

**CAROLINE VALENTE**

**CARACTERIZAÇÃO DE FUNÇÕES MITOCONDRIAIS EM *Araucaria  
angustifolia***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eva Gunilla Skare Carnieri

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Maria Suter Correia Cadena

**CURITIBA**

**2007**

Dedico este trabalho aos meus pais Hamilton e Rosili pelo carinho e pelo apoio irrestrito, incondicional e de todas as ordens, ao longo dessa e de todas as minhas caminhadas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, pois sem eles este trabalho seria inviável.

À orientadora Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Eva Gunilla Skare Carnieri, pela amizade, paciência e pelo acompanhamento e revisão do estudo, pois suas críticas propiciaram um maior aprofundamento da pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Maria Suter Correia Cadena pela sua atenção, sugestões, amizade e por todo o carinho a mim dispensado.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Maurer-Menestrina e o Prof. Dr. Aducto Bellarmino Pereira-Neto pela disponibilização das células embriogênicas de araucária, bem como pela manutenção das culturas vegetais durante os primeiros meses do mestrado.

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela gentileza em ceder as células embriogênicas de araucária que foram utilizadas em todo o mestrado e pelo treinamento em seu laboratório em Florianópolis. E agradeço também a aluna de doutorado Neusa Steiner pela atenção dedicada no treinamento do repique das células.

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi e Prof Dr. Jiri Borecký por terem gentilmente doado o anticorpo AtPUMP utilizado nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rose Adele Monteiro pela atenção e ajuda nos experimentos de *western blot* da PUMP realizados em seu laboratório, bem como pela ajuda na interpretação dos resultados.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, Olga e Luiza do Departamento de Biologia Celular pelo auxílio nas análises microscópicas.

Ao Prof. Dr. André Bellin Mariano pela sua inesgotável paciência, carinho, dedicação e amizade durante meu aprendizado. Agradeço por ter me ensinado o procedimento de isolamento de mitocôndrias e por todas as ajudas.

Aos colegas Marco, Francine e Heide pelas ajudas indispensáveis no nivelamento, nas disciplinas, referatas, sempre me socorrendo nos momentos mais difíceis. Se não fossem os seus incentivos eu não teria chegado aqui. Obrigada pelo apoio e amizade.

À grande amiga Francine Valenga, pelos conselhos, convivência, amizade duradoura e paciência, até quando eu não me agüentava.

À colega Amanda do Rocio por todo o seu carinho e atenção dedicados. Por seu ombro amigo, seus conselhos e trocas de experiências.

Agradeço a todas as professoras do laboratório, pela atenção, compreensão, conselhos e pela paciência.

Agradeço também aos professores, funcionários, colegas do laboratório e do departamento, especialmente aos alunos de iniciação científica Patrícia Pasqualim e Thiago Jacomasso pela ajuda durante o repique das células, isolamento das mitocôndrias e experimentos realizados. Também agradeço a aluna de doutorado Ana Claudia e ao Luciano por toda ajuda dedicada nos experimentos de *western blot*.

Agradeço a Coordenação da Pós-Graduação em Bioquímica por todo o apoio concedido. Agradeço também o apoio financeiro da Capes e CNPq.

Às professoras da graduação da PUCPR, Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia W. Klüppel e Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maria Stuelp Campelo, por me mostrar e ensinar o maravilhoso mundo da bioquímica e pelo grande incentivo à pesquisa. E a querida técnica Cleide, sempre pronta a ajudar, obrigada por tudo.

Aos meus tios Aires e Vera, minha segunda família, por seu grande afeto e amizade demonstrados durante todos esses anos.

A toda a minha família que sempre me apoio e incentivou em todos os momentos.

Ao Alessandro Jarabiza, pelo amor, carinho e todo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, só me resta agradecer.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 <i>Araucaria angustifolia</i> .....	01
1.2 MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS.....	04
1.2.1 NAD(P)H Desidrogenases Alternativas.....	07
1.2.2 Oxidase Alternativa.....	08
1.2.3 Proteína Desacopladora de Plantas.....	10
1.3 ESTRESSE.....	12
1.4 FLAVONÓIDES.....	13
<b>2 JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 REAGENTES.....	21
4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	21
4.3 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	22
4.4 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> TRATADAS PELO FRIO E PELO CALOR.....	23
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	23
4.6 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	25
4.7 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ( $\Delta\psi$ ).....	25
4.8 WESTERN BLOT.....	26
4.8.1 Eletroforese de Proteína.....	26
4.8.2 Transferência das Proteínas.....	26

4.9 PREPARO DA SUSPENSÃO DE MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS.....	28
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA.....	28
4.11 ANÁLISES MICROSCÓPICAS DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	29
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DO CONTROLE RESPIRATÓRIO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	30
5.2 EFEITO DA FLAVONA NAS OXIDAÇÕES DE NADH EXTERNAMENTE ADICIONADO E DE SUCCINATO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	33
5.3 EFEITO DA FLAVONA NA OXIDAÇÃO DO MALATO/GLUTAMATO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	36
5.4 EFEITO DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ( $\Delta\psi$ ) EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	39
5.5 EFEITO DA FLAVONA SOBRE COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	43
5.6 RESPIRAÇÃO INSENSÍVEL AO CIANETO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	47
5.7 IDENTIFICAÇÃO DA PUMP EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	49
5.8 ATIVIDADE DA PUMP EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	53
5.9 EFEITO DO ESTRESSE SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	58
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	EFEITO DA FLAVONA SOBRE A ATIVIDADE DA NADH DESIDROGENASE EM MITOCÔNDRIAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	44
TABELA 2	EFEITO DA FLAVONA SOBRE A ATIVIDADE DA NADH CITOCROMO C REDUTASE DE MITOCÔNDRIAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	46
TABELA 3	EFEITO DA ALBUMINA SOBRE OS VALORES DE CONTROLE RESPIRATÓRIO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	55
TABELA 4	ATIVIDADE DA PUMP EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	57

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	02
FIGURA 2	ORGANIZAÇÃO DA CADEIA RESPIRATÓRIA DE PLANTAS.....	06
FIGURA 3	ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.....	15
FIGURA 4	ESTRUTURA GERAL DE ALGUMAS CLASSES DE FLAVONÓIDES.....	15
FIGURA 5	ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	24
FIGURA 6	TRAÇADOS DEMONSTRATIVOS DO CONSUMO DE O <sub>2</sub> E POTENCIAL DE MEMBRANA ( $\Delta\psi$ ) DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	32
FIGURA 7	TRAÇADOS DEMONSTRATIVOS DO EFEITO DA FLAVONA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> UTILIZANDO NADH E SUCCINATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS.....	35
FIGURA 8	TRAÇADOS DEMONSTRATIVOS DO EFEITO DA FLAVONA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> UTILIZANDO MALATO/GLUTAMATO COMO SUBSTRATOS OXIDÁVEIS.....	38
FIGURA 9	TRAÇADOS DEMONSTRATIVOS DO EFEITO DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> USANDO NADH COMO SUBSTRATO.....	41
FIGURA 10	TRAÇADOS DEMONSTRATIVOS DO EFEITO DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> UTILIZANDO MALATO/GLUTAMATO COMO SUBSTRATO.....	42
FIGURA 11	TRAÇADOS REPRESENTATIVOS DO CONSUMO DE O <sub>2</sub> NA PRESENÇA DE CIANETO E SHAM EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE <i>A. angustifolia</i> OXIDANDO NADH EXTERNO E MALATO/GLUTAMATO.....	48



FIGURA 12	ELETOFORESE DESNATURANTE DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> E DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA.....	51
FIGURA 13	IMUNODETECÇÃO DA PUMP DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> E DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULOS DE BATATA.....	52
FIGURA 14	CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> SUBMETIDAS À ANÁLISE CITOQUÍMICA COM CARMIM ACÉTICO E AZUL DE EVANS, CÉLULAS CONTROLE.....	59
FIGURA 15	CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> SUBMETIDAS À ANÁLISE CITOQUÍMICA COM CARMIM ACÉTICO E AZUL DE EVANS DE CÉLULAS TRATADAS PELO FRIO.....	60
FIGURA 16	CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> SUBMETIDAS À ANÁLISE CITOQUÍMICA COM CARMIM ACÉTICO E AZUL DE EVANS, CÉLULAS TRATADAS PELO CALOR.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina-5'-difosfato
AIA	ácido indolil – 3 – acético
ABA	ácido abscísico
AOX	oxidase alternativa
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BAP	6-benzilaminopurina
BHAM	ácido benzilhidroxâmico
BMCP	proteína transportadora de mitocôndrias de cérebro
BSA	albumina de soro bovina
Ca <sup>2+</sup>	íon cálcio
CCR	coeficiente de controle respiratório
cDNA	DNA complementar
CN	Cianeto
DH	Desidrogenase
DPI	<i>Diphenyleneiodonium</i>
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenóxiacético
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGTA	ácido etileno glico-bis(β-amino éter) N, N, N', N'-tetracético
EROS	espécies reativas de oxigênio
FCCP	carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona
GDP	guanosina-5'-difosfato
GTP	guanosina-5'-trifosfato
HEPES	[N-(2 hidroxietil) piperazina N'-(2 ácido etanosulfônico)]
Mal/glut	malato/glutamato
Mito	Mitocôndria
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
<i>nda1</i>	gene codificador da proteína NDA1

NDA1	proteína NADH desidrogenase A1
ndb1	gene codificador da proteína NDB1
NDB1	proteína NADH desidrogenase B1
Pi	fosfato inorgânico
PUMP	proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS
SHAM	ácido salicilhidroxâmico
Suc	Succinato
UCP	proteína desacopladora mitocondrial
UQ	Ubiquinona
Tris	tris (hidrometil) amino metano
$\Delta\psi$	potencial elétrico de membrana
$\Delta\text{pH}$	gradiente de pH
$\Delta\mu_{\text{H}^+}$	gradiente eletroquímico de prótons

## RESUMO

Mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia* contêm na sua membrana interna a cadeia transportadora de elétrons, bombeadora de  $H^+$  e produtora de ATP e também uma oxidase alternativa (AOX), não bombeadora de  $H^+$ , insensível a cianeto e sensível ao SHAM. Possuem outros componentes alternativos como as NADH desidrogenases alternativas, que são sensíveis a flavona, uma oxidase alternativa (AOX) e uma proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP) identificada neste trabalho, pela primeira vez, em gimnospermas. Mitocôndrias de *A. angustifolia* foram capazes de respirar pela oxidação dos substratos malato/glutamato e succinato, com alta capacidade fosforilativa, demonstrada pelos controles respiratórios. Estas mitocôndrias também oxidaram o NADH externamente adicionado na presença e na ausência de rotenona. Malato/glutamato foram oxidados na presença de rotenona, evidenciando a presença da NADH desidrogenase interna. A adição de flavona a mitocôndrias respirando na presença de FCCP, causou inibição de 60% em ambas as desidrogenases alternativas. O complexo I e a succinato oxidase foram inibidos em 10-15% e 20%, respectivamente. O grau de inibição pela flavona nas atividades de NADH desidrogenase e NADH citocromo *c* redutase em mitocôndrias rompidas, também sugere o envolvimento das NADH desidrogenases alternativas. Além disso, a flavona causou uma significativa queda no potencial de membrana em mitocôndrias energizadas por NADH ou malato/glutamato. Mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia* tratadas pelo frio e pelo calor, foram isoladas com o intuito de compará-las com mitocôndrias não submetidas a estresse. Através de análises por *western blot* foi possível identificar a proteína PUMP nas mitocôndrias de *A. angustifolia* submetidas ao estresse pelo frio e pelo calor. Foi utilizando o anticorpo policlonal de *Arabidopsis thaliana* (AtPUMP), o qual tem sido utilizado na identificação da PUMP de diferentes espécies de plantas, como do tubérculo de batata e tomate. A PUMP foi visualizada em uma única banda com peso molecular maior que 33 kDa. Células expostas a uma temperatura de 4°C por 48h tiveram aumento da expressão da PUMP quando comparadas com as mitocôndrias de células não submetidas a estresse. Já o efeito da exposição a 43°C por 4h parece ter sido muito drástico, pois desapareceu a banda da PUMP. A atividade da PUMP foi avaliada pela adição de BSA aos meios de isolamento e/ou de reação. Os valores de controle respiratório mostraram que o BSA previne o desacoplamento em todas as condições de estresse, indicando sua ação inibitória sobre a PUMP. Nos estudos comparativos da morfologia das células embriogênicas da *A. angustifolia* submetidas ou não a estresses por variação de temperatura, observou-se que o estresse pelo frio ou pelo calor foram danosos à morfologia tanto das células embrionárias como das suspensoras, interferindo na multiplicação celular, levando a uma diminuição no número de células e ocasionando deformações nas células suspensoras.

## ABSTRACT

Mitochondria, containing in the inner membrane the proton-pumping respiratory chain that transfers electrons via cytochromes and synthesizes ATP, were isolated from embryogenic cells of *A. angustifolia*. The membrane also includes a second pathway characteristically inhibited by salicylhydroxamic acid (SHAM), insensitive to cyanide, non-proton pumping and called alternative oxidase (AOX). Other characterized alternative components are the alternative NADH dehydrogenases, that were sensitive to flavone and, the plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) that was identified for the first time in gymnosperms. Mitochondria from *A. angustifolia* respired by oxygen consumption through the oxidation of the substrates malate/glutamate and succinate. They were highly functional, showing high phosphorylation capacity, demonstrated by the respiratory controls values. The external rotenone-insensitive NADH dehydrogenase was characterized through oxidation of externally added NADH in the absence or presence of rotenone. Internal NADH dehydrogenase was characterized by the oxidation of malate/glutamate in the presence of rotenone. The external and internal NADH dehydrogenases were inhibited at 60% by the addition of flavone to mitochondria respiring in the presence of FCCP. Complex I and succinate oxidase were inhibited at 10-15% and 20%, respectively. The inhibition of the alternative NADH dehydrogenases by flavone was also suggested through its effect on NADH dehydrogenase and NADH cytochrome *c* reductase in disrupted mitochondria. Flavone also caused a significant depolarization of the inner membrane in mitochondria energized by NADH ou malate/glutamate oxidation. Mitochondria were isolated from embryogenic cells of *A. angustifolia* that had been submitted to temperature changes (cold or heat) and compared to untreated. The PUMP protein was identified in mitochondria from *A. angustifolia* through Western blotting and using this assay we also identified the differences on the protein expression respective to the treated and untreated cells. Polyclonal antibodies for *Arabidopsis thaliana* (AtPUMP) that already are used in the identification of PUMP from several plant species such as potato and tomato, were used in this assay. PUMP protein was visualized as a protein with a molecular mass higher than 33 kDa. Cells exposed at 4°C for 48h increased the expression of PUMP when compared to the unstressed. When cells were exposed to 43°C for 4h the effect seemed to be too severe and caused the disappearance of the protein band. The activity of PUMP protein was evaluated through the addition of BSA to the isolation and/or reaction medium. The values for the respiratory control ratio showed that BSA prevents uncoupling at all stress conditions indicating its inhibitory action on PUMP. Studies concerning the morphology of the embryogenic cells submitted or not to temperature changes showed that cold or heat caused damage to the embryonic and suspensor cells interfering in the cell multiplication with decrease in the quantity and causing deformation of the suspensor cells.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 *Araucaria angustifolia*

*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, conhecido como Pinheiro do Paraná, é uma conífera da família Araucariaceae. Do ponto de vista biogeográfico, esta é uma das famílias mais interessantes entre as gimnospermas, pois representa árvores das mais antigas (SETOGUCHI *et al.*, 1998). É encontrada especialmente no sul do Brasil, principalmente nos planaltos frios dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo a única espécie do gênero de ocorrência natural no Brasil (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981; GUERRA *et al.*, 2000; ZANDEVALLI *et al.*, 2004). As árvores são monóicas, com 10 a 35 metros de altura e 50 - 120 centímetros de diâmetro, os troncos são retos quase cilíndricos, a casca é grossa e resinosa (CARVALHO, 1994).

A árvore teve grande importância econômica no Brasil, sendo muito explorada, pois dela são retiradas madeira, fruto, fibras e resinas. A madeira de alta qualidade tem grande importância nas indústrias, principalmente na produção de papel e móveis. A resina serve de base na produção de verniz, acetona e outros produtos químicos. Seu fruto tem alto valor nutritivo, sendo consumido por humanos e também por animais silvestres. Entre estes destacam-se a gralha-azul (*Cyanocorax caeruleus*) o serelepe (*Scirus aestuans*) e os porcos-do-mato (CARVALHO, 1994; MATTOS, 1994).

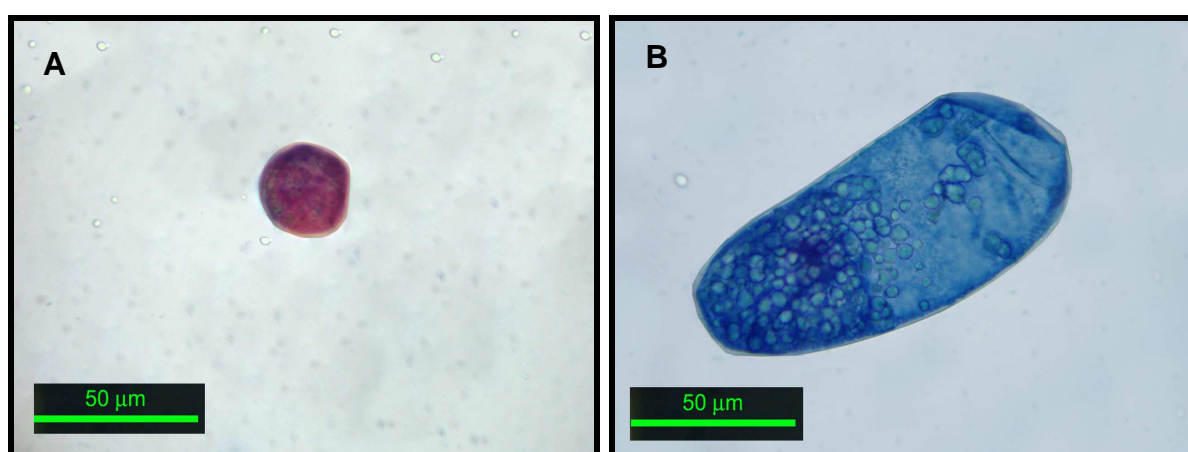
A exploração de *A. angustifolia* intensificou-se a partir de 1934, tendo seu auge entre as décadas de 50 e 70, com produção estável em torno de 2,8 milhões de metros cúbicos de madeira (MATTOS, 1994). No estado de São Paulo, as grandes reservas de mata nativa foram quase totalmente exploradas entre 1930 e 1940. Em 1977, *A. angustifolia* cobria apenas 4,3% da área original no estado do Paraná (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981).

Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* são obtidas quando embriões zigóticos imaturos são retirados de cones femininos imaturos e inoculados no meio básico de crescimento das células (VON ARNOLD & ERIKSSON, 1981). A indução, estabelecimento e multiplicação das culturas embriogênicas e o efeito do ácido

abscísico (ABA) e dos agentes osmóticos na maturação dessas culturas são reportados por Astarita e Guerra (1998), Guerra *et al.*, (2000) e Astarita e Guerra (2000). Alguns fatores afetam a frequência de indução das culturas embriogênicas em coníferas. Em *A. angustifolia* esses fatores estão relacionados com o genótipo da planta mãe, crescimento com fitorreguladores e a escolha do estágio de desenvolvimento do explante (RADOJEVIC *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2002). O estágio de desenvolvimento do embrião zigótico utilizado como explante nas diferentes coletas foi avaliado por meio da coloração com carmim acético e azul de Evans, pois dessa maneira podemos diferenciar as células que compõem as culturas embriogênicas (STEINER *et al.*, 2005).

As culturas embriogênicas de *A. angustifolia* são constituídas de dois tipos de células: a) as células embrionárias, que são isodiamétricas, pequenas, de citoplasma denso e reativas ao carmim acético, resultando em coloração vermelha; b) as células suspensoras, que são alongadas, vacuoladas e permeáveis ao azul de Evans, resultando em uma coloração azul (STEINER *et al.*, 2005) (Figura 1).

As células embrionárias e as células suspensoras apresentam-se agrupadas em agregados celulares presentes nas culturas embriogênicas durante a multiplicação e as células embrionárias estão associadas com a competência da célula para o desenvolvimento celular (STEINER *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006).



**Figura 1. Células embriogênicas de *Araucaria angustifolia***

a) célula embrionária e b) célula suspensora

Culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia* têm sido utilizadas com sucesso em estudos de eficiência do crescimento celular e estudos dos processos bioquímicos e fisiológicos das células (ASTARITA & GUERRA, 1998 e 2000; MINOCHA & MINOCHA, 2004). O crescimento das culturas embriogênicas é geralmente associado ao metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos. O nível dessas substâncias depende das diferentes fases do crescimento (LULSDORF *et al.*, 1992; SILVEIRA *et al.*, 2004), e elas fornecem energia para o crescimento celular (SILVEIRA *et al.*, 2004).

Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* também têm sido empregadas nos estudos do crescimento celular com e sem fitorreguladores, com diferentes fontes de carbono e para os estudos da liberação de proteínas extracelulares (ASTARITA & GUERRA, 1998 e 2000). A suplementação de carbono e dos fitorreguladores ao meio de cultura influencia significativamente as taxas de crescimento das culturas embriogênicas. O meio de cultura suplementado com sacarose apresentou uma alta proliferação celular, especialmente quando combinado com os fitorreguladores. Contudo, a suplementação do meio de cultura com maltose e fitorreguladores resultou em uma redução da proliferação celular (STEINER *et al.*, 2005). A adição exógena de fitorreguladores ao meio de cultura estimula a produção endógena de hormônios, pois culturas que foram suplementadas com fitorreguladores tiveram um aumento no conteúdo endógeno de auxinas. Em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, o conteúdo endógeno de AIA, que é uma auxina natural das plantas, foi diretamente relacionado com a multiplicação celular (FEHÉR *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2004).

O acúmulo das proteínas extracelulares no meio de cultura sugere uma intensiva extrusão celular, que pode ser resultante das modificações bioquímicas na estrutura das células ou da lise celular (ASTARITA & GUERRA, 2000).

Estudos foram realizados com células embriogênicas e tecidos de *A. angustifolia* em diferentes estágios de diferenciação, incluindo a extração de flavonóides (FONSECA *et al.*, 2000; YAMAGUCHI *et al.*, 2005). Yamaguchi e colaboradores isolaram no ano 2005 flavonóides da *Araucaria angustifolia* pertencentes à classe dos biflavonóides: a amentoflavona, o mono-O-metilamentoflavona, o di-O-metilamentoflavona, o ginkgetin, o tri-O-



metilamentoflavona e o tetra-O-metilamentoflavona, que diferem entre si pelo número e posição do grupo methoxil. A fração dos biflavonóides estudada por esse grupo foi isolada, precipitada com solução MeOH – H<sub>2</sub>O (3:7) e analisada por HPLC/MS.

Flavonóides são amplamente encontrados no metabolismo secundário das plantas e possuem propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, anticarcinogênicas entre outras (MIDDLETON & KANDSWAMI, 1986). Os biflavonóides da *A. angustifolia* agiram como seqüestradores de radicais livres e mostraram uma proteção eficiente contra o dano oxidativo, sugerindo serem excelentes candidatos ao uso como antioxidantes e fotoprotetores (YAMAGUCHI *et al.*, 2005).

Mitocôndrias de *A. angustifolia* foram isoladas pela primeira vez por Mariano *et al.*, 2004, pois, até então, constava da literatura científica apenas o isolamento de mitocôndrias de calos cultivados de gimnosperma *Larix x leptoeuropae*, uma espécie híbrida de ocorrência natural (KUMAR *et al.*, 1995). Contudo, o maior objetivo de Kumar e colaboradores (1995) foi o isolamento e caracterização do DNA mitocondrial. As propriedades e funções das mitocôndrias de gimnospermas de *A. angustifolia* ainda não haviam sido caracterizadas tornando relevante o estudo das funções desta organela. O interesse em se estudar mitocôndrias de gimnospermas, em especial a família Araucariaceae, é a sua origem no início da Era Mesozóica, no período Triássico, em comparação com as angiospermas que surgiram depois, no início do período Cretáceo (KERSHAW & WAGSTAFF, 2001). A comparação entre as mitocôndrias desta gimnosperma ancestral e das mitocôndrias de angiospermas estudadas até o momento provoca grande interesse (BEAVIS & VERCESI, 1992; FORTES *et al.*, 2001; CALEGARIO *et al.*, 2003; RUY *et al.*, 2004; CAMACHO *et al.*, 2004).

## 1.2 MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS

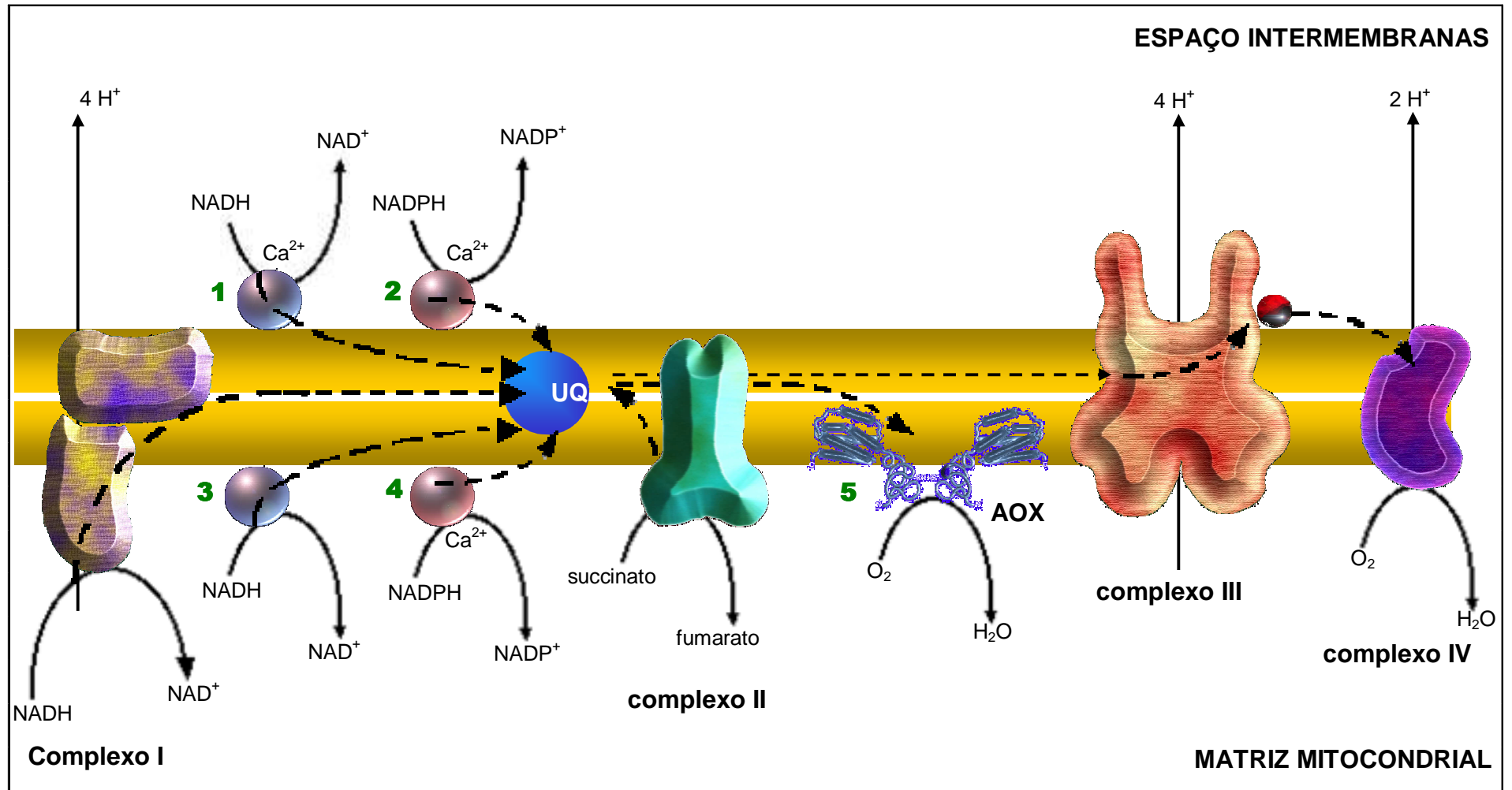
Tanto mitocôndrias de mamíferos quanto de vegetais possuem na membrana mitocondrial interna a cadeia transportadora de elétrons, bombeadora de prótons e produtora de ATP. Porém, mitocôndrias de vegetais possuem além da NADH – UQ

oxidoreductase (complexo I), que é bombeadora de prótons, quatro NAD(P)H desidrogenases (NAD(P)H – DH) não bombeadoras de prótons e insensíveis a rotenona, sendo duas localizadas na face externa da membrana mitocondrial interna (NAD(P)H – DH<sub>ext</sub>), e duas localizadas na face interna da membrana mitocondrial interna (NAD(P)H - DH<sub>int</sub>). Na membrana mitocondrial interna estão também presentes uma oxidase alternativa (AOX) insensível a cianeto e uma proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas PUMP (MØLLER, 2001) (Figura 2).

As duas NAD(P)H - DH localizadas na face externa da mitocôndria são NADH e NADPH específicas, respectivamente, e requerem a presença de Ca<sup>2+</sup> para a atividade máxima. Acredita-se que o Ca<sup>2+</sup> facilite a associação da NAD(P)H - DH<sub>ext</sub> com a membrana mitocondrial e ainda regule a atividade da enzima (KESCHER, 2000). As NAD(P)H - DH localizadas no lado interno da membrana são NADH e NADPH específicas, respectivamente. Entretanto, somente a NADPH - DH<sub>int</sub> é dependente de Ca<sup>2+</sup> para a sua máxima atividade (RASMUSSEN & MØLLER, 1991). As NAD(P)H desidrogenases externas permitem que a mitocôndria vegetal utilize o NAD(P)H exógeno, transferindo elétrons para a ubiquinona, resultando na transferência de elétrons pela cadeia respiratória e na produção de ATP (LUETHY *et al.*, 1991).

A oxidase alternativa (AOX) desvia os elétrons provenientes da ubiquinona, eliminando sua passagem pelos complexos III e IV (SIEDOW & UMBACH, 2000). Esta via alternativa é inibida especificamente por alguns agentes complexantes de ferro, como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o ácido benzohidroxâmico (BHAM) (VANLBERGUE & McINTOSH, 1997).

A proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP) foi descrita primeiramente por Vercesi *et al.*, 1995, em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata e confirmada por clonagem do seu cDNA (LALOI *et al.*, 1997). O aumento da síntese desta proteína tem sido relacionada ao envelhecimento e ao estresse pelo frio, e segundo Møller (2001) funciona como proteção contra as espécies reativas de oxigênio, assim como a AOX e as NAD(P)H desidrogenases alternativas.



**Figura 2. Organização da cadeia respiratória de plantas**

Mitocôndrias de plantas possuem cinco enzimas não bombeadoras de prótons. 1 – NADH desidrogenase externa, 2 – NAD(P)H desidrogenase externa, 3 – NADH desidrogenase interna, 4 – NAD(P)H desidrogenase interna e 5 – Oxidase alternativa. Fonte: MARIANO, 2005

### 1.2.1 NAD(P)H Desidrogenases Alternativas

A atividade de NAD(P)H desidrogenase em mitocôndrias de plantas foi primeiramente observada em 1961 por Bonner e Voss que demonstraram que estas organelas, ao contrário de mitocôndrias de mamíferos, oxidavam o NAD(P)H adicionado externamente (SOOLE & MENZ, 1995). Wiskich e Bonner (1963) observaram que a rotenona e a piericidina A não causavam a completa inibição da oxidação de NADH (SOOLE & MENZ, 1995). Diferentes sensibilidades ao inibidor DPI (*diphenylpicrylhydrazolium*) permitiram a observação de diferentes NAD(P)H desidrogenases presentes na face interna da membrana mitocondrial interna de organelas isoladas de *Solanum tuberosum* e *Arum maculatum* (ROBERTS *et al.*, 1995). Essas diferenças de sensibilidade mostraram a presença de no mínimo duas desidrogenases localizadas na face externa da membrana mitocondrial interna, específicas para diferentes substratos, NADH e NADPH e com diferentes sensibilidades ao inibidor DPI. E, ainda, que essas desidrogenases externas também doavam seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (MØLLER, 2001).

Duas homólogas NADH – DH alternativas não bombeadoras de prótons foram identificadas em leveduras e em *E. coli*, *nda1* e *ndb1*, respectivamente, e também foram identificadas em folhas de batata. O estudo da expressão do gene nas proteínas da cadeia respiratória de mitocôndrias isoladas de folhas de batata revelou que há um aumento da expressão do gene *nda1* durante o desenvolvimento da folha, cuja maturação é completamente dependente da luz, sugerindo que a rota da NDA1 está envolvida com a fotorespiração (SVENSSON & RASMUSSEN, 2001). Foi observado que, depois do estresse pelo frio, houve uma específica diminuição da regulação da transcrição da proteína NDA1, resultando em uma diminuição da capacidade respiratória e na oxidação do NADH adicionado externamente nas mitocôndrias isoladas de folhas de batata. (SVENSSON *et al.*, 2002).

Acredita-se que a dependência da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  para a oxidação de NADH, externamente adicionado à preparação de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (*S. tuberosum*), se deva à presença de uma seqüência específica de aminoácidos na NADH desidrogenase externa, que constituem o domínio EF-hand, produto do gene *ndb1*. Essa seqüência de aminoácidos possui

grande homologia com o domínio EF-hand da NADH desidrogenase interna de *N. crassa*, uma proteína de 64 kDa (MELO *et al.*, 1999).

Já na face interna da membrana mitocondrial interna estão localizadas duas NAD(P)H: ubiquinona oxidoreduases que oxidam NADH e NADPH da matriz competindo com o complexo I. A NADH - DH<sub>in</sub> que oxida NADH, independe da presença de Ca<sup>2+</sup> e a NADPH - DH<sub>in</sub> que oxida NADPH de forma dependente de Ca<sup>2+</sup> e é sensível ao inibidor DPI (MELO *et al.*, 1996). As evidências da presença de diferentes enzimas NAD(P)H desidrogenases, alojadas no lado interno da membrana mitocondrial interna, surgiram com os estudos em partículas submitocondriais invertidas, (*inside-out* - SMP). O potencial elétrico de membrana gerado pela adição de deamino-NADH foi colapsado pela adição de rotenona. A adição subsequente de NADPH gerou um pequeno potencial de membrana que foi colapsado pela adição de DPI, mostrando que a NADPH desidrogenase Ca<sup>2+</sup> dependente é sensível ao DPI (RASMUSSEN & MØLLER, 1991). Na presença de rotenona, condição em que o complexo I está inibido, e DPI, condição em que a NADPH interna está inibida, a adição de NADH gera um rápido consumo de oxigênio e um potencial elétrico de membrana que são inibidos por antimicina A e colapsados, respectivamente (MØLLER, 2001).

Estudos realizados com a cadeia respiratória de plantas, a qual divide semelhanças com a cadeia respiratória de fungos, mostraram que as NADH desidrogenases alternativas são sensíveis à flavona e insensíveis à rotenona (RAVANEL *et al.*, 1981; TUDELLA *et al.*, 2003; UYEMURA *et al.*, 2004; JUÁREZ *et al.*, 2004).

### 1.2.2 Oxidase Alternativa

A AOX é uma proteína de 34 kDa localizada na superfície interna da membrana mitocondrial (DUCET & GAUVRIT, 1977) e foi inicialmente purificada de *Arum maculatum*, *Arum italicum* e *Sauromatum guttatum* (ELTHON & McINTOSH, 1986, 1987).

A oxidase alternativa cataliza a oxidação do ubiquinol e a redução do oxigênio a água, sem bombeamento de prótons e conseqüentemente sem a geração do

gradiente eletroquímico de prótons. Essa enzima não é sensível ao cianeto, antimicina A ou mixothiazol, mas é inibida por agentes complexantes de ferro, os ácidos hidroxâmicos como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o ácido benzohidroxâmico (BHAM) e o tiocianato de potássio, e estimulada por ácidos orgânicos semelhantes ao piruvato (MILLAR *et al.*, 1996).

A proteína AOX é expressa constitutivamente e o gene que codifica a AOX possui regiões que são conservadas, sugerindo que essa via alternativa é uma rota importante no metabolismo da planta (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997). Entretanto a função dessa via não está totalmente esclarecida. A AOX tem sua expressão aumentada quando a planta é exposta a baixas temperaturas e ao ataque de patógenos (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1992, 1997).

Esse tipo de respiração foi melhor definido na florescência termogênica de *Sauromatum guttatum* (MEEUSE, 1975). Neste organismo o calor é produzido e liberado em flores efêmeras durante um único dia de florescência, volatilizando aromas com o objetivo de atrair insetos polinizadores (McINTOSH, 1994).

Alguns estudos têm proposto que a AOX pode prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) em resposta ao estresse (WAGNER, 1995; MILLAR & DAY, 1996, 1997; MAXWELL *et al.*, 1999; CALEGARIO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004). As proteínas AOX e PUMP mostraram similaridades fisiológicas, pois ambas são dissipadoras de energia (SIEDOW & BERTHOLD, 1986; VERCESI *et al.*, 1995; WAGNER & KRAB, 1995; CALEGARIO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004) e protetoras contra EROS. Além disso, AOX e PUMP têm sido estimuladas por baixas temperaturas (ELTHON *et al.*, 1986; LALOI *et al.*, 1997; NANTES *et al.*, 1999; CALEGARIO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004). Apesar dessa similaridade, essas proteínas podem ter diferentes funções. De fato, AOX e PUMP são reguladas de modo inversamente proporcional pelos ácidos graxos livres. A PUMP é ativada pelo aumento da concentração de ácidos graxos enquanto que a atividade da AOX é progressivamente diminuída, sugerindo que as proteínas não podem expressar a atividade máxima simultaneamente (SLUSE *et al.*, 1998; CALEGARIO *et al.*, 2003).

As proteínas AOX são classificadas em duas subfamílias, AOX1 e AOX2, codificadas por genes nucleares (CONSIDINE *et al.*, 2002). Membros da família

AOX1, presentes em mono e dicotiledôneas, são mais largamente estudados, sendo regulados de maneira diferenciada em diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento, além de responderem ao estresse. AOX2, por outro lado, possui expressão gênica constitutiva e está presente somente em dicotiledôneas (CONSIDINE *et al.*, 2002). Essa distinção molecular sugere uma divergência entre as AOX nas famílias de plantas e pode ter implicações nas rotas fisiológicas nas diferentes espécies de plantas (CONSIDINE *et al.*, 2002).

### 1.2.3 Proteína Desacopladora de Plantas

Em animais, a temperatura do corpo pode ser elevada pela ação da proteína desacopladora (UCP1), a qual dissipa o gradiente eletroquímico de prótons da membrana mitocondrial produzindo calor e diminuindo a síntese de ATP (LALOI *et al.*, 1997). Em 1995, Vercesi *et al.* constataram a presença de uma proteína desacopladora mitocondrial de plantas, com características muito parecidas com a proteína desacopladora (UCP1) de tecido adiposo marrom, que foi chamada de PUMP. A descoberta da PUMP iniciou a procura por novas UCP homólogas em mamíferos. Entre 1997 e 2000, quatro homólogas da UCP foram descobertas; UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5, também chamada de BMCP. A UCP2 é expressa em todos os tecidos, a UCP3 é específica do músculo esquelético e a UCP4 e UCP 5 são encontradas somente no cérebro (RICQUIER & BOUILLAUD, 2000).

A proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP) foi primeiramente isolada de tubérculos de batata (VERCESI *et al.*, 1995) e tomate (JESEK *et al.*, 1997) utilizando métodos que foram aplicados para mitocôndrias de tecido adiposo marrom. A fração protéica da PUMP foi obtida após a solubilização das proteínas mitocondriais em cromatografia de coluna de hidroxapatita. Após a reconstituição dessa fração protéica em proteolipossomos, na presença de carboxiatractilato, que é um inibidor do translocador de nucleotídeos, a PUMP foi capaz de realizar o transporte de H<sup>+</sup> (JESEK *et al.*, 1998 e 2000).

A PUMP é uma proteína integral de membrana com cerca de 300 aminoácidos e com massa molecular aparente de 30 a 33 kDa (VERCESI *et al.*, 2006). Essa proteína é similar à proteína desacopladora de mitocôndrias de animais

(UCP). O alinhamento da seqüência de aminoácidos da PUMP de *Solanum tuberosum* (StPUMP) e de *Arabidopsis thaliana* (AtPUMP) com a seqüência de UCP de animais mostra que essas proteínas possuem 41% de similaridade com a UCP1 e 43% (StPUMP) e 46% (AtPUMP) de similaridade com a UCP2 (RICQUIER *et al.*, 2000; LALOI, 1999; JESEK & URBANKOVA, 2000).

Laloi *et al.* em 1997, identificaram o DNA complementar da batata (*Solanum tuberosum*) que codifica para a proteína desacopladora de plantas, chamada StUCP. Mais tarde, Maia *et al.* (1998) identificaram o gene da *Arabidopsis*, AtPUMP, que exhibe similaridade com a StPUMP. Recentemente, genes que codificam para a PUMP foram identificados em algumas espécies de mono e dicotiledôneas. Foram identificados seis genes que codificam para PUMP (AtPUMP1-6) no genoma de *Arabidopsis* e cinco homólogos (SsPUMP1-5) também foram encontrados para a cana-de-açúcar (*Brazilian sugarcane*) (VERCESI *et al.*, 2006).

A ativação da PUMP é feita por ácidos graxos de cadeia longa como o ácido linolênico, ácido linoléico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido mirístico e ácido láurico e é inibida por BSA, ATP, GTP, GDP e ADP (JESEK *et al.*, 1996; VERCESI *et al.*, 1998). Em estudos realizados com mitocôndrias de tubérculos de batata, a PUMP foi ativada pela adição de ácido linoléico, e ocorreu uma diminuição da produção EROS nessas mitocôndrias. Quando a PUMP foi inibida, ocorreu um aumento do peróxido de hidrogênio (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998). Coerentemente, a ativação da UCP em tubérculos de alcachofra de Jerusalém por ácidos graxos está relacionada com a diminuição de EROS e com a diminuição da produção de ânions superóxidos (PAVENTI *et al.*, 2006).

Um dos muitos mecanismos propostos para explicar como a mitocôndria diminui a produção de EROS envolve o desacoplamento entre a respiração e a síntese de ATP, resultando no aumento da velocidade respiratória. A UCP, bem como a AOX, são vias dissipadoras da energia (SKULACHEV, 1996).

As funções fisiológicas das UCP estão divididas em diferentes grupos, como a geração dos metabólitos da termogênese (NICHOLLS & RIAL, 1999), resposta ao estresse (MØLLER, 2001), controle da geração das espécies reativas de oxigênio (EROS) pela mitocôndria (SKULACHEV, 1996) e regulação do metabolismo energético (SLUSE & JARMUSZKIEWICZ, 2000). A função da UCP, em cada um



desses casos, está relacionada à capacidade desacopladora e ao metabolismo específico de cada tecido (VERCESI *et al.*, 2006). O desacoplamento mitocondrial reduz drasticamente a formação de ânion superóxido pela cadeia transportadora de elétrons (SKULACHEV, 1996; MIWA & BRAND, 2003) e assim fornece um mecanismo de *feedback* pelo qual a UCP pode limitar a quantidade de EROS produzida pela mitocôndria.

A indução da PUMP pode ocorrer em conseqüência ao aumento da produção de EROS, por diferentes formas de estresse, como ataque de patógenos (MAXWELL *et al.*, 2002), estresse mecânico, aumento da luz, secas e baixas ou altas temperaturas (APEL & HIRT, 2004). A PUMP teve sua expressão aumentada no estresse pelo frio em várias plantas, incluindo as mitocôndrias de folhas de batata (LALOI *et al.*, 1997) e em *arabidopsis* (MAIA *et al.*, 1998). Em mitocôndrias de tubérculos de batata que sofreram estresse pelo frio, também houve um aumento da expressão da PUMP com a conseqüente estimulação da respiração (CALEGARIO *et al.*, 2003).

### **1.3 ESTRESSE**

Estresse é qualquer fator que promove uma situação desvantajosa para a planta e está intimamente ligado com o processo de aclimação o qual resulta em alterações transientes da expressão gênica e produção de compostos específicos durante a exposição da planta as condições de estresse. Entretanto, cada planta responde de uma maneira, pois uma determinada condição ambiental que é desfavorável para uma planta pode não ser para outra espécie de planta. Por exemplo, a comparação da temperatura de crescimento da ervilha (*Pisum sativum*) com a soja (*Glycine max*). Enquanto a ervilha cresce a uma temperatura de até 20°C a soja desenvolve-se melhor em temperaturas de 30°C ou mais, sem apresentar sintomas de estresse por altas temperaturas (TAIZ & ZEIGER, 1998; NOGUEIRA, 2004).

Estresses abióticos ou ambientais e estresses bióticos podem alterar o funcionamento das organelas celulares e como as plantas são muito sensíveis, pois não podem se locomover, elas desenvolveram algumas estratégias para se proteger

contras esses estresses. Em resposta a essas alterações as células necessitam aclimatar-se as essas novas condições impostas de solo, temperatura e clima aumentando ou diminuindo a produção de um determinado gene (CHERRY, 1994; NOGUEIRA, 2004). Por isso, não é de se surpreender que as suas respostas celulares, moleculares e bioquímicas sejam extremamente complexas (KEEGSTRA & THOMASHOW, 2002).

Um dos principais estresses ambientais é aquele relacionado com os extremos de temperatura. Cada espécie de planta possui uma temperatura ideal de crescimento e a sua distribuição geográfica é determinada pela faixa de crescimento na qual a espécie é capaz de sobreviver. Enquanto plantas de climas temperados ou frios toleram temperaturas em torno de -30°C durante o inverno, já as plantas de clima equatorial ou quentes toleram temperaturas de até 60°C durante o verão (THOMASHOW, 1999; NOGUEIRA, 2004).

O frio é um dos mais importantes estresses ambientais, pois afeta o crescimento das plantas e a produtividade agrícola. Plantas de clima tropical e subtropical são geralmente sensíveis ao estresse pelo frio e os efeitos podem variar dependendo do tipo e duração do estresse, e do estágio do desenvolvimento vegetal (TAIZ & ZEIGER, 1998; DU *et al.*, 1999; NOGUEIRA, 2004).

Estresse por baixas temperaturas promove um aumento na produção de EROS que podem funcionar tanto como indutor dos mecanismos de tolerância ao estresse quanto como agentes causadores de injúrias e morte celular (PRASAD *et al.*, 1994; NOGUEIRA, 2004).

#### **1.4 FLAVONÓIDES**

Flavonóides são compostos fenólicos de baixo peso molecular, derivados benzo-y-pironas e amplamente distribuídos na natureza. Compõem um grande grupo de metabólitos secundários das plantas, compreendendo cerca de 9 mil estruturas químicas diferentes (BORS *et al.*, 1990; MIDDLETON & KANDASWAMI, 1986; HEIN *et al.*, 2002; WILLIAMS & GRAYER, 2004).

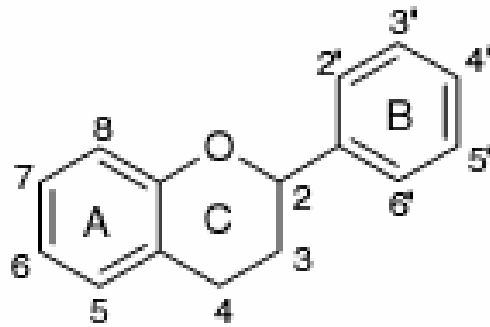
Possuem diversas funções no metabolismo das plantas, como proteção contra luz UV, coloração e odor das flores, e defesa das plantas contra patógenos.

Outras aplicações dos flavonóides estão relacionadas com a agricultura, nutrição humana, aos efeitos farmacológicos, como com a prevenção e tratamento do câncer (MARTENS & MITHÖFER, 2005).

Os flavonóides são encontrados em abundância na dieta humana, já que estão presentes em alimentos vegetais como frutas, sementes, nozes e produtos alimentícios derivados de vegetais, como azeite de oliva, chá e vinho tinto. Estes compostos são importantes para a nutrição e saúde, pois desencadeiam importantes efeitos biológicos (MARTENS & MITHÖFER, 2005). Exibem funções antiinflamatória (HAVSTEEN, 1983; MIDDLETON & KANDASWAMI, 1986; ARTS & HOLLMAN, 2005), antialérgica (HAVSTEEN, 1983; MIDDLETON & KANDASWAMI, 1986), antiviral (HAVSTEEN, 1983; MIDDLETON & KANDASWAMI, 1986), cardioprotetora (BISNACK *et al.*, 2001; KROMHOUT, 2001; MARTENS & MITHÖFER, 2005), antihipertensiva (DUARTE *et al.*, 2001), antioxidante (KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994; HAVSTEEN, 2002), antibacteriana (MARTENS & MITHÖFER, 2005). É importante considerar que o aumento ou diminuição da atividade biológica de cada composto depende da classe do flavonóide, da estrutura e da posição dos substituintes (MARTENS & MITHÖFER, 2005).

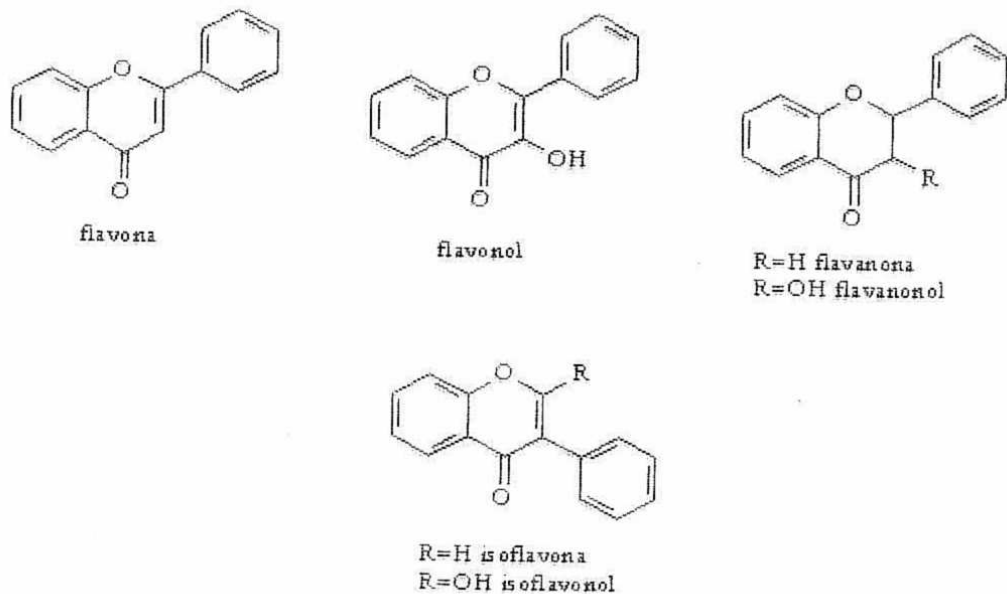
Nas plantas, os flavonóides são geralmente encontrados na forma glicosilada (KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994). Entretanto, podem também ser encontrados na forma metilada ou agliconada. A forma glicosilada normalmente é encontrada nos vacúolos, enquanto que a forma agliconada pode estar presente em regiões lipofílicas como glândulas de óleo (WOLLENWEBER & DIETZ, 1982).

Sua estrutura fundamental é constituída de dois anéis benzênicos (A e B) ligados por três átomos de carbono, que podem ou não formar um terceiro anel (C). A numeração dos anéis A e C é feita com números ordinários, enquanto que o anel B é numerado utilizando-se apóstrofo (BORS *et al.*, 1990; BRAVO, 1998) (Figura 3).



**Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides**

São conhecidas dez classes de flavonóides que possuem o mesmo núcleo básico (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991). O composto é classificado de acordo com seus constituintes, sendo a flavona a estrutura base dos flavonóides (HEIN *et al.*, 2002) (Figura 4).



**Figura 4. Estrutura geral de algumas classes de flavonóides**

Foi demonstrado que um grande número de flavonóides afeta o transporte de elétrons e o consumo de oxigênio em mitocôndrias de plantas e animais (ERNEST *et al.*, 1963; RAVANEL *et al.*, 1981; RAVANEL, 1986; HODNICK *et al.*, 1987; TUDELLA *et al.*, 2003; JUÁREZ *et al.*, 2004). Este é um dado importante, considerando-se que além do papel central no metabolismo energético, as mitocôndrias estão envolvidas no processo de morte celular programada (KANTROW *et al.*, 2000).

Muitos flavonóides inibidores da transferência de elétrons têm sua ação sobre a fração flavoproteína, (FP) do complexo I, com variável eficiência, dependendo do flavonóide. A rotenona, por exemplo, é um derivado dos flavonóides e inibe de forma específica o complexo I, não sendo, portanto surpreendente que outros flavonóides também causem inibição deste complexo enzimático (ERNSTER *et al.*, 1963; RAVANEL *et al.*, 1981).

Foi demonstrado que a flavona tem ação eficiente sobre as NADH desidrogenases interna e externa de algumas plantas e fungos (RAVANEL *et al.*, 1981; RAVANEL *et al.*, 1982; TUDELLA *et al.*, 2003; UYEMURA *et al.*, 2004; JUÁREZ *et al.*, 2004). Todas as formas da NADH desidrogenase parecem ser afetadas, mas uma inibição mais pronunciada ocorre quando o NADH exógeno é utilizado (RAVANEL *et al.*, 1981). Em um estudo onde foram relacionadas estruturas dos flavonóides com a atividade da succinato oxidase, verificou-se que os flavonóides que apresentam anel catecol em B demonstram maior efeito inibitório (HODNICK *et al.*, 1986).

Diversos trabalhos mostram a atividade desacopladora dos flavonóides. Mathiesen e colaboradores (1996) testaram a atividade de alguns flavonóides em mitocôndrias de fígado de rato e observaram um efeito desacoplador semelhante àquele provocado por 2,4 – dinitrofenol (DNP), um desacoplador clássico. A propriedade desacopladora dos flavonóides também foi demonstrada em mitocôndrias de plantas, em que foi mostrada a relação entre a estrutura e a atividade desacopladora de uma série de flavonóides. Verificou-se que a presença de grupamentos hidroxila nas posições 4' e 7 e a característica lipofílica da molécula são condições que favorecem o desacoplamento (RAVANEL, 1986).

É importante considerar que a atividade citotóxica da flavona pode resultar ou de alterações na bioenergética celular e ou da inibição da respiração mitocondrial

(HODNICK *et al.*, 1988). Desse modo, o estudo do efeito da flavona em mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia* constitui um dos grandes objetivos deste trabalho.

## 2 JUSTIFICATIVAS

Na literatura científica são escassos os estudos que caracterizam as propriedades das mitocôndrias de *A. angustifolia*. Destacam-se os trabalhos de Mariano (MARIANO *et al.*, 2004; MARIANO, 2005) que estabeleceram a técnica de isolamento de mitocôndrias intactas cujas propriedades funcionais foram preservadas. Alguns aspectos importantes foram descritos nestes estudos, como os mecanismos envolvidos no transporte de cálcio e a presença, nestas organelas, das desidrogenases alternativas, da AOX e da PUMP. No entanto, muito ainda falta para ser investigado e esclarecido. É fundamental, por exemplo, analisar de forma mais detalhada as características das desidrogenases alternativas, da AOX e da PUMP, uma vez que estas proteínas estão envolvidas na resposta ao estresse (SIEDOW *et al.*, 1995). Neste contexto, sabe-se que estresses ambientais ou abióticos representam um dos principais fatores que limitam a sobrevivência das plantas, que por sua vez, necessitam aclimatar-se às condições adversas do solo, clima e temperatura. A aclimação envolve alterações transientes da expressão gênica e produção de compostos específicos durante a exposição dos organismos às condições desfavoráveis (TAIZ & ZEIGER, 1998; KEEGSTRA & THOMASHOW, 2002). A indução da PUMP, por exemplo, pode ocorrer como consequência do aumento de espécies reativas de oxigênio, em resposta à diferentes tipos de estresse, como o resultante do ataque de patógenos (MAXWELL *et al.*, 2002), o estresse mecânico ou os causados por variação na intensidade de luz, de temperatura e umidade (APERL & HIRT, 2004). Em mitocôndrias de tubérculos de batata, Calegario *et al.* (2003) descreveram o aumento da expressão da PUMP em resposta ao estresse pelo frio. Entretanto, para gimnospermas não existem relatos na literatura a este respeito, tornando relevante a avaliação do efeito do estresse por temperatura sobre a expressão da PUMP, o que seria uma informação inédita na literatura.

Os flavonóides possuem as atividades antioxidante e seqüestradora de radicais livres bem documentadas em mitocôndrias de plantas e animais (MARTENS & MITHOFER, 2005). Já para as flavonas, pertencentes a esta classe de compostos, são atribuídos efeitos inibitórios sobre o transporte de elétrons na cadeia respiratória

(RAVANEL *et al.*, 1981; RAVANEL, 1986; HODNICK *et al.*, 1987; TUDELLA *et al.*, 2003; UYEMURA *et al.*, 2004; JUÁREZ *et al.*, 2004), porém, nenhuma informação é descrita em relação aos seus efeitos sobre os níveis de EROS em condições de estresse por variação de temperatura em mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia*. O presente estudo busca também acrescentar esta informação à literatura, no intuito de contribuir para o entendimento dos eventos bioquímicos que ocorrem nestas plantas em resposta ao estresse.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar as funções mitocondriais de *A. angustifolia* objetivando o conhecimento de alguns aspectos da bioenergética mitocondrial dessa espécie vegetal, bem como determinar o efeito do estresse sobre os componentes alternativos da cadeia respiratória.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Em mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*:

- a) Determinar a velocidade do consumo de oxigênio utilizando malato/glutamato e succinato como substratos oxidáveis.
- b) Avaliar o efeito da flavona sobre os componentes da cadeia respiratória.
- c) Avaliar o efeito da flavona sobre o potencial elétrico de membrana.
- d) Avaliar o efeito da flavona sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória.
- e) Confirmar a presença da oxidase alternativa (AOX) utilizando malato/glutamato e NADH como substratos oxidáveis.
- f) Identificar e determinar a atividade da proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP).
- g) Determinar a variação da expressão e atividade da PUMP em mitocôndrias submetidas ou não ao estresse pelo frio e calor.

Em células embriogênicas de *A. angustifolia* realizar análise microscópica após submeter ou não ao estresse pelo frio e pelo calor.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

HEPES, EGTA, EDTA, glutamato de sódio, succinato de sódio, NADH, ATP, ADP, FCCP, rotenona, BSA, BSA essencialmente desprovido de ácidos graxos, citocromo c, SHAM, piruvato, safranina O, cisteína, flavona, mio – inositol, ácido nicotínico, piridoxina – HCl, glicina, tiamina – HCl, glutamina, 2,4 – D, BAP, cinetina e caseína hidrolisada foram adquiridos da Sigma Chemical Co<sup>®</sup>. (EUA).

Hidróxido de potássio, sacarose, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico e DMSO foram adquiridos da Merck<sup>®</sup> do Brasil.

Os demais reagentes utilizados foram do melhor grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água deionizada através de sistema purificador Millipore MilliQ<sup>®</sup>.

O anticorpo policlonal de *Arabidopsis thaliana* (AtPUMP) foi gentilmente doado pelo professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi e Dr. Jiri Borecký do Laboratório de Bioenergética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A cultura inicial das células embriogênicas de *A. angustifolia*, originada a partir do tecido de embriões zigóticos foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Miguel Pedro Guerra do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal no Departamento de Fitotecnia no Centro de Ciências Agrárias na Universidade Federal de Santa Catarina.

### 4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia*

As culturas embriogênicas foram originadas a partir de tecido de embrião zigótico de *A. angustifolia*, e foram cultivadas em meio de cultura básico sólido BM (GUPTA & PULLMAN, 1991), suplementado com: mio–inositol 55 mmol.L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 8 nmol.L<sup>-1</sup>, piridoxina–HCl 5 nmol.L<sup>-1</sup>, glicina 50 nmol.L<sup>-1</sup>, tiamina–HCl 6

nmol.L<sup>-1</sup>, glutamina 6,8 mmol.L<sup>-1</sup>, ácido 2,4–diclorofenóxiacético 2 μmol.L<sup>-1</sup>, benzilaminopurina 0,5 μmol.L<sup>-1</sup>, cinetina 0,5 μmol.L<sup>-1</sup>, sacarose a 3% (m/v), caseína a 0,5 % (m/v) e Phytigel (Sigma<sup>®</sup>) a 2% (m/v) (SANTOS *et al.*, 2002). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com KOH antes de ser autoclavado a 121°C (1 atm) por 20 minutos. As soluções de L–glutamina e de hidrolisado de caseína foram filtradas através de uma membrana esterilizante de 25 mm de diâmetro e 0,22 μm de poro e adicionadas ao meio de cultura autoclavado e frio.

Para manutenção do tecido vegetal as culturas embriogênicas foram cultivadas por 20 dias, no escuro em temperatura de 25 ± 0,5°C e umidade relativa do ar igual a 70% ± 5. A cada 20 dias as culturas foram repicadas e transferidas para placas de Petri contendo o meio BM.

#### **4.3 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE *Araucaria angustifolia***

Mitocôndrias foram isoladas de culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, através de centrifugações diferenciais pela técnica desenvolvida por Mariano e colaboradores (2004), como descrito a seguir. Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de 15 – 17 dias foram transferidas para um béquer na presença do meio de extração gelado a 4°C contendo sacarose 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,6), EGTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, cisteína 3 mmol.L<sup>-1</sup> e BSA 0,2 g%. Utilizando uma tesoura o material foi reduzido a pequenos fragmentos. Em seguida, o tecido foi homogeneizado utilizando-se o homogeneizador van Potter–Elvehjem (10 vezes com o pistilo frouxo e 10 vezes com o pistilo apertado) e rompido em homogeneizador Turrtec através de ciclos de 4 segundos na presença de meio de extração gelado a 4°C. A proporção de meio utilizado foi de 200 mL para 35 g de tecido. O homogenato foi filtrado através de tecido gabardine e o pH foi ajustado para 7,2 com NaOH. O filtrado foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 x g e o sobrenadante foi centrifugado por 10 minutos a 15.000 x g. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em meio de isolamento (sacarose 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2), EGTA 0,25 mM, BSA 0,2 g%) e transferidos para um único tubo. Este foi centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 15.000 x g por 10 minutos, e o precipitado, contendo

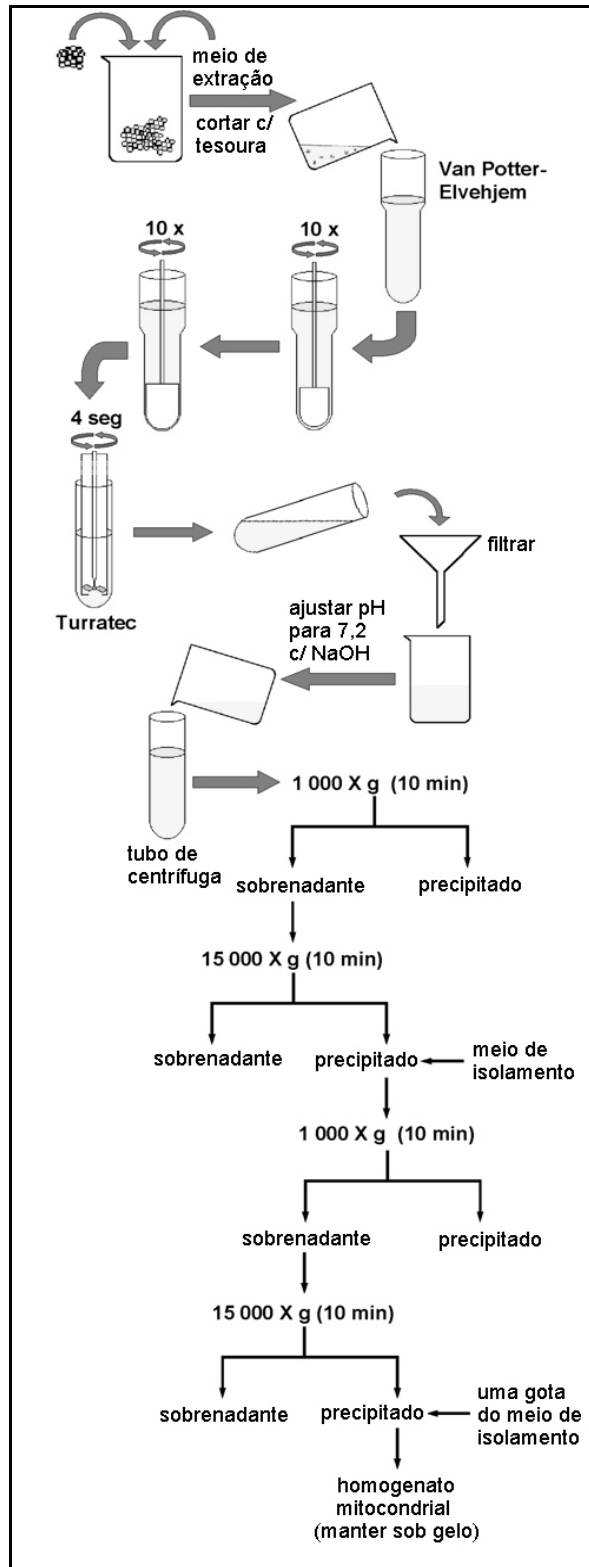
a fração mitocondrial, foi ressuspensa em meio de isolamento de modo a obter uma suspensão correspondente a aproximadamente 10–20 mg de proteína por mL. Um esquema do isolamento de mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia* está representado na Figura 5.

#### **4.4 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE *Araucaria angustifolia* TRATADAS PELO FRIO E PELO CALOR**

As culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia* foram submetidas ao estresse pelo frio e pelo calor. No estresse pelo frio as placas de Petri com as culturas de araucária foram deixadas por 24h e por 48h a uma temperatura de  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$  em uma sala refrigerada, na ausência da luz. Já no estresse pelo calor as placas de Petri com as culturas de araucária foram deixadas por 4h em estufa a  $43 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e por 12h em uma estufa a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, essas células foram utilizadas para o isolamento de mitocôndrias segundo o item 4.3. As mitocôndrias das células submetidas ao estresse, foram utilizadas para analisar os efeitos provocados pelo frio e calor no controle respiratório e na expressão da PUMP pela técnica de *western blot*. Para uma melhor visualização da atividade da PUMP foram isoladas mitocôndrias utilizando meios de extração, isolamento e de reação que continham ou não BSA desprovido de ácidos graxos.

#### **4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS**

As concentrações de proteínas das suspensões mitocondriais foram determinadas pelo método descrito por Lowry *et al.*, (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão. As leituras foram realizadas a 700 nm em espectrofotômetro HITASHI 2001 acoplado a uma impressora Epson LX 300.



**Figura 5. Isolamento de mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia***

Fonte: MARIANO *et al.*, 2004

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

O consumo de  $O_2$  foi determinado a uma temperatura de  $29^\circ\text{C}$  com eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) em câmara fechada termostaticada em polarógrafo Gilson. O sistema de reação em um volume final de 1,3 mL foi denominado meio de reação padrão e sendo constituído de sacarose  $250\text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $2\text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10\text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2), BSA 0,2 g% e rotenona  $40\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  (exceto quando indicado) e proteína mitocondrial em quantidades adequadas para cada experimento. Este meio foi suplementado com os substratos malato  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ , glutamato  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ , succinato  $5\text{ mmol.L}^{-1}$  ou NADH  $2\text{ mmol.L}^{-1}$  conforme indicado nas figuras. Outras adições foram feitas de acordo com o protocolo seguido no dia do experimento. O coeficiente de controle respiratório (CCR) foi obtido da razão entre a velocidade respiratória no estado 3 e estado 4, e serviu como determinante da qualidade da preparação (CHANCE & WILLIAMS, 1955). Neste caso o meio foi suplementado com Pi  $2\text{ mmol.L}^{-1}$ , malato  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ , glutamato  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ , ADP 80 nmol e 160 nmol por mg de proteína.

As velocidades respiratórias foram expressas em nanomoles de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, considerando-se que a solubilidade do oxigênio na água a  $29^\circ\text{C}$  e 1 atmosfera é de  $296,40\text{ }\mu\text{mol}$  por litro (ESTABROOK, 1967).

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ( $\Delta\psi$ )

O potencial elétrico de membrana foi acompanhado fluorometricamente através da variação da fluorescência da safranina O em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC acoplado a uma impressora (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976). O sistema de incubação foi constituído de sacarose  $250\text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES- $K^+$  (pH 7,2)  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA 0,1 g%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $1\text{ mmol.L}^{-1}$ , rotenona  $5\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  e safranina O  $5\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ , usando os comprimentos de onda de 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão) com abertura de fenda de 3 nm (excitação e emissão). A medida do potencial de membrana foi iniciada com succinato  $2\text{ mmol.L}^{-1}$ , malato  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ , glutamato  $10\text{ mmol.L}^{-1}$  ou NADH  $2\text{ mmol.L}^{-1}$  conforme indicado.

## 4.8 WESTERN BLOT

### 4.8.1 Eletroforese de Proteína

O procedimento utilizado foi descrito por Laemmli (1970) e foi desenvolvido no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio, sob o acompanhamento dos Professores Dr.<sup>a</sup> Rose Adele Monteiro e Dr. Emanuel Maltempo de Souza. As amostras, contendo a proteína a ser analisada, foram submetidas à separação eletroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE) em sistema vertical utilizando o sistema do fabricante BioRad. A concentração do gel separador utilizado foi de 12% e do gel de empilhamento foi de 4%.

As amostras contendo 100 µg de extrato mitocondrial de células embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas ou não ao estresse pelo frio por 24h e 48h a 4°C e pelo calor por 12h a 37°C e por 4h a 43°C e de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum* L., cv. Bintje) submetido ou não ao estresse pelo frio por 5 dias a 4°C foram misturadas com tampão de amostra contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 6,8 e 5% de β-mercaptoetanol e foram fervidas a 100°C por 5 min antes da aplicação. A voltagem da corrida variou de 100 a 200V, utilizando o tampão de corrida Laemmli com 3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS. Após a corrida em gel de eletroforese, um gel foi utilizado para a transferência das proteínas e no outro as proteínas foram coradas com corante Coomassie Blue.

### 4.8.2 Transferência das Proteínas

As proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para a membrana de PVDP Hybond<sup>®</sup> e utilizando um sistema semi – seco, com tampão de transferência A1, A2 e C e foi transferido por 1h a 80 mA. Os três tampões utilizados foram preparados da seguinte maneira: Tampão A1: 150 mL de Tris, 50 mL de metanol e 50 mL de água; Tampão A2: 12,5 mL de Tris, 50 mL de metanol e 187,5 mL de água; Tampão C: 12,5 mL de Tris, 25 mL de ácido capróico, 162,5 mL de água e 50 ml de metanol. Os tampões de transferência foram preparados usando soluções

estoques com as concentrações de Tris  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 10 e ácido capróico  $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$  e a membrana foi ativada com metanol por 10 segundos, depois lavada 2 vezes com água destilada e colocado no tampão A2.

A placa do ânodo foi molhada com tampão A1 e coberta com duas camadas de papel de filtro encharcadas com tampão A1. Sobre os 2 papeis filtros, foi colocado 1 camada de papel filtro encharcadas com tampão A2, depois foi colocado a membrana previamente molhada com tampão A2. Em seguida, o gel de poliacrilamida contendo as proteínas foi colocado sobre a membrana que estava encharcada com o tampão A2. Sobre o gel foram colocadas 3 camadas de papel filtro encharcados em tampão C. Uma pipeta de vidro foi utilizada para retirar as bolhas de ar e o excesso de tampão foi retirado com um papel de filtro. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas do papel filtro e o sistema foi ligado.

Após a transferência da membrana de PVDP Hybond™ P foi então incubada por 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante a noite, em tampão TBST (Tris  $2,42 \text{ g.L}^{-1}$  pH 7,6, NaCl  $8 \text{ g.L}^{-1}$  e tween 20  $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ), contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico) com a finalidade de bloquear sítios reativos da membrana. Após esse período a membrana foi tratada com o anticorpo primário (AtPUMP) diluído 1:1000 em tampão TBST-1% leite. Para o anticorpo anti-AtPUMP, extratos celulares totais de *E. coli* sonificados foram utilizados para bloquear interações inespecíficas do anticorpo com outras proteínas.

A incubação do anticorpo com a membrana foi feita sob leve agitação por 5 horas à temperatura ambiente. Após incubação, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 15, 5 e 5 minutos cada, com tampão TBST. Após a lavagem, a membrana foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a peroxidase (HRP) diluído 1:5000 em tampão TBST-1% leite. Após incubação a membrana foi lavada 4 vezes sob agitação, durante 15, 5, 5 e 5 minutos cada, com tampão TBST. A detecção das proteínas reconhecidas pelo anticorpo foi feita através da reação da peroxidase por quimioluminescência (sistema ECL Plus, GE Healthcare) de acordo com as orientações do fabricante. A revelação da membrana foi feita em câmara escura e o resultado foi registrado utilizando uma câmera CCD, em um sistema acoplado vídeo-imagem (UVP).



#### 4.9 PREPARO DA SUSPENSÃO DE MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS

Mitocôndrias foram isoladas de *A. angustifolia*, conforme descrito no item 4.3 e foram congeladas em nitrogênio líquido, até o momento da sua utilização. As organelas foram rompidas por 4 ciclos de congelamento e descongelamento. Os fragmentos de membrana foram utilizados para a avaliação da atividade de enzimas de complexos da cadeia respiratória.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

Determinação da atividade de enzimas ligadas à cadeia respiratória foi realizada em preparações de mitocôndrias rompidas como descrito no item anterior. Os métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos em espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300.

A atividade do complexo NADH-Desidrogenase (EC 1.6.5.3 - NADH: ferricianeto óxido-redutase) foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por SINGER (1974). A reação ocorreu a 28°C, em sistema de reação constituído de: tampão Hepes 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, NADH 0,17 mmol.L<sup>-1</sup>, ferricianeto de potássio 0,6 mmol.L<sup>-1</sup>, rotenona 1 µmol.L<sup>-1</sup> e proteína mitocondrial em concentração adequada (0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial). A reação foi monitorada a 420 nm e os resultados expressos em micromol de ferricianeto reduzido. min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de 1.040 mol.L<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup> (CREUTZ & SUTIN, 1973).

A atividade da NADH citocromo c redutase (EC 1.6.99.3 - NADH: Citocromo c óxido redutase) foi avaliada pelo método descrito por SOMLO (1965), em sistema de reação constituído de: tampão Hepes 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup>, NADH 50 µmol.L<sup>-1</sup>, citocromo c (oxidado) 40 µmol.L<sup>-1</sup>, NaCN 1 mmol.L<sup>-1</sup> e proteína mitocondrial em concentração adequada (0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial). A reação ocorreu a 28°C e foi iniciada pela adição de NADH. A velocidade de redução do citocromo c foi acompanhada a 550 nm e o resultado expresso em nmol de citocromo c reduzido. min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial, considerando-se a

diferença no coeficiente de extinção do citocromo c (red-ox) a 550 nm de 19.000 mol.L<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup> (KEYHANI & KEYHANI, 1975).

#### **4.11 ANÁLISES MICROSCÓPICAS DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia***

As culturas das células embriogênicas de *A. angustifolia* foram submetidas ao estresse pelo frio por 24h e por 48h a uma temperatura de  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$  em uma sala refrigerada, na ausência da luz e no estresse pelo calor por 4h na estufa a  $43 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e à 12h em uma estufa a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, estas células, e também aquelas não submetidas a estresse foram analisadas por meio de coloração com carmim acético (1%) e azul de Evans (0,5%) de acordo com Durzan, (1988).

Em uma pequena quantidade de massa celular contendo as células suspensoras e embrionárias, foram adicionadas gotas de azul de Evans (0,1%) (peso/volume) e foi deixado descansar por 2 a 3 minutos, em lamina de vidro ou relógio.

Retirou-se o excesso de azul de Evans e foram adicionadas gotas do carmim acético (2%) (peso/volume) pelo mesmo período de tempo. Após a retirada do excesso de corante, parte do material foi transferido para uma lâmina, colocou-se a lamínula, e as células foram analisadas através de um microscópio óptico Quimis, modelo Motic BA200 nos aumentos de 4x e 10x e registradas em câmera digital Sony Cybershot DSC-W7 7.2 megapixels.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DO CONTROLE RESPIRATÓRIO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE *A. angustifolia*

O controle respiratório *in vivo* representa uma função bastante complexa e seus valores variam entre mitocôndrias de diferentes tecidos e também em condições metabólicas distintas para as mesmas mitocôndrias.

A adição de mitocôndrias a um sistema contendo um eletrodo de oxigênio, capaz de monitorar variações de oxigênio do meio, permite a determinação do consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas (*in vitro*), quando em um meio de reação adequado contendo substratos oxidáveis.

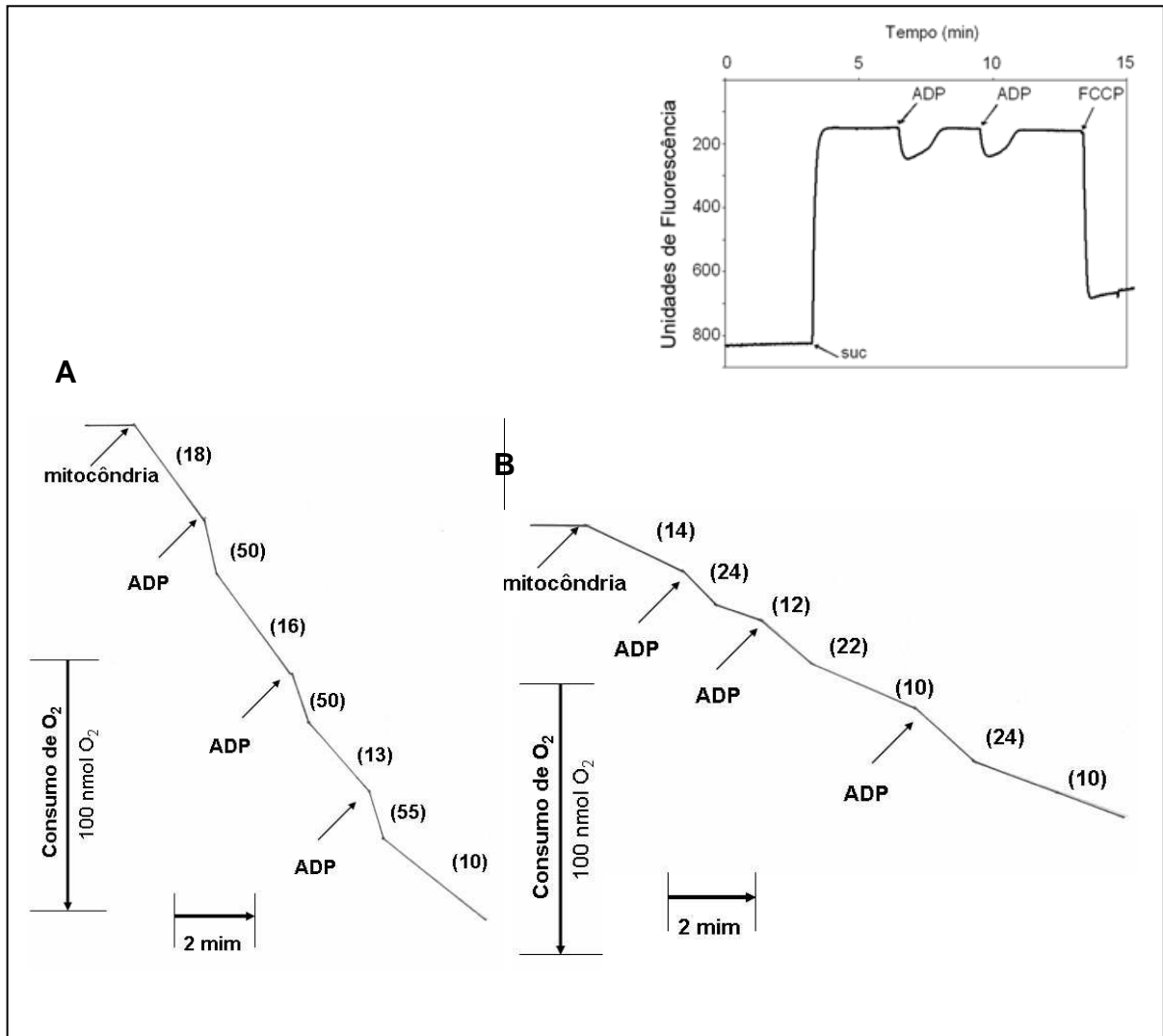
A adição de mitocôndrias a este meio isotônico, tamponado, e na presença de fosfato (Pi) e substrato, dá início a um lento consumo de oxigênio em resposta à respiração mitocondrial (estado de repouso). A passagem de elétrons pela cadeia respiratória permite a saída de H<sup>+</sup> através da membrana mitocondrial interna, formando um gradiente eletroquímico de prótons, ficando esta membrana com carga negativa internamente ( $\Delta\psi$ ) e com um gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ), ácido do lado externo. A adição de ADP permite a síntese de ATP pela ATP – sintase acoplada ao retorno de H<sup>+</sup> através da membrana interna (estado 3). Quando todo o ADP é consumido há o retorno ao estado 4. Novas adições de ADP repetem a seqüência de eventos.

No experimento representado pela Figura 6A observa-se o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, adicionadas ao meio de reação padrão descrito no item 4.6 do Material e Métodos, respirando com malato/glutamato como substrato, na presença de fosfato. A adição de 160 nmol de ADP permitiu o cálculo do coeficiente de controle respiratório (CCR). Este, foi determinado pela razão entre as velocidades de consumo de oxigênio, velocidade esta que, pela adição de ADP variou de 50 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> (estado 3) para 16 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> após o consumo de todo o ADP adicionado (estado 4). Após novas adições de ADP foram observados novamente os estados 3 e 4 da respiração, evidenciando a capacidade fosforilativa das mitocôndrias.

A Figura 6B mostra o consumo de oxigênio em mitocôndrias oxidando succinato, também na presença de fosfato. As velocidades dos estados 3 e 4 foram de 24 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> e 12 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, respectivamente. Adições seqüenciais de ADP indicaram controles respiratórios similares.

A capacidade fosforilativa das mitocôndrias de *A. angustifolia* demonstrada nos experimentos de consumo de oxigênio, Figura 6(A e B), foram confirmadas pelo experimento mostrado no inserto da Figura 6. O inserto está mostrando a variação do potencial elétrico ( $\Delta\psi$ ) em mitocôndrias por adições de ADP a partir da energização da mitocôndria com succinato. Os resultados mostram a formação do potencial elétrico quando succinato foi adicionado. Adições de 80 nmol de ADP induziram diminuições transitórias de  $\Delta\psi$ , indicando a capacidade fosforilativa da preparação mitocondrial utilizada. A queda do  $\Delta\psi$  após a adição do ADP mostra que a síntese de ATP depende do potencial elétrico de membrana. Essa queda do  $\Delta\psi$  é acompanhada pelo aumento da velocidade respiratória (Figura 6A e B). Observa-se no inserto que a adição subsequente de FCCP provoca o colapso do potencial elétrico de membrana.

Os valores de controle respiratório de ~4,0 para mitocôndrias energizadas com malato/glutamato (Figura 6A) e de ~2,0 para a respiração com succinato (Figura 6B) são considerados bons controles respiratórios para mitocôndrias isoladas de plantas e mostram que estão acopladas e funcionais. O isolamento de mitocôndrias de plantas é dificultado devido a presença da parede celular e do conteúdo de vacúolos. Mitocôndrias de plantas também apresentam menores valores de CCR devido a presença da proteína desacopladora de plantas (PUMP).



**Figura 6. Traçados demonstrativos do consumo de  $O_2$  e potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) de mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia***

Meio de reação: sacarose  $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ , HEPES-KOH  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2), KCl  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA essencialmente livre de ácido graxos  $0,2 \text{ g\%}$ , Pi  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , malato/glutamato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (A) e succinato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (B), EGTA  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  (A e B) e rotenona  $40 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  (B) em um volume final de  $1,3 \text{ mL}$  a  $29^\circ\text{C}$ . O consumo de oxigênio foi iniciado com adições de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial e outras adições foram ADP  $160 \text{ nmol}$  por  $\text{mg}$  de proteína como indicado nas Figuras. A Figura é representativa de 5 experimentos independentes. O número entre parêntese corresponde as velocidades de consumo de  $O_2$  expressas em  $\text{nmol } O_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

Inserto foi adicionado  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial ao meio de reação padrão descrito no item 4.7 do material e métodos, suplementado com Pi  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , rotenona  $40 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ , e safranina O  $5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  em um volume final de  $2 \text{ mL}$  a  $28^\circ\text{C}$ . A reação foi iniciada com a adição de succinato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Outras adições foram ADP  $80 \text{ nmol}$  por  $\text{mg}$  de proteína e FCCP  $5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ , como indicado nas Figuras. A Figura é representativa de 3 experimentos independentes.

## 5.2 EFEITO DA FLAVONA NAS OXIDAÇÕES DE NADH EXTERNAMENTE ADICIONADO E DE SUCCINATO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE *A. angustifolia*

Como mencionado anteriormente, mitocôndrias vegetais possuem além do complexo I que é sensível a rotenona, duas NADH desidrogenases alternativas, não bombeadoras de prótons e insensíveis a rotenona, uma localizada na face externa da membrana mitocondrial interna (NADH desidrogenase externa), e outra localizada na face interna da membrana mitocondrial interna (NADH desidrogenase interna). Por isso, mitocôndrias de plantas são capazes de oxidar NADH adicionado externamente (MØLLER, 2001).

Algumas drogas podem atuar inibindo o transporte de elétrons, como por exemplo, a rotenona que inibe o complexo I, o SHAM que inibe a AOX e o cianeto que inibe o complexo IV. Por outro lado, alguns compostos provocam o desacoplamento mitocondrial, como é o caso do FCCP que age como protonóforo colapsando o  $\Delta\psi$  (ERNSTER *et al.*, 1963; CHANCE & HOLLINGER, 1963).

Na literatura são descritos diversos flavonóides que interferem no transporte de elétrons em mitocôndrias de plantas e animais (RAVANEL *et al.*, 1981; RAVANEL, 1986; HODNICK *et al.*, 1987). Em mitocôndrias de plantas, na presença de rotenona, a flavona inibe de forma específica as NADH desidrogenases interna e externa (RAVANEL *et al.*, 1981; JUÁREZ *et al.*, 2004; UYEMURA *et al.*, 2004). Como a presença das NADH desidrogenases alternativas em mitocôndrias de *A. angustifolia* foi confirmada anteriormente por Mariano *et al.* (2004), torna-se importante o estudo da flavona sobre alguns parâmetros destas mitocôndrias.

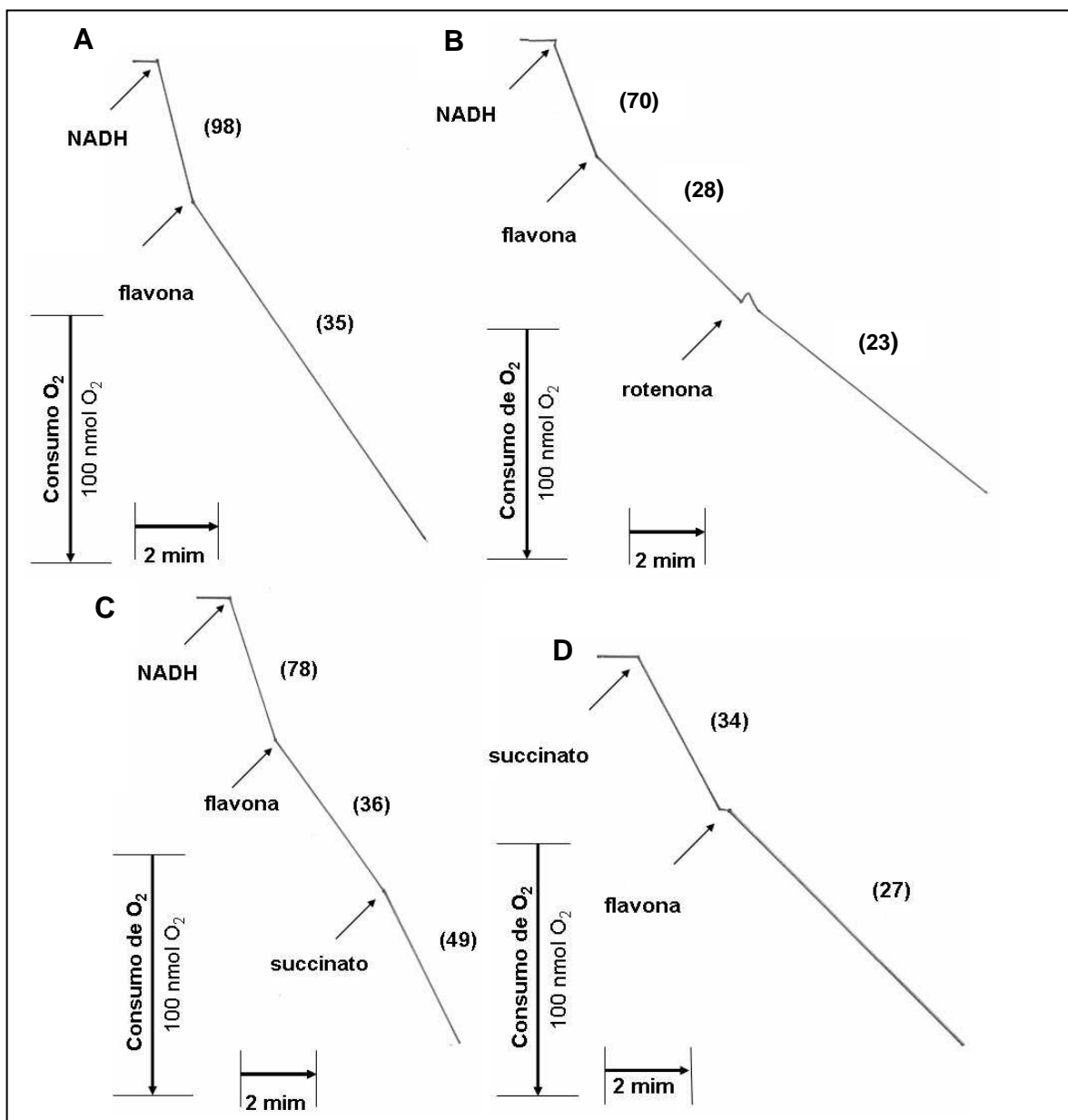
A Figura 7 mostra o efeito da flavona em mitocôndrias de *A. angustifolia* utilizando NADH (Figuras 7A, B e C) ou succinato (Figura 7D) como substratos oxidáveis.

A Figura 7A representa o efeito da flavona sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias desacopladas, respirando em velocidade máxima devido a presença de FCCP. A respiração foi iniciada pela adição de NADH ao meio de reação contendo a suspensão mitocondrial. Observa-se que a inibição do consumo de oxigênio pela adição de 500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de flavona foi de ~60%. Uma vez que os procedimentos de

isolamento poderiam provocar o rompimento de algumas organelas, estes experimentos (Figura 7A e C) foram realizados na presença de rotenona, que inibe o complexo I da cadeia respiratória, descartando, assim uma possível oxidação do NADH através deste complexo. Observou-se que a adição do inibidor (Figura 7B) não modifica o perfil do experimento.

A Figura 7C representa um experimento contendo mitocôndrias oxidando NADH nas condições descritas acima. Após a inibição pela flavona, foi adicionado succinato ao sistema e houve um aumento do consumo de oxigênio. Este fato mostra que há um restabelecimento do consumo de oxigênio pela cadeia respiratória pela adição do substrato do complexo II. Este também parece ser afetado em algum grau pela flavona já que o retorno da respiração foi apenas parcial.

Para avaliar a hipótese de inibição pela flavona utilizando o substrato de complexo II, foi feito o experimento mostrado na Figura 7D. Este, mostra o efeito da flavona sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias, respirando em velocidade máxima devido a presença de FCCP e utilizando succinato como substrato oxidável. A adição de flavona  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  provocou uma inibição de aproximadamente 20%. Confirma-se assim que esse flavonóide também tem ação inibitória na presença deste substrato, mesmo que menor quando comparado com a respiração pelo NADH. Estes resultados estão de acordo aos descritos na literatura em que os flavonóides inibem de forma mais pronunciada as desidrogenases alternativas em comparação ao segmento da succinato oxidase, não só em plantas, como também em alguns fungos e protozoários (RAVANEL *et al.*, 1981; HODNICK *et al.*, 1987; TUDELLA *et al.*, 2003; JUÁREZ *et al.*, 2004; UYEMURA *et al.*, 2004).



**Figura 7. Traçados demonstrativos do efeito da flavona sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* utilizando NADH e succinato como substratos oxidáveis**

Suspensão mitocondrial ( $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada ao meio de reação padrão descrito no item 4.6 de Material e Métodos contendo rotenona  $40 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  (A, C e D) e FCCP  $5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  (A, B, C e D), em um volume final de 1.3 mL a  $29^\circ\text{C}$ . Outras adições foram NADH  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  (A, B e C), flavona  $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  (A, B, C e D), succinato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (C e D) e rotenona  $40 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  (B), como indicado nas Figuras. A Figura é representativas de no mínimo 3 experimentos independentes. O número entre parêntese corresponde as velocidades de consumo de  $\text{O}_2$  expressas em  $\text{nmol O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.



### 5.3 EFEITO DA FLAVONA NA OXIDAÇÃO DO MALATO/GLUTAMATO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE *A. angustifolia*

Como foi constatado em mitocôndrias de tubérculos de batata (RAVANEL *et al.*, 1981) de *Aspergillus fumigatus* (TUDELLA *et al.*, 2003) de *Ustilago maydis* (JUÁREZ *et al.*, 2004) e de *Plamodium yoelii yoelii* (UYEMURA *et al.*, 2004), a flavona causa inibição tanto sobre a NADH desidrogenase interna como sobre a externa.

Para verificar se a flavona inibe também a NADH desidrogenase interna de mitocôndrias de *A. angustifolia*, foram feitos experimentos com malato/glutamato, que oxidados no interior da organela geram NADH que cede seus elétrons para o complexo I e também para NADH desidrogenase interna. Considerando novamente que a rotenona é um inibidor específico somente do complexo I, e não das NADH desidrogenases alternativas, em um meio contendo malato/glutamato como substrato e rotenona, uma possível inibição do consumo de O<sub>2</sub> pela flavona será específica sobre a NADH desidrogenase interna (TUDELLA *et al.*, 2003; JUÁREZ *et al.*, 2004; UYEMURA *et al.*, 2004).

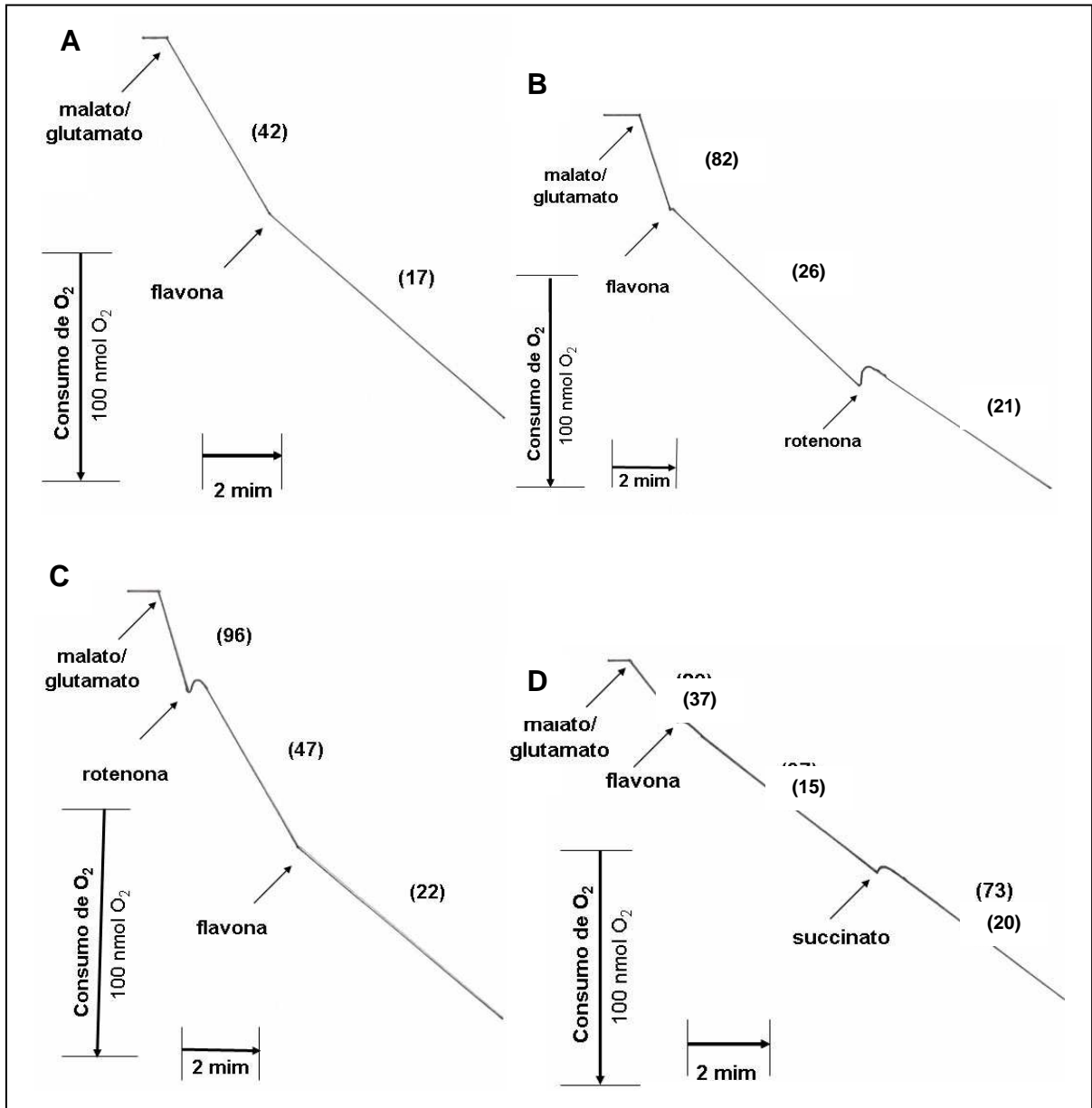
A Figura 8 mostra o efeito da flavona sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias respirando em velocidade máxima devido a presença de FCCP, utilizando malato/glutamato como substrato oxidável. No experimento da Figura 8A foram adicionados 40 µmol.L<sup>-1</sup> de rotenona ao meio de reação contendo a suspensão mitocondrial. A adição de malato/glutamato causou um consumo de O<sub>2</sub> de 42 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial. Nessas condições o complexo I está totalmente inibido. A adição posterior de 500 µmol.L<sup>-1</sup> de flavona causou uma diminuição de aproximadamente 60% no consumo de oxigênio. A Figura 8C mostra a respiração por malato/glutamato na ausência de rotenona. Nessa condição o consumo de O<sub>2</sub> foi de 96 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. A adição subsequente de rotenona (inibindo o complexo I) causou uma diminuição do consumo de oxigênio para 47 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> o qual foi reduzido para 22 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> por uma adição posterior de flavona. Pelo resultado das Figuras 8(A e C) conclui-se que a inibição da NADH desidrogenase interna foi de aproximadamente 60%.

No experimento mostrado na Figura 8D a adição de succinato após a adição da flavona (Figura 8D) restabeleceu parcialmente o consumo de oxigênio, confirmando que a succinato oxidase é afetada em algum grau pela flavona.

A Figura 8B, onde não foi adicionado rotenona ao meio de reação contendo a suspensão mitocondrial, mostra os efeitos inibitórios de  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de flavona sobre o complexo I e sobre a NADH desidrogenase interna. A somatória das inibições causadas pela flavona no complexo I e na NADH desidrogenase interna foi de aproximadamente 70%. Salientando que a inibição da NADH desidrogenase interna foi de aproximadamente 60% (Figuras 8A e 8C) conclui-se que a inibição do complexo I foi de aproximadamente 10%. Entretanto a adição de rotenona após a inibição pela flavona (Figura 8B) não causou significativa alteração.

Uma análise mais detalhada dos resultados obtidos para as inibições da flavona, demonstra que a flavona provocou uma inibição de aproximadamente 60% do consumo de oxigênio, quando foi utilizado NADH como substrato oxidável (Figura 7A, B e C), sendo também de aproximadamente 60%, quando se utilizou malato/glutamato (8A, C e D). Quando o succinato foi o substrato, a inibição do consumo de oxigênio ficou em torno de 20% (Figura 7D).

Com base nestes resultados podemos inferir que a flavona atua inibindo ambas as NADH desidrogenases alternativas (externa e interna) e que exerce, ainda, uma inibição discreta sobre o complexo I (~10%) e sobre o segmento da succinato oxidase (~20%).



**Figura 8. Traçados demonstrativos do efeito da flavona sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* utilizando malato/glutamato como substratos oxidáveis**

Suspensão mitocondrial ( $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada ao meio de reação padrão descrito no item 4.6 de Material e Métodos contendo rotenona  $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (A e D) e FCCP  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (A, B, C e D), em um volume final de 1.3 mL a  $29^\circ\text{C}$ . A reação foi iniciada com a adição de malato/glutamato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (A, B, C e D), outras adições, conforme indicado nas Figuras foram flavona  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (A, B, C e D), succinato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (D) e rotenona  $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (B e C). A Figura é representativa de no mínimo 3 experimentos independentes. O número entre parêntese corresponde as velocidades de consumo de  $\text{O}_2$  expressas em  $\text{nmol O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

#### 5.4 EFEITO DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ( $\Delta\psi$ ) EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE *A. angustifolia*

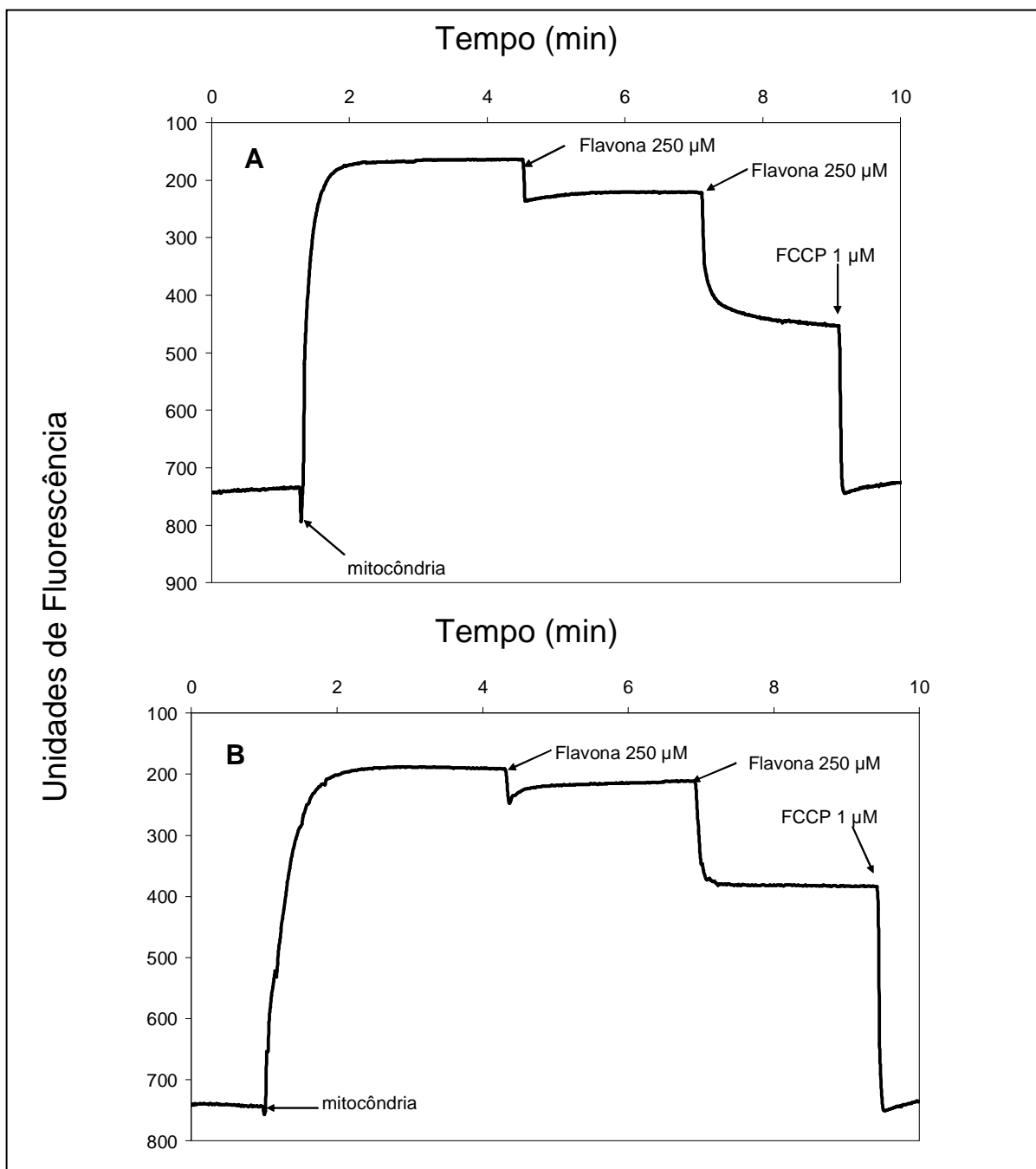
A passagem de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória induz o fluxo de prótons da matriz para o espaço intermembranas, formando um gradiente eletroquímico de prótons,  $\Delta\mu_{H^+}$ , que direciona a síntese de ATP, a partir de ADP e fosfato inorgânico, através da ATP – sintase (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Os experimentos anteriores de consumo de  $O_2$  (Figuras 7 e 8) demonstraram que a flavona promove uma importante inibição no transporte de elétrons que poderá comprometer a formação do  $\Delta\psi$ . Com o objetivo de avaliar a intensidade deste comprometimento, os efeitos da flavona sobre o potencial de membrana foram determinados em mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, utilizando safranina O como sonda fluorescente. Em mitocôndrias não energizadas, a safranina, que possui carga positiva, distribui-se nos dois lados da membrana mitocondrial interna. Com a formação do potencial de membrana esse corante desloca-se do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, interagindo com os sítios aniônicos, formando paliçadas. Este fenômeno pode ser acompanhado pela diminuição da fluorescência emitida pela safranina O, permitindo estabelecer uma relação linear entre o valor de  $\Delta\psi$ , resultante da energização da membrana, e a variação da fluorescência, resultante da ligação das moléculas de safranina no interior da mitocôndria (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976).

As Figuras 9 e 10 mostram a formação do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) a partir da energização da mitocôndria por NADH e malato/glutamato, respectivamente. Na Figura 9A, onde o  $\Delta\psi$  foi gerado pela adição de mitocôndrias a um meio contendo rotenona e NADH, adições sucessivas de flavona  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  provocaram uma queda do potencial elétrico de membrana. O colapso do potencial de membrana foi provocado pela adição de FCCP (Figura 9A). Na Figura 9B, em um meio contendo NADH, mas sem a presença de rotenona, o  $\Delta\psi$  também foi gerado pela adição de mitocôndrias, adições sucessivas da flavona  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  também causaram uma despolarização similar à mostrada em (A). Também nesse caso, o colapso do  $\Delta\psi$  foi promovido pela adição de FCCP. A queda do potencial de membrana destes experimentos é referente ao efeito inibitório da flavona sobre a

NADH desidrogenase externa, mostrando ainda que o complexo I não interfere na passagem de elétrons da NADH desidrogenase externa a ubiquinona, visto que a presença de rotenona no meio de reação não alterou os resultados.

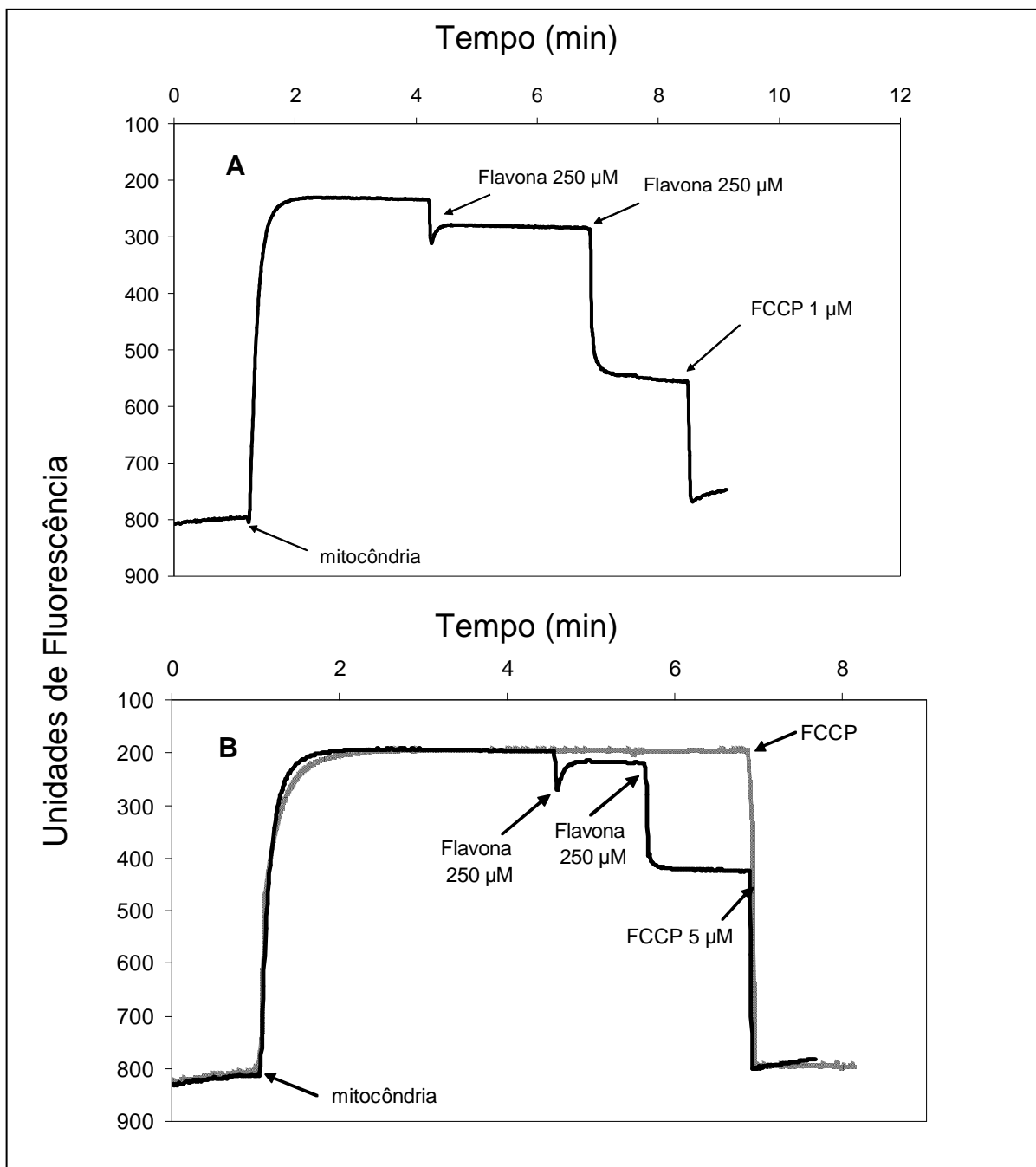
Nos experimentos representados pela Figura 10A o potencial de membrana foi gerado a partir da adição de malato/glutamato. A adição de flavona em um meio com rotenona foi capaz de causar uma diminuição do potencial elétrico. Ainda na Figura 10A observa-se que a adição de FCCP provoca o colapso do  $\Delta\psi$ . Na Figura 10B, onde o  $\Delta\psi$  também foi gerado por malato/glutamato, mas o meio não continha rotenona, a adição da flavona também causou uma queda do potencial de membrana, e a adição de FCCP também provocou o total colapso do potencial de membrana. Nesta situação experimental, tanto a NADH desidrogenase interna quanto o complexo I estão ativos. Assim, como não houve grande diferença nas quedas de potencial em A e B, esta é decorrente da inibição da NADH desidrogenase interna pela flavona.

Esta queda do  $\Delta\psi$  observado pela adição de flavona deve-se à restrição do fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, também evidenciados nos experimentos anteriores de consumo de  $O_2$ . Estes resultados estão de acordo também com os estudos de Tudella *et al.* (2003) e Uyemura *et al.* (2004) que nestas mesmas condições demonstraram inibição da respiração, confirmando o efeito inibitório em componentes da cadeia respiratória.



**Figura 9. Traçados demonstrativos do efeito da flavona sobre o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* usando NADH como substrato**

O substrato NADH  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  foi adicionada ao meio de reação padrão descrito no item 4.7 de Material e Métodos suplementado com rotenona  $40 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (A), Pi  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e safranina O  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  em um volume final de 2 mL a  $28^{\circ}\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição de  $0.25 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial. Outras adições foram flavona  $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (2 vezes) (A e B) e FCCP  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (A e B), como indicado nas Figuras. A Figura é representativa de 3 experimentos independentes.



**Figura 10. Traçados demonstrativos do efeito da flavona sobre o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* utilizando malato/glutamato como substrato**

O substrato malato/glutamato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  foi adicionada ao meio de reação padrão descrito no item 4.7 de Material e Métodos suplementado com  $\text{Pi } 2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e safranina O  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  em um volume final de 2 mL a  $28^\circ\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição de  $0.25 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial. Outras adições foram rotenona  $40 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (A), flavona  $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (2 vezes) (A e B) e FCCP 1 e  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (A e B), como indicado nas Figuras. A Figura é representativa de 3 experimentos.

## **5.5 EFEITO DA FLAVONA SOBRE COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE *A. angustifolia***

As intensas inibições causadas pela flavona sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias oxidando NADH externamente adicionado, ou pela adição de malato/glutamato na presença de rotenona (Figuras 7 e 8), e a diminuição parcial do potencial elétrico de membrana (Figuras 9 e 10) motivaram a avaliação dos efeitos da flavona sobre complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

Utilizando mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, foram realizados os experimentos de determinação das atividades da NADH desidrogenase e da NADH - citocromo c redutase nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os resultados referentes aos complexos enzimáticos determinados em mitocôndrias rompidas, mostram os efeitos de inibição pela flavona das NADH desidrogenases (complexo I + NADH desidrogenase alternativas) e da NADH citocromo c redutase, pela análise das respectivas atividades enzimáticas.

A Tabela 1 mostra o resultado de experimentos com mitocôndrias rompidas e incubadas na presença de flavona. A atividade da NADH desidrogenase na presença de concentrações crescentes de flavona (25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) foi inibida de modo dose dependente. Houve uma inibição de ~25% na presença de flavona 100  $\mu\text{M}$ . A determinação de atividade NADH desidrogenase acredita-se representar a atividade das 3 desidrogenases (complexo I, NADH - DH externa e NADH - DH interna)



**Tabela 1. Efeito da flavona sobre a atividade da NADH desidrogenase em mitocôndrias de *A. angustifolia***

Flavona ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	NADH Desidrogenase
0	100
25	92,1 ( $\pm 1,9$ )
50	84,1 ( $\pm 2,6$ )
100	75,2 ( $\pm 9,4$ )

O ensaio foi realizado conforme procedimentos descritos em Materiais e Métodos, no item 4.10 com suspensão mitocondrial de  $0.1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em volume final de 1 mL a  $28^{\circ}\text{C}$ . Os resultados estão expressos em Atividade Enzimática em % relativa ao controle. Controle 100% corresponde a atividade da enzima: NADH – Desidrogenase:  $147,6 \text{ nmol de ferricianeto reduzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. Os valores da Tabela são representativos de 4 experimentos independentes, com 3 repetições cada.

Na Tabela 2 estão apresentados os efeitos da flavona  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  sobre a atividade da NADH - citocromo *c* redutase. Esses experimentos foram feitos na ausência ou presença de rotenona, com o objetivo de confirmar os possíveis locais de ação da flavona. Considerando que a rotenona é um potente inibidor específico do complexo I (ERNSTER *et al.*, 1963), seria esperado que essa inibição pela flavona fosse específica para as NADH desidrogenases internas e externas.

A atividade total obtida na determinação da NADH citocromo *c* redutase foi de  $51,3 (\pm 2,3) \text{ nmol de citocromo } c \text{ reduzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial (controle=100%). Esta atividade corresponde a soma da atividade de todas as NADH desidrogenas presentes: complexo I + interna + externa. Na ausência de rotenona, a atividade das enzimas na presença da flavona foi de  $42,4 (\pm 1,1) \text{ nmol de}$

citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. Este valor corresponde a uma inibição conjunta sobre as três desidrogenases de ~17%.

Na presença de rotenona, a determinação da NADH citocromo c redutase foi de 31,1(±2,6) nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> (60% em relação ao controle). Salientando que nesta condição o complexo I está inibido, a atividade verificada corresponde, portanto, somente as NADH desidrogenases alternativas. Pela adição de flavona ao sistema contendo rotenona, o valor obtido foi de 24,0 (±1,3) nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> o que corresponde a uma inibição de ~22%.

A partir destes resultados é possível estimar também a inibição causada pela flavona sobre o complexo I. De acordo com a tabela 2, basta deduzir do valor da atividade do segmento enzimático na ausência de flavona e rotenona, o valor correspondente na presença de rotenona.

Ou seja

$$51,3(\pm 2,3) - 31,1(\pm 2,6) = \sim 20,2 \text{ nmol de citocromo c reduzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$$

Este valor de 20,2 nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> representaria 100% de atividade do complexo I. Por sua vez, o valor de inibição da flavona sobre o complexo I pode ser calculado subtraindo-se do valor de 42,4 (±1,1) nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> (atividade na presença de flavona e ausência de rotenona) o valor correspondente na presença de rotenona de 24,0 (±1,3) nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, ou seja uma atividade de 18,4 nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>.

Portanto, se: 20,2 nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> corresponde a 100%, então 18,4 nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> corresponde a uma atividade de 91,3% e a inibição do complexo I corresponderia a ~9%, valor compatível aos obtidos nos experimentos de consumo de oxigênio.

Estes resultados sugerem que a flavona inibe preferencialmente as desidrogenases alternativas e são condizentes aos resultados obtidos em experimentos anteriores.

Uma análise mais detalhada dos efeitos da flavona sobre o transporte de elétrons na cadeia respiratória exige também a avaliação dos demais complexos envolvidos.

**Tabela 2. Efeito da flavona sobre a atividade da NADH Citocromo C Redutase em mitocôndrias de *A. angustifolia***

Flavona ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	NADH	NADH
	Citocromo c Redutase S/Rotenona (nmol de cit c red.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	Citocromo c Redutase C/Rotenona (nmol de cit c red.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
0	51,3 ( $\pm 2,3$ ) = 100% ( $\pm 4,4$ )	31,1 ( $\pm 2,6$ ) = 60,6% ( $\pm 5,0$ )
100	42,4 ( $\pm 1,1$ ) = 82,8% ( $\pm 2,2$ )	24,0 ( $\pm 1,3$ ) = 46,8% ( $\pm 2,5$ )

O ensaio foi realizado conforme procedimentos descritos em Materiais e Métodos, no item 4.10 com suspensão mitocondrial de 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> em volume final de 1 mL a 28°C. Os resultados estão expressos em Atividade Enzimática em % relativa ao controle. Controle 100% corresponde a atividade da NADH – Citocromo c Redutase: 51,3 ( $\pm 2,3$ ) nmol de citocromo c reduzido.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial. Os valores são expressos como porcentagem em relação ao controle, sem rotenona e sem flavona. Os dados são representativos 2 experimentos independentes, com 3 repetições em cada.

## 5.6 RESPIRAÇÃO INSENSÍVEL AO CIANETO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE *A. angustifolia*

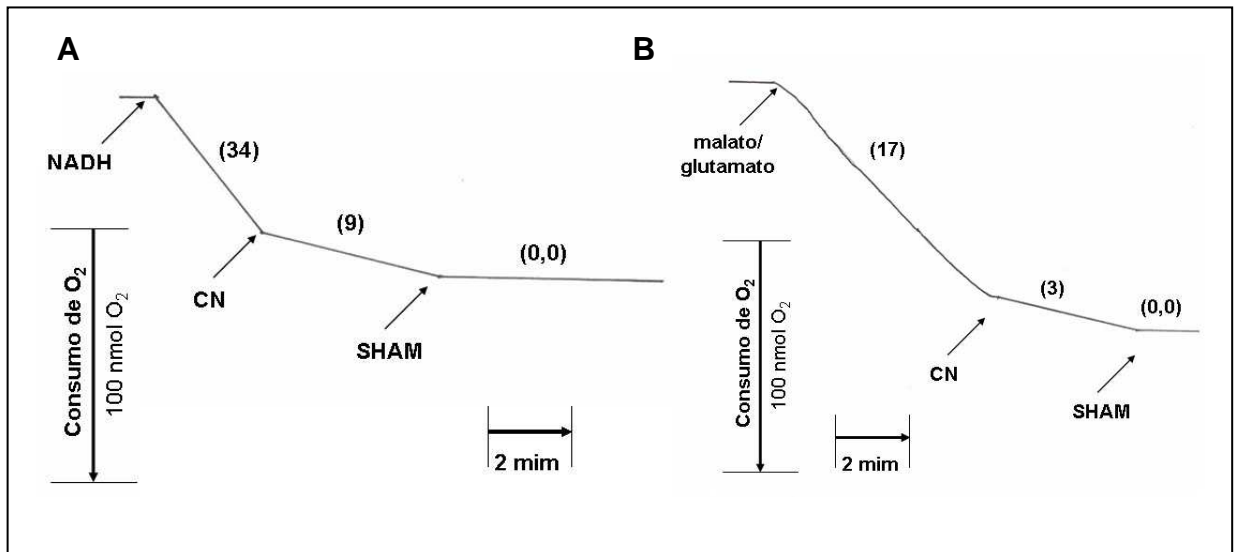
Mitocôndrias de plantas são caracterizadas pela presença de 2 vias respiratórias para a redução do oxigênio a água, a via citocromo encontrada em todos os eucariotos e a via alternativa (AOX) encontrada em todas as plantas e em alguns fungos e protozoários. A via do citocromo é acoplada a produção de ATP e é inibida por cianeto. Já a via da AOX não é acoplada a produção de ATP, é insensível ao cianeto e é inibida por SHAM (COSTA *et al.*, 2004).

Mariano (2005) demonstrou a presença da AOX em mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* em experimentos de consumo de O<sub>2</sub> utilizando succinato como substrato oxidável. No presente estudo, utilizou-se NADH e malato/glutamato para evidenciar esta respiração insensível ao cianeto.

A Figura 11A mostra a atividade da AOX no consumo de oxigênio pela oxidação de NADH, externamente adicionado e a Figura 11B mostra a atividade na oxidação de malato/glutamato, em mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*. O piruvato foi adicionado ao meio de reação para manter a AOX na sua conformação ativa (WAGNER *et al.*, 1995).

Na Figura 11(A e B) observa-se que o consumo de oxigênio foi fortemente reduzido por KCN 2 mmol.L<sup>-1</sup>. Esta inibição foi de aproximadamente 82% usando malato/glutamato como substratos (Figura 11A) e em torno de 74% para o NADH (Figura 11B). Nesta condição, a via citocromo está inibida e somente a via alternativa é funcional. A atividade da AOX corresponde assim a 18% (Figura 11A) e 26% (Figura 11B) da respiração total, quando os substratos presentes são malato/glutamato ou NADH. Entretanto, este consumo de O<sub>2</sub> residual equivalente a participação da AOX na respiração é totalmente inibido pela adição de SHAM 2 mmol.L<sup>-1</sup> (Figuras 11A e B) um comprovado inibidor da oxidase alternativa (VANLBERGUE & McINTOSH, 1997).

Dessa forma, esses experimentos consolidam os resultados anteriores de Mariano (2005) e mostram que as mitocôndrias de *A. angustifolia* são capazes de consumir oxigênio na presença de cianeto e de ter a respiração totalmente inibida na presença de SHAM, confirmando a presença da via alternativa (AOX).



**Figura 11. Traçados representativos do consumo de O<sub>2</sub> na presença de cianeto e SHAM em mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* oxidando NADH externo e malato/glutamato**

Suspensão mitocondrial (0.5 mg.mL<sup>-1</sup>) foi adicionado ao meio de reação contendo rotenona 40 μmol.L<sup>-1</sup> (A) e piruvato 100 mmol.L<sup>-1</sup> (A e B), em um volume final de 1.3 mL a 29°C. Outras adições, conforme indicado nas Figuras foram NADH 2 mmol.L<sup>-1</sup> (A), malato/glutamato 10 mmol.L<sup>-1</sup> (B), KCN 2 mmol.L<sup>-1</sup> (A e B) e SHAM 2 mmol.L<sup>-1</sup> (A e B). A Figura é representativa de 3 experimentos independentes. O número entre parêntese corresponde as velocidades de consumo de O<sub>2</sub> expressas em nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial.

## 5.7 IDENTIFICAÇÃO DA PUMP EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE *A. angustifolia*

A PUMP é uma proteína integral de membrana que dissipa o gradiente eletroquímico de prótons sem haver a síntese de ATP (VERCESI *et al.*, 1995; LALOI *et al.*, 1997). Essa proteína é estimulada por ácidos graxos e inibida por nucleotídeos de purina como o ATP (JESEK *et al.*, 1996; VERCESI *et al.*, 1998) e tem sua expressão aumentada no estresse (LALOI *et al.*, 1997; MAIA *et al.*, 1998; CALEGARIO *et al.*, 2003; PAVENTI *et al.*, 2005). A PUMP foi identificada em estudos funcionais ou por imunodeteção em vários órgãos e tecidos de aproximadamente 30 espécies de plantas superiores, incluindo mono e dicotiledôneas e plantas C3, C4 e CAM (JEZEK *et al.*, 1998, 2000; TRONO *et al.*, 2004).

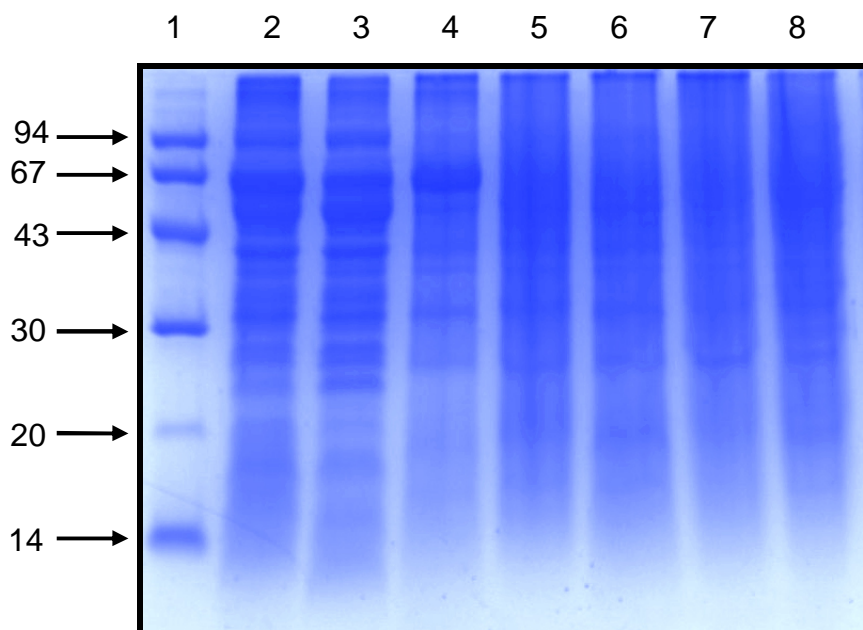
A identificação da PUMP foi feita através da técnica de *western blot* conforme descrito no item 4.8 de Material e Métodos. Para a verificação da ocorrência da PUMP em mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia* utilizou-se o anticorpo policlonal de *Arabidopsis thaliana* (AtPUMP), o qual tem sido utilizado na identificação da PUMP de diferentes espécies de plantas como do tubérculo de batata (CALEGARIO *et al.*, 2003), tomate (ALMEIDA *et al.*, 2002) e do tubérculo de alcachofra de Jerusalém (PAVENTI *et al.*, 2006). A presença da PUMP em mitocôndrias de plantas demonstra que as UCP provavelmente envolveram de um gene ancestral comum, divergindo entre os animais, fungos e plantas (MAIA *et al.*, 1998; SLUSE & JARMUSZKIEWICZ, 2002).

A Figura 12 mostra a eletroforese do extrato mitocondrial de araucária e batata. A concentração utilizada de extrato de proteína mitocondrial de *A. angustifolia* e tubérculo de batata (*Solanum tuberosum* L., cv. Bintje) foi 100 µg. Na Figura 13 está demonstrado o *western blot* da PUMP, observa-se a PUMP de *A. angustifolia* visualizada em uma única banda com peso molecular maior que 33 kDa. A banda da PUMP de mitocôndrias de tubérculos de batata estressada pelo frio a 4°C durante 5 dias e não sujeita a estresse foram utilizadas como controles positivos.

Os resultados da Figura 13 demonstraram que houve um aumento na expressão da PUMP em mitocôndrias provenientes de culturas de araucária estressadas pelo frio, assim como ocorreu com a batata. No entanto, somente no estresse pelo frio a 4°C por 48h houve um aumento significativo na expressão da PUMP, enquanto que a temperatura de 4°C por 24h não foi suficiente para induzir a expressão da PUMP. Também o estresse pelo calor (12h a 37°C) não foi capaz de aumentar a expressão da proteína após a exposição a altas temperaturas. Por sua vez, após 4h a 43°C a banda correspondente a PUMP não apareceu, sugerindo que a condição do estresse foi tão drástica que pode ter ocasionado a morte das células. Outra possível explicação para este fato é que a araucária é uma planta de clima frio e parece não possuir o aparato molecular necessário para o processo de aclimação a altas temperaturas, o qual está presente em outras espécies vegetais, incluindo as plantas de clima quente (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Durante os períodos de aclimação pelo frio ou pelo calor, novas proteínas são sintetizadas para ajudar a planta a se adaptar as novas modificações do meio ambiente. Este estudo, de forma similar aos resultados com mitocôndrias de batata (NANTES *et al.*, 2001), demonstra que a expressão da PUMP foi aumentada no estresse pelo frio por 48h a 4°C, na tentativa de proteger as células do dano que o estresse pode causar, pois a PUMP funciona na proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROS) aumentadas nesta condição (CALEGARIO *et al.*, 2003).

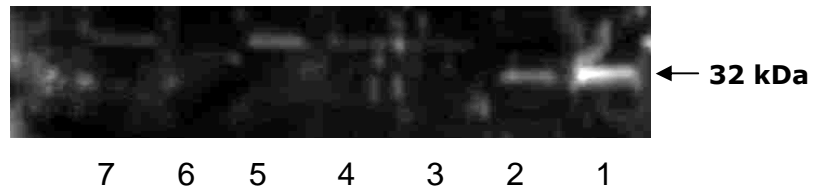
A identificação da PUMP em mitocôndrias de *A. angustifolia* é de fundamental importância, visto que até o momento não constava na literatura científica informações sobre a sua identificação em gimnospermas, somente em mono e dicotiledôneas, como o milho e o tubérculo de batata. Esses dados sugerem que, embora gimnospermas e angiospermas estejam separadas em termos evolutivos por milhões de anos, alterações metabólicas similares podem estar ocorrendo quando ambas as espécies são submetidas a baixas temperaturas. Dessa forma, a identificação da PUMP poderá servir de base para experimentos futuros com outras gimnospermas as quais poderão fornecer informações adicionais sobre as possíveis funções dessa proteína para o processo de aclimação ao estresse pelo frio e calor.



**Figura 12. Eletroforese desnaturante de mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia* e de mitocôndrias de tubérculos de batata**

As amostras foram submetidas à separação eletroforética em condições desnaturantes (SDS – PAGE) em sistema vertical. A concentração do gel foi de 12% e as proteínas foram coradas com corante Coomassie Blue. Linha 1: Padrão de massa molecular. Linha 2: Mitocôndrias de tubérculo de batata submetidas ao estresse pelo frio por 5 dias a 4°C; Linha 3: Mitocôndrias de tubérculo de batata; Linha 4: Mitocôndrias de araucária; Linha 5: Mitocôndrias de araucária submetidas ao estresse pelo frio por 24h a 4°C; Linha 6: Mitocôndrias de araucária submetidas ao estresse pelo frio por 48h a 4°C; Linha 7: Mitocôndrias de araucária submetidas ao estresse pelo calor por 4h a 43°C e Linha 8: Mitocôndrias de araucária submetidas ao estresse pelo calor por 12h a 37°C.





**Figura 13. Imunodeteccção da PUMP de mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia* e de mitocôndrias de tubérculos de batata**

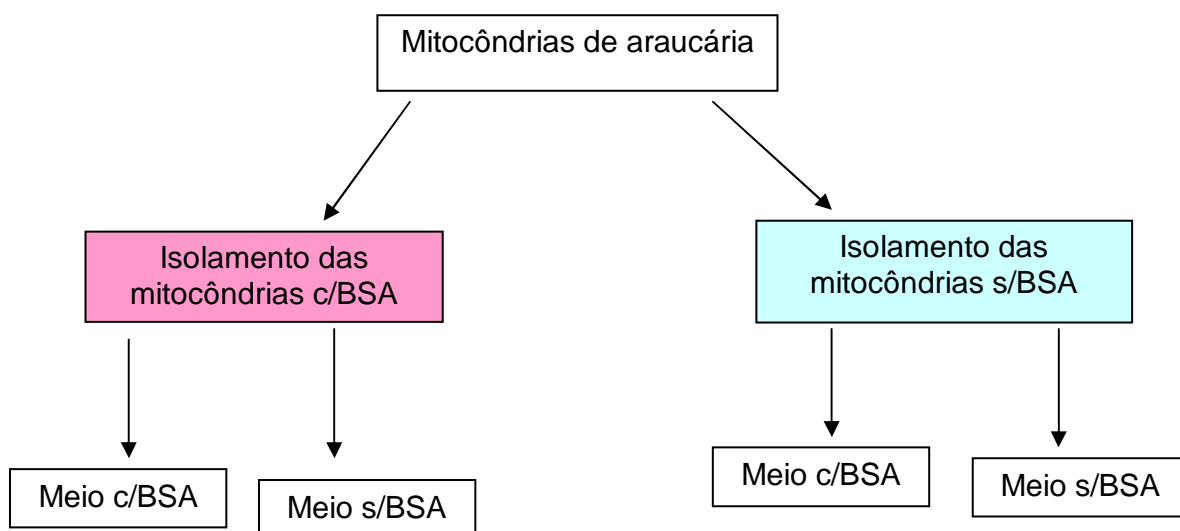
A banda apontada pela seta refere-se a banda de 32 kDa da proteína PUMP de tubérculo de batata. Linha 1: Mitocôndrias de tubérculo de batata submetidas ao estresse pelo frio por 5 dias a 4°C; Linha 2: Mitocôndrias de tubérculo de batata; Linha 3: Mitocôndrias de araucária; Linha 4: Mitocôndrias de araucária submetidas ao estresse pelo frio por 24h a 4°C; Linha 5: Mitocôndrias de araucária submetidas ao estresse pelo frio por 48h a 4°C; Linha 6: Mitocôndrias de araucária submetidas ao estresse pelo calor por 4h a 43°C e Linha 7: Mitocôndrias de araucária submetidas ao estresse pelo calor por 12h a 37°C.

## 5.8 ATIVIDADE DA PUMP EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE *A. angustifolia*

As espécies reativas de oxigênio (EROS) podem causar danos oxidativos em diversas biomoléculas e organelas celulares, como a mitocôndria, a qual é particularmente sensível a esse dano devido ao fato de a cadeia respiratória estar continuamente gerando EROS (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998). A presença da PUMP pode diminuir EROS minimizando estes danos (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998; VERCESI *et al.*, 2006).

A proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas é ativada por ácidos graxos livres e inibida por nucleotídeos derivados de guanina ou adenina como o ATP, ADP, GTP e GDP. Estes últimos se ligam à PUMP com alta afinidade, reacoplando a respiração à fosforilação. O BSA também inibe a atividade da PUMP, e o conseqüente desacoplamento mitocondrial, pois se liga aos ácidos graxos livres responsáveis pela ativação da PUMP. Assim o desacoplamento depende da presença simultânea de PUMP e de ácidos graxos livres (VERCESI *et al.*, 2006).

Dessa forma para determinar a atividade da PUMP, as mitocôndrias de *A. angustifolia* foram isoladas em meio de extração, isolamento e reação com e sem BSA essencialmente desprovido de ácidos graxos, segundo o esquema abaixo:



Considerando que o desacoplamento mitocondrial está relacionado com baixos valores de controle respiratório, pois neste parâmetro está refletido o acoplamento entre o consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa, a atividade da PUMP foi demonstrada através da determinação do controle respiratório conforme as Tabelas 3 e 4, com malato/glutamato como substrato oxidável.

Os efeitos da albumina sobre os valores de controle respiratório de mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* não submetidas a condições de estresse estão demonstrados na Tabela 3. Como mencionado anteriormente, a albumina de soro bovino (BSA), por ligar ácidos graxos, exerce um efeito acoplador e por isto sua presença nos meios de isolamento e de reação resultou em valores maiores de controle respiratório (CCR = 4,5) em comparação ao valor de CCR de mitocôndrias isoladas em meio com BSA mas analisadas em meio de reação sem BSA (CCR = 2,7). Já o controle respiratório de mitocôndrias isoladas em meio sem BSA e analisadas em meio de reação com BSA foi maior (CCR=3,7) do que o valor para mitocôndrias isoladas em meio com BSA, mas analisadas em meio de reação sem BSA (CCR=2,7). A ausência de BSA nos meios de isolamento e reação promoveu a diminuição do valor de CCR para 1,7. Estes resultados além de ressaltarem a importância da presença da albumina para a qualidade das preparações, ou seja, para a obtenção de mitocôndrias acopladas com controles respiratórios satisfatórios, demonstram que sua presença no meio de reação é fundamental. Além disto, os valores de CCR sugerem a presença de PUMP nestas mitocôndrias, uma vez que esta proteína é sabidamente estimulada por ácidos graxos livres que não estão presentes quando a BSA é adicionada aos meios de isolamento e/ou de reação.

**Tabela 3. Efeito da albumina sobre os valores de controle respiratório de mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia***

<b>Composição dos meios (presença ou ausência de albumina)</b>	<b>Valores de CCR</b>
Meio de Isolamento e de reação com albumina	4,5
Meio de Isolamento com albumina e de reação sem albumina	2,7
Meio de Isolamento sem albumina e de reação com albumina	3,7
Meio de Isolamento e de reação sem albumina	1,7

O meio de reação continha sacarose  $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ , Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2), KCl  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , Pi  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , EGTA  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e malato/glutamato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , em um volume final de 1,3 a  $29^{\circ}\text{C}$ . Onde indicado, na presença de 0,2 g% de BSA essencialmente livre de ácidos graxos. O consumo de oxigênio foi iniciado com  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial e ADP 160 nmol por mg de proteína foi adicionado após 2 minutos. Os valores de CCR são representativos de 3 experimentos independentes.

Na Tabela 4 está representada a atividade da PUMP de mitocôndrias de *A. angustifolia* submetidas a diferentes condições de estresse por variações de temperatura. Os efeitos da adição de albumina nos meios de isolamento e reação sobre a atividade desta enzima também estão demonstrados. Observa-se que em mitocôndrias submetidas ao estresse pelo frio e calor a PUMP apresentou sua atividade estimulada, refletida nos valores menores de CCR em comparação as mitocôndrias não estressadas. A adição de albumina aos meios de isolamento e/ou de reação promoveu uma aumento nos valores de CCR, também nas situações de estresse, confirmando os resultados anteriores (Tabela 3). Podemos verificar a diminuição dos controles respiratórios nas mitocôndrias isoladas com BSA e meio de reação que continha BSA de 4,5 do controle sem estresse para 3,9 no estresse pelo frio por 24h a  $4^{\circ}\text{C}$ , 4,0 no estresse pelo frio por 48h a  $4^{\circ}\text{C}$ , 3,1 no estresse pelo calor por 12h a  $37^{\circ}\text{C}$  e 2,5 no estresse pelo calor por 4h a  $43^{\circ}\text{C}$ . Essa redução do controle respiratório também foi verificada nas mitocôndrias (+BSA) e meio (-BSA), mitocôndrias (-BSA) e meio (+BSA) e principalmente nas mitocôndrias (-BSA) e

meio (-BSA) que foram submetidas ao estresse pelo frio e calor, quando comparadas com as células que não foram submetidas ao estresse. Uma vez que o estresse causado pelo frio ou calor envolve uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2004; VERCESI *et al.*, 2006), os resultados destes experimentos, que evidenciaram um aumento da atividade da PUMP nestas situações de estresse, confirmam a importância desta proteína nos mecanismos de defesa da planta, o que pode diminuir os conseqüentes danos. Calegario e colaboradores (2003) demonstraram que nos períodos de aclimação ao frio ou ao calor, novas proteínas são sintetizadas para ajudar a planta a se adaptar as novas modificações do meio ambiente. De fato, no presente estudo, os experimentos de *western blot* e atividade da PUMP, evidenciaram uma expressão aumentada desta proteína, certamente na tentativa de proteger as células do dano causado pelo estresse em função do aumento de EROS.

**Tabela 4. Atividade da PUMP em mitocôndrias isoladas de *Araucaria angustifolia***

Células Embriogênicas	Controle Respiratório							
	Mito +BSA	Meio +BSA	Mito +BSA	Meio -BSA	Mito -BSA	Meio +BSA	Mito -BSA	Meio -BSA
Controle (s/estresse)	4,5		2,7		3,7		1,7	
Frio 4°C – 24h	3,9		2,2		2,7		1,3	
Frio 4°C – 48h	4,0		2,7		3,3		1,5	
Calor 37°C – 12h	3,1		2,2		2,5		1,0	
Calor 43°C – 4h	2,5		1,9		2,2		1,0	

O meio de reação continha sacarose 0,25 mol.L<sup>-1</sup>, Hapes 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2), KCl 2 mmol.L<sup>-1</sup>, Pi 2 mmol.L<sup>-1</sup>, EGTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> e malato/glutamato 10 mmol.L<sup>-1</sup>, em um volume final de 1,3 a 29°C. Onde indicado, na presença de 0,2 g% de BSA essencialmente livre de ácidos graxos (+BSA) ou na ausência de BSA (-BSA). O consumo de oxigênio foi iniciado com 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial e ADP 160 nmol por mg de proteína foi adicionado após 2 minutos. Os valores de CCR são representativos de 3 experimentos independentes.

## 5.9 EFEITO DO ESTRESSE SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia*

Foram observados dois principais tipos celulares nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. As células embrionárias as quais são isodiamétricas, pequenas e com citoplasma denso, e são reativas ao carmim acético. As células suspensoras que são células alongadas, as quais são altamente vacuoladas e permeáveis ao corante azul de Evans. Estas células apresentam-se agrupadas em agregados celulares presentes nas culturas embriogênicas durante a multiplicação. Os agregados celulares apresentam variação no tamanho e morfologia revelando diferentes afinidades aos corantes durante a análise citoquímica (STEINER *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006). A reação positiva ao carmim acético (DURZAN, 1988) está associada com a competência da célula para o desenvolvimento celular (STEINER *et al.*, 2005). As diferenças na morfologia celular podem ser influenciadas por diversos fatores como a fonte de explante, composição do meio de cultura (FEHÉR *et al.*, 2003) e o estresse pelo frio e pelo calor.

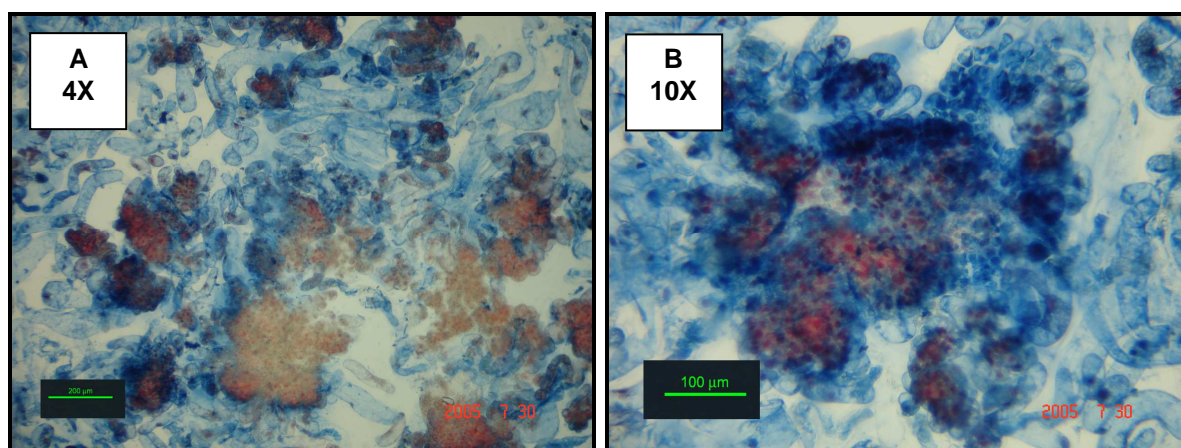
Nas Figuras 14, 15 e 16 observamos a morfologia das células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* não submetidas a estresse (Figuras 14A e B), submetidas a estresse: pelo frio por 24 horas a 4°C (Figuras 15A e B), por 48 horas a 4°C (Figuras 15C e D), por 12 horas a 37°C (Figuras 16A e B) e por 4 horas a 43°C (Figuras 16C e D).

Comparadas com os controles as células submetidas ao estresse sofreram modificações na sua morfologia, uma diminuição dos agregados de células embrionárias e suspensoras e número de células (Figuras 15A, B, C e D e 16A, B, C e D).

Nas Figuras 15A e B as células suspensoras apresentaram alteração da forma, aumento do tamanho celular e um aumento de vacúolos, com conseqüente diminuição do número dessas células, já as células embrionárias, que estão relacionadas com o desenvolvimento celular, também estavam em menor número, indicando uma diminuição na multiplicação celular. Esse efeito também pode ser observado nas Figuras 15C e D em que o tratamento pelo frio por 48h foi um pouco mais drástico que o tratamento por 24h a 4°C, pois as células suspensoras

apresentaram maior alteração da forma e no tamanho. As Figuras 16A e B também mostraram esse efeito, mas somente nas Figuras 16C e D esse efeito foi mais drástico, pois quase não se vê as células embrionárias restando somente as células suspensoras que apresentaram a pior deformação celular. Estas observações sugerem que, durante a exposição de plantas sensíveis a temperaturas elevadas, ocorre uma diminuição da competência da célula para o desenvolvimento celular.

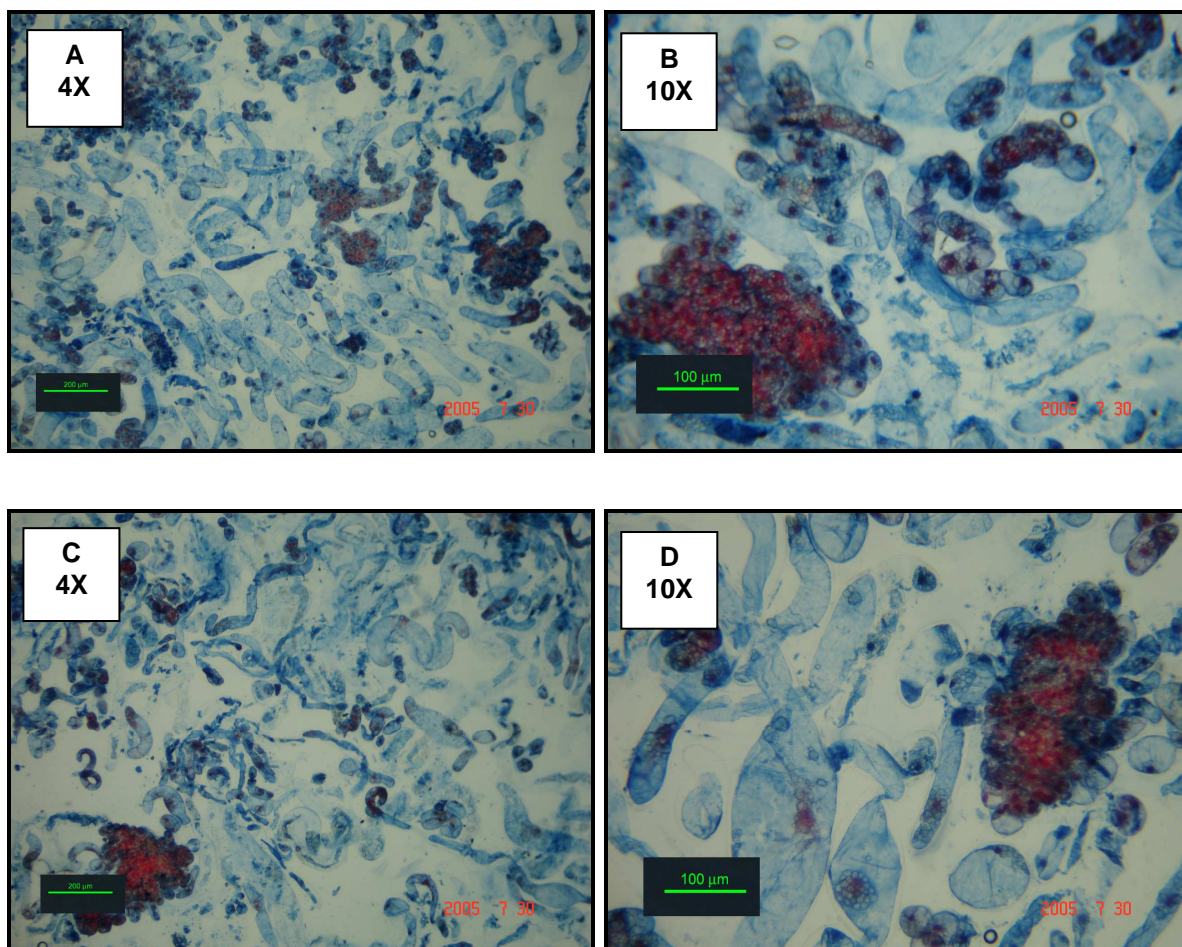
Com isso podemos observar que o estresse pelo frio ou pelo calor foi danoso às células embriogênicas de *A. angustifolia* interferindo com a multiplicação celular, levando a uma diminuição no número de células. Concluímos que o estresse pelo calor por 4h a 43°C foi o mais drástico para as células.



**Figura 14. Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas à análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans, células controle**

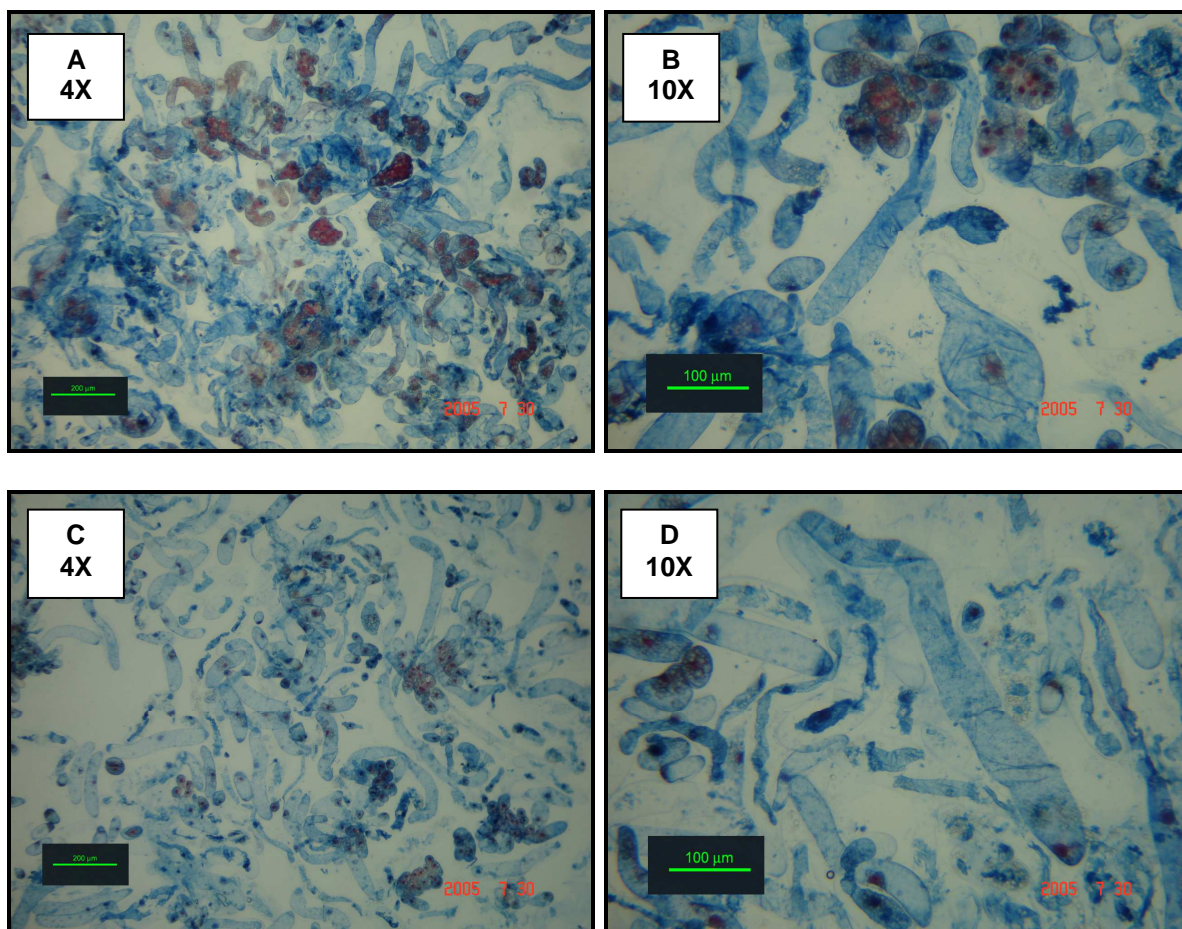
(A e B) Controle, células sem estresse. Em vermelho: células embrionárias reativas ao carmim acético. Em azul: células suspensoras permeáveis ao corante azul de Evans. A: Objetiva de 4X e escala de 200 µm e B: Objetiva de 10X e escala de 100 µm





**Figura 15. Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas à análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans de células tratadas pelo frio**

(A e B) Células submetidas ao estresse pelo frio 24h a 4°C e (C e D) Células submetidas ao estresse pelo frio por 48h a 4°C. Em vermelho: células embrionárias reativas ao carmim acético. Em azul: células suspensoras permeáveis ao corante azul de Evans. A e C: Objetiva de 4X e escala de 200 µm e B e D: Objetiva de 10X e escala de 100 µm



**Figura 16. Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas à análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans, células tratadas pelo calor**

(A e B) Células submetidas ao estresse pelo calor por 12h a 37°C e (C e D) Células submetidas ao estresse pelo calor por 4h a 43°C. Em vermelho: células embrionárias reativas ao carmim acético. Em azul: células suspensoras permeáveis ao corante azul de Evans. A e C: Objetiva de 4X e escala de 200 µm e B e D: Objetiva de 10X e escala de 100 µm

## 6 DISCUSSÃO

Muitas evidências bioquímicas e morfológicas mostram a sensibilidade de plantas a condições de injúria impostas por diversos fatores, tais como o ataque por patógenos, alterações climáticas, agrotóxicos, estresses mecânicos, entre outros, é motivadora de estresse (MAXWELL *et al.*, 2002; APEL & HIRT, 2004). Entretanto, as espécies vegetais diferem entre si quanto ao grau de sensibilidade a esses fatores. Se forem comparadas as sensibilidades a variações de temperatura, por exemplo, fica evidente que algumas espécies não são afetadas pelo frio enquanto que outras resistem bem a altas temperaturas (TAIZ & ZEIGER, 1998; KEEGSTRA & THOMASHOW, 2002).

Alterações da expressão de genes que respondem ao tratamento pelo frio foram descritas em várias plantas, como cana de açúcar, arroz e *A. thaliana* (NOGUEIRA *et al.*, 2003; FOWLER & THOMASHOW, 2002; RABBANI *et al.*, 2003). Foi também sugerido que diversas vias regulatórias estão envolvidas no processo de aclimação de plantas durante a exposição a baixas temperaturas (NOGUEIRA, 2004). A aclimação, por sua vez, envolve alterações transientes da expressão gênica e produção de compostos específicos durante a exposição dos organismos às condições desfavoráveis. Sendo assim, não é de se surpreender que seus mecanismos fisiológicos e moleculares sejam extremamente complexos (KEEGSTRA & THOMASHOW, 2002).

Estudos em mitocôndrias isoladas de tecidos vegetais mostram que algumas enzimas são induzidas quando a planta é exposta a estresse por baixas temperaturas. Entre as enzimas mais estudadas estão as NADH desidrogenases alternativas, a oxidase alternativa (AOX) e a proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP) (MØLLER, 2001).

Dentre os fatores que podem ocasionar estresse e causar o aumento da expressão gênica destas enzimas estão a alteração do metabolismo pelo aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, por exemplo. A possibilidade da formação de EROS em consequência à exposição da planta a fatores extremos de temperatura tem sido amplamente descrita (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998; MØLLER, 2001; CALEGARIO *et al.*, 2003; VERCESI *et al.*, 2006).

As alterações metabólicas provocadas pelo estresse ao frio em mono e dicotiledôneas são muito semelhantes, (VINCENTZ *et al.*, 2004) embora exista, em termos evolutivos uma grande distancia (NOGUEIRA *et al.*, 2003; NOGUEIRA, 2004) entre as angiospermas e gimnospermas, a análise destes fatores em gimnospermas é de extrema importância. Dessa forma, a continuidade do presente estudo na gimnosperma *A. angustifolia* poderá em muito contribuir no seu esclarecimento.

Os resultados dos estudos desenvolvidos neste trabalho mostram que em mitocôndrias isoladas de células cultivadas desta conífera algumas das enzimas responsivas ao estresse foram identificadas e/ou caracterizadas, e podem ter sua expressão alterada pela exposição a condições variadas de temperatura, como foi determinado para a PUMP. Esta proteína desacopladora, conhecida por ser alterada pelo frio (CALEGARIO *et al.*, 2003; PAVENTI *et al.*, 2005), mostrou variações na expressão gênica tanto em condições de maior ou de menor temperatura em araucária. Como mostrado nos experimentos da Figura 13, a exposição das células a duas diferentes situações, tanto de calor quanto de frio, alterou de modo diferenciado o aparecimento da banda que indica a presença da PUMP. O estresse por frio de 4°C mostrou que a variação da exposição de 24 para 48 horas aumentou consideravelmente a expressão da proteína. Já os dados com as células submetidas a estresse por calor de 37°C por 12h, sugerem um aumento pouco significativo da expressão da PUMP. Porém, assim como o resultado da exposição a 43°C por 4 horas, estes resultados devem ser melhor avaliados e sugerem a necessidade da continuidade destes estudos.

A atividade da PUMP foi avaliada pela adição de BSA aos meios de isolamento e/ou de reação. Os valores dos controles respiratórios mostram que a presença de BSA previne o desacoplamento em todas as situações indicando sua ação inibitória sobre a PUMP. Entretanto, pela análise do efeito de variações de temperatura sobre a morfologia das células embriogênicas, a diminuição do número de células causaria também redução no número de mitocôndrias. Assim sendo, uma menor quantidade de mitocôndrias em relação a quantidade de vacúolos levaria ao isolamento de uma organela potencialmente de menor qualidade, justificando um menor controle respiratório das células tratadas pelo frio ou pelo calor. Esta poderia ser uma das causas das atividades respiratórias alteradas, conseqüentes às

alterações de temperatura. Para uma melhor compreensão deste fato seriam importantes análises mais detalhadas da relação entre o número de células, de mitocôndrias e da alteração da expressão da PUMP.

A oxidase alternativa (AOX) foi caracterizada em mitocôndrias de *A. angustifolia* através de comparação da respiração via citocromos com a respiração resistente ao cianeto, mas sensível ao SHAM. Esta, mostrou-se ativa na oxidação de substratos de complexos enzimáticos, como dos complexos I e II, e da NADH desidrogenase externa. Para a complementação desta análise torna-se importante a identificação da expressão gênica da AOX em variadas condições ambientais.

O aumento da atividade das NAD(P)H desidrogenases alternativas também tem sido considerado como uma resposta ao estresse (MØLLER, 2001). No presente trabalho, a avaliação da atividade das NADH desidrogenases em *A. angustifolia* foi feita através da adição de flavona a mitocôndrias respirando pela oxidação de NADH, succinato e malato/glutamato (+rotenona). Vários autores atribuíram à flavona efeitos sobre a respiração mitocondrial. A este flavonóide tem sido atribuídas inibição de estado 3, desacoplamento, e inibição de NADH desidrogenases (RAVANEL *et al.*, 1981; RAVANEL, 1986; HODNICK *et al.*, 1987; TUDELLA *et al.*, 2003; UYEMURA *et al.*, 2004; JUÁREZ *et al.*, 2004). Os resultados mostraram uma expressiva inibição das NADH desidrogenases alternativas pela adição da flavona na presença de FCCP. O efeito foi menor na respiração de repouso, estado 4, (dados não mostrados), porém nessa condição houve uma queda do potencial elétrico de membrana, sugerindo ser decorrente da inibição das enzimas. O efeito inibitório foi confirmado pela análise dos complexos enzimáticos NADH desidrogenase e NADH-citocromo *c* redutase em mitocôndrias rompidas. Na seqüência destes estudos é importante avaliar se os efeitos da flavona poderiam estar relacionados com estresse conseqüente a formação de EROS, visto que alguns flavonóides são considerados antioxidantes (MARTENS & MITHÖFER, 2005).

Finalmente, a determinação da expressão da PUMP, assim como das atividades da AOX e NADH desidrogenases alternativas em *A. angustifolia*, nos estudos desenvolvidos por este grupo de pesquisa, servirá como referência para experimentos futuros nesta e em outras gimnospermas.

## 7 CONCLUSÕES

### **Mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*:**

- Oxidaram os substratos malato/glutamato e succinato evidenciando a capacidade fosforilativa dessas mitocôndrias.
- Os controles respiratórios obtidos, assim como a eficiente geração de  $\Delta\psi$  mostram que estas mitocôndrias estavam acopladas e funcionais.
- Foram capazes de oxidar o NADH e malato/glutamato (+rotenona) indicando a presença das NADH desidrogenases alternativas.
- Confirmaram as evidências da presença da respiração insensível ao cianeto e sensível ao SHAM referente à oxidase alternativa (AOX).

### **Em relação aos efeitos da flavona:**

- As NADH desidrogenases alternativas foram sensíveis a flavona.
- As NADH desidrogenases externa e interna foram inibidas pela flavona com a mesma magnitude (60%).
- O complexo I foi inibido em aproximadamente 10%.
- A flavona provocou uma inibição de 20% quando foi utilizado succinato como substrato oxidável.
- A maior inibição pela flavona parece estar relacionada com as NADH desidrogenases alternativas.
- A flavona diminuiu o potencial de membrana para os dois substratos testados.

### **Em relação à proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP):**

- Mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustifolia* apresentaram, através de experimentos de *Western blot*, evidências da presença da proteína PUMP com massa molecular maior que 33 kDa.
- A expressão da PUMP foi aumentada pela exposição ao frio de 4°C por 48h. O estresse pelo calor de 43°C por 4h foi muito drástico para as células, desaparecendo a banda da PUMP.
- O BSA é necessário para o isolamento das mitocôndrias de *A. angustifolia*, pois se liga aos ácidos graxos livres que ativam a PUMP, e se torna indispensável para obter um controle respiratório satisfatório.
- Os efeitos dos estresses por alterações de temperatura na atividade da PUMP foram minimizados pela inibição da proteína por BSA.

### **Em relação à morfologia das células embriogênicas de *A. angustifolia*:**

- Os estresses pelo frio e pelo calor causaram danos à morfologia das células embriogênicas de *A. angustifolia*, diminuindo o número de células embrionárias e suspensoras.
- As células suspensoras sofreram deformação celular com aumento de tamanho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÅKERMAN, K.E. AND WIKSTRÖM, M.K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, v. 68, n. 2, p. 191-197, 1976.

ALMEIDA, A.M.; NAVET, R.; JARMUSKIEWICZ, W.; VERCESI, A.E.; SLUSE – GOFFART, C.M.; SLUSE, F.E. The energy – conserving and energy – dissipating processes in mitochondria isolated from wild type and nonripening tomato fruits during development on the plant. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 34, n. 6, p. 487–498, 2002.

APEL, K.; HIRT, H.; Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, n. 55, p. 373–399, 2004.

ARTS, I.C.; HOLLMAN, P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 317–325, 2005.

ASTARITA, L.V. AND GUERRA, M.P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* - Induction and maintenance of embryonal - suspensor mass culture. **Revista Bras. de Fisiol. Vegetal**, v.10, n. 2, p. 113-118, 1998.

ASTARITA, L.V. AND GUERRA, M.P. Conditioning of culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.36, p. 194-200, 2000.

BEAVIS, A.D. AND VERCESI, A.E., Anion uniport in plant-mitochondria is mediated by a  $Mg^{2+}$ -insensitive inner membrane anion channel. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 3079–3087, 1992.

BISNACK, R.; BOERSMA, B.J.; PATEL, R.P.; KIRK, M.; WHITE, C.R.; DARLEY – USMAR, V.; BARNES, S.; ZHOU, F.; PARKS, D. A. Enhanced antioxidant activity



after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. **Alcoholism Clinical e Experimental Research**, v. 25, n. 6, p. 434–443, 2001.

BONNER, W.D. AND VOSS, D.O. Some Characteristics of mitochondria extracted from higher plants. **Nature**, v. 191, n. 478, p. 682–689, 1961.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Meth. Enzymol.**, v. 186, p. 343–355, 1990.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary source, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

CALEGARIO, F.F.; COSSO, R.G.; FAGIAN, M.M.; ALMEIDA, F.V.; JARDIM, W.F.; JEZEK, P.; ARRUDA, P. AND VERCESI, A.E. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 35, p. 211–220, 2003.

CAMACHO, A.; MORENO–SANCHEZ, R. AND BERNAL–LUGO, I. Control of superoxide production in mitochondria from maize mesocotyls. **FEBS Lett.**, v. 570, p. 52–56, 2004.

CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **EMBRAPA-CNPQ**, p.70-80, 1994.

CHANCE, B.; HOLLINGER, G. Effects of amytal, thiopental, rotenone, progesterone and methylene glycol. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 1, 1963.

CHANCE, B. AND WILLIAMS, G.R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, v. 217, n. 1, p. 383–393, 1955.

CHERRY, J.H. **Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1994.

CONSIDINE, M.J.; HOLTZAPFFER, R.C.; DAY, D.A.; WHELAN, J.; MILLAR, A.H. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. **Plant Physiol.**, v. 129, p. 949–953, 2002.

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

CREUTZ, C. AND SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome *c* by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington DC, v. 70, n. 6, p. 1701-1703, 1973.

DIJK, C.; DRIESSEN, A.J.M.; RE COURT, K. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1593–1600, 2000.

DU, Y.C.; NOSE, A.; WASANO, K. Thermal characteristics of C4 photosynthetic enzymes from leaves of three sugarcane species differing in cold sensitivity. **Plant Cell Physiol.** v. 40, p. 298-304, 1999.

DUARTE, J.; PEREZ – PALENCIA. R.; VARGAS, F.; OCETE, M.A.; PEREZ – VISCAIO, F.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n, 1, p. 117–124, 2001.

DUCET, G.; GAUVRIT, C. Induction de résistance au cyanure dans les mitochondries du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). **Physiol. Végét.**, v. 58, p. 145–152, 1977.

DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: Hallgren, J.E. (Ed). Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish. Proceedings... Swedish: University of Agricultural Sciences, v. 8, p. 147–186, 1988.

ELTHON, T.E.; STEWART C.R.; McCOY, C.A. AND BONNER-JR, W.D. Alternative respiratory path capacity in plant mitochondria: effect of growth temperature, the electrochemical gradient and assay pH. **Plant Physiol.**, v. 82, p. 1-6, 1986.

ELTHON, T.E. AND McINTOSH L. Characterization and solubilization of the alternative oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 80, p. 378-383, 1986.

ELTHON, T.E. AND McINTOSH L. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 8300-8403, 1987.

ERNEST, L.; DALLNER, G.; FELICE, G.A. Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. **Journal Biological Chemistry**, v. 238, n. 3, 1963.

ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. In: **Methods Enzymology**, v. 10, p. 41–47, 1967.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201–228, 2003.

FONSECA, F.N.; FERREIRA, A.J.S.; SARTORELLI, P.; LOPES, N.P.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. AND KATO, M.J. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 575–580, 2000.

FORTES, F.; CASTILHO, R.F.; CATISTI, R.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Ca<sup>2+</sup> induces a cyclosporin A – insensitive permeability transition pore in isolated

potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. **J. Bioenerg. Biomemb.**, v. 33, p. 43–51, 2001.

FOWLER, S; THOMASHOW, M.F. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **Plant Cell**, v. 14, p. 1675-1690, 2002

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; SANTOS, A.L.W.; ASTARITA, L.V. AND NODARI, R.O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In – *Somatic embryogenesis in woody plants*, eds. S. Jain, P. Gupta; R. Newton. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 6, p. 457–478, 2000.

GUPTA, P.K.; PULLMAN, G.S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. **US Patent 5,036,007**. 1991

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141–1148, 1983.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, p. 67–202, 2002.

HEIN, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 672–584, 2002.

HODNICK, W.F.; KUNG, F.S.; ROETTGER, W.J.; CRAIG, W.B.; PARDINI, R.S. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 14, p. 2345–2357, 1986.

HODNICK, W.F.; BOHMONT, C.W.; CAPPS, C.; PARDINI, R.S. Inhibition of the mitochondrial NADH – oxidase ( NADH – coenzyme Q oxido – reductase) enzyme

system by flavonoids: a structure – activity study. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 17, p. 2873–2874, 1987.

HODNICK, W.F.; MILOSAVLJEVIC, E.B.; NELSON, J.H.; PARDINI, R.S. Electrochemistry of flavonoids – Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2607–2611, 1988.

HERRERIAS, T. **Estudo do Mecanismo de Ação da Eupafolina sobre o Metabolismo Energético Mitocondrial e Viabilidade Celular de Células Hela**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

JEZEK, P.; COSTA, A.D. AND VERCEIS, A.E. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondrial. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 32743-32748, 1996.

JEZEK, P.; COSTA, A.D. AND VERCEIS, A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 24272–24278, 1997.

JEZEK, P.; ENGSTOVA, H.; ZACKOVA, M.; VERCESI, A.E.; COSTA, A.D.; ARRUDA, P. AND GARLID, K.D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1365, p. 319–327, 1998.

JESEK, P. AND URBANKOVA, E. Specific sequence of motifs of mitochondrial uncoupling proteins. **IUBMB Life**, v. 49, p. 63-70, 2000.

JEZEK, P.; ZACKOVA, M.; KOSAROVA, J.; RODRIGUES, E.T.S.; MADEIRA, V.M.C. AND VICENTE, J.A.F. Occurrence of plant–uncoupling mitochondrial protein (PUMP) in diverse organs and tissues of several plants. **J. Bioenerg. Biomem.**, v. 32, p. 549–561, 2000.

JUÁREZ, O.; GUERRA, G.; MARTINEZ, F.; PARDO, J.P. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1658, p. 244–251, 2004.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. **Free Radicals in Diagnostic Medicine**. Ed. D. Armstrong, Plenum Press, 1994.

KANTROW, S.P.; TATRO, L.G.; PIANTADOSI. Oxidative stress and adenine nucleotide control of mitochondrial permeability transition. **Free Radical Biology e Medicine**. v. 28, n. 2, p. 251–260, 2000.

KEEGSTRA, K.; THOMASHOW, M. Adapting physiology and metabolism to changes in the environment. **Cur Opi. Plant Biol.**, v. 5, p. 191–192, 2002.

KERSCHER, S.J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1459, p. 274–283, 2000.

KERSHAW, P. AND WAGSTAFF, B. The southern conifer family Araucariaceae: history, status and value for paleoenvironmental reconstruction. **Annu. Ver. Ecol. Syst.**, v. 32, p. 397–414, 2001.

KEYHANI, J. AND KEYHANI, E. Cytochrome *c* oxidase biosynthesis and assembly in *Candida utilis* yeast cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 167, p. 588-595, 1975.

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

KROMHOUT, D. Diet and cardiovascular diseases. **Journal of Nutrition, Health, and Aging**, v. 5, p. 144–149, 2001.

KUMAR, R.; LELU, M.A. AND SMALL, I., Purification of mitochondria and mitochondrial nucleic acids from embryogenic suspension-cultures of a gymnosperm, *Larix x. leptoeuropaea*. **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 8, p. 534–538, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680 – 685, 1970.

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

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

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C. AND RANDAL, R.J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUETHY, M.H.; HAYES, M.K. AND ELTHON, T.E. Partial purification and characterization of three NAD(P)H dehydrogenases from *Beta vulgaris* mitochondria, **Plant Physiol.**, v. 97, p. 1317–1322, 1991.

LULSDORF, M.M.; TAUTORUS, T.E.; KIKCIO, S.I.; DUNSTAN, D.I. Growth parameters of embryogenic suspension culture of Interior spruce (*Picea glauca – engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). **Plant Sci.**, v. 82, p. 227–234, 1992.

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

MARCANO, D.; MASAHISSA, H. **Fitoquímica Orgânica**. Caracas: Universidade Central de Venezuela, p. 81, 1991.

MARIANO, B.M. **Efeitos do Estresse sobre Componentes Alternativos da cadeia Respiratória e na Transição de Permeabilidade em Mitocôndrias de Tubérculos de Batata e Caracterização de Mitocôndrias de *Araucária Angustifolia***. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MARIANO, A.B.; KOVALHUK, L.; VALENTE, C.; MAURER – MENESTRINA, J.; PEREIRA – NETTO, A.B.; GUERRA, M.P. AND CARNIERI, E.G.S. Improved method for isolation of coupled mitochondria of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 47, n. 6, p. 873–879, 2004.

MARKHAM, K.R. **Techniques of Flavonoid Identification**. Londres: Academic Press, p. 113, 1982.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases, **Phytochemistry**, v. 66, p. 2399–2407, 2005.

MATHIESEN, L.; MALTERUD, K.E.; SUND, R.B. Uncoupling of respiration and inhibition of ATP synthesis in mitochondria by C – methylated flavonoids from *Myrica gale* L. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4. p. 373–379, 1996.

MATTOS, J.R. O pinheiro brasileiro, **Artes Gráficas Princesa LTDA**, v. 1, 2<sup>o</sup> ed., p. 225, 1994.

MAXWELL, D.P.; WANG Y. AND McINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondria reactive oxygen production in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 8271-8276, 1999.



MAXWELL, D.P.; NICKELS, R. AND McINTOSH, L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. **Plant J.**, v. 29, p. 269-279, 2002.

McINTOSH, L. Molecular biology of the alternative oxidase. **Plant Physiol.**, v. 105, p. 781–786, 1994.

MEEUSE, B.J.D. Thermogenic respiration in aroids. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 26, 117–126, 1975.

MELO, A.M.P., ROBERTS, T.H., MØLLER, 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**, v. 1276, p. 133–139, 1996.

MELO, A.M.P., DUARTE, M. AND VIDEIRA, A. Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1412, p. 282-287, 1999.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: **The Flavonoids: advances in Research since 1986 (Ed Harbone JD)**. p. 619–652. Chapman & Hall, London, 1986.

MILLAR, A.H. AND DAY, D.A. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. **FEBES Lett.**, v. 398, p. 155-158, 1996.

MILLAR, A.H.; HOEFNAGEL, M.H.N.; DAY, D.A. AND WISKICH, J.T. Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 613-618, 1996.

MILLAR, A.H. AND DAY, D.A. Alternative solutions to radical problems. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 289-290, 1997.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; LONG, S. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.** v. 40, p.572-580, 2004

MIWA, S. AND BRAND, M.D. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 1300–1301, 2003.

MØLLER, I.M. Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 561–591, 2001.

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

NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics 2** San Diego: Academic Press, p. 65–204, 1992.

NICHOLLS, D.G. AND RIAL, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1. **J. Bionerg. Biomembr.**, v. 31, p. 399-418, 1999.

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

NOGUEIRA, F.T.S. **Identificação e Caracterização de Genes Expressos em Resposta ao Estresse por Baixas Temperaturas em Cana-de-açúcar.** Campinas,

2004. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

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

PINHEIRO, H.A.; BORGES, R.; SILVA, M.A.P.; CENTENO, D.C. Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 16, n. 2, p. 69–76, 2004.

PRASAD, T.K.; ANDERSON, M.D.; MARTIN, B.A.; STEWART, C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**. v. 6, p. 65-74, 1994.

RABBANI, M.A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M.A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant Physiol**, v. 133, p.1755-1767, 2003.

RADOJEVIC, L.; ÄLVAREZ, C.; FRAGA, M.F.; RODRÍGUEZ, R. Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. *Ssp.Salzmannii* embryos. **In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant.**, v. 35, p. 206–209, 1999.

RASMUSSEN, A.G. AND MØLLER, I.M. NAD(P)H Dehydrogenases on the inner surface of the inner mitochondrial membrane studied using inside–out submitochondrial particles. **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 357–365, 1991.

RAVANEL, P.; TISSUT, M.; DOUCE, R. Effects of flavone on the oxidative properties of intact plant mitochondria. **Phytochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2101–2103, 1981.

RAVANEL, P.; TISSUT, M.; DOUCE, R. Uncoupling activities of chalcones and dihydrochalcones on isolated mitochondria from potato tubers and mung bean hypocotyls. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2845–2850, 1982.

RAVANEL, P. Uncoupling activities of a series of flavones and flavonols on isolated plant mitochondria. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1015–1020, 1986.

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

ROBERTS, T.H.; FREDLUND, K.M. AND MØLLER, I.M. Direct evidence for the presence of two external NAD(P)H dehydrogenases coupled to the electron transport chain in plant mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 373, p. 307–309, 1995

RUY, F.; VERCESI, A.E.; ANDRADE, P.B.M.; BIANCONI, M.L.; CHAIMOVICH, H. AND KOWALTOWSKI, A.J. A highly active ATP-insensitive K<sup>+</sup> import pathway in plant mitochondria. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 36, p. 195–202, 2004.

SANTOS, A.L.W.; SILVEIRA, V.; STEINER, N. AND VIDOR, M. GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis in Parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Braz. Arch. Biol. Tech.**, v. 45, p. 97–106, 2002.

SETOGUCHI, H.; OSAWA, T.A.; PINTAUD, J.; JAFFRÉ, T.; VEILLON, J. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. **Am. J. of Botany**, v. 85, n. 11, p. 1507, 1998.

SHIMIZU, J.Y.; OLIVEIRA, Y.M.M. Distribuição da variação e usos dos recursos genéticos de araucária no Sul do Brasil. **EMBRAPA-URPFCS**, documento 4, 1981.

SIEDOW, AND BERTHOLD, D.A. The alternative oxidase: a cyanide-resistant respiratory pathway in higher plants. **Plant Physiol.**, v. 66, p. 569-573, 1986.

SIEDOW, J.N.; UMBACH, A.L. AND MOORE, A.L. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. **FEBS Lett.**, v. 362, p. 10–14, 1995.

SIEDOW, J.N. AND UMBACH, A.L. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1459, p. 432–439, 2000.

SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 53–60, 2004

SILVEIRA, V.; SANTA – CATARINA, C.; TUN, N.N.; SCHERER, G.F.E.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**. v. 171, p. 91–98, 2006.

SINGER, T.P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenaseS. **Methods Biochem. Anal.**, Weinheim, 1974, v. 22, p. 123-175, 1974.

SKULACHEV, V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. **FEBS Lett.**, v. 397, p. 7–10, 1996.

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

SLUSE, F.E.; ALMEIDA A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W. AND VERCESI, A.E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 433, p. 237-240, 1998.

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

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

SOMLO, M. Induction des lactico-cytocrome c reductases (D - ET L -) de la levure aerobie par les lactates (D - ET- L). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 97, p. 183-201, 1965.

SOOLE, K.L. AND MENZ, R.I. Functional molecular aspects of the NADH dehydrogenases of plant mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 27, n. 4, p. 397–406, 1995.

SVENSSON, A.S.; RASMUSSEN A.G. Light – dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. **Plant J.**, v. 28, p. 73–82, 2001.

SVENSSON, A.S.; JOHANSSON, F.L.; MØLLER, I.M.; RASMUSSEN, A.G. Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves. **FEBS Lett.**, v. 517, p. 79–82, 2002.

STEINER, N.; VIEIRA, F.N.; MALDONADO, S., GUERRA, M.P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 48, n. 6, p. 895–903, 2005.

STEINER, N. **Parâmetros Fisiológicos e Bioquímicos Durante a Embriogênese Zigótica e Somática de *Araucária Angustifolia* (BERT.) O. KTZE.** Florianópolis, 2005. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

TAIZ, L. ZEIGER, E. (eds.) **Plant Physiology** (2nd ed.) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1998.

THOMASHOW, M.F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 50, p. 571-599, 1999.

TRONO, D.; FLAGELLA, Z.; LAUS, M.N.; DI FONZO, N.; PASTORE, D. The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hyperosmotic stress in mitochondria from durum wheat seedling. **Plant Cell and Environ.**, v. 27, p.437-448, 2004.

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*. **The international Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 36, p. 162–172, 2003.

UYEMURA, A.S.; LUO, S.; VIEIRA, M.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPOS, R. Oxidative phosphorylation and rotenone – insensitive malate – and NADH – quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelli yoelli* mitochondria *in situ*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 1, p. 385–393, 2004.

VANLERBERGHE, G.C.; McINTOSH, L. Lower temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. **Plant Physiology**, v. 100, p. 115-119, 1992.

VANLERBERGHE, G.C.; McINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 703-734, 1997.

VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M. AND CHAIMOVICH, H. Pumping Plants. **Nature**, v. 375, p. 24, 1995.

VERCESI, A.E.; JESEK, P.; COSTA, A.D.T.; KOWALTOVSKI, A.J.; MAIA, I.G. AND ARRUDA, P. A plant uncoupling mitochondrial protein. In *Plant mitochondrial: from gene to function*, Backhuys Publisher, Leiden, Netherlands, p. 435-440, 1998.

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

VINCENTZ, M.; CARA, F.A.; OKURA, V.K.; DA SILVA, F.R.; PEDROSA, G.L.; HEMERLY, A.S.; CAPELLA, A.N.; MARINS M.; FERREIRA, P.C.; FRANCA, S.C.; GRIVET, L.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; BURNQUIST, W.L.; TARGON, M.L.; SIQUEIRA, W.J.; KURAMAE, E.E.; MARINO, C.L.; CAMARGO, L.E.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; FERLAN, L.R.; LEMOS, M.V.; NUNES, L.R.; GOMES, S.L.; SANTELLI, R.V.; GOLDMAN, M.H.; BACCI, M. JR.; GIGLIOTI, E.A.; THIEMANN, O.H.; SILVA, F.H.; VAN SLUYS, M.A.; NOBREGA, F.G.; ARRUDA, P.; MENCK, C.F. Evaluation of monocot and eudicot divergence using the surgacane transcriptome. **Plant Physiol**, v. 134, p. 951-959, 2004.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 870-874, 1981.



YAMAGUCHI, L.F.; VASSÃO, D.G.; KATO, M.J. AND MASCIO, P. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2238-2247. 2005.

WAGNER, A.M. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. **FEBS Lett.**, v. 368, p. 339–342, 1995.

WAGNER, A.M. AND KRAB, K. The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. . **Plant Physiol.**, v. 95, p. 318–325, 1995.

WAGNER, A.M.; Van der BERGEN, C. W. M.; WINCENCJUSZ, H. Stimulation of the alternative pathway by succinate and malate. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 1035–1042, 1995.

WILLIAMS, C.A.; GRAYER, R.J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Products Repopts.** v. 21, p. 539–573, 2004.

WISKICH, JT. AND BONNER, W.D. Preparation and properties of sweet potato mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 38, p. 594–604, 1963.

WOLLENWEBER, E.; DIETZ, V.H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycnes in plants. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 869, 1982.

ZANDAVALLI, R.B.; DILLENBURG, L.R. AND SOUZA, P.V.D. Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. **Applied Soil Ecology**, v. 25, p. 245–255. 2004.