{\bullet-}$ pelas mitocôndrias de amora preta. Além disso, a presença confirmada da AOX e a evidência da presença da PUCP em nosso modelo experimental podem explicar a baixa magnitude da fluorescência observada, e por consequência menor concentração de ERO, se comparada aos modelos animais, uma vez que essas enzimas diminuem a formação de ERO em mitocôndrias vegetais.

5.3. Efeitos do AS e do Ca^{2+} sobre mitocôndrias de *Rubus fruticosus*

O ácido salicílico (AS) e o íon Ca^{2+} já demonstraram ser sinalizadores químicos fundamentais em diversos processos fisiológicos que ocorrem nas plantas (ALVAREZ, 2000; MA e BERKOWITZ, 2007; MUR et al., 2007). Mais do que atuarem isoladamente, AS e Ca^{2+} parecem agir em conjunto, especialmente nas mitocôndrias, em condições de estresse e na morte celular programada associada à resposta de hipersensibilidade (RH) em plantas. Durante este fenômeno, o fluxo de Ca^{2+} aumenta

drasticamente, sendo captado em grande escala pelas mitocôndrias, ocorrendo também o acúmulo de AS que, nessas condições, pode aumentar em até 1000 vezes (MUR et al., 2007). Ambos podem levar à geração de ERO por mecanismos ainda desconhecidos, porém já se sabe que AS é inibidor de enzimas antioxidantes tais como peroxidase e catalase (ALVAREZ et al., 2000).

5.3.1. Ácido Salicílico (AS)

Em mitocôndrias de *Rubus fruticosus*, o AS teve diversos efeitos. O composto foi capaz de inibir ou aumentar a velocidade de consumo de O₂, dependendo do substrato respiratório utilizado, succinato ou NADH, respectivamente (**Fig. 6**). O AS foi, ainda, capaz de dissipar completamente o potencial elétrico de membrana gerado pelas mitocôndrias energizadas com succinato (**Fig. 8A**), bem como inibiu a produção de ERO induzida por antimicina e por Ca²⁺ (**Fig. 12C**). Os efeitos de AS sobre as mitocôndrias nos motivou a busca por possíveis mecanismos pelos quais este composto poderia estar atuando.

Estudos preliminares levantaram a hipótese de que o AS provavelmente inibia a respiração mitocondrial por meio do bloqueio do fluxo de elétrons das desidrogenases para a ubiquinona (NORMAN et al., 2004), porém essa hipótese era apenas especulativa. Nossos resultados mostraram que o AS inibiu a atividade da succinato citocromo *c* redutase (SCCR), complexo que catalisa a transferência de elétrons do succinato para o citocromo *c*. O AS não exerceu efeito sobre a atividade da succinato ubiquinona redutase (**Fig. 13A**) diretamente, mas sim sobre a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo *c* (**Fig. 13B**). Tal inibição pelo AS seguiu perfil semelhante à inibição do consumo de O₂ e da diminuição da produção de ERO

(induzida por antimicina ou Ca^{2+}), sendo a inibição, nos três casos, da ordem de 40% (**Figs. 6B, 12C e 13B**). Nossos resultados reforçam a idéia de que o AS inibe a respiração mitocondrial por meio da interação com os Complexos II e III, por intermédio da ubiquinona.

Baseando-se em estudos computacionais de interação entre AS e ubiquinona, um modelo foi proposto para explicar o mecanismo de ação do AS sobre as mitocôndrias. O ácido salicílico, por ser um ácido fraco, tende a estar desprotonado em pH fisiológico. Assim, no espaço intermembranas, o AS encontra-se na forma desprotonada, porém após energização mitocondrial, com subsequente translocação de prótons, estes são prontamente transferidos ao AS, sendo que temos um possível mecanismo pelo qual ocorre a perda do potencial de membrana na presença do ácido.

Entretanto, com sua natureza apolar, o AS pode penetrar a MMI e interagir com a ubiquinona, mais precisamente com o radical semiquinona, doando seu próton ácido a este intermediário. Esse fenômeno acarretaria então em desativação do radical e consequentemente diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio geradas por meio da semiquinona, como no caso das ERO induzidas por antimicina. Nesse contexto, os estudos computacionais mostraram que o AS possui uma afinidade eletrônica muito baixa frente à ubiquinona e provavelmente não retira elétrons do meio. Assim, seus efeitos seriam devidos à sua acidez. A protonação do radical intermediário ubisemiquinona pelo AS pode ocorrer de maneira energeticamente favorável ($-17,23 \text{ kcal.mol}^{-1}$) e este efeito impediria o fluxo normal de elétrons, o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas (dissipando o $\Delta\psi$) e consequentemente impediria a redução monoelétrica do oxigênio molecular, realizada pelo radical semiquinona para geração de ERO. De fato, é conhecido da literatura que o radical semiquinona encontra-se desprotonado no pH mitocondrial, desestabilizando-se na presença de

oxigênio molecular para formação de $O_2^{\cdot-}$ (BARREIROS et al., 2006). Assim, o mecanismo proposto acima é plausível e compatível com as condições empregadas em nosso modelo experimental.

O efeito do AS em aumentar a velocidade de consumo de O_2 sobre mitocôndrias energizadas com NADH poderia ser proveniente desta característica ácida, uma vez que em pH baixo a atividade da NADH desidrogenase externa pode aumentar (RASMUSSEN et al., 2008), porém esta hipótese é meramente especulativa, necessitando de estudos mais detalhados.

O efeito de AS foi mais pronunciado na geração de ERO induzida por antimicina ou Ca^{2+} , pois a produção basal de ERO pelas mitocôndrias energizadas com succinato foi pequena. A interação entre antimicina e AS sobre mitocôndrias vegetais já foi demonstrada (GILLILAND et al., 2003, NORMAN et al., 2004). Ambos podem aumentar a expressão da AOX e de outros genes relacionados a estresse, porém os mecanismos regulatórios de expressão não são conhecidos. Como a expressão gênica relacionada ao estresse muitas vezes envolve sinalização por ERO, a produção destas espécies deve ser estritamente controlada.

Sabe-se que em algumas condições de estresse, tal como durante morte celular associada à resposta de hipersensibilidade, ocorre um acúmulo de AS nas células, concomitantemente com geração de ERO, de maneira bifásica, representada por rápida e intensa produção, diminuição e novo aumento (ALVAREZ, 2000; MUR et al., 2007). A morte celular por RH deve se restringir ao local de infecção, para limitar o patógeno a essa área e uma das questões mais intrigantes durante tal fenômeno é como acontece a restrição da morte celular. É possível que o AS, acumulando-se em grandes concentrações, possa atingir as mitocôndrias, exercendo os efeitos aqui observados,

diminuindo a produção de ERO e consequentemente restringindo a morte celular. Embora as concentrações utilizadas em nosso estudo sejam aparentemente altas, estas podem ocorrer em diversos modelos experimentais após adição do próprio AS (adição de AS exógeno), como já demonstraram alguns grupos de pesquisa, inclusive o nosso (NORMAN et al., 2004, de SOUZA, 2005).

5.3.2. Efeito do íon cálcio

O Ca^{2+} , quando adicionado às mitocôndrias de *Rubus fruticosus*, atuou na dissipação do potencial de membrana (**Fig. 8B**), porém seu efeito, mesmo em altas concentrações, foi menor que o efeito observado para o AS. O Ca^{2+} poderia dissipar o potencial elétrico de membrana por atuar em canais específicos da MMI, permitindo assim sua abertura e formação de poros de transição de permeabilidade nas mitocôndrias (HE e LEMASTERS, 2002). Em plantas, a formação desses poros já foi demonstrada (PETRUSSA et al., 2001; SAVIANI et al., 2002; TIWARI et al., 2002), porém nossos resultados de inchamento mitocondrial não evidenciaram este fenômeno em mitocôndrias isoladas de células de amora preta (**Fig. 10**). Assim, não poderíamos atribuir os efeitos do cálcio sobre a dissipação do potencial à abertura desses poros, pelo menos sob nossas condições experimentais.

Além disso o Ca^{2+} , de maneira dose dependente, aumentou a geração de ERO pelas mitocôndrias de *Rubus fruticosus* energizadas com succinato (**Fig. 12A**). Um dos possíveis mecanismos pelo qual o Ca^{2+} poderia atuar para aumentar a geração de ERO foi proposto por Grijalba e colaboradores (1999). Os autores mencionam que o Ca^{2+} pode interagir com a cardiolipina, fosfolípídeo presente na membrana mitocondrial interna, desestruturando a MMI e por consequência os complexos nela presentes,

favorecendo assim o vazamento de elétrons, redução incompleta do O₂ e subsequente geração de ERO (GRIJALBA et al., 1999). Esta hipótese foi testada em nosso modelo experimental, porém não observou-se diferenças no conteúdo de cardiolipina nas mitocôndrias de amora preta tratadas com cálcio (**Fig. 16B**).

Além disso, o marcador de estresse oxidativo utilizado em nossos estudos, a lipoperoxidação, também não foi induzido por Ca²⁺ em nossas condições experimentais. Como já mencionado nos parágrafos anteriores, pode ser que a potencial capacidade antioxidante das mitocôndrias isoladas de *Rubus fruticosus* não tenha permitido danos oxidativos às organelas. Aqui, sugerimos que o aumento da produção de ERO em mitocôndrias energizadas com succinato pelo Ca²⁺ seja devido à ativação da succinato desidrogenase e consequente alteração do estado redox da ubiquinona, fenômeno há muito tempo reconhecido na literatura. Por exemplo, Kowaltowski e colaboradores concluíram que a ubiquinona reduzida pelo succinato é a doadora de elétrons para a formação de ERO durante danos oxidativos causados por Ca²⁺ em mitocôndrias de fígado de rato (KOWALTOWSKI et al., 1995). Além disso, estudos preliminares confirmaram que a ação do Ca²⁺ na membrana mitocondrial interna ativa a succinato desidrogenase, regulando reações oxidativas nas mitocôndrias (EZAWA e OGATA, 1979).

Em suma, foram isoladas e caracterizadas mitocôndrias de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus* (amora preta). Nosso modelo experimental mostrou-se robusto para os diversos estudos que podem ser realizados em mitocôndrias isoladas. Dentre estes estudos, verificamos a capacidade das organelas em produzir espécies reativas de oxigênio, bem como o possível sítio mitocondrial por onde estas espécies foram geradas. Além disso, dois sinalizadores químicos, AS e Ca²⁺, foram testados sobre as mitocôndrias de amora preta, sendo que para o primeiro foi proposto um

mecanismo de ação para explicar os efeitos observados. Nossos estudos pretendem contribuir para a compreensão dos fenômenos envolvendo AS e Ca^{2+} , principalmente relacionados à morte celular programada em plantas, onde estes dois compostos, juntamente com as mitocôndrias e as ERO, parecem ter papel fundamental.

CONCLUSÕES

i) As mitocôndrias isoladas de cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus* mostraram-se bem acopladas e respirando ativamente na presença de vários substratos respiratórios. Foi evidenciada nas mitocôndrias a presença da NADH e NADPH desidrogenases alternativas externas, da oxidase alternativa (AOX) e da proteína desacopladora (PUCP). Portanto, nosso modelo experimental mostrou-se viável para estudos mitocondriais

ii) O principal sítio de geração de ERO em mitocôndrias oxidando succinato foi o complexo citocromo bc_1 (Complexo III), evidenciado pelo aumento da produção destas espécies por antimicina e diminuição por KCN.

iii) Em mitocôndrias oxidando succinato, o AS agiu como inibidor do consumo de O_2 , além de dissipar o potencial elétrico de membrana e de diminuir a geração de ERO induzida por antimicina. O AS inibiu, ainda, o fluxo de elétrons da ubiquinona para o citocromo *c*. Um mecanismo foi proposto para explicar a ação do AS sobre as mitocôndrias.

iv) A quantidade de ERO gerada pelas mitocôndrias de *Rubus fruticosus* não foi suficiente para provocar danos oxidativos nas organelas, tais como lipoperoxidação e diminuição do conteúdo de cardiolipina. Este fato pode ser explicado pela presença efetiva de enzimas responsáveis pela diminuição da geração destas espécies, como a AOX e a PUCP.

CAPÍTULO II

Expressão e caracterização de metacaspases de *Arabidopsis thaliana*

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O destino celular é predominantemente determinado pelos processos de divisão, diferenciação e morte. Existem diferentes tipos de morte celular, que são classificados em relação a aspectos fisiológicos e/ou morfológicos. **Apoptose** foi descrita originalmente como o tipo de morte celular caracterizada pelo encolhimento da célula (*shrinking*), condensação da cromatina, fragmentação nuclear e a formação de protuberâncias na membrana plasmática (*blebbing*) (KERR et al., 1972). Durante a apoptose em tecidos animais, a membrana plasmática mantém-se intacta até os estágios finais da morte celular, prevenindo assim uma resposta inflamatória não desejada (KRYSKO et al., 2006).

Um segundo tipo de morte celular é a **autofagia**. Este tipo de morte celular é definida pela vacuolização do citoplasma. Os vacúolos autofágicos possuem duas membranas, contêm organelas não intactas e conteúdo citoplasmático (GOZUACIK e KIMCHI, 2007). A **necrose**, o último tipo de morte celular, é caracterizada por inchamento celular, dilatação das organelas e subsequente ruptura da membrana plasmática (FESTJENS et al., 2006). Assim, as células podem ter vários mecanismos para ativação de morte e as definições usadas anteriormente devem ser usadas com cautela. Recentemente, a Comissão de Nomenclatura em Morte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD*) sugeriu uma forma para distinguir entre os diversos tipos de morte celular (KROEMER et al., 2005). Apenas para citar um exemplo, o termo apoptose deveria ser usado apenas quando fossem observadas modificações específicas na morfologia celular, tais como as descritas anteriormente, durante a morte celular.

A morte celular por apoptose ocorre principalmente através de dois tipos de ativação: caspase-dependente e caspase independente. Como o primeiro caso é o mais importante para os objetivos do presente trabalho, este será detalhado nos parágrafos subsequentes.

As **caspases** pertencem à família das cisteíno-proteases e clivam resíduos de ácido aspártico em seus substratos. Tais proteases utilizam um resíduo de cisteína como nucleófilo catalítico (ALNEMRI et al., 1996). Todas as caspases estudadas até o momento existem na célula como precursores não ativos (zimógenos). Essas proteínas nascentes são originalmente sintetizadas como pró-enzimas cataliticamente inativas, constituídas por três partes principais (um polipeptídeo único com a massa de **32-55 kDa** representando 3 domínios em comum): um grande domínio central interno com **17-21 kDa (p20)** contendo a subunidade catalítica (sítio ativo), um domínio C-terminal pequeno com **10-13 kDa (p10)** e um pró-domínio N-terminal com **3-24 kDa** denominado domínio de morte (*death domain*, DD).

Em um grande número de pró-caspases as subunidades p10 e p20 estão separadas por um pequeno fragmento (*linker*) (CHOWDHURY et al., 2008). Baseados em seus modos de ativação e estrutura, as caspases de mamíferos podem ser subdivididas em 3 tipos: **caspases inflamatórias**, envolvidas na maturação das citocinas e nas respostas inflamatórias, que possuem grandes pró-domínios (DEVEAREUX et al., 1998); **caspases iniciadoras**, com pró-domínios longos contendo os domínios de recrutamento (CARD) ou de morte (DED), envolvidas na ativação da apoptose; **caspases efetoras**, contendo pró-domínios curtos e envolvidas na execução da morte celular por apoptose (DEVEAREUX et al., 1997,1998; ROY et al., 1997; XU et al, 2001; CHOWDHURY et al., 2008).

As pró-caspases inativas são ativadas em resposta a estímulos através do processamento proteolítico seletivo em resíduos de aspartato específicos. Tal processamento gera subunidades que irão formar a protease heterotetramérica ativa para iniciar o processo apoptótico. Essa configuração tetramérica permite um arranjo ideal dos aminoácidos envolvidos no sítio catalítico, promovendo o mecanismo perfeito para a atividade proteolítica (CHOWDHURY et al., 2008).

1.1. Metacaspases

Apesar dos vários estudos descritos anteriormente mostrando a grande evolução do conhecimento sobre os mecanismos de morte celular em animais, até o presente momento, genes para caspases não foram encontrados no genoma vegetal. O genoma de *Arabidopsis* codifica para cerca de 800 proteases, distribuídas entre quase 60 famílias, pertencentes à cerca de 30 clãs (grupos de proteases que pertencem a um ancestral comum) diferentes (banco de dados MEROPS, www.sanger.ac.uk). Devido à sua grande importância, as proteases têm sido alvos de estudos intensos durante anos.

No final do ano 2000, Uren e colaboradores identificaram uma nova classe de proteases semelhantes às caspases, sendo encontradas em plantas, fungos e protozoários. Essas proteases foram denominadas **metacaspases** (UREN et al., 2000). De acordo com sua estrutura, as metacaspases são divididas em 2 subgrupos. Metacaspases do **tipo I** contêm uma extensão N-terminal com um pró-domínio que consiste em “*Zn-finger*” e prolina, característico de proteínas que se ligam ao DNA ou que promovem interações proteína-proteína. Metacaspases do **tipo II** não possuem tal pró-domínio, porém contêm um pequeno espaçamento entre as supostas subunidades p20 e p10 (UREN et al., 2000; VERCAMMEN et al., 2004). Todas as metacaspases

contêm um sítio catalítico conservado de His/Cys, determinante para definir o clã das cisteíno-proteases (**Fig. 1**) (VERCAMMEN et al., 2007).

Figura 1. Representação esquemática das estruturas sugeridas para as metacaspases de *Arabidopsis thaliana*. Os domínios catalíticos consistem de uma subunidade grande (p20, verde) e de uma subunidade menor (p10, azul). O sítio catalítico composto por His/Cys está indicado entre as barras vermelhas. As metacaspases do tipo I possuem um pró-domínio que consiste de Zn e Pro, as metacaspases do tipo II não possuem tal domínio e possuem uma região de espaçamento (*linker*) maior entre as subunidades p20 e p10.

No genoma de *Arabidopsis* são encontrados nove genes correspondentes às metacaspases. Três metacaspases do tipo I (AtMCP1a-1c) e seis metacaspases do tipo II (AtMCP2a-2f). A metacaspase 1c está localizada no cromossomo 4, AtMCP1a e AtMCP2f estão localizadas no cromossomo 5 e as demais metacaspases localizadas no cromossomo 1.

1.1.1. Propriedades catalíticas das metacaspases

As caspases possuem os resíduos de aminoácidos Arg¹⁷⁹, Gln²⁸³ e Arg³⁴¹, numerados de acordo com a caspase-1, responsáveis pela formação de uma cavidade básica (S1) para ligação do resíduo de aspartato (P1-Asp) em seus substratos (FUENTES-PRIOR e SALVESEN, 2004). Quando alinham-se as sequências de aminoácidos das metacaspases com às de caspases, Gln²⁸³ é trocada por um Asp e Arg³⁴¹ por um Glu. A Arg¹⁷⁹ das caspases alinha-se à Leu. Mais próximo à extremidade C-terminal, um resíduo de Asp, altamente conservado entre as metacaspases, alinha-se ao Asp¹⁶³ da proteína bacteriana gingipaína R, sendo que tal resíduo coordena a ligação de P1-Arg nos substratos desta peptidase (EINCHINGER et al., 1999; VERCAMMEN et al., 2007). Todos os resíduos anteriormente mencionados para as metacaspases são posicionados de maneira a criar uma cavidade ácida (S1) acceptora de resíduos básicos tais como **Arg** e **Lys** (VERCAMMEN et al., 2007).

De fato, todas as metacaspases estudadas até o momento clivam seus substratos após um resíduo de Arg ou Lys na posição P1. Dentre as metacaspases que foram estudadas encontram-se a metacaspase de levedura **YCA1** (WATANABE e LAM, 2005), uma metacaspase do tipo II de *Picea abies*, denominada **mcII-Pa** (BOZHKOV et al., 2005) e as metacaspases de *A. thaliana* **1b**, **2b** (WATANABE e LAM, 2005), **2d**, **2f** (VERCAMMEN et al., 2004) e **2e** (HE et al., 2008). Dentre estas metacaspases, apenas AtMCP2f não depende de Ca²⁺ e pH neutro para exercer sua atividade proteolítica, adquirida num pH ótimo de 5,5 (VERCAMMEN et al., 2004). Todas as outras metacaspases descritas anteriormente foram Ca²⁺-dependentes e necessitam de ambiente neutro (pH em torno de 7,4) para ativação.

1.1.2. Propriedades biológicas das metacaspases

As descobertas de que as metacaspases não clivam substratos clássicos de caspases animais e não são inibidas por inibidores de caspases abriram a questão sobre as verdadeiras funções das metacaspases *in vivo*. As análises de sequência e estrutura demonstraram que as metacaspases são proteínas muito distantes em homologia das caspases e a procura pelo envolvimento das metacaspases (MCPs) durante morte celular em plantas está em progresso atualmente. As evidências para o envolvimento das MCPs na morte celular programada em plantas foram sugeridas por algumas razões, tais como: (1) uma possível origem comum com as caspases; (2) a ausência de homólogos próximos das caspases em plantas; (3) a proliferação de genes que codificam para as metacaspases no genoma das plantas como o reflexo da proliferação dos genes codificadores de caspases nos genomas animais (ARAVIND e KOONIN, 2002).

Alguns estudos demonstraram, de fato, evidências para o envolvimento das MCPs durante morte celular programada. Em 2005, Watanabe e Lam demonstraram que duas metacaspases de *Arabidopsis*, **AtMCP1b** e **AtMCP2b** foram capazes de restaurar o fenótipo de morte celular a cepas de leveduras mutantes *ycal1*, que perderam a expressão da metacaspase YCA1, a única metacaspase presente em *Saccharomyces cerevisiae*. Estes resultados sugeriram que poderia existir uma relação evolucionária entre morte celular e a família das metacaspases (WATANABE e LAM, 2005).

Bozhkov e colaboradores, no final de 2005, demonstraram que uma metacaspase do tipo II de *Picea abies* (**mcII-Pa**), translocou-se do citoplasma para o núcleo em células diferenciadas que estavam destinadas à eliminação. Esta proteína se colocou com o poro nuclear e a cromatina, causando a ruptura do envelope nuclear e fragmentação do DNA. Estes resultados sugeriram a mcII-Pa como executora de morte

celular durante a embriogênese vegetal no modelo estudado (BOZHKOV et al., 2005). Tal função da mcII-Pa, referente ao desenvolvimento vegetal, sugere mais uma vez a relação evolucionária entre as caspases animais e as metacaspases, uma vez que algumas caspases de mamíferos também exercem funções referentes ao desenvolvimento celular.

Um potente inibidor da metacaspase 2f (**AtMCP2f**) foi identificado por Vercammen e colaboradores em *Arabidopsis thaliana*. Tal inibidor pertence à classe das serpinas e foi denominado AtSerp1, sendo que o mesmo possuiu uma potente atividade inibitória da AtMCP2f *in vitro*. Tanto AtSerp1 quanto AtMCP2f foram localizados no espaço extracelular (apoplasto), como demonstrado através do isolamento de proteínas do apoplasto de *A. thaliana* superexpressando o inibidor e a metacaspase mencionados anteriormente (VERCAMMEN et al., 2006). Estes resultados sugerem que tal interação poderia estar ocorrendo *in vivo*. Apesar de estudos demonstrarem que serpinas inibem serino - proteases, algumas serpinas puderam inibir também outra classe de proteases, como por exemplo, as cisteíno - proteases caspase-1, caspase-8 e caspase-10 (VERCAMMEN et al., 2006). Além disso, AtMCP2f recombinante foi inibida por leupeptina (95%), assim como AtMCP2d recombinante foi inibida em 82% por PMSF, um inibidor de serino - proteases (VERCAMMEN et al., 2004).

A metacaspase AtMCP2f demonstrou ser regulada por S-nitrosilação (ligação covalente de um grupamento NO à cadeia lateral de tiol de uma cisteína). Tal regulação parece ser a principal forma de modificação pós-traducional dependente de NO, envolvido em diversas funções fisiológicas em plantas (BELENGHI et al., 2007). Apesar dos estudos descritos anteriormente, nenhuma função biológica foi atribuída à metacaspase 2f até o presente momento.

Recentemente, He et al. (2008) demonstraram que uma metacaspase do tipo II de *Arabidopsis thaliana* **AtMCP2e (AtMCP8)** está envolvida na regulação de morte celular programada induzida por estresse oxidativo. Utilizando como modelo experimental plantas e protoplastos de *Arabidopsis* superexpressando AtMCP2e ou linhagens nocauteadas deficientes na produção desta metacaspase, os autores concluíram que a superexpressão acelerou a morte celular, enquanto a supressão do gene retardou a morte celular induzida por estresse oxidativo (UVC, H₂O₂ ou metil viologênio). Este estudo fornece uma forte evidência genética para o envolvimento de uma metacaspase de *A. thaliana* na morte celular programada.

Alguns estudos conduzidos pelo laboratório do Dr. Eric Lam demonstraram que a superexpressão da metacaspase de *A. thaliana* **AtMCP2d** causou uma aceleração da morte celular em folhas de *Arabidopsis* infiltradas com fumonisina B1 (FB1), uma micotoxina que causa reação de hipersensibilidade em plantas. Por outro lado, *Arabidopsis* mutantes que tiveram o gene para AtMCP2d nocauteado (*mcp2d-1*) demonstraram uma diminuição do fenótipo de morte celular induzida nas mesmas condições. Assim, temos evidência de que AtMCP2d pode estar envolvida na sinalização que leva à morte celular induzida por FB1 (WATANABE e LAM, dados não publicados).

O objetivo do presente estudo foi a produção de linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando diferentes metacaspases, tanto em plantas selvagens (WT), quanto em plantas nocaute para o gene AtMCP2d (*mcp2d-1*). Usando tal sistema, poderemos comparar a habilidade de diferentes metacaspases em substituir a função da AtMCP2d durante ativação de morte celular induzida por FB1. Para tal propósito, versões das metacaspases marcadas com o epítipo V₅ e uma cauda de histidina (V₅-His₆) foram construídas em um vetor binário de expressão em plantas contendo o

promotor 35S (vetor EL103). Os vetores foram transformados em plantas *Arabidopsis* ecotipo Col-0 selvagens (WT) ou mutantes (*mcp2d-1*).

Outras análises genéticas realizadas no laboratório do Dr. Eric Lam demonstraram que os efeitos do nocaute nas plantas *mcp2d-1* em relação ao desenvolvimento do vegetal foram dramaticamente acentuados quando outro nocauteamento, desta vez no gene *AtMCP1c* (plantas *mcp1c*), foi realizado na mesma planta. Os mutantes duplos *mcp2d-1/mcp1c* possuem um fenótipo claro em relação ao desenvolvimento das plantas, com folhas e raízes mal formadas.

Entretanto, também verificou-se que a combinação *mcp1b/mcp2d-1* não causou o mesmo fenótipo de morte celular descrito para os mutantes *mcp2d-1/mcp1c*, sugerindo uma especificidade de interação entre as metacaspases, principalmente porque *AtMCP1b* tem uma expressão maior que *AtMCP1c* em todos os tecidos de *Arabidopsis* analisados. Uma possível explicação para tal observação é que *AtMCP1c*, porém não *AtMCP1b*, possua um alvo celular em comum com *AtMCP2d*. Para testar essa possibilidade, foram construídos vetores binários de expressão com os genes para as metacaspases *AtMCP1c* e *AtMCP1b*, marcadas com V₅His₆, sendo que estes foram posteriormente transformados em plantas WT e *mcp2d-1* para verificação do fenótipo.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente estudo foram:

i) Construir os vetores binários para expressão das metacaspases de *Arabidopsis thaliana* **1b, 1c, 2b e 2f** marcadas com o epítipo V₅ e a cauda de hexahistidina (His₆), bem como as respectivas versões mutantes das proteases, com mutações nos respectivos sítios catalíticos.

ii) Realizar a transformação de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Col-0 (WT) e *mcp2d-1*, com *Agrobacterium tumefaciens* contendo os vetores binários de expressão descritos acima.

iii) Selecionar os transformantes utilizando-se marcadores de seleção antibióticos e Western blot.

iv) Verificar o fenótipo das plantas transgênicas e caracterizar a expressão das metacaspases.

v) Construir os vetores de expressão em bactéria contendo os genes de diferentes metacaspases de *Arabidopsis*, bem como suas respectivas versões mutadas no sítio catalítico.

vi) Caracterizar funcionalmente as metacaspases recombinantes em *E. coli*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Construção dos vetores binários de expressão

Foram construídos ao todo 8 vetores para expressão das metacaspases em *Arabidopsis thaliana*. Estes vetores continham os genes para expressão das metacaspases descritas a seguir, bem como suas versões mutadas pontualmente no sítio catalítico: **AtMCP2b** e **2b^m** (C139A) e **AtMCP2f** e **2f^m** (C139A); **AtMCP1b** e **1b^m** (C220A) e **AtMCP1c** e **1c^m** (C256A).

As AtMCPs clonadas continham também cauda de histidina (His₆) e o epítipo V₅ na extensão C-terminal para facilitar as análises de expressão gênica (AtMCP-V₅-His₆). As sequências para expressão (*expressed sequence tags*, ESTs) foram retiradas de bancos genômicos públicos (*Arabidopsis Biological Resource Center*, Ohio State University, OH, USA) e utilizadas como moldes para clonagem.

3.1.1. Clonagem dos genes *AtMCPs 1b, 1b^m, 1c, 2b e 2b^m*

Para a construção dos vetores binários de expressão para as **AtMCPs 1b, 1b^m, 1c, 2b e 2b^m** foram utilizados recursos já existentes no laboratório, ou seja, vetores de expressão em fungos que continham as metacaspases citadas. Os fragmentos de interesse foram subclonados do vetor pYES 2.1/ His-TOPO diretamente no vetor binário de expressão **EL103**, contendo o promotor CaMV35S (*cauliflower mosaic virus* 35S) e um cassete para o gene de resistência à kanamicina (MITLLER et al., 1995). Para a subclonagem, utilizou-se as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I, para clivagem de ambos os vetores, seguido de purificação de gel de agarose dos fragmentos de interesse (QUIAEX II Gel extraction kit, QUIAGEN). Os fragmentos foram ligados diretamente no vetor binário de expressão **EL103** através de reação com DNA ligase T4 (NEB). Para confirmação dos fragmentos ligados foram realizadas digestões com

*Bam*HI e *Xba*I seguidas por eletroforese em gel de agarose para verificação do tamanho do fragmento esperado.

3.1.2. Clonagem dos genes *AtMCPs 1c^m, 2f e 2f^m*

A **Tab. 1** mostra os primers utilizados para amplificação dos genes. A amplificação do gene *AtMCP1c* (*C256A*) foi realizada utilizando-se como molde o plasmídeo pNW 173^m (*AtMCP1c* (*C256A*) / pYES 2.1-V₅-His₆-TOPO), por meio de PCR sucessivas utilizando-se os primers **EL 3372** e **EL3342**. A amplificação do gene *AtMCP2f* foi feita utilizando-se como molde sua sequência codificadora (EST) previamente clonada. A mutagênese, para obtenção do gene *AtMCP2f* (*C139A*), foi realizada por PCR (“*overlapping*” PCR), utilizando-se como molde a sequência obtida anteriormente e os primers **EL3343**, **EL3345**, **EL3346** e **EL3363**. Os produtos de PCR *AtMCP2f* ou *AtMCP2f^m* foram ligados por PCR ao fragmento de histidina/epítipo V₅ (obtidos por amplificação do fragmento do plasmídeo pYES 2.1-V₅-His₆-TOPO, com os primers **EL3341** e **EL3342**), utilizando-se os primers **EL3345** e **EL3342**, para obtenção dos genes marcados *AtMCP2f-V₅His₆* ou *AtMCP2f^m-V₅His₆*.

Após verificação dos produtos de PCR, esses foram clonados no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Os vetores foram transformados em células competentes utilizando-se as bactérias e o protocolo fornecido pelo fabricante. A confirmação dos clones foi realizada após isolamento dos plasmídeos (lise alcalina), digestão destes com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I e verificação dos fragmentos em gel de agarose. A verificação definitiva dos clones foi realizada através da reação de sequenciamento automático (Genewiz, New Jersey, USA).

Após confirmação dos clones de interesse, estes foram subclonados no vetor binário EL103 como descrito anteriormente para as outras metacaspases.

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação dos genes de interesse.

Primer	Sequencia (5' 3')
EL3341	TCTCAACCTAAGGGCGAGCTTCGAGGT
EL3342	CCTTTGAGTGAGCTGATACC
EL3343	ATGA G CTCTGATTCT G CCCATAGTGGTGGTC
EL3345	<u>CACCGGATCCACGATGGATCAACAAGGGATGGT</u>
EL3346	CTCGCCCTTAGGTTGAGAAAGGAACGTCG
EL3363	GACCACCACTATGG G CAGAATCAGAG C TCAT
EL3371	CTCGCCCTTTAAAGAGAAGGGCTTCTC
EL3372	<u>CACCGGATCCACGATGTTGTTGCTGGTGGACC</u>

* Os nucleotídeos em **vermelho** representam as mutações realizadas.

** A sequencia sublinhada representa sequencia para clonagem direcional no vetor pENTR/TOPO.

3.2. Material vegetal e condições de crescimento

A espécie escolhida para nossos estudos foi a planta modelo *Arabidopsis thaliana* do ecotipo Columbia (Col-0). Sementes previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio a 50 % (v/v) e Triton X-10, foram transferidas para placas de Petri contendo meio de Murashige e Skoog (MS), suplementado com sacarose 1 % (m/v) e phytigel (2,5 g.L⁻¹). As amostras foram mantidas no escuro por 2 dias, a 4 °C e posteriormente transferidas para uma câmara de crescimento, onde foram mantidas em

ciclos de 16 horas de luminosidade, sob temperatura de 22 °C. As plantas foram transferidas para o solo após 10 dias de crescimento. Para os ensaios de transformação, esperou-se as inflorescências atingirem cerca de 10 cm de altura.

3.3. Geração das plantas transgênicas

3.3.1. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Os vetores binários de expressão contendo os genes das metacaspases foram introduzidos em cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (linhagem GV3101). Aproximadamente 10 µL de plasmídeo isolado (EL103/AtMCPs) foram inoculados em 100 µL de células competentes de *A. tumefaciens*. As células foram congeladas em nitrogênio líquido por 5 minutos e posteriormente colocadas a 37 °C por 25 minutos. Às células foi adicionado 1 mL de meio LB (10 g de triptona, 10 g de NaCl e 5 g de extrato de levedura por litro de meio), sendo então levadas à estufa (28 °C) por 3 horas. Logo após as células foram centrifugadas a 7.000 x g por 2 minutos e 700 µL de meio foram retirados.

As células foram ressuspensas e colocadas em placas de Petri contendo meio LB suplementado com 50 µg.L⁻¹ de gentamicina, 50 µg.L⁻¹ de kanamicina e ágar 12 g.L⁻¹. As placas foram incubadas a 28 °C por 3 dias, as colônias foram transferidas para meio LB líquido suplementado com a mesma concentração de gentamicina e kanamicina descrita anteriormente e incubadas *overnight* a 28 °C. Após, fez-se um estoque de glicerol para cada alíquota de *A. tumefaciens* transformada com os vetores binários de expressão.

3.3.2. Transformação de plantas selvagens (WT) e mutantes (*mcp2d-1*)

A transformação de *Arabidopsis*, ecotipo Columbia-0, foi realizada através do método da imersão floral, de acordo com Clough e Bent (1998). As bactérias (*A. tumefaciens*, GV3101) foram crescidas até a fase estacionária a 30 °C, 250 rpm, em meio de cultura LB esterilizado suplementado com 50 µg.L⁻¹ de kanamicina e gentamicina. As células foram recuperadas por centrifugação a 5.500 x *g* por 10 minutos, a temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensas em meio de inoculação floral [sacarose 5 g % e surfactante Silwet L-77 0,05 % (v/v)], após atingirem uma D.O._{600nm} 0.8.

Para a imersão floral, o inóculo foi colocado em um béquer contendo o meio de imersão e as plantas a serem transformadas (WT ou mutantes *mcp2d-1*) foram invertidas cuidadosamente na suspensão até submersão de todos os tecidos. As plantas foram removidas do meio após 5 segundos. As amostras foram deixadas 16 horas no escuro, a 24 °C, cobertas com uma bandeja umidificada. As plantas foram descobertas 1 dia após o tratamento e crescidas por mais 5 semanas. As sementes transgênicas (T₁) foram então removidas das inflorescências cuidadosamente, depositadas sobre um pedaço de papel limpo e estocadas a 4 °C.

3.3.3. Seleção dos transformantes com marcador antibiótico

As sementes T₁ foram esterilizadas com 1 mL de hipoclorito de sódio 50 % (v/v) e 10 µL de Triton X-10 por 5 minutos e depois lavadas 3 vezes com água deionizada. Para a seleção dos transformantes, cerca de 3.000 sementes foram suspensas em agarose a 1 % (m/v) esterilizada e semeadas em placas de Petri contendo meio MS suplementado com antibiótico kanamicina (20 µg.L⁻¹), carbenicilina (200 µg.L⁻¹), para

evitar crescimento de *A. tumefaciens* nas placas) e agarose 0,8 % (m/v). As placas foram transferidas para uma câmara fria (4 °C) por 2 dias.

As sementes foram retiradas da câmara fria e colocadas em ambiente controlado a 24 °C, sob 23 horas de luz, sendo crescidas por 7-10 dias. Os transformantes foram verificados através de sua capacidade de resistência à kanamicina, cujas sementes produziram folhas verdes e raízes bem estabelecidas (CLOUGH e BENT, 1998).

As linhagens que demonstraram as características citadas anteriormente foram transferidas para o solo para produção de sementes T₂ (segunda geração). No tempo apropriado, folhas maduras (100 mg) foram recolhidas para análise da expressão das metacaspases. As sementes das linhagens positivas durante imunodeteção foram plaqueadas em meio MS contendo kanamicina (20 µg.L⁻¹) para análise da segregação. As plantas que apresentaram segregação de **3:1** (segregação mendeliana) foram transferidas para o solo para manutenção e/ou geração de sementes T₃.

3.4. Análise da expressão gênica

As folhas maduras, recolhidas das plantas possivelmente expressando o gene de interesse, foram submetidas ao processamento para extração de proteínas. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas mecanicamente com o auxílio de homogeneizador Polytron, em tampão de extração [Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4 % (m/v), glicerol 2 % (v/v), 2-mercaptoetanol 0,1 % (m/v) e *Comassie Brilliant Blue* 10 mg.mL⁻¹].

As amostras foram fervidas e depois centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e a concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976).

As proteínas (10-20 µg) foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE (10 %, v/v). Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (0,45 µm, Immobilon-P, Millipore) através de blotter semi-seco (Bio-Rad). Interações não-específicas na membrana foram bloqueadas com leite livre de ácidos graxos em tampão TBST [Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM e Tween-20 0,1 % (m/v)] durante 1 hora à temperatura ambiente.

As metacaspases, contendo o epítipo V₅, foram imunodetectadas com anticorpo anti-V₅ diluído 1:10000 (v/v), por 1 hora, em tampão TBST. A membrana foi incubada por mais 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado com fosfatase alcalina, sendo a reação realizada com auxílio de kit (BioRad).

Um esquema mostrando todos os passos para a geração das plantas transgênicas está apresentado na **Fig. 2**.

Figura 2. Esquema de geração das plantas transgênicas. *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) selvagem (WT) ou mutante (*mcp2d-1*) são transformadas com *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) contendo o vetor EL103. Após 5 semanas, sementes (primeira geração, T₁) são colhidas e plaqueadas em meio MS com antibióticos. As plantas resistentes são transferidas para o solo e são crescidas por 6-7 semanas até a colheita de sementes T₂ (segunda geração). Durante o crescimento, folhas maduras são processadas para extração de proteínas e Western blot (WB) é realizado para análise de expressão gênica. As sementes das linhagens positivas são plaqueadas em meio MS com antibióticos para análise da segregação.

3.5. Genotipagem das plantas transgênicas

A confirmação da inserção dos genes de interesse nas plantas transgênicas foi determinada através da genotipagem das linhagens que demonstraram ser positivas durante a imunodeteção. Foi realizada também a genotipagem das plantas mutantes (*background*) *mcp2d-1*, para verificação se as plantas utilizadas para a transformação realmente continham o T-DNA responsável pelo nocaute do gene *AtMCP2d*. Para a genotipagem, o DNA genômico de folhas maduras foi extraído em 1 mL de **tampão de extração de DNA** [EDTA 25 mM, Tris-HCl 0,2 M, NaCl 50 mM e SDS 0,5 % (m/v)].

As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas como descrito anteriormente, com ajuda de homogeneizador Polytron. Um igual volume (1 mL) de fenol:clorofórmio:álcool isopropílico (25:24:1) foi adicionado às amostras, que foram então centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos. A fase aquosa foi separada (sobrenadante) e transferida a um novo tubo, onde foi adicionado igual volume (aproximadamente 500 µL) de isopropanol. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores, descartando-se o sobrenadante. Ao precipitado, adicionou-se 1 mL de etanol 70% (v/v), centrifugando-se novamente as amostras nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras contendo o DNA genômico foram ressuspensas em 30 µL de tampão TE + RNase (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 e RNase A 10 µg.mL⁻¹).

O DNA genômico foi amplificado através de PCR utilizando-se primers específicos (**EL1929 e EL 1930**), contendo sequências presentes no vetor binário **EL103**, para confirmação dos transgênicos, ou primers contendo a sequência do locus de inserção do T-DNA das plantas nocaute (**EL1526 e EL1528** ou **EL1617 e**

EL1618). Os produtos da PCR foram confirmados através de eletroforese em gel de agarose.

3.6. Estudo das Proteínas Recombinantes

Para os ensaios das proteínas AtMCPs recombinantes (**2b**, **2b^m**, **2d**, **2d^m**, **2e**, **2f** e **2f^m**), produzidas em *E. coli* BL21(DE3)pLysE (Invitrogen), a região da sequência codificadora de cada gene foi amplificada por PCR e clonada “*in-frame*” no vetor para expressão em bactérias pET23a (Novagen), resultando em proteínas com fusão dupla (porção N-terminal contendo o promotor T7 e porção C-terminal contendo His₆).

A expressão das metacaspases foi induzida pela adição de IPTG 1mM (isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo) à cultura celular após esta atingir uma D.O.₆₀₀ de 0,5-0,6. Após, as amostras foram agitadas a 280 rpm a 30 °C durante um período de 3-4 horas.

As células foram coletadas, lavadas com água destilada e ressuspensas em tampão SDS (Tris-HCl 0,5 M, SDS 0.4 % (p/v), glicerol 20 % (v/v), mercaptoetanol 0,1 % (p/v) e *Comassie Brilliant Blue* 1 μ g.mL⁻¹). Posteriormente as células foram fervidas e centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos.

O extrato das células lisadas foi submetido à eletroforese em SDS-PAGE (10 %, v/v) e, quando pertinente, submetidos a Western blot usando o anticorpo anti-T7 conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*, diluição 1:10000). A reação de revelação foi realizada com o kit 4-CN (Bio-Rad).

Para os ensaios de atividade proteolítica das metacaspases, as células foram coletadas após indução com IPTG 1 mM em tampão de extração (HEPES 50 mM, pH 7,5, glicerol 10 % (v/v), CaCl₂ 10 mM, ditiotretol 10 mM e CHAPS 0,1 % (m/v), exceto para AtMCP2f, cujo tampão de extração continha MES 500 mM, pH 5,5, NaCl

150 mM, sacarose 10 % (m/v), CHAPS 0,1 % (m/v) e DTT 10 mM. A seguir, as células foram sonicadas e o material insolúvel foi removido por centrifugação (10.000 x g, 10 min, 4 °C).

O sobrenadante resultante foi usado como extrato ativo para medida direta da atividade proteolítica das metacaspases *in vitro*. Esta atividade foi medida espectrofluorometricamente através da hidrólise de substratos fluorogênicos (Boc-Gly-Arg-Arg-MCA ou Boc-Phe-Arg-MCA para AtMCP2f). A reação enzimática foi realizada em 100 µL de tampão reacional (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol 10 % (v/v), CaCl₂ 10 mM, ditioneitol 10 mM e CHAPS 0,1 % (m/v) exceto para AtMCP2f, cujo tampão reacional continha MES 500 mM, pH 5,5, NaCl 150 mM, sacarose 10 % (m/v), CHAPS 0,1 % (m/v) e DTT 10 mM), 6.5 µg de proteína (dosadas pelo método de Bradford, 1976) e 100 µM de substrato. Após 10 minutos de reação, a quantidade de substrato fluorogênico liberado foi medida fluorometricamente (excitação 360 nm, emissão 460 nm) através de um leitor de microplacas (Sinergy HT, Bio-Tek).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Clonagem das metacaspases em vetor binário de expressão

Os genes para expressão de diversas metacaspases foram clonados no vetor binário **EL103**. Este vetor foi especialmente construído para facilitar a expressão de genes de interesse em plantas e contém um cassete designado *NPTII*, que confere resistência ao antibiótico kanamicina. O promotor que dirige a expressão gênica no vetor EL103 é o **CaMV35S**, sendo que o mesmo é derivado de um vírus que infecta um grande número de espécies vegetais (*cauliflower mosaic virus*). Através deste promotor, o vírus replica seu DNA utilizando-se da maquinaria presente nas células vegetais. Devido a esta característica, este promotor é largamente utilizado para expressão de genes de interesse em plantas.

O vetor EL103 contém ainda uma sequência de DNA específica para aumento da eficiência da tradução (sequência Ω) e um terminador na borda esquerda, o *tNOS*. Todos os genes codificadores das metacaspases foram ligados à sequências referentes a uma cauda de histidina (His_6) e ao epítipo V_5 , para facilitar a análise de expressão gênica nas plantas por imunodeteção. A **Fig. 3** representa um esquema do vetor binário EL103.

Foram clonados 4 genes referentes às metacaspases, bem como seus derivados com mutações pontuais no sítio catalítico. Os genes clonados foram: *AtMCPs 1b*, *1b^m* (C220A), *1c*, *1c^m* (C256A), *2b*, *2b^m* (C139A), *2f* e *2f^m* (C139A). A **Fig. 4** mostra o gel de agarose correspondente a cada um dos genes clonados após digestão do vetor binário EL103 com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I.

Figura 3. Estrutura do vetor binário para expressão em plantas EL103. O vetor é composto pelo gene *NPTII*, que confere resistência à kanamicina, o promotor CaMV35S, a sequência Ω para maior eficiência da tradução, o gene para metacaspase ligado à cauda de histidina e ao epítipo V₅ e o terminador *tNOS*. RB, *right border* (borda direita) e LB, *left border* (borda esquerda).

Figura 4. Produtos da reação de digestão do vetor EL103 com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I. O vetor EL103 foi digerido com as enzimas durante 3 horas a 37 °C. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. M, marcador molecular (1.5 Kb); 1- *AtMCP1b* (1.2 Kb); 2- *AtMCP1b^m* (1.2 Kb); 3- *AtMCP1c* (1.3 Kb); 4- *AtMCP1c^m* (1.3 Kb); 5- *AtMCP2b* (1.3 Kb); 6- *AtMCP2b^m* (1.3 Kb); 7- *AtMCP2f* (1.0 Kb); 8- *AtMCP2f^m* (1.0 Kb);

4.2. Geração das plantas transgênicas

4.2.1. Seleção dos transformantes

A seleção dos transformantes foi realizada utilizando-se placas contendo o meio MS suplementado com kanamicina, carbenicilina e ágar em concentrações pré-determinadas. Entretanto, foi possível perceber que as plantas, mesmo aquelas demonstrando resistência à kanamicina, não cresceram de forma saudável (folhas e raízes bem formadas).

Assim, decidiu-se crescer as plantas em diferentes concentrações de antibióticos e de agentes solidificantes, com o intuito de padronizar as condições de crescimento das plantas. Para isto, foram utilizadas concentrações de kanamicina que variaram de 0-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo mantida a concentração de carbenicilina em 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de meio. Foram comparados também dois agentes solidificantes, ágar 0,8 % (p/v) e phytigel 2,5 g.L^{-1} .

Algumas linhagens reconhecidamente transgênicas, portanto, resistentes à kanamicina (linhagens CCT) e plantas selvagens (WT), foram crescidas e comparadas. Os resultados mostraram que as plantas cresceram de forma mais adequada em meio contendo phytigel e que a concentração ótima de kanamicina foi de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Fig. 5**).

Figura 5. Comparação entre plantas transgênicas (linhagens CCT, Kan^R) e WT crescidas em meio MS suplementado com antibióticos, ágar ou phytagel. A. *Arabidopsis* Col-0 WT crescida em meio MS suplementado com kanamicina 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e phytagel 2,5 g.L^{-1} ; **B.** Linhagem CCT crescida em meio MS suplementado com kanamicina 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e phytagel 2,5 g.L^{-1} ; **C.** *Arabidopsis* Col-0 WT crescida em meio MS suplementado com kanamicina 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ágar 0,8 % (p/v); **D.** Linhagem CCT crescida em meio MS suplementado com kanamicina 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ágar 0,8 % (p/v).

4.3. Análise da geração T₁

4.3.1. Análise da expressão das metacaspases do tipo I

Nossos protocolos de transformação e geração de plantas transgênicas mostraram-se eficientes, uma vez que todas as *Arabidopsis* transgênicas propostas foram geradas, pelo menos em sua primeira geração (T₁). A **Fig. 6** mostra os padrões das bandas de cada uma das metacaspases do tipo I expressas durante a primeira geração de *Arabidopsis* Col-0 WT e mutantes *mcp2d-1* transformados.

O Western blot das plantas transgênicas expressando as metacaspases do tipo I **AtMCP1b-V₅His₆** e **AtMCP1c-V₅His₆**, demonstrou que estas metacaspases possuem um único fragmento, de acordo com as bandas simples apresentadas, de aproximadamente **47 KDa** (AtMCP1b-V₅His₆) e **60 KDa** (AtMCP1c-V₅His₆). As metacaspases do tipo I assemelham-se às caspases iniciadoras encontradas em animais, que possuem em sua extremidade N-terminal um pro-domínio, sendo que para as metacaspases tal domínio é constituído por *Zn-finger* e prolina. As AtMCPs 1b e 1c não demonstraram autoprocessamento, assim como ocorre com as caspases iniciadoras em animais.

Figura 6. Western blot de plantas transgênicas expressando metacaspases do tipo I.

Os extratos das plantas transgênicas foram submetidos à imunodeteção utilizando-se o anticorpo primário anti-V₅ e o anticorpo secundário de rato anti-IgG, conjugado com fosfatase alcalina. As bandas foram detectadas através da reação da fosfatase alcalina com kit específico.

A. AtMCP1b-V₅His₆ (1b) e a versão mutante AtMCP1b(C220A)-V₅His₆ (1b^m), expressas em plantas WT e *mcp2d*. **B.** AtMCP1c-V₅His₆ (1c) e a versão mutante AtMCP1c(C256A)-V₅His₆ (1c^m), expressas em plantas WT e *mcp2d-1*.

4.3.2. Análise das metacaspases do tipo II: expressão da AtMCP2b

A metacaspase do tipo II **AtMCP2b-V₅His₆** demonstrou um padrão de bandas peculiar durante sua expressão, na geração T₁ (**Fig. 7**). A proteína nativa demonstrou uma banda de tamanho correspondente a **57 kDa**. A versão mutante, **AtMCP2b(C139A)-V₅His₆**, mostrou equivalente àquela da proteína nativa, porém a intensidade desta banda durante expressão da proteína mutada é maior se comparada com a versão nativa, tanto em plantas WT quanto *mcp2d-1*.

A AtMCP2b demonstrou o que parece ser um autoprocessamento quando expressa em plantas, assim como quando expressa em leveduras (WATANABE e LAM, 2005). Foram observados dois fragmentos, um correspondente a **30 kDa** e outro a **15 kDa**, que podem corresponder às subunidades p20 e p10 desta metacaspase, em analogia com as caspases animais.

Um fato intrigante foi que AtMCP2b em sua versão mutante (C139A), quando expressa em plantas WT ou *mcp2d-1*, demonstrou exatamente o mesmo padrão de processamento observado para a AtMCP2b nativa, porém a intensidade destes fragmentos na proteína mutada foram menores que a intensidade dos fragmentos na proteína nativa. A análise do padrão de processamento da AtMCP2b (nativa e mutante) levou-nos a questionar o porque desta metacaspase, mesmo com o sítio catalítico mutado, possuir a capacidade de autoprocessamento. A metacaspase AtMCP2d, que compartilha um alto grau de identidade na sequência de aminoácidos com AtMCP2b (cerca de 75%), não possui autoprocessamento quando expressa em bactéria (VERCAMMEN et al., 2004) ou em plantas (nossos resultados não publicados) após mutação no sítio catalítico (C139A). Esse resultado nos motivou a genotipar as plantas transgênicas, para evitar qualquer dúvida em relação ao transgene.

Figura 7. Western blot de plantas transgênicas expressando as metacaspases do tipo II, AtMCP2b-V₅His₆ (2b) e AtMCP2b(C139A)-V₅His₆ (2b^m). Os extratos das plantas transgênicas (geração T₁) foram submetidos à imunodeteção utilizando-se o anticorpo primário anti-V₅ e o anticorpo secundário de rato anti-IgG, conjugado com fosfatase alcalina. As bandas foram detectadas através da reação da fosfatase alcalina com kit específico.

4.3.2.1. Genotipagem das plantas transgênicas

Com o intuito de confirmarmos a presença do transgene AtMCP2b-V₅His₆ nas plantas WT e *mcp2d-1*, bem como o uso do *background* correto, plantas WT e *mcp2d-1* com ou sem o transgene foram genotipadas. A genotipagem evita qualquer dúvida em relação ao gene expresso e as plantas (*backgrounds*) utilizadas. Para este fim, o DNA genômico de linhagens positivas para AtMCP2b e 2b^m, bem como das plantas WT e *mcp2d-1* foi extraído e amplificado por PCR com primers específicos.

A **Fig. 8B** representa os produtos de PCR obtidos após amplificação do DNA genômico de plantas WT e *mcp2d-1*. Os primers e os sítios utilizados para amplificação estão mostrados na **Fig. 8A**. Quatro linhagens positivas foram escolhidas: **2b/WT #9** e **2b/2d-1 #9** e **2b^m/WT #6** e **2b^m/2d-1 #10**.

Os resultados mostraram que tanto o gene AtMCP2b-V₅His₆ quanto sua versão mutante estavam de fato inseridos no genoma das plantas analisadas. O tamanho do fragmento esperado para os produtos de PCR foram confirmados (2 Kb). Os plasmídeos contendo os genes de interesse (2b/EL103 e 2b^m/EL103), bem como o DNA genômico de plantas WT sem o transgene foram amplificados e utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Como podemos observar na **Fig. 8B**, plantas WT sem o transgene não apresentaram produto de PCR, como era de se esperar, ao contrário dos plasmídeos contendo os transgenes.

Para analisarmos a diferença entre as metacaspases originais (AtMCP2b) de suas versões mutadas, [AtMCP(C139A)], foi realizada digestão dos produtos de PCR obtidos previamente com a enzima de restrição Tsp45I. A versão mutante da proteína perde o sítio de reconhecimento da referida enzima, podendo assim ser feita a distinção entre as mesmas analisando-se os produtos de digestão em gel de agarose.

Na **Fig. 8C** podemos observar os produtos da reação de digestão referentes à AtMCP2b nativa, correspondentes aos tamanhos de fragmentos esperados para digestão com Tsp45I (800 pb e 1 Kb). Por outro lado, os produtos de PCR referentes à versão mutada não apresentaram bandas adicionais após a digestão com a enzima, confirmando-se a presença dos transgenes corretos nas plantas.

Para a verificação de que os genes foram inseridos no *background* correto, realizou-se também a genotipagem das plantas *mcp2d-1* que foram transformadas e que apresentaram resultado positivo para expressão de AtMCPs 2b e 2b^m.

A **Fig. 9** mostra os resultados obtidos, bem como o mapa de inserção do T-DNA responsável pelo nocaute do gene *AtMCP2d* e os sítios de amplificação referentes aos primers empregados (**Fig. 9A**). Utilizando-se o DNA genômico e pares de primers que amplificavam (**EL1528 e EL1528**) ou não (**EL1617 e EL1618**) o sítio de inserção do T-DNA, no locus correspondente a *mcp2d-1*, foi possível diferenciar as plantas WT das plantas *mcp2d-1*. Como observado na **Fig. 9B**, os primers que não amplificavam o sítio de inserção apresentaram bandas no gel de agarose (600 pb) apenas nas plantas WT. Entretanto, com o outro par de primers, somente plantas que continham a inserção (*mcp2d-1*) tiveram seu DNA genômico amplificado, representado por bandas de 900 pb (**Fig. 9C**).

O controle da reação de PCR foi realizado com o uso de primers para amplificação do gene constitutivo actina-2 (**EL3031 e EL 3033**), que apresentaram bandas de 300 pb (**Fig. 9D**). Duas linhagens positivas para AtMCP2b, nos respectivos backgrounds (2b/WT ou 2b/*mcp2d-1*) foram escolhidas também para análise, além das plantas controle sem o transgene.

As análises confirmaram a presença tanto do gene *AtMCP2b* quanto da utilização correta dos *backgrounds*, WT ou *mcp2d-1*. Assim, temos uma forte evidência que a

metacaspase AtMCP2b é capaz do autoprocessamento e que este fenômeno não é totalmente dependente do sítio catalítico, fato novo e intrigante ainda não observado para outras cisteíno-proteases.

Figura 8. Genotipagem de linhagens transgênicas positivas e produtos da digestão com a enzima Tsp45I. O DNA genômico das plantas foi extraído e amplificado por PCR utilizando os primers EL1929 e EL1930. **A.** Sítio de amplificação dos primers EL1929 e EL1930. **B.** Gel de agarose 1 % representando os produtos de PCR. **M**, marcador molecular (10 kb); **1**- WT; **2**- plasmídeo 2b/EL103; **3**- 2b/WT #9; **4**- 2b/2d-1 #9; **5**- plasmídeo 2b^m/EL103; **6**- 2b^m/WT #6; **7**- 2b^m/2d1 #10. **C.** Os produtos de PCR obtidos previamente foram digeridos com a enzima Tsp45I por 3 horas a 37 °C e analisados em gel de agarose 1 %. **M**, marcador molecular (10 kb); **1**- WT; **2**- plasmídeo 2b/EL103; **3**- 2b/WT #9; **4**- 2b/2d-1 #9; **5**- plasmídeo 2b^m/EL103; **6**- 2b^m/WT #6; **7**- 2b^m/2d1 #10.

Figura 9. Genotipagem das plantas WT e *mcp2d-1*. O DNA genômico das amostras foi amplificado por PCR utilizando-se primers específicos e os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. **A.** Mapa do locus *mcp2d-1* e sítios de amplificação dos primers utilizados. **B.** Produtos de PCR obtidos através de amplificação com os primers EL1617 e EL1618, não correspondentes ao sítio de inserção do T-DNA responsável pelo nocaute de *AtMCP2d*. **C.** Produtos de PCR obtidos através de amplificação com os primers EL1526 e EL1528, correspondentes ao sítio de inserção do T-DNA responsável pelo nocaute de *AtMCP2d*; **D.** Produtos de PCR obtidos através da amplificação com os primers EL3031 e EL3033, correspondentes ao gene constitutivo actina-2, representando o controle positivo da reação.

4.3.3. Análise das metacaspases do tipo II: Expressão da AtMCP2f

A análise por Western blot da expressão da metacaspase AtMCP2f em *Arabidopsis* demonstrou que esta proteína possui uma massa molecular de aproximadamente **40 kDa** e diferentes padrões de processamento (**Fig. 10**). A proteína nativa foi capaz de processar-se nos dois *backgrounds*, WT e *mcp2d-1*, gerando dois fragmentos, de aproximadamente **20 kDa** e **15 kDa**. Como já observado por Vercammen et al. (2004), tais fragmentos poderiam ser as subunidades **p20 (22 kDa)** e **p10 (15,4 kDa)**. A versão mutante da proteína mostrou processamento apenas quando superexpressa em *mcp2d-1*, gerando o fragmento de **15 kDa**. Neste ponto, não está claro por que tais diferenças no padrão de processamento de AtMCP2f ocorreram, sendo necessários estudos bioquímicos para um maior esclarecimento.

Figura 10. Western blot de plantas transgênicas expressando a metacaspase do tipo II AtMCP2f-V₅His₆ (2f) e AtMCP2f(C139A)-V₅His₆ (2f^m). Os extratos das plantas transgênicas foram submetidos à imunodeteção utilizando-se o anticorpo primário anti-V₅ e o anticorpo secundário de rato anti-IgG, conjugado com fosfatase alcalina. As bandas foram detectadas através da reação da fosfatase alcalina com kit específico.

As análises descritas anteriormente, mesmo realizadas durante a geração T₁ podem fornecer evidências importantes sobre as metacaspases de *Arabidopsis*. Inicialmente, por meio das análises de Western blot, foi possível identificar o tamanho das proteínas. Além disso, as análises evidenciaram um padrão de processamento das metacaspases *in planta*, mostrando alguns aspectos da natureza destas proteases. Por exemplo, o fato de que AtMCP2b (C139A) possa sofrer processamento tanto em plantas WT quanto em *mcp2d-1* sugere que o sítio catalítico desta metacaspase não é importante para o processamento. Porém, é preciso ressaltar que tal fenômeno possa ocorrer devido à clivagem desta metacaspase por outra protease vegetal.

Um fato intrigante é que AtMCP2d (C139A) não demonstre o mesmo processamento observado para AtMCP2b (C139A), mesmo com estas duas proteases apresentando alto grau de identidade em sequência de aminoácidos. Uma possível explicação para tal fato é que os diferentes aminoácidos de AtMCP2d poderiam estar “protegendo” os sítios de clivagem desta proteína, impedindo assim seu autoprocessamento ou a clivagem por outra protease.

Como demonstrado por Belenghi et al. (2007), metacaspases contêm um resíduo de cisteína que pode atuar como segundo sítio catalítico, sendo que tal resíduo é altamente conservado entre as metacaspases de *Arabidopsis*. De alguma forma, esse resíduo poderia participar da clivagem de AtMCP2b mas não de AtMCP2d, por motivos de diferenças estruturais entre as duas proteases. Esta hipótese é altamente plausível e sugere um nível refinado de regulação, uma vez que proteases são reguladas de maneira muito eficaz a fim de se evitarem degradações de outras proteínas senão àquelas envolvidas durante a resposta fisiológica.

Outra questão a ser levantada é quais dos fragmentos gerados pelas metacaspases são biologicamente ativos. No caso das caspases animais, os fragmentos gerados são os responsáveis pela ação efetora dessas proteases. Este fato seria verdadeiro para as metacaspases ou essas proteases estão sujeitas a outro tipo de regulação?

Estudos recentes demonstraram que AtMCP2f é regulada por *S*-nitrosilação (BELENGHI et al., 2007), sendo que regulação semelhante é conhecida atualmente para poucos tipos de proteínas vegetais, assim como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (LINDERMAYR et al., 2005) e a metionina adenosiltransferase (LINDERMAYR et al., 2006). Assim, a *S*-nitrosilação parece ser um tipo muito especial de regulação, a qual as metacaspases podem estar sujeitas.

Outra informação importante retirada das análises de plantas T₁ superexpressando metacaspases é a observação do fenótipo apresentado pelas plantas transgênicas. Como demonstrado na **Fig. 11**, nenhum fenótipo anormal pode ser observado em *Arabidopsis* superexpressando as metacaspases propostas neste estudo.

Figura 11. Plantas transgênicas superexpressando metacaspases, em diferentes estágios de desenvolvimento. A. Estágio primário de desenvolvimento. B. Plantas com cerca de 4 semanas. C. Detalhes das inflorescências.

4.4. Análise da Geração T₂

Foram analisadas, na geração T₂, apenas as linhagens superexpressando a metacaspase **AtMCP1b** e sua versão mutante em plantas WT e *mcp2d-1*. Após a confirmação da expressão das metacaspases nas linhagens transgênicas, as plantas foram crescidas por aproximadamente 7 semanas, sendo as sementes coletadas nesse período (geração T₂).

As sementes foram então germinadas em placas contendo kanamicina e as linhagens que apresentaram segregação de 3:1, ou seja, 3 plantas resistentes à kanamicina para 1 planta sensível, foram submetidas a imunodeteção para confirmarmos a expressão das metacaspases na geração T₂.

A **Fig. 12** representa algumas linhagens transgênicas analisadas. Algumas linhagens resistentes à kanamicina não demonstraram segregação de 3:1, sendo denominadas linhagens complexas. Este fato pode ser devido à ocorrência de inserções múltiplas do transgene no genoma da planta.

Outras linhagens apresentaram a segregação de 3:1, mas perderam a resistência à kanamicina, provavelmente devido a mecanismos de silenciamento gênico. Apenas aquelas linhagens demonstrando segregação de 3:1, boa resistência à kanamicina, caracterizada por plantas saudáveis, com folhas verdes e raízes bem alongadas, e que estavam expressando o gene (verificado por imunodeteção) é que estão aptas para ensaios biológicos.

Figura 12. Análise de linhagens transgênicas supostamente expressando o gene *AtMCP1b* em plantas WT e *mcp2d* durante a segunda geração (T_2). As sementes das linhagens transgênicas selecionadas foram germinadas em placas contendo meio MS suplementado com kanamicina $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e deixadas a 4°C por 3 dias. Após, as placas foram transferidas para câmara de crescimento a 24°C por 7 dias. As linhagens transgênicas demonstraram diferentes padrões de segregação e resistência à kanamicina (Kan^R). **A.** Padrão de segregação complexa. **B e C.** Padrões de segregação de 3:1 e boa resistência à kanamicina (plantas saudáveis). **D.** Plantas com segregação de 3:1, porém com perda da Kan^R .

A análise da expressão gênica por imunodeteção, para linhagens transgênicas expressando AtMCP1b na geração T₂, está demonstrada na **Fig. 13**. Algumas linhagens que demonstraram expressão do transgene na geração T₁ não o fizeram na geração T₂, provavelmente devido ao silenciamento do transgene ou por dificuldades de transmissão do gene das linhagens parentais para a geração seguinte. As linhagens que mantiveram a expressão do gene *AtMCP1b* na geração T₂ apresentaram o mesmo padrão da banda observada na primeira geração após imunodeteção, uma banda simples de **40 kDa**.

As linhagens AtMCP1b/WT #8, AtMCP1b^m/WT #12 e AtMCP1b/2d1 #4 demonstraram padrão complexo de segregação. Para as linhagens AtMCP1b/WT #15 e AtMCP1b^m/2d1 #20 foi observada a perda da resistência à kanamicina e as linhagens **AtMCP1b/WT #11 e 12, AtMCP1b^m/WT #4 e 11, AtMCP1b^m/2d1 # 3 e 18** apresentaram segregação de 3:1, Kan^R e expressão gênica satisfatórias, sendo boas candidatas aos ensaios biológicos.

Em suma, nosso sistema para geração das linhagens transgênicas expressando AtMCPs demonstrou-se eficiente, sendo que no total foram geradas 4 linhagens transgênicas expressando diferentes metacaspases (1b, 1c, 2b e 2f), bem como suas respectivas versões mutantes (1b^m, 1c^m, 2b^m e 2f^m), nos dois *backgrounds* de *Arabidopsis thaliana* (WT e *mcp2d-1*).

Figura 13. Western blot de plantas transgênicas expressando a metacaspase AtMCP1b-V₅His₆ (1b) e AtMCP1b(C220A)-V₅His₆ (1b^m) na geração T₂. Os extratos das plantas transgênicas foram submetidos à imunodeteção utilizando-se o anticorpo primário anti-V₅ e o anticorpo secundário de rato anti-IgG, conjugado com fosfatase alcalina. As bandas foram detectadas através da reação da fosfatase alcalina com kit específico.

4.5. Estudo das proteínas recombinantes

4.5.1. Expressão em *E. coli*

Foram clonados 7 genes correspondentes às metacaspases de *Arabidopsis* no vetor pET23a, que foi então introduzido em bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Todas as proteínas foram marcadas com His na porção C-terminal e expressas através do promotor T7 presente no vetor pET23a. As metacaspases 2b, 2b^m (C139A), 2d, 2d^m (C139A), 2e, 2f e 2f^m (C139A) foram clonadas com sucesso, expressas em *E. coli* através de indução com IPTG e detectadas por Western blot utilizando-se o anticorpo anti-T7 conjugado com peroxidase (**Fig. 14**).

O padrão das bandas apresentado pelas metacaspases recombinantes foi semelhante aquele demonstrado pelas metacaspases quando expressas em *Arabidopsis*.

Porém, não está claro se as metacaspases AtMCP2b, AtMCP2d e suas versões mutadas sofreram processamento de fato ou se as bandas são produtos de contaminação ou ligação cruzada com o anticorpo utilizado (anti-T7). De qualquer forma, o padrão das bandas apresentado pelas metacaspases AtMCP2b, AtMCP2b^m e AtMCP2d é exatamente o mesmo, apresentando uma banda intensa principal de aproximadamente 60 kDa. Por outro lado, AtMCP2d^m demonstrou uma banda principal maior, de cerca de 66 kDa. A metacaspase AtMCP2e demonstrou banda única de cerca de 50 kDa.

Durante a análise da expressão de AtMCP2f, detectou-se uma banda correspondente à proteína integral com cerca de 40 kDa e um processamento bem definido, com um fragmento de aproximadamente 24 kDa, ligeiramente maior que o fragmento apresentado quando AtMCP2f foi expressa em planta (15 kDa, **Fig. 13**). Este fato pode ser explicado pela diferença entre os marcadores usados para detecção das proteínas em bactérias e plantas. AtMCP2f^m recombinante não demonstrou processamento após expressão em *E. coli*.

Figura 14. Western blot para detecção de metacaspases recombinantes expressas em *E. coli*. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* BL21(DE3)pLysE como descrito em Material e Métodos. Os extratos celulares foram submetidos à imunodeteção utilizando-se o anticorpo anti-T7 conjugado com peroxidase. O controle negativo é representado pelo vetor pET23a sem a presença do transgene.

4.5.2. Atividade biológica das metacaspases recombinantes

Durante os estudos para a análise da expressão das metacaspases recombinantes em *E. coli*, notou-se que após a indução com IPTG as culturas celulares expressando as metacaspases 2b, 2b^m e 2d estavam sendo lisadas, como verificado através da diminuição da turbidez do meio. Assim, decidiu-se por medir a densidade óptica das células após indução com IPTG, de maneira tempo-dependente. De fato, uma diminuição significativa da D.O._{600nm} foi observada nas culturas expressando as metacaspases anteriormente descritas (**Fig 15**).

Por outro lado, a expressão da metacaspase AtMCP2f e sua versão mutante demonstrou efeito contrário, ou seja, as células cresceram indefinidamente se comparadas ao controle, que atingiu a saturação (**Fig. 15C**).

A **Fig. 16** mostra os géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) para AtMCP2d e AtMCP2f, confirmando os resultados descritos acima. A toxicidade da metacaspase AtMCP2d nativa pode ser observada pelo decréscimo da quantidade total de proteínas após indução da expressão por 3 horas, fenômeno este não observado no controle (pET23a vazio) e para a versão mutante (**Fig. 16A**).

Entretanto, podemos verificar o aumento da quantidade total de proteínas quando AtMCP2f foi expressa nas bactérias durante 3 horas, sendo esta resposta verificada tanto para a versão nativa quanto mutante, embora para esta última o efeito tenha sido menor (**Fig 16B**).

Figura 15. Curva de crescimento de cultura de *E. coli* após indução de expressão das metacaspases do tipo II. A expressão foi induzida pela adição de IPTG 1 mM na cultura celular com D.O._{600nm} de 0,5-0,6. As células foram homogeneizadas a 30 °C e recolhidas para medidas da D.O._{600nm} de maneira tempo-dependente, como indicado nas figuras. **A.** AtMCP2b e AtMCP2b (C139A). **B.** AtMCP2d e AtMCP2d (C139A). **C.** AtMCP2f, AtMCP2f (C139A). O controle representa o vetor pET23a sem o transgene. Os resultados representam 10 experimentos independentes.

Figure 16. Análise em SDS-PAGE de proteínas totais após expressão de AtMCPs recombinates em *E. coli*. A expressão foi induzida pela adição de IPTG 1 mM na cultura celular com D.O._{600nm} de 0,5-0,6. As células foram homogeneizadas a 30 °C e recolhidas para medidas da D.O._{600nm} de maneira tempo-dependente (0 - 3 horas). As amostras foram removidas no tempo determinado e ressuspensas em tampão SDS (2X), fervidas e submetidas à eletroforese, sendo o gel corado com Comassie Brilliant Blue. **A.** AtMCP2d e **B.** AtMCP2f. O controle está representado pelo vetor sem o transgene, pET23a. Os resultados são representativos de 5 experimentos independentes.

Com o intuito de testarmos se a atividade proteolítica das proteínas recombinantes era de fato importante para a atividade biológica observada em *E. coli*, as atividades das AtMCPs 2b, 2b^m, 2d, 2d^m, 2f e 2f^m foram medidas fluorometricamente utilizando-se substratos sintéticos.

Como observado na **Fig. 17**, as metacaspases AtMCP2b e AtMCP2d nativas demonstraram alta atividade contra o substrato Boc-GRR-MCA (**Fig. 17A**), sendo o mesmo verdadeiro para a metacaspase AtMCP2f nativa contra o substrato Boc-FR-MCA (**Fig. 17B**).

As metacaspases mutadas em seus sítios catalíticos demonstraram pouca ou mesmo nenhuma atividade contra os substratos sintéticos. Os resultados descritos anteriormente sugerem que, pelo menos em parte, os sítios catalíticos de AtMCP2b e AtMCP2f não sejam essenciais para as atividades observadas em *E. coli*, embora as atividades tenham sido levemente atenuadas quando as versões mutantes foram expressas. Por outro lado, AtMCP2d foi totalmente dependente do sítio catalítico para exercer a mesma função biológica.

Figura 17. Atividade proteolítica das metacaspases recombinantes. A expressão foi induzida pela adição de IPTG 1 mM na cultura celular com D.O._{600nm} de 0,5-0,6. As células foram homogeneizadas a 30 °C e recolhidas para as medidas de atividade após 1 hora de indução. As células foram processadas como descrito em Material e Métodos. **A.** Atividade proteolítica de AtMCP2b, AtMCP2b (C139A), AtMCP2d, e AtMCP2d (C139A) contra o substrato sintético Boc-GRR-MCA. **B.** Atividade proteolítica de AtMCP2f e AtMCP2f (C139A) contra o substrato sintético Boc-FR-MCA. Os resultados são representativos de 5 experimentos independentes. A análise estatística (one-way ANOVA) mostrou que $p < 0,001$ para todos os resultados representados.

Assim, as metacaspases de *Arabidopsis thaliana*, quando expressas em bactéria, demonstraram atividades biológicas promissoras. No momento, não existem evidências dos mecanismos pelos quais estas proteases exercem os efeitos observados, uma vez que os estudos bioquímicos das metacaspases encontram-se no início.

O fato de que AtMCP2b e AtMCP2d, mesmo apresentando um grau considerável de identidade em aminoácidos (cerca de 75%), tenham efeitos diferentes quando mutadas em seu sítio catalítico, sugere que estas metacaspases possam ter funções diferentes nas plantas e que não sejam apenas produtos de redundância gênica como era imaginado, observando-se apenas o grau de identidade.

Com o efeito contrário observado para as metacaspases 2b e 2d, AtMCP2f parece interferir na comunicação celular entre a população de bactérias (*quorum sensing*). Esta comunicação é fundamental para que as bactérias interrompam o crescimento, restringindo assim a população para que não se esgote os nutrientes do meio em que se encontram.

Nesse contexto, o *quorum sensing* consiste na liberação de sinais perceptíveis pelas células vizinhas, sendo que em certas situações estas moléculas sinalizadoras consistem em fatores de patogenicidade encontrados em bactérias (BOYER e WISNIEWSKI-DYÉ, 2009; AHMER, 2004; WINZER e WILLIAMS, 2001). Este fenômeno tem sido alvo de intensos debates recentes na literatura e sabe-se que muitas destas moléculas sinalizadoras consistem de peptídeos, que muitas vezes são induzidos ou reprimidos em bactérias, controlando a comunicação celular. Assim, não seria

inviável a participação de proteases, tais como as metacaspases, no controle da patogenicidade ou sobrevivência de colônias bacterianas.

Em suma, o estudo das metacaspases de plantas encontra-se ainda no início. Estas proteases demonstraram propriedades muito interessantes, tanto em plantas quanto em bactérias, tornando-se agora alvos de intensa investigação a respeito de suas verdadeiras funções biológicas e evolutivas.

5. CONCLUSÕES

i) As metacaspases expressas em *Arabidopsis thaliana* demonstraram padrão de processamento semelhante às caspases animais, reforçando a hipótese de que as proteases vegetais possam estar envolvidas na regulação de morte celular. Como as plantas superexpressando as AtMCPs não apresentaram fenótipo de morte celular, possivelmente este fenômeno exija o envolvimento conjunto e regulado de duas ou mais metacaspases para ocorrência do fenômeno.

ii) O estudo das metacaspases recombinantes demonstrou que os possíveis sítios catalíticos das AtMCPs 2b e 2f não foram importantes para a atividade biológica em *Escherichia coli*, fenômeno contrário apresentado pela AtMCP2d que, quando mutada no mesmo sítio perdeu atividade. Entretanto, a atividade proteolítica, quando testada contra substratos sintéticos, foi totalmente dependente da cisteína catalítica das proteases recombinantes.

iii) Os estudos iniciais realizados no presente trabalho, quando observados em conjunto, sugerem que as metacaspases possuem peculiaridades em relação às caspases quanto, por exemplo, ao padrão de processamento, possível sítio catalítico e funcionalidade. Mais estudos bioquímicos e moleculares se fazem necessários, como por exemplo, um estudo estrutural detalhado, a superexpressão de duas proteases em conjunto ou a produção de duplos-mutantes para verificação de um fenótipo de morte celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-VIZI, V.; CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **Trends in Pharmacological Sciences**, Oxford, v. 27, p. 639-645, 2006.
- AGIUS, S. C.; BYKOVA, N. V.; IGAMBERDIEV, A. U.; MOLLER, I. M. The internal rotenone insensitive NADPH dehydrogenase contributes to malate oxidation by potato tuber and pea leaf mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 329-336, 1998.
- AHMER, B. M. Cell-to-cell signaling in *Escherichia coli* and *Salmonella euterica*. **Molecular Microbiology**, New York, v., p. 52933-52945, 2004.
- AKERMAN, K. E.; WIKSTRÖN, M. K. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 68 (2), p. 191-197, 1976.
- ALI, R.; MA, W.; LEMTIRI-CHLIEH, F. Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* *CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL2* and innate immunity. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1081-1095, 2007.
- ALNEMRI, E. S., LIVINGSTON, D. J., NICHOLSON, D. W., SALVENSEN, G., THORNBERRY, N. A., WONG, W. W., YUAN, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. **Cell**, Cambridge, v. 87, p. 171, 1996.
- ALVAREZ, M. E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 44, p. 429-442, 2000.

- ARAVIND, L., KOONIN, E. V. Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. **Proteins: Structural and Functional Genetics**, Boston, v. 46, p. 355-367, 2002.
- ARRON, G. P.; EDWARDS, G. E. Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by potato mitochondria. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 65, p. 591-594, 1980.
- ARRON, G. P.; EDWARDS, G. E. Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by plant mitochondria. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 57, p. 1392-1399, 1979.
- BARJA, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 31, p. 347-366, 1999.
- BARJA, G.; HERRERO, A. J. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 30, p. 235-243, 1998.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, Brasília, v. 29 (1), p. 113-123, 2006.
- BARRIENTOS, A. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. **Methods**, San Diego, v. 26, p. 307-316, 2002.
- BEAVIS, A. D.; VERCESI, A. E. Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg^{2+} -insensitive inner membrane anion channel. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 3079-3087, 1992.

- BEERS, E. P., FREEMAN, T. B. Proteinase activity during tracheary element differentiation in *Zinnia mesophyll* cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v.113 (3), p. 873-880, 1997.
- BELENGHI, B., ROMERO-PUERTAS, M. C., VERCAMMEN, D., BRACKENIER, A., INZÉ, D., DELLEDONNE, M., VAN BREUSEGEM, F. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282 (2), p. 1352-1358, 2007.
- BLACKSTONE, N. W.; GREEN, D. R. The evolution of a mechanism of cell suicide. **Bioessays**, Cambridge, v. 21, p. 84-88, 1999.
- BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, London, v. 128, p. 617-630, 1972.
- BOYER, M.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Cell-cell signaling in bacteria: not simply a matter of quorum. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 70, p. 1-19, 2009.
- BOZHKO, P. V., SUAREZ, M. F., FILONOVA, L. H., DANIEL, G., ZAMYATININ, A. A., RODRIGUEZ-NIETO Jr., S., ZHIVOTOVSKY, B., SMERTENKO, A. Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant organogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 14463-14468, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BRUNTON, C. J.; PALMER, J. M. Pathways for the oxidation of malate and reduced pyridine nucleotide by wheat mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 283-291, 1973.
- CAPE, J. L.; BOWMAN, M. K.; KRAMER, D. M. Understanding the cytochrome *bc* complexes by what they don't do. The Q cycle at 30. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, p. 46-55, 2006.
- CHOWDHURY, I., THARAKAN, B., BHAT, G. K. Caspases-an update. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, Oxford, v. 151, p. 10-27, 2008.
- CLOUGH, S. J., BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 16 (6), p. 735-743, 1998.
- CLOUGH, S. J.; FENGLER, K. A.; YU, I. C. The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 97, p. 9323-9328, 2000.
- CONSIDINE, M. J.; DALEY, D. O.; WHELAN, J. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 126, p. 1619-1629, 2001.
- CONSIDINE, M. J.; GOODMAN, M.; ECHTAY, K. S.; LALOI, M.; WHELAN J. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 22298-22302, 2003.

CONSIDINE, M. J.; HOLTZAPFFEL, R. C.; DAY, D. A.; WHELAN, J.; MILLAR, A.

H. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots.

Plant Physiology, Lancaster, v. 129, p. 949-953, 2002.

DAY, D. A.; WISKICH, J. T. The effect of exogenous nicotinamide adenine dinucleotide on the oxidation of NAD-linked substrates by isolated plant mitochondria. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 54, p. 360-363, 1974.

de SOUZA, W. R. **Estudo do efeito elicitor do ácido salicílico e do polissacarídeo extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) em cultura de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*)**. 2005, 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas- Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

de ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage: application in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown, v. 26, p. 202-226, 1999.

del POZO, O., LAM, E. Caspase-like protease involvement in the control of Plant Cell, Rockville death. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 44, p. 417-428, 2000.

del POZO, O., LAM, E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. **Current Biology**, Cambridge, v. 8, p. 1129-1132, 1998.

DEMAREUX, N.; DISTELHORST, C. Apoptosis- the calcium connection. **Science**, London, v. 300, p. 65-67, 2003.

DEVERAUX, Q. L., ROY, N., STENNICKE, H. R., VAN ARSDALE, T., ZHOU, Q., SRINIVASULA, S. M., ALNEMRI, E. S., SALVENSEN, G. S., REED, J. C.

- IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome *c* by direct inhibition of distinct caspases. **EMBO Journal**, Oxford, v. 17, p. 2215-2223, 1998.
- DEVERAUX, Q. L., TAKAHASHI, R., SALVENSEN, G. S., REED, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. **Nature**, London, v. 388, p. 300-304, 1997.
- DOUCE, R.; NEUBURGER, M. The uniqueness of plant mitochondria. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 40, p. 371-414, 1973.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell functions. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.
- ECHTAY, K. S.; MURPHY, M. P.; SMITH, R. A.; TALBOT, D. A.; BRAND, M. D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, p. 47129-47135, 2002.
- EICHINGER, A., BEISEL, H. -G., JACOB, U., HUBER, R., MEDRANO, F. -J., BANBULA, A., POTEMPA, J., TRAVIS, J., BODE, W. Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold. **EMBO Journal**, Oxford, v. 18, p. 5453-5462, 1999.
- ELTHON, T. E.; NICKELS, R. L.; McINTOSH, L. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 89, p. 1311-1317, 1989.

- ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. **Methods in Enzymology**, New York, v. 10, p. 41-47, 1967.
- EZAWA, I.; OGATA, E. Ca^{2+} -induced activation of succinate dehydrogenase and the regulation of mitochondrial oxidative reactions. **Journal of Biochemistry**, Abingdon, v. 85 (1), p. 65-74, 1979.
- FERNANDEZ, M. I. G.; CECCARELI, D.; MUSCATELLO, U. Use of the fluorescent dye 10N-nonyl acridine orange in qualitative and location assays of cardiolipin: a study on different experimental models. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 328, p. 174-180, 2004.
- FERRI, K. R.; KROEMER, G. Mitochondria – the suicide organelles. **Bioessays**, Cambridge, v. 23, p. 111-115, 2001.
- FESTJENS, N., VANDEN BERGHE, T., VANDENABEELE, P. Necrosis, a well orchestrated form of cell demise: signaling cascades, important mediators and concomitant immune responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1757, p. 1371-1387, 2006.
- FINNEGAN, P. M.; SOOLE, K. L.; UMBACH, A. L. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants. In: DAY, D. A.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. **Advances in Photosynthesis and Respiration**, Ed. Boston: Kluwers, 2004.
- FUENTES-PRIOR, P., SALVENSEN, G. S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. **Biochemical Journal**, London, v. 384, p. 201-232, 2004.

- FUKUDA, H. Signals that control plant vascular cell differentiation. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 379-391, 2004.
- GADJEV, I.; VANDERAUWERA, S.; GECHEV, T. S.; LALOI, C.; MINKOV, I. N.; SHULAEV, V.; APEL, K.; INZE, D.; MITTLER, R.; VAN BREUSEGEM, F. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, p. 436-445, 2006.
- GARCÍA-HEREDIA, J. M.; HERVÁS, M.; DE la ROSA, M. A.; NAVARRO, J. A. Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. **Planta**, New York, v. 228, p. 89-97, 2008.
- GENOVA, M. L.; VENTURA, B.; GIULIANO, G.; BOVINA, C.; FORMIGGINI, G.; PARENTE, C. G.; LENA, Z. G. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 505, p. 364-368, 2001.
- GILLILAND, A.; SINGH, D. P.; HAYWARD, J. M.; MOORE, C. A.; MURPHY, A. M.; YORK, C.J.; SLATOR, J.; CARR, J. P. Genetic modification of alternative respiration has differential effects on antimycin A-induced versus salicylic acid-induced resistance to tobacco mosaic virus. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, p. 1518-1528, 2003.
- GOPALAN, S., WEI, W., HE, S. Y. *hrp* gene-dependent induction of *hin1*: a plant gene activated rapidly by both harpins and the *avrPto* gene-mediated signal. **Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 591-600, 1996.
- GOZUACIK, D., KIMCHI, A. Autophagy and cell death. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 78, p. 217-245, 2007.

- GREEN, D. R. Apoptosis pathways: paper wraps stone blunts scissors. **Cell**, Cambridge, v. 10, p. 1-4, 2000.
- GRIJALBA, M. T.; VERCESI, A. E.; SCHREIER, S. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possibly early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, Washington, v. 38, p. 13279-13287, 1999.
- HAN, D.; ANTUNES, F.; CANALI, R.; RETTORI, D.; CADENAS, E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 5557-5563, 2003.
- HE, L.; LEMASTERS, J. J. regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 512, p. 1-7, 2002.
- HE, R., DRURY, G. E., ROTARI, V. I., GORDON A., WILLER, M., FARZANEH, T., WOLTERING, E. J., GALLOIS, P. Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H_2O_2 in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283 (2), p. 774-783, 2008.
- HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. **Annalé Scintifique Naturé Biologie Végétale**, Paris, v. 14, p. 1-233, 1953.
- HETHERINGTON, A. M.; BROWNLEE, C. The generation of Ca^{2+} signals in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 401-427, 2004.
- HOEFNAGEL, M. H. N.; ATKIN, O. K.; WISKICH, J. T. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 235-255, 1998.

- HONDA, S. I.; GREGORY, J. M. Studies in the metabolism of plant cells, XII, ionic effects on oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide and cytochrome *c* by plant mitochondria. **Australian Journal of Biological Sciences**, East Melbourne, v. 11, p. 1-15, 1957.
- HUA, J.; GRISAFI, P.; CHENG, S. H. Plant growth homeostasis is controlled by the *Arabidopsis BON1* and *BAP1* genes. **Genes Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, p. 2263-2272, 2001.
- HUSTACHE, G.; MOLLARD, A.; BARNOUD, F. Culture illimitée d'une source anergieé de *Rosa glauca* par la technique ds suspensions cellulaires. **CR Academy of Sciences**, New York, v. 281, p. 1381-1384, 1975.
- IKUMA, H.; BONNER, W. D. Jr. Properties of higher plant mitochondria. III. Effects of respiratory inhibitors. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 42, p. 1535-1544, 1967.
- JIN, C.; REED, J. C. Yeast and apoptosis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 3, p. 453-459, 2002.
- JUSZCZUK, I. M.; RYCHTER, A. M. Alternative oxidase in higher plants. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 50, p. 1257-1271, 2003.
- KAEWSUYA, P.; DANIELSON, N. D.; EKHTERAEE, D. Fluorescent determination of cardiolipin using 10*N*-nonyl acridine orange. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, p. 2775-2782, 2007.
- KERR J.F.; WYLLIE A.H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, London, v.26. p.239-257, 1972.

- KLESSIG, D. F.; DURNER, J.; NOAD, R. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 97, p. 8849-8855, 2000.
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of COQ redox state. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 269, p. 141-147, 1995.
- KRAUSE, M.; DURNER, J. Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, p. 131-139, 2004.
- KROEMER, G., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., PETER, M. E., VAUX, D., VANDENABEELE, P., ZHIVOTOVSKY, M. V., BLAGOSKLONNY, M. V., MALORNI, W., KNIGHT, R. A. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature and Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 12, p. 1463-1467, 2005.
- KROMER, S. Respiration during photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 45-70, 1995.
- KRYSKO, D. V., D'HERDE, K., VANDENABEELE, P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. **Apoptosis**, Boston, v. 11, p. 1709-1726, 2006.
- KUSHNAREVA, Y.; MURPHY, A. N.; ANDREYEV, A. Complex I mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome *c* and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. **Biochemical Journal**, London, v. 368, p. 545-553, 2002.
- LACOMME, C.; SANTA CRUZ, S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 94, p. 7956-7961, 1999.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LALOI, M.; KLEIN, M.; RIESMEIER, J. W.; MULLER-ROBER, B.; FLEURY, C. A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**, London, v. 389, p. 135-136, 1997.
- LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 305-315, 2004.
- LAM, E. Programmed cell death in plants: orchestrating an intrinsic suicide program within walls. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 27, p. 413-423, 2008.
- LAM, E.; KATO N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, London, v. 411, p. 848-853, 2001.
- LAMBERT, A. J.; BRAND, M. D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 39414-39420, 2004.
- LINDERMAYR, C., SAALBACH, G., BAHNWEG, G., DURNER, J. Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, p. 4285-4291, 2006.
- LINDERMAYR, C., SAALBACH, G., DURNER, J. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 137, p. 921-930, 2005.
- LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I.; Superoxide and iron: partners in crime. **IUBMB Life**, London, v. 48, p. 157-161, 1999.

- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193 (1), p. 265-275, 1951.
- MA, W.; BERKOWITZ, G. A. The greatful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9 (11), p. 2571-2585, 2007.
- MAGNANI, T.; SORIANI, F. M.; MARTINS, V. P.; NASCIMENTO, A. M.; TUDELLA, V. G.; CURTI, C.; UYEMURA, S. A. Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 271 (2), p. 230-238, 2007.
- MAIA, I. G.; BENEDETTI, C. E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S. R.; VERCESI, A. E. AtPUMP: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 429, p. 403-406, 1998.
- MARIANO A. B.; KOVALHUK, L.; VALENTE, C.; MAURER-MENESTRINA, J.; PEREIRA-NETTO, A. B.; GUERRA, M. P.; CARNIERI, E. G. S. Improved method for isolation of coupled mitochondria of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasília, v. 47 (6), p. 873-879, 2004.
- MARIANO, A. B.; VALENTE, C.; MAURER, J. B. B.; CADENA, S. M. S. C.; ROCHA, M. E. M.; de OLIVEIRA, M. B. M.; SALGADO, I.; CARNIERI, E. G. S. Functional characterization of mitochondria isolated from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. **Plant Science**, Shanon, v. 175, p. 701-705, 2008.

- MARX, R.; BRICKMAN, K. Characteristic of rotenone-insensitive oxidation of matrix-NADH by broad-bean mitochondria. **Planta**, New York, v. 142, p. 83-90, 1978.
- MAXWELL, D. P.; NICKELS, R.; McINTOSH, L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogens attack and senescence. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 269-279, 2002.
- MAXWELL, D. P.; WANG, Y.; McINTOSH L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 96, p. 8271-8276, 1999.
- McLENNAN, H. R.; ESPOSTI, M. D. The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 32, p. 153-162, 2000.
- MELO, A. M. P.; ROBERTS, T. H.; MOLLER, I. M. Evidence for the presence of two rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner membrane of potato tuber mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1276, p. 133-139, 1996.
- MENZ, R. I.; DAY, D. A. Purification and characteristics of a 43-kDa rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from plant mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, p. 23117-23120, 1996b.
- MITCHELL, P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *b-c₁* complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 56, p. 1-6, 1975.

- MITTLER, R., SHULAEV, V., LAM, E. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. **Plant Cell**, Rockville, v. 7 (1), p. 29-42, 1995.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen network of plants. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 9, p. 490-498, 2004.
- MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, 2007.
- MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, 2001.
- MOORE, A. L.; AKERMAN, K. E. O. Ca^{2+} stimulation of external dehydrogenase in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 109, p. 513-517, 1982.
- MUR, L. A. J.; KENTON, P.; LLOYD, A. J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 239, p. 1-20, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidative Phosphorylation. **In: Lehninger: Principles of Biochemistry**, 4th Ed., p. 660-690, Worth Publishers, New York, 2005.
- NICHOLLS, D. G.; FERGUNSON, S. J. The Q cycle. **In: Bioenergetics**, 3rd Ed., Academic Press, London, 2002.
- NICHOLLS, D. G.; LOCKE, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 64, p. 1-64, 1984.

- NORMAN, C.; HOWELL, K. A.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. M.; DAY, D. A.
Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport.
Plant Physiology, Lancaster, v. 134, p. 492-501, 2004.
- OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria,
oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, Boston, v. 12, p. 913-922, 2007.
- PARSONS, H. L.; YIP, J. Y. H.; VANLERBERGHE, G. C. Increased restriction during
phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase.
Plant Physiology, Lancaster, v. 121, p. 1309-1320, 1999.
- PERAZZOLLI, M.; DOMINICI, P.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; ZAGO, E.; ZEIER,
J.; SONODA, M.; LAMB, C.; DELLEDONNE, M. Arabidopsis nonsymbiotic
hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. **Plant Cell**, Rockville, v.
16, p. 2785-2794, 2004.
- PETIT, J.-M.; MAFTAH, A.; RATINAUD, M. H.; JULIEN, R. 10*N*-nonyl acridine
orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid
in isolated mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 209, p.
267-273, 1992.
- PETRUSSA, E.; BERTOLINI, A.; KRAJNÁKOVÁ, J.; CASOLO, V.; MACRI, F.;
VIANELLO, A. Isolation of mitochondria from embryogenic cultures of *Picea*
abies (L.) Karst. and *Abies cephalonica* Loud.: characterization of a K⁺_{ATP}
channel. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, p. 137-146, 2008.
- PETRUSSA, E.; CASOLO, V.; BRAIDOT, E.; CHIANDUSSI, E.; MACRI, F.;
VIANELLO, A. Cyclosporin A induces the opening of a potassium-selective
channel in higher plant mitochondria. **Journal of Bioenergetics and**
Biomembranes, New York, v. 33, p. 107-117, 2001.

PITTON, P.; RIZZUTO, R. Bcl-2 and Ca^{2+} : homeostasis in the endoplasmic reticulum.

Cell Death and Differentiation, London, v. 13, p. 1409-1418, 2006.

PONTIER, D., GODIARD, L., MARCO, Y., ROBY, D. *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant pathogen interactions. **Plant Journal**, Oxford, v. 5, p. 507-521, 1994.

PURVIS, A. C.; SHEWFET, R. J. Does the alternative pathway ameliorates chilling injury in sensitive plant tissues? **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, p. 712-718, 1993.

RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 401-409, 2002a.

RASKIN, I.; EHMANN, A.; MELANDER, W. R.; MEEUSE, B. J. D. Salicylic acid: a natural inducer of heat production in arum lilies. **Science**, London, v. 237, p. 1601-1602, 1987.

RASMUSSEN, A. G. The Q cycle explains how protons can be pumped across the inner mitochondrial membrane. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 4th Ed., p. 130-156, Kluwer Academics Press, 2006.

RASMUSSEN, A. G.; GEISLER, D. A.; MOLLER, I. M. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. **Mitochondrion**, New York, v. 8, p. 47-60, 2008.

RASMUSSEN, A. G.; MOLLER, I. M. Effect of calcium ions and inhibitors on internal NAD(P)H dehydrogenases in plant mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 202, p. 617-623, 1991a.

- RASMUSSEN, A. G.; SOOLE, K. L.; ELTHON, T. E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 55, p. 23-39, 2004.
- ROBSON, C. A.; VANLERBERGHE, G. C. Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and-independent pathways of programmed cell death. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 1908-1920, 2002.
- ROY, N.; DEVERAUX, Q. L.; TAKAHASHI, R.; SALVENSEN, G. S.; REED, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. **EMBO Journal**, Oxford, v. 16, p. 6914-6925, 1997.
- RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 1809-1819, 1996.
- SAVIANI, E. E.; ORSI, C. H.; OLIVEIRA, J. F. P.; PINTO-MAGLIO, C. A. F.; SALGADO, I. Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 510, p. 136-140, 2002.
- SCORRANO, L.; OAKES, S. A.; OPFERMAN, J. T. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. **Science**, London, v. 300, p. 135-139, 2003.
- SCOTT, I.; LOGAN, D. C. Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, New York, v. 177, p. 90-101, 2008.

- SHIRASU, K.; NAKAJIMA, H.; RAJASEKHAR, V. K. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 261-270, 1997.
- SIEDOW, J. N.; UMBACH, A. L. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1459, p. 432-439, 2000.
- SIMONS, B. H.; MILLENAAR, F. F.; MULDER, L.; VAN LOON, L. C.; LAMBERS, H. Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv tomato. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 120, p. 529-538, 1999.
- SLUSE, F. E.; JARMUSZKIEWICZ, W. Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling proteins in mitochondria from tomato fruit. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 33, p. 259-268, 2000.
- SOOLE, K. L.; MENZ, R. I. ATP Synthesis in plant mitochondria: substrates, inhibitors, uncouplers. **Encyclopedia of Biological Chemistry**, New York, v.1, p. 128-132, 2004.
- SPECTOR, A. A.; JOHN, K.; FLETCHER, J. E. Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. **Journal of Lipids Research**, Bethesda, v. 10, p. 56, 1969.
- STENNICKE, H. R. SALVENSEN, G. S. Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1477 (1-2), p. 299-306, 2000.
- SZAL, B.; JOLIVET, Y.; HASENFRANTZ-SAUDER, M.; DIZENGREMEL, P.; RYCHTER, A. M. Oxygen concentration regulates alternative oxidase expression

- in barley roots during hypoxia and post-hypoxia. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 119, p. 494-502, 2003.
- TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D. T.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristic of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown, v. 46, p. 1283-1297, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Respiration and lipid metabolism. **In: Plant Physiology**, 3rd Ed., p. 237, Sinauer Associates, Inc., 2002.
- TIWARI, B. S.; BELENGHI, B.; LEVINE, A. Oxidative stress increases respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, p. 1271-1281, 2002.
- TOMSIG, J. L.; CREUTZ, C. E. Copines: a ubiquitous family of Ca²⁺-dependent phospholipid binding proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 59, p. 1467-1477, 2002.
- TORRES, M. A.; DANGL, J. L.; JONES, J. D. *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 99, p. 517-522, 2002.
- TRUMPOWER, B. L. The protonmotive Q cycle. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, p. 11409-11412, 1990.
- TUDELLA, V. G.; CURTI, C.; SORIANI, F. M.; SANTOS, A. C.; UYEMURA, S. A. In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the

- respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Amsterdam, v. 36, p. 162-172, 2003.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, New York, v. 552.2, p. 335-344, 2003.
- TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 237, p. 408-414, 1985.
- TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal**, London, v. 191, p. 421-427, 1980.
- TURRENS, J. F.; FREEMAN, B. A.; LEVITT, J. G.; CRAPO, J. D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 217, p. 401-410, 1982.
- UMBACH, A. L.; SIEDOW, J. N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 103, p. 845-854, 1993.
- UMBACH, A. L.; WISKICH, J. T.; SIEDOW, J. N. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 348, p. 181-184, 1994.
- UREN, A. G., O'ROURKE, K., ARAVIND L., PISABARRO, M. T., SESHAGIRI, S., KOONIN, E. V., DIXIT, V. M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a role in MALT lymphoma. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 6, p. 961-967, 2000.

- URQUHART, W.; GUNAWARDENA, A. H.; MOEDER, W. The chimeric cyclic nucleotide-gated ion channel ATCNGC11/12 constitutively induces programmed cell death in a Ca^{2+} -dependent manner. **Plant Molecular Biology**, Oxford, v. 65 (6), p. 747-761, 2007.
- VAN BREUSEGEM, F.; DAT, J. F. Reactive oxygen species in plant cell death. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, p. 384-390, 2006.
- VAN DER HOORN, R. A. L. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 191-223, 2008.
- VANLERBERGHE, G. C.; McINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 703-734, 1997.
- VANLERBERGHE, G. C.; McINTOSH, L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 100, p. 115-119, 1992.
- VERCAMMEN, D., BELENGHI, B., VAN DE COTTE, B., BEUNENS, T., GAVIGAN J. -A., DE RYCKE, R., BRACKENIER, A., INZÉ, D., HARRIS, J. L., VAN BREUSEGEM, F. Serpin 1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 364, p. 625-636, 2006.
- VERCAMMEN, D., DECLERCQ, W., VANDENABEELE, P., VAN BREUSEGEM, F. Are metacaspases caspases? **Journal of Cell Biology**, New York, v. 179 (3), p. 375-380, 2007.

- VERCAMMEN, D., VAN DE COTTE, B., DE JAEGER, G., EECKHOUT, D., CASTEELS, P., VANDEPOELE, K., VANDENBERGHE, I., VAN BEEUMEN, J., INZÉ, D., VAN BREUSEGEM, F. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.279, p. 45329-45336, 2004.
- VERCESI, A. E., MARTINS, I. S., SILVA, M. A. P., LEITE, H. M. F., CUCCOVIA, I. M., CHAIMOVICH, H. Pumping Plants. **Nature**, London, v. 375, p. 24, 1995.
- VERCESI, A. E.; BORECKÝ, J.; MAIA, I. G.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I. M.; CHAIMOVICH, H. Plant uncoupling mitochondrial proteins. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 383-404, 2006.
- WATANABE, N., LAM, E. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.280, p. 14691-14699, 2005.
- WATANABE, N., LAM, E. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate Apoptosis, Boston-like cell death in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, p. 14691-14699, 2005.
- WATANABE, N.; LAM, E. Programmed cell death in plants: apoptotic but not quite. In: YIN, X. Y.; DONG, Z. (eds.). **Essential of apoptosis: a guide for basic and clinical research**, 4th edition, p. 1-20, 2009.
- WILSON, R. H; HANSON, J. B. The effect of respiratory inhibitors on NADH, succinate and malate oxidation in corn mitochondria. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 44, p. 1335-1341, 1969.

- WINZER, K.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v., p. 291131-291143, 2001.
- XIE, Z.; CHEN, Z. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, p. 183-190, 2000.
- XU, G., CIRILLI, M., HUANG, Y., RICH, R. L., MYSZKA, D. G., WU, H. Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. **Nature**, London, v. 410, p. 494-497, 2001.
- YIP, J. Y. H.; VANLERBERGHE, G. C. Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a rapid period of respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, p. 327-333, 2001.
- YOSHIOKA, K.; MOEDER, W.; KANG, H. G. The chimeric *Arabidopsis* *CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12* activates multiple pathogen resistance responses. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 747-763, 2006.
- ZHAO, Y., JIANG, Z. F., SUN, Y., ZHAI, Z. -H. Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 448, p. 197-200, 1999a.