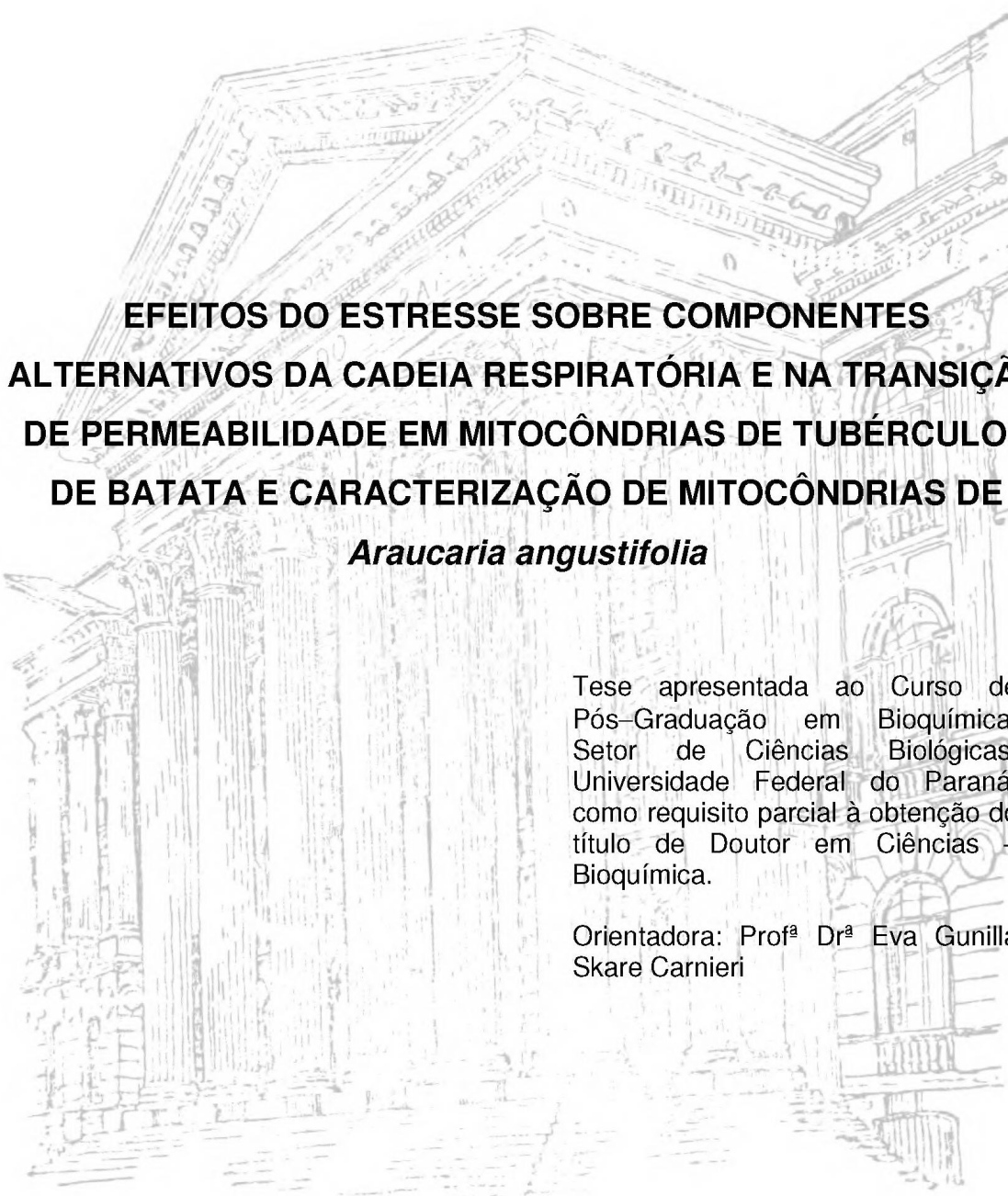


ANDRÉ BELLIN MARIANO



**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
*Araucaria angustifolia***

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Eva Gunilla Skare Carnieri

CURITIBA

2005

ANDRÉ BELLIN MARIANO

**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
*Araucaria angustifolia***

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:



Profª Drª Eva Gunilla Skare Carnieri
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR




Profª Drª Maria Eliane Merlin Rocha
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR



Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi
Departamento de Patologia Clínica
UNICAMP



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Departamento de Fitotecnia
UFSC



Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
USP - Ribeirão Preto

Curitiba, 30 de Março de 2005

Orientadora: Prof^a Dr^a Eva Gunilla Skare Carnieri

“Tú... és forte! Mas a medida de todos... seja ele homem ou Deus... não é pela força que ele possui... mas o que ele faz com ela.”

Kurt Busiek

AGRADECIMENTOS

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

Em especial agradeço a Prof. Juliana Maurer-Menestrina e o Prof. Adauto Bellarmino Pereira-Neto pela disponibilização dos calos de araucária bem como pela manutenção das culturas vegetais durante o todo o trabalho.

Agradeço toda a atenção da Prof. Ione Salgado e sua ajuda nos experimentos de transporte de cálcio realizados em seu laboratório bem como na ajuda durante a redação do manuscrito publicado na revista *Plant Physiology and Biochemistry*.

Agradeço toda a ajuda e sugestões do Prof. Albert James Gorin durante a redação dos artigos em inglês.

Agradeço também os professores, funcionários e colegas do laboratório e do departamento, especialmente a estagiária Caroline Valente e o bolsista Leonardo Kovalhuk pela ajuda durante o isolamento das mitocôndrias e experimentos realizados, bem como a Prof. Eva Gunilla Skare Carnieri pela orientação, amizade e paciência.

Agradeço a Coordenação por todo o apoio concedido e por permitir a qualificação do mestrado para o doutorado. Agradeço também o apoio financeiro da Capes e do CNPq.

Agradeço a minha orientadora Prof. Eva Gunilla Skare Carnieri por todo o seu apoio durante esses 4 anos de doutorado, toda a sua paciência e principalmente por sua amizade.

SUMÁRIO

LISTA DA TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS.....	1
1.1.1. NAD(P)H desidrogenases Alternativas.....	1
1.1.1.1. NAD(P)H desidrogenases alternativas externas.....	1
1.1.1.2. NAD(P)H desidrogenases alternativas internas.....	4
1.1.2. Oxidase alternativa.....	6
1.1.3. Proteína Desacopladora em Plantas.....	9
1.1.4. <i>Araucaria angustifolia</i>	11
1.1.5. Espécies Reativas de Oxigênio.....	12
1.1.6. Transição de Permeabilidade Mitocondrial.....	15
1.1.7. Transporte mitocondrial de Ca ²⁺	18
2. JUSTIFICATIVAS.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. OBJETIVO GERAL.....	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. TRATAMENTO DOS TUBÉRCULOS DE BATATA PELO FRIO.....	26
4.2. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULO DE BATATA.	26
4.3. MANUTENÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Araucaria angustifolia</i>.....	27
4.4. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE <i>Araucaria angustifolia</i>.....	27
4.5. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	30
4.6. DETERMINAÇÃO DA TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL.....	
4.7. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ($\Delta\psi$).....	31
4.7.1. Calibração.....	31
4.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	34
4.9. DETERMINAÇÃO DO TRANSPORTE DE Ca^{2+}.....	34
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1. ESTUDO COM MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULO DE BATATA.....	35
5.1.1. Oxidação de NADH externamente adicionado.....	35
5.1.2. Oxidação do succinato.....	38
5.1.3. Respiração resistente ao cianeto.....	40
5.1.4. Efeitos de diferentes concentrações de Ca^{2+} sobre a oxidação de NADH e succinato.....	43

5.1.5. Determinação do Potencial Elétrico de Membrana.....	45
5.1.6. Transição de Permeabilidade Mitocondrial.....	46
5.2. ESTUDO COM MITOCÔNDRIAS DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	
DE <i>A. angustifolia</i>	57
5.2.1. Isolamento de mitocôndrias de culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i>	57
5.2.2. Determinação do controle respiratório (CR).....	57
5.2.3. Capacidade de oxidação de NAD(P)H.....	60
5.2.4. Determinação de Potencial Elétrico de Membrana.....	61
5.2.5. Transporte de Ca ²⁺	64
5.2.6. Determinação da respiração insensível ao cianeto e sensível ao SHAM.....	66
5.2.7. Desacoplamento provocado por ácido oléico.....	68
6. DISCUSSÃO	70
6.1. ESTUDO COM MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULO DE BATATA	70
6.2. ESTUDO COM MITOCÔNDRIAS DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	
DE ARAUCARIA	75
7. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO I	97
ANEXO II	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resumo das propriedades respiratórias das NADH:ubiquinona oxidoreduases localizadas na membrana mitocondrial interna.....	5
Tabela 2.	Capacidade de oxidação de NAD(P) em mitocôndrias de <i>A. angustifolia</i> rompidas em nitrogênio líquido.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organização da cadeia de transporte de elétrons na membrana interna de mitocôndrias vegetais.....	3
Figura 2.	Isolamento de mitocôndrias de calos de <i>Araucaria angustifolia</i>	28
Figura 3.	Calibração do potencial elétrico de membrana em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados.....	31
Figura 4.	Relação entre o potencial elétrico de membrana (mV) e a variação de fluorescência em experimentos realizados em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados.....	32
Figura 5.	Efeitos do Ca^{2+} , mersalil e diamida sobre a oxidação de NADH externo em mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados (<u>A</u>) e estressados pelo frio (<u>B</u>) na ausência e presença de SHAM.....	36
Figura 6.	Efeitos do Ca^{2+} , mersalil e diamida na oxidação de succinato em mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados (<u>A</u>) e estressados pelo frio (<u>B</u>) na ausência e presença de SHAM.	38
Figura 7.	Efeitos do Ca^{2+} , mersalil e diamida sobre a oxidação de NADH externo e succinato em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados e estressados pelo frio.	41
Figura 8.	Efeito de diferentes concentrações de Ca^{2+} na velocidade de oxidação do NADH e succinato.....	43
Figura 9.	Efeitos da adição de mersalil, SHAM e FCCP no $\Delta\psi$ em mitocôndrias isoladas de tubérculos estressados pelo frio.....	44
Figura 10.	Inchamento mitocondrial induzido pela adição de Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados (A) e estressados (B) pelo frio.....	47
Figura 11.	Efeitos do SHAM e BHAM sobre o inchamento mitocondrial induzido pela adição de Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados.....	49

Figura 12.	Efeitos do SHAM sobre o inchamento mitocondrial induzido pela adição de Ca^{2+} e diamida em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados.....	51
Figura 13.	Efeitos do SHAM sobre o inchamento mitocondrial induzido pela adição de mersalil em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados.....	53
Figura 14.	Efeitos do SHAM sobre o inchamento mitocondrial induzido pela adição de mersalil em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata estressados.....	55
Figura 15.	Consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> utilizando succinato, malato/glutamato ou NADH como substratos oxidáveis.....	58
Figura 16.	Efeitos da adição de Ca^{2+} , ADP, oligomicina, FCCP e/ou vermelho de rutênio sobre o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i>	62
Figura 17.	Transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias de <i>Araucaria angustifolia</i>	64
Figura 18.	Respiração insensível ao cianeto e sensível ao SHAM em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i>	66
Figura 19.	Consumo de oxigênio (A) e $\Delta\psi$ (B,C) demonstrando a presença da PUMP em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i>	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Antimicina A
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AO	ácido oleico
AOX	Oxidase alternativa
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BHAM	Ácido benzilhidroxâmico
BSA	Soroalbumina bovina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CsA	Ciclosporina A
Da	Dalton
DPI	<i>Diphenyleneiodonium</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glico-bis(β-amino éter) N, N, N', N'-tetracético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	Carbonil cianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	[N-(2 hidroxietil) piperazina N'-(2 ácido etanosulfônico)]
HNE	4-hidroxi-2- <i>nonenal</i>
[K ⁺] _{in}	Concentração de potássio da matriz mitocondrial
[K ⁺] _{ex}	Concentração de potássio no exterior da mitocôndria
K _m	Constante de Michaelis
MCP	Morte celular programada
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
•OH	Radical hidroxil
Pi	Fosfato inorgânico

PUMP	Proteína desacopladora de plantas
RC	Coefficiente de controle respiratório
SHAM	Ácido salicilhidroxâmico
Suc	Succinato
SOD	Superóxido dismutase
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
U.A.	Unidades arbitrárias
UCP	Proteína desacopladora mitocondrial
VR	Vermelho de rutênio
$\Delta\psi$	Potencial Elétrico de Membrana
ΔA_{540}	Delta de absorbância em 540 nm

RESUMO

Mitocôndrias de tubérculos de batata tratados pelo frio foram isoladas com o intuito de comparar os efeitos deste estresse com mitocôndrias de tubérculos não tratados. Este tratamento aumentou a sensibilidade da NADH desidrogenase externa - localizada na face externa da membrana mitocondrial interna - ao mersalil, mas não alterou os efeitos estimulatórios provocados pelo Ca^{2+} . Não foram observados efeitos do mersalil, diamida ou Ca^{2+} sobre o consumo de O_2 quando o substrato era o succinato. A diamida inibiu a oxidação de NADH e succinato em mitocôndrias de batata somente na presença de cianeto, indicando a ação sobre a oxidase alternativa (AOX). Houve inibição da AOX na presença de Ca^{2+} durante a oxidação de succinato e NADH, mostrando uma possível regulação da enzima pelo íon. O inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} mostrou-se mais evidente após o tratamento dos tubérculos pelo frio. Houve proteção por DTT, EGTA e catalase nas situações de estresse e sem estresse, indicando que grupamentos SH, Ca^{2+} e espécies reativas de O_2 (ERO), estão envolvidos no fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) em ambas as situações. O inchamento provocado por Ca^{2+} e/ou mersalil foi impedido pela presença de SHAM, mesmo em mitocôndrias de tubérculos não estressados, mostrando que o efeito protetor observado não está relacionado com sua capacidade de inibir a AOX e sim, com suas propriedades de quelação aos íons ferro.

Neste trabalho também foram isoladas pela primeira vez mitocôndrias de calos de *Araucaria angustifolia* e assim obtidas mitocôndrias capazes de respirar pela oxidação dos substratos malato / glutamato, NADH e succinato, com alta capacidade fosforilativa, demonstrada pelos controles respiratórios e $\Delta\psi$. Ao contrário das mitocôndrias de batata, mitocôndrias isoladas de calos de *Araucaria angustifolia* foram capazes de captar Ca^{2+} de modo sensível ao vermelho de rutênio e dependente do potencial elétrico de membrana e fosfato. Houve também efluxo do íon tanto pelo reverso da via de influxo, pela adição de FCCP, como pela via de efluxo com vermelho de rutênio. Estas mitocôndrias foram capazes de oxidar NADH externamente adicionado na presença de rotenona, e apresentaram um consumo de O_2 insensível ao cianeto e sensível ao SHAM, indicando a presença de NADH desidrogenase externa e AOX, respectivamente. Além disso as mitocôndrias foram desacopladas pela presença de ácido graxo e ausência de BSA, sugerindo a presença de proteína desacopladora de plantas, aqui denominada Araucaria-UCP. O estudo destas mitocôndrias capazes de captar Ca^{2+} e isoladas de uma gimnosperma encontrada principalmente em regiões frias do sul do Brasil permitirá a comparação com mitocôndrias de angiospermas que apresentem ou não o mecanismo de transporte do íon, bem como aprofundar os conhecimentos em relação a TPM e aos efeitos de estresse pelo frio.

ABSTRACT

Mitochondria were isolated from potato tubers exposed to cold temperature in order to compare the effects of this stress with unstressed tuber mitochondria. Cold treatment increased the sensitivity of the external NADH dehydrogenase – located on the external face of the internal membrane – to mersalyl, but did not alter the stimulatory effects caused by Ca^{2+} . There were no effects caused by mersalyl, diamide or Ca^{2+} on the oxygen consumption when the substrate was succinate. Diamide inhibited the oxidation of NADH and of succinate in potato mitochondria only when in the presence of cyanide, indicating an action on the alternative oxidase (AOX). The results showed that Ca^{2+} presented an inhibitory effect on the AOX pathway when mitochondria were energized with NADH or succinate, indicating a possible regulation of the enzyme by this ion. The mitochondrial swelling induced by Ca^{2+} was more evident after cold treatment of the tubers. In stressed and unstressed conditions there was protection from swelling by DTT, EGTA and catalase. This shows that thiol reagents, Ca^{2+} and reactive oxygen species (ROS) are involved in mitochondrial permeability transition (MPT) under both conditions. Swelling by Ca^{2+} and/or mersalyl was delayed when in the presence of SHAM even in mitochondria from unstressed tubers, which shows that its protective effect is unrelated to its capacity of inhibiting AOX and probably related to iron quelation.

Mitochondria were also isolated for the first time from callus of *Araucaria angustifolia*. The mitochondria obtained were able to oxidize malate/glutamate, NADH and succinate as respiratory substrates and able to sustain a high transmembrane electrical potential. Unlike potato mitochondria, those isolated from callus of *A. angustifolia* were able to take up Ca^{2+} supported by substrate oxidation, sensitive to ruthenium red and dependent on membrane potential and phosphate. Efflux of Ca^{2+} by the reversal of the influx pathway occurred by addition of FCCP and by the efflux pathway by addition of ruthenium red. These mitochondria were also able to oxidize externally added NADH in the presence of rotenone, and presented oxygen consumption insensitive to cyanide and sensitive to SHAM indicating the presence of external NADH-dehydrogenase and AOX, respectively. Besides, mitochondria were uncoupled, in the absence of BSA, by the addition of the free fatty acid – oleic acid – thus suggesting the presence of the plant uncoupling mitochondrial protein, hereby denominated *Araucaria*-UCP. The study of these mitochondria capable of Ca^{2+} uptake, isolated from a gymnosperm found principally on the highlands of southern Brazil, will allow the comparison with mitochondria from angiosperms presenting or not the Ca^{2+} transporting mechanism. It will also increase our knowledge regarding MPT and the effects relative to cold stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1. MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS

1.1.1. NAD(P)H desidrogenases Alternativas

As mitocôndrias de vegetais, a exemplo do que ocorre com mitocôndrias de mamíferos contêm na membrana mitocondrial interna a cadeia transportadora de elétrons, bombeadora de prótons. Porém, diferentemente do que ocorre com mitocôndrias de mamíferos, a cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias vegetais possui pelo menos quatro NAD(P)H desidrogenases não bombeadoras de prótons e insensíveis a rotenona: duas localizadas na face externa da membrana mitocondrial interna, NADH desidrogenase externa e NADPH desidrogenase externa, e duas localizadas na face interna da membrana mitocondrial interna, respectivamente a NADH desidrogenase interna e NADPH desidrogenase interna (MØLLER, 2001) (Figura 1). As NAD(P)H desidrogenase externas permitem que a mitocôndria vegetal oxide NAD(P)H exógeno, transferindo elétrons diretamente para a ubiquinona, resultando na produção de ATP (LUETHY *et al.*, 1991).

1.1.1.1. NAD(P)H desidrogenases alternativas externas

A presença de atividade NADH:ubiquinona oxidoreductase alternativa foi primeiramente observada por BONNER e VOSS (1961) ao evidenciarem que mitocôndrias de plantas, ao contrário das mitocôndrias de mamíferos, eram capazes de oxidar NAD(P)H externamente adicionado (SOOLE e MENZ, 1995). WISKICH e BONNER (1963) ao trabalharem com mitocôndrias de plantas, observaram que os inibidores do complexo I (a rotenona e a piericidina A) não causavam completa inibição da oxidação de NADH (WISKICH e BONNER, 1963). ROBERTS *et al.* (1995) mostraram que a oxidação de NAD(P)H apresentou diferentes sensibilidades ao DPI (*diphenyleneiodonium*) e permitiu a observação de distintas NAD(P)H desidrogenases presentes na face

citossólica da membrana mitocondrial interna de organelas isoladas de *Solanum tuberosum* L. e *Arum maculatum*. Nesses experimentos, foi observado que o DPI ($0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$) inibe totalmente a oxidação de NADPH dentro de 1 minuto, sendo a inibição da oxidação de NADH de 44%. Além disso, estes autores constataram que o DPI colapsou totalmente o potencial elétrico de membrana gerado pela adição de NADPH externo, e uma adição seqüencial de NADH regenerou o potencial, sendo em seguida colapsado por adição de antimicina A (inibidor do complexo III) (ROBERTS *et al.*, 1995). Estes resultados mostram claramente 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. Também mostram que as desidrogenases externas doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, sendo capaz de gerar potencial elétrico de membrana.

Em mitocôndrias de batata foram encontradas duas enzimas homólogas as NADH desidrogenases alternativas encontradas em *E. coli* e *S. cerevisiae*, denominadas de proteínas NDA e NDB, respectivamente (RASMUSSEN *et al.*, 1999). O trabalho ainda mostrou que as proteínas são endereçadas para a membrana mitocondrial interna, sendo que a proteína NDA fica direcionada para a matriz mitocondrial e a proteína NDB fica voltada para o lado citossólico. Única entre as NADH desidrogenases, a seqüência de aminoácidos da proteína NDB possui um inserto não conservado, que é similar ao motivo *EF-hand* para ligação ao cálcio. Este fato justificaria a dependência da NADH desidrogenase externa ao Ca^{2+} (MELO *et al.*, 1999). Acredita-se que o Ca^{2+} facilita a associação da NADH desidrogenase externa com a membrana mitocondrial interna por ligação ao domínio "EF-HAND", já que até o momento não foi descrita a presença de hélices transmembranas dentre todas as NAD(P)H desidrogenases alternativas (KERSCHER, 2000).

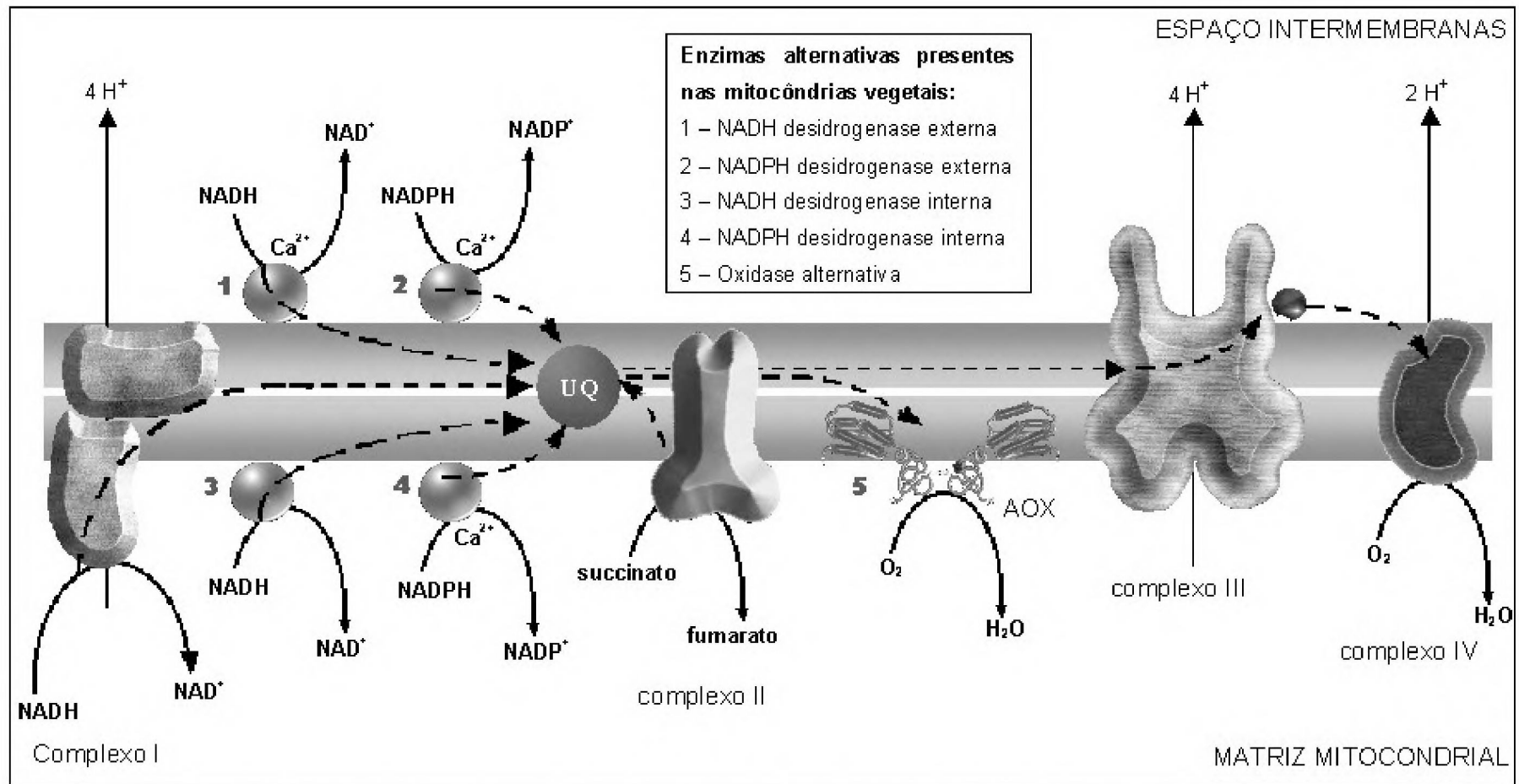


Figura 1. Organização da cadeia de transporte de elétrons na membrana interna de mitocôndrias vegetais: Mitocôndrias de plantas contêm cinco enzimas adicionais não bombeadoras de prótons. Inibidores específicos: rotenona para complexo I, antimicina para complexo III, cianeto para complexo IV e ácido salicilhidroxâmico (SHAM) para oxidase alternativa (AOX).

1.1.1.2. NAD(P)H desidrogenases alternativas internas

Na face interna da membrana mitocondrial interna estão localizadas duas NAD(P)H desidrogenases que oxidam NAD(P)H da matriz, competindo com o Complexo I: a NADH desidrogenase interna que oxida NADH (independente da presença de Ca^{2+}), e a NADPH desidrogenase interna que oxida NADPH de forma dependente da presença de Ca^{2+} (RASMUSSON e MØLLER, 1991) e sensível ao inibidor DPI (MELO *et al.*, 1996). As evidências para a presença de diferentes enzimas NAD(P)H desidrogenases alojadas no lado interno da membrana mitocondrial interna surgiram a partir de estudos em partículas submitocondriais invertidas (*inside-out SMP*). Neste modelo experimental, as oxidações de deamino-NADH e deamino-NADPH – análogos reduzidos de NADH e NADPH, respectivamente – foram totalmente inibidas pela adição de rotenona mostrando que somente o complexo I foi responsável por essa atividade (MENZ *et al.*, 1992). Em contraste, a oxidação de NADH e NADPH foi parcialmente inibida pela presença da rotenona, indicando que existe, portanto, ao menos uma desidrogenase separada capaz de oxidá-los (RASMUSSON e MØLLER, 1991). Assim sendo, a atividade de desidrogenase insensível a rotenona pode usar tanto NADH quanto NADPH como substrato. Além disso, a oxidação de NADPH mostrou-se ser Ca^{2+} -dependente (RASMUSSON e MØLLER, 1991). Entretanto, somente em 1996 é que evidências diretas da presença de pelo menos duas NADH desidrogenases alternativas internas foram apresentadas por MELO e colaboradores, ao trabalharem também com partículas submitocondriais invertidas, obtidas de mitocôndrias de *Solanum tuberosum* L. (tubérculos de batata) (MELO *et al.*, 1996). Em seus experimentos, o potencial elétrico de membrana gerado pela adição de deamino-NADH foi colapsado pela adição de rotenona, confirmando os dados de MENZ *et al.* (1992) que afirmavam que somente o complexo I era responsável pela oxidação dos análogos reduzidos de NADH e também de NADPH, porém com um alto K_m . A adição subsequente de NADPH gerou pequeno potencial de membrana que foi colapsado pela adição de DPI, mostrando que a NADPH desidrogenase interna Ca^{2+} -dependente é sensível

ao DPI (RASMUSSEN e MØLLER, 1991). Na presença de rotenona (condição onde o Complexo I está inibido) e DPI (condição onde a NADPH desidrogenase Ca^{2+} - dependente está inibida) a adição de NADH originou um rápido consumo de oxigênio e geração de um potencial elétrico de membrana, os quais foram inibidos e colapsados por antimicina A (inibidor do complexo III), respectivamente. Dessa forma, MELO e colaboradores evidenciaram a presença de uma terceira desidrogenase (NADH desidrogenase) no lado interno da membrana mitocondrial interna também ligada à cadeia de transporte de elétrons via complexos III e IV. Alternando a presença de EGTA 1 mmol.L^{-1} e $\text{Ca}^{2+} 1 \text{ mmol.L}^{-1}$ nesses experimentos, MELO e colaboradores (1996) confirmaram que dentre as três NAD(P)H desidrogenases internas, apenas a oxidação de NADPH insensível a rotenona é dependente de Ca^{2+} . Um resumo das propriedades respiratórias das NADH desidrogenases localizadas na membrana mitocondrial interna está apresentado na Tabela I.

TABELA 1. Resumo das propriedades respiratórias das NADH:ubiquinona oxidoreduases localizadas na membrana mitocondrial interna.

Parâmetro	Complexo I	Desidrogenases insensíveis a Rotenona			
		Face Interna ^A		Face Externa ^B	
		NADPH	NADH	NADPH	NADH
<i>Especificidade ao substrato</i>					
Deamino-NADH	+	-	-	-	-
NADH	+	RF	+	-	+
NADPH	RF	+	-	+	RF
<i>Sensibilidade a Inibidores</i>					
Rotenona	+	-	-	-	-
DPI (<i>diphenyleneiodonium</i>)	+	+	-	+	-
Dependência ao Ca^{2+}	-	+	-	+	+

RF indica reação fraca.

A – (MELO *et al.*, 1996), (RASMUSSEN e MØLLER, 1991), (MENZ *et al.*, 1992), (RASMUSSEN e MØLLER, 1993).

B – (MØLLER e LIN, 1986), (MØLLER *et al.*, 1993), (ROBERTS *et al.*, 1995).

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que em mitocôndrias de tubérculos de batata (rompidas em nitrogênio líquido) mostraram um estímulo na oxidação do NADH (condição na qual as quatro

NAD(P)H desidrogenases e o complexo I estão ativos) bem como inibição de algumas enzimas na presença de mersalil e diamida (MARIANO *et al.*, 1998).

1.1.2. Oxidase Alternativa

Divergindo das mitocôndrias de mamíferos, as mitocôndrias de plantas e de alguns microorganismos (por exemplo: *Neurospora crassa*, *Hansenula anomala* e *Candida lipolytica*) possuem um transporte de elétrons bifurcado. Além da respiração via citocromo encontrada em todos os eucariontes, estes organismos possuem uma segunda via, alternativa, insensível a antimicina-A e a cianeto, que diverge da cadeia de transporte de elétrons principal após a ubiquinona (SOLOMOS, 1977; VANLERBERGHE e McINTOSH, 1997). Nesta via alternativa, os elétrons passam da ubiquinona para a oxidase alternativa ao invés de passar pelos complexos III e IV. Na via alternativa não existe portanto a geração de $\Delta\mu_{H^+}$ pelo trecho entre ubiquinona até complexo IV. A enzima responsável por essa atividade é a oxidase alternativa, normalmente denominada de AOX (SIEDOW e UMBACH, 2000).

Em geral, os termos “respiração resistente a cianeto”, “respiração insensível a cianeto” ou “via alternativa” são usados para descrever a respiração celular, decorrente da atividade da oxidase alternativa, que é resistente aos inibidores terminais (cianeto, azida, CO) e inibidores que agem entre os citocromos tipo *b* e *c* (antimicina A) (IKUMA, 1972; SOLOMOS, 1977). Esse tipo de respiração foi mais bem definida na florescência termogênica da “voodoo lily” (*Sauromatum guttatum*) por MEEUSE (1975). Nesta planta o calor é produzido e liberado em flores efêmeras durante um único dia de florescência para melhor volatilizar aromas com o objetivo de atrair insetos polinizadores graças ao grande aumento na expressão da AOX (McINTOSH, 1994).

Os primeiros estudos da base genética para a respiração alternativa vieram do trabalho com *Neurospora*. Esses estudos mostraram que a oxidase alternativa é codificada por um único gene estrutural, *aod1*, no núcleo, e um segundo gene nuclear, *aod2*, que pode codificar elemento regulatório (BERTRAND *et al.*, 1983). O aprofundamento das investigações sobre a

oxidase alternativa só foi possível devido à produção de anticorpos e subsequente isolamento de cDNA de *S. guttatum* (KUMAR e SOLL, 1992) e *H. anomala* (SAKAJO *et al.*, 1991). Experimentos de complementação foram realizados com linhagem de *E. coli* mutante para *hemA* com cDNA isolado de *Arabidopsis thaliana*. Essa linhagem caracteriza-se por ser incapaz de crescer aerobicamente devido à falta de um heme necessário para a respiração via citocromos. Os autores isolaram células com capacidade de crescer aerobicamente nas quais a mutação tinha sido complementada pelo gene *aox1*. Como esperado, essa nova via respiratória foi insensível a cianeto e sensível a SHAM (KUMAR e SOLL, 1992). Esse experimento demonstrou claramente que a oxidase alternativa é produto de um único gene (McINTOSH, 1994).

A oxidase alternativa de plantas é uma proteína única que existe na membrana mitocondrial interna na forma de um homodímero (MOORE e SIEDOW, 1991; MAXWELL *et al.*, 1999). Sua forma madura – isto é, sem o peptídeo de trânsito mitocondrial – contém em torno de 280 aminoácidos (RHOADS e McINTOSH, 1991). Análise de hidropatia da seqüência de aminoácidos indica que a maior parte da proteína é hidrofílica, mas que existem duas regiões hidrofóbicas com aproximadamente 20 aminoácidos de comprimento, começando nos resíduos 110 e 170 na proteína madura, respectivamente (MOORE e SIEDOW, 1991). Segundo MOORE e SIEDOW (1991) o fato da oxidase alternativa se comportar como uma proteína integral de membrana sugere que estas regiões hidrofóbicas ancoram a proteína na membrana formando duas α -hélices transmembranas. Neste arranjo, a maior massa da proteína estaria situada na fase aquosa da matriz da membrana mitocondrial interna. Uma região inter-hélice, consistindo de aproximadamente 40 aminoácidos, estaria localizada no espaço intermembrana ligando as duas regiões transmembrana (MOORE e SIEDOW, 1991).

A via alternativa é inibida especificamente por agentes complexantes de ferro, como ácido hidroxâmico substituído (ácido salicilhidroxâmico – SHAM, ácido benzil hidroxâmico – BHAM ou n-propil galato) (VANLERBERGHE e

McINTOSH, 1997), tiocianato de potássio, 8-hidroxiilamina e α,α' -dipiridila (IKUMA, 1972).

A função da oxidase alternativa ainda não é totalmente conhecida. Todavia a função de produção de calor na *Sauromatum guttatum* (MEEUSE, 1975) descrita acima é bem aceita. Outras condições associadas a estresses bióticos e abióticos foram estudadas, e mostraram-se eficientes em afetar a expressão e/ou a atividade da AOX (VANLERBERGHE e McINTOSH, 1997). A dificuldade de quantificar a influência destas condições na AOX impede a unificação de hipóteses sobre a função metabólica específica da enzima (McINTOSH, 1994).

Alguns experimentos interessantes foram realizados com cultivo de células de tabaco transgênico apresentando baixo nível de AOX (MAXWELL *et al.*, 1999). Essas células apresentaram altos níveis de formação de espécies reativas de oxigênio em relação ao tipo selvagem, indicando o envolvimento da AOX na regulação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Afirma-se que, tanto a via respiratória pelos citocromos quanto à via alternativa, são reguladas em função do balanço de oxidação/redução do *pool* de ubiquinona e *turnover* de carbono, em resposta aos níveis de ATP citosólicos. Esta afirmação é feita com base em dados que mostraram que a respiração resistente ao cianeto está ativa em condições onde a via do citocromo não está saturada (SIEDOW e UMBACH, 2000).

Outros trabalhos sustentam diferentes possibilidades para a função da AOX. MOORE e SIEDOW (1991) afirmam que devido à capacidade da AOX aceitar elétrons a partir da ubiquinona, o excesso de elétrons pode ser desviado para a via alternativa em situações onde a cadeia de transporte de elétrons esteja saturada. Esta habilidade seria particularmente útil para manter a cadeia respiratória reduzida para minimizar a produção de ERO (MØLLER, 2001). Sustentando essa teoria está o fato de que a síntese da oxidase alternativa é induzida por situações onde há um aumento de ERO, como por exemplo no estresse induzido por baixas temperaturas ou por ataque de patógenos (LAMB e DIXON, 1997).

Tecidos da maioria das plantas superiores estudadas até o presente, demonstram certa quantidade de captação de oxigênio sensível ao SHAM e resistente ao cianeto. Isto é interpretado como sendo devido à presença da oxidase alternativa, porém a quantidade total e a atividade desta enzima podem variar amplamente (SIEDOW e DAY, 2000). Experimentos realizados em nosso laboratório mostram que a porcentagem de respiração resistente ao cianeto pode variar, em tubérculos de batata, de 5 até 35% em relação à respiração total. Tubérculos de batata, um exemplo de tecido dormente, funcionam como tecido de reserva de amido durante o verão, que na primavera é mobilizado para formar uma nova planta. Neste tecido a AOX pode ser induzida por tratamento com etileno, envelhecimento dos tubérculos (GROEN *et al.*, 1992) ou tratamento pelo frio (CALEGARIO *et al.*, 2003), contudo o mecanismo pela qual a indução ocorre ainda não é conhecido.

A atividade de oxidase alternativa *in vivo* é fortemente dependente da quantidade de proteína presente e da concentração de seu substrato, ubiquinona reduzida (MOORE e SIEDOW, 1991). Entretanto, nos últimos anos, houve progresso na compreensão de mecanismos adicionais para a regulação pós-traducional da oxidase alternativa de plantas (SIEDOW e UMBACH, 2000). Como descrito acima, a enzima de planta consiste em um dímero. Se as duas subunidades monoméricas estão covalentemente ligadas por uma ponte dissulfeto – por exemplo quando oxidadas pela presença de diamida – a enzima é essencialmente inativa. Redução das pontes dissulfeto por ditioneitol (DTT), produz a forma mais ativa (SIEDOW e UMBACH, 1991; UMBACH e SIEDOW, 1993). A adição de NADH ou NADPH extramitocondrial não foi capaz de promover a redução da oxidase alternativa, indicando ser um processo intramitocondrial (VANLERBERGHE *et al.*, 1995). A predominância da forma dimérica com os resíduos –SH reduzidos é favorecida pela presença de α -cetoácidos, em especial o piruvato (DAY e WISKICH, 1995), possivelmente devido à formação de um tiohemiacetal (RHOADS *et al.*, 1998). Como o piruvato é um intermediário chave no metabolismo vegetal, é possível que a ativação da oxidase alternativa constitua um mecanismo sensível para regular os níveis deste α -cetoácido. Neste caso, o aumento dos níveis de piruvato

promoveria a ativação da oxidase alternativa, estimulando o transporte de elétrons e contribuindo para a diminuição dos níveis de piruvato. Esta possibilidade foi inferida em plantas transgênicas destituídas de oxidase alternativa. Neste caso, a inibição da respiração por antimicina A (inibidor do Complexo III) resultou em produção de alta quantidade de etanol, decorrente da fermentação do piruvato acumulado graças ao desequilíbrio entre o metabolismo de carbono e o transporte de elétrons (VANLERBERGHE *et al.*, 1995).

1.1.3. Proteína Desacopladora em Plantas

Em todos os organismos eucariontes, incluindo as plantas, o gradiente eletroquímico de prótons gerado através da membrana mitocondrial interna pelo fluxo de elétrons na cadeia respiratória é utilizado pela ATPsintase para a produção de ATP. Em 1976 foi descrita uma proteína desacopladora em mitocôndrias isoladas de tecido adiposo marrom, a UCP1, capaz de transportar prótons para o interior da organela sem que houvesse a síntese de ATP (RICQUIER e KADER, 1976).

A proteína desacopladora em mitocôndrias de plantas (PUMP) foi primeiramente isolada de batata (VERCESI *et al.*, 1995) e tomate (JEZEK *et al.*, 1997) utilizando métodos previamente aplicados para mitocôndrias de tecido adiposo marrom. Posteriormente, cDNAs para proteínas desacopladoras (UCPs) foram obtidos de batata, *Arabidopsis thaliana*, trigo (HANAK e JEZEK, 2001) e recentemente de arroz (WATANABE e HIRAI, 2002). A fração protéica, chamada de PUMP, foi obtida depois de solubilização das proteínas mitocondriais e cromatografia em coluna de hidróxiapatita. A fração da PUMP foi capaz de realizar o transporte de H⁺ depois da reconstrução em proteolipossomos na presença de carboxiatractilato (inibidor do translocador de nucleotídeos), que também é um potente inibidor. A PUMP foi identificada em estudos funcionais ou por imunodeteção em vários órgãos e tecidos de aproximadamente 30 espécies de plantas superiores, incluindo

monocotiledôneas e dicotiledôneas e plantas C3, C4 e CAM (JEZEK et al., 1998, 2000; TRONO et al., 2004).

No reino vegetal, o primeiro cDNA homólogo à UCP1 foi isolado de uma biblioteca de cDNA de flores de batata em 1997 e chamado StUCP (LALOI et al., 1997; HOURTON–CABASSA et al., 2004). Desde então, vários homólogos das UCPs têm sido identificados em outras plantas, levando a um grande aumento no número de trabalhos dedicados a esta família de proteínas, e apesar disso o papel destas proteínas ainda está longe de ser elucidado. Três homólogos das UCPs foram identificados em *Arabidopsis thaliana*: AtUCP1 (MAIA et al., 1998), AtUCP2 (WATANABE et al., 1999) e AtUCP4 (MILLAR e HEAZLEWOOD, 2003). Segundo Møller, tanto a PUMP quanto a AOX são enzimas que estariam envolvidas na proteção da planta contra a formação de ERO (MØLLER, 2001). Já foi demonstrado em células de tabaco cultivadas um papel protetor da AOX (MAXWELL et al., 1999), bem como o papel protetor da PUMP (BRANDALISE et al., 2003) contra ERO. Mais recentemente foi demonstrado que UCP é estimulada por superóxido em batata (CONSIDINE et al., 2003) além de interferir no ciclo de ácidos tricarbóxicos (SMITH et al., 2004), aumentando a conversão de piruvato para citrato devido ao aumento no nível de UCP. Assim sendo, o maior avanço na compreensão das funções das proteínas desacopladoras foi a descoberta de que os ácidos graxos não ativam diretamente as UCPs. Ao invés disso, demonstrou-se que radicais superóxidos gerados externamente ativam as UCPs em mamíferos na presença de ácidos graxos (ECHTAY et al., 2002) e plantas (LALOI et al., 1997). Para ativar a UCP, o radical superóxido deve estar presente na matriz mitocondrial, e dessa forma o radical superóxido externo deve de alguma forma atravessar a membrana mitocondrial interna (ECHTAY et al., 2002). O superóxido é um componente inicial na via de ativação da UCP. Os produtos de peroxidação lipídica como o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) parecem ser o ponto final desta via (SMITH et al., 2004). Estes produtos de peroxidação lipídica são potentes ativadores de UCPs de mamíferos. No mecanismo recentemente proposto, o superóxido na matriz reage com Fe²⁺ (que possivelmente é formado como resultado de ataque de superóxido nas proteínas contendo ferro–enxofre) para

formar um radical hidroxila altamente ativo. Este radical inicia a formação de radicais lipídicos levando a peroxidação lipídica que finalmente resulta em produtos de degradação de aldeídos como HNE que provavelmente ativa UCP (MURPHY et al., 2003). Devido a que um leve desacoplamento da mitocôndria reduz drasticamente a formação de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons (SCKULACHEV, 1996; MIWA e BRAND, 2003) esta via fornece um elegante mecanismo de feedback pelo qual a UCP pode limitar a quantidade de ERO produzida pela mitocôndria.

Mitocôndrias de batata já foram estudadas em relação à presença de UCPs (PUMP e StUCP), contudo nada se conhece sobre a presença destas proteínas em *Araucaria angustifolia* ou mesmo outras gimnospermas.

1.1.4. *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze, conhecido como Pinheiro do Paraná é uma conífera da família Araucariaceae, amplamente distribuída no sul do Brasil, especialmente nos planaltos frios dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (GUERRA et al., 2000; ZANDAVALLI et al., 2004). Vários estudos foram realizados com calos e tecidos de *A. angustifolia* em diferentes estágios de diferenciação (FONSECA et al., 2000), incluindo a extração de flavonas (GUERRA et al., 2000). Entretanto, mitocôndrias de *A. angustifolia* nunca foram antes isoladas. Até o presente momento, apenas a gimnosperma *Larix x leptoeuropae*, uma espécie híbrida de ocorrência natural, teve suas mitocôndrias isoladas de calos cultivados (KUMAR et al., 1995), contudo o maior objetivo do trabalho foi o isolamento e caracterização do DNA mitocondrial. Deste modo, o estudo das propriedades das mitocôndrias de *A. angustifolia* é de grande importância, bem como a determinação da presença de componentes alternativos como a AOX, uma proteína amplamente distribuída em plantas, fungos e protozoários (SIEDOW et al., 1995). O diferencial 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 e WAGSTAFF, 2001). A comparação entre as mitocôndrias desta gimnosperma ancestral e das mitocôndrias de angiospermas estudadas até o momento (BEAVIS e VERCESI, 1992; FORTES *et al.*, 2001; CALEGARIO *et al.*, 2003; RUY *et al.*, 2004; CAMACHO *et al.*, 2004) constitui-se de grande interesse.

1.1.5. Espécies Reativas de Oxigênio

Todos os organismos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), durante o curso normal do processo metabólico (MAXWELL *et al.*, 1999). Segundo PUNTARULO *et al.* (1988), aproximadamente 1% do total de O_2 consumido pelo tecido de planta é direcionado para a produção de ERO (MØLLER, 2001). Embora as espécies reativas de oxigênio sejam convencionalmente vistas como um produto tóxico do metabolismo celular, um número crescente de evidências sugere que elas possam regular a transdução de sinais em células vegetais e animais (JABS, 1999). Em baixas concentrações (micromolar), ERO age como segundo mensageiro, regulador de genes e mediador para ativação celular. Sob condições de produção excessiva ou redução de antioxidante disponível ou eficiente, ERO podem se acumular atingindo níveis desequilibrados ($\geq 1 \text{ mmol.L}^{-1}$) e danificar a maioria dos componentes celulares. As ERO podem causar desnaturação de proteínas, agregação e perda de funções, peroxidação dos lipídeos e membranas subcelulares, múltiplas lesões no DNA e alterações mitocondriais (LAMB e DIXON, 1997).

Em plantas, diferentes situações levam à formação de ERO e subsequente morte celular programada. Entre tais situações estão: a senescência, o estresse osmótico ou por baixa temperatura, a presença de ácido salicílico, a exposição à radiação ultravioleta e a inoculação com patógenos avirulentos que provoquem a morte celular por resposta hipersensível, evitando a proliferação sistêmica da infecção. Este último mecanismo consiste em uma grande atividade oxidativa de NAD(P)H

desidrogenases da membrana celular que ocasionam um estresse oxidativo, resultando na morte da célula (JABS, 1999). O estresse oxidativo decorrente do desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e mecanismos de defesa em plantas, é caracterizado pelos efeitos deletérios de ERO em lipídeos, proteínas e DNA ocasionando aumento da permeabilidade de membranas, diminuição de atividade enzimática e mutação, respectivamente. As plantas possuem estratégias de defesa distintas contra o estresse oxidativo. MØLLER, (2001), classificou estas estratégias em três linhas: (a) evitar a produção de ERO, (b) detoxificação de ERO e (c) reparo de danos causados por ERO. Para evitar a produção de ERO, a planta pode: (1) manter o equilíbrio entre a disponibilidade de substrato e requerimento de ATP, (2) ativar o gene que codifica a oxidase alternativa, (3) ativar a proteína desacopladora (VERCESI *et al.*, 1995; KOWALTOWSKI *et al.*, 1998), e/ou (4) ativar as NAD(P)H:Ubiquinona oxidoreduases alternativas. Maxwell *et al.* (1999) demonstraram que, quando a expressão de AOX é suprimida, grande quantidade de ERO é formada em suas mitocôndrias por tratamento com antimicina A (inibidor do Complexo III), sugerindo um papel importante da AOX em manter baixos os níveis de espécies reativas de oxigênio.

Para manter baixos os níveis de ERO, existem nas células vegetais mecanismos não-enzimáticos e enzimáticos responsáveis por essa função. Antioxidantes não enzimáticos incluem ascorbato e glutathione (GSH), bem como tocoferol, flavonóides, alcalóides e carotenóides. Enquanto GSH é oxidado por ERO, formando glutathione oxidada (GSSG), o ascorbato é oxidado à monodeidroascorbato (MDA) e deidroascorbato (DHA). Através de um ciclo ascorbato-glutathione, GSSG, MDA e DHA podem ser reduzidos e formarem novamente GSH e ascorbato (APEL e HIRT, 2004). Em resposta ao choque térmico por calor, frio, ataque de patógenos ou estresse hídrico, as plantas aumentam a atividade das enzimas de biossíntese de GSH (VANACKER *et al.*, 2000) e dessa forma os níveis de GSH (93). Uma alta taxa de ascorbato e GSH reduzidos é necessária para uma boa defesa oxidante nas células contra ERO. O estado reduzido dos antioxidantes é mantido pela glutathione redutase (GR), monodeidroascorbato redutase (MDAR) e deidroascorbato redutase (DHAR),

usando NADPH como fonte redutora (TSUGANE *et al.*, 1999). Além disso, o balanço geral entre diferentes antioxidantes deve ser fortemente controlado. A importância deste equilíbrio é evidente quando células com biossíntese de glutatona aumentada em cloroplasto mostram danos por estresse oxidativo, provavelmente devido a mudanças do estado redox geral dos cloroplastos (CREISSEN *et al.*, 1999).

Os mecanismos enzimáticos de defesa contra ERO em plantas incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona peroxidase (GPX) e catalase. SOD age como uma primeira defesa contra ERO, dismutando o superóxido para H_2O_2 . APX, GPX e catalase subsequentemente detoxificam H_2O_2 . Em contraste a catalase, APX requer um sistema de regeneração de ascorbato e glutatona. Detoxificação de H_2O_2 para H_2O pela APX ocorre pela oxidação do ascorbato a MDA, o qual pode ser regenerado pela MDA redutase (MDAR) usando NAD(P)H como equivalentes redutores. MDA pode espontaneamente dismutar a deidroascorbato. A regeneração do ascorbato é mediada através da atividade da deidroascorbato redutase (DHAR) graças à oxidação de GSH para GSSG. Finalmente, glutatona redutase (GR) pode regenerar GSH a partir de GSSG usando NAD(P)H como agente redutor. Como APX, GPX também detoxifica H_2O_2 para H_2O , mas utiliza GSH diretamente como agente redutor. O ciclo GPX é fechado pela regeneração de GSH a partir de GSSG pela GR. Diferentemente de muitos organismos, as plantas possuem múltiplos genes codificadores de SOD e APX. Isoformas diferentes são especificamente direcionadas para cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, bem como para citosol e apoplastos (TSUGANE *et al.*, 1999). Enquanto GPX é uma enzima citosólica, catalase está localizada principalmente nos peroxissomos. A extensão do estresse oxidativo em células é determinada pelas quantidades de superóxido, H_2O_2 e radicais hidroxila. Entretanto, o balanço das atividades de SOD, APX e catalase é crucial para a supressão dos níveis tóxicos de ERO nas células. Mudanças no balanço das enzimas detoxificadoras de ERO induzem mecanismos compensatórios. Por exemplo, quando a atividade da catalase é reduzida em plantas, enzimas

protetoras como APX e GPX são expressas em maiores quantidades (APEL e HIRT, 2004).

Uma grande produção de ERO ocorre durante a morte celular programada (MCP) que ocorre em vários estágios de desenvolvimento vegetal (JABS, 1999) como, por exemplo, decorrente da resposta hipersensível. Esta resposta caracteriza-se por um brusco aumento de superóxido e acúmulo de H_2O_2 e é observado no início da resposta hipersensível após a percepção do sinal de virulência a patógenos, que ocorre pela ativação da NAD(P)H de membrana plasmática. Esse fenômeno é conhecido como "burst" oxidativo, e sua ativação constitui em uma intrincada rede de sinais envolvendo o ácido salicílico e perturbações de Ca^{2+} citosólico (LAMB e DIXON, 1997).

Outro fenômeno importante nos mecanismos de morte celular envolve a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), descrita inicialmente por HUNTER e HAWORTH (1979) em mitocôndrias isoladas de mamíferos e citada como sendo o ponto de desencadeamento principal desses mecanismos (LEMASTERS *et al.*, 1998).

1.1.6. Transição de Permeabilidade Mitocondrial

O termo transição de permeabilidade foi primeiramente definido por HUNTER e HAWORTH (1979), os quais demonstraram um inchamento mitocondrial induzido pelo acúmulo de Ca^{2+} , ocorrendo quando a mitocôndria passa de estado acoplado com configuração agregada para o estado desacoplado e matriz mitocondrial expandida. Estas alterações mitocondriais causadas pelo Ca^{2+} , permitem a passagem de moléculas de baixo peso molecular ($PM \leq 1,5$ kDa), componentes do suporte osmótico, que se deve ao aumento inespecífico da permeabilidade da membrana (ZORATTI e SZABÒ, 1995).

O dogma da transição de permeabilidade é a necessidade do acúmulo de Ca^{2+} na matriz. As quantidades de Ca^{2+} necessárias para o início do fenômeno varia com a espécie ou órgão de origem da mitocôndria (ZORATTI e SZABÒ, 1995). Embora a adição de Ca^{2+} seja suficiente para induzir a

transição de permeabilidade (em mitocôndrias de fígado, coração, rim e córtex adrenal), este fenômeno pode ser acelerado por ação de algumas substâncias designadas de indutores (ZORATTI e SZABÒ, 1995). Adicionalmente agentes protetores também são descritos (VERCESI, 1984; BERNARDES *et al.*, 1986; CROMPTON *et al.*, 1987; VALLE *et al.*, 1993).

A permeabilização que ocorre na presença de Ca^{2+} no espaço intramitocondrial é inibida pelo imunossupressor ciclosporina A (NOVGORODOV *et al.*, 1990) ou “sanglifehrin A” (CLARKE *et al.*, 2002), os quais se ligam à proteína ciclofilina D em sítios distintos, componente essencial do agregado protéico que forma o poro da TPM, prevenindo a sua abertura. O termo ‘transição’ é usado porque a permeabilização pode ser parcialmente revertida, logo após o início do processo, pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou de redutores, como o DTT, que evitam a oxidação de grupos protéicos tiólicos (–SH). A formação do poro pode ser estimulada por compostos capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial: fosfato inorgânico, oxidantes de nucleotídeos de piridina e de grupamentos tiólicos, protonóforos (carreadores de prótons) e outros (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). Reagentes capazes de interferir no estado redox dos grupos SH também parecem estar envolvidos na indução de transição de permeabilidade. Dentre eles, destacam-se os metais pesados e de transição e seus complexos (Hg^{2+} e mercuriais, mersalil, Cu^{2+} , Zn^{2+}), além das substâncias que induzem a formação de ligações cruzadas e pontes dissulfeto como a diamida e a n-etilmaleimida (GUNTER e PFEIFFER, 1990; ZORATTI e SZABÒ, 1995).

A estrutura molecular do poro não é conhecida. Provavelmente seja um agregado formado pela ciclofilina, translocador de nucleotídeos e o canal aniônico voltagem dependente (membrana mitocondrial externa). Deste modo, o poro pode estar localizado em locais de contato entre as membranas mitocondriais externas e interna (DEDOV *et al.*, 1999). Apesar dessas evidências alguns autores afirmam que o translocador de nucleotídeos não é essencial para a formação do poro de transição de permeabilidade (KOKOSZKA *et al.*, 2004).

Um dos mecanismos propostos para explicar o fenômeno da TPM baseia-se na ligação do Ca^{2+} a sítios internos da membrana permitindo a abertura de um canal hidrofílico transmembrana (HUNTER e HAWORTH, 1979). Este poro é regulado pela ligação de Ca^{2+} na membrana no lado da matriz, revertida por EGTA e inibido por H^+ , Mg^{2+} e nucleotídeos de adenina (HUNTER e HAWORTH, 1979). Por outro lado, a queda do $\Delta\psi$ devido a abertura do poro de transição de permeabilidade é revertida por redutores de nucleotídeos de piridina (VERCESI, 1984), EGTA (BERNARDES *et al.*, 1986; CROMPTON *et al.*, 1987), ditioneitol (VALLE *et al.*, 1993), ciclosporina A em presença de Mg^{2+} ou ADP (NOVGORODOV *et al.*, 1990) ou “sanglifehrin A” (CLARKE *et al.*, 2002).

Há evidências experimentais de que a TPM seria um evento essencial no processo de morte celular, por apoptose ou por necrose. O aumento prolongado da concentração de Ca^{2+} no citosol e na matriz mitocondrial pode induzir essa permeabilização. Na morte celular por necrose, o teor de Ca^{2+} aumenta no citosol por falência dos mecanismos que promovem a retirada desse íon e a TPM generalizada leva à falta de ATP, seguida de morte celular. Na morte por apoptose, a TPM seria um evento restrito a locais de aumento do Ca^{2+} liberado de forma regulada pelo retículo sarco-endoplásmico. Nesse caso, a produção do ATP necessário para esse tipo de morte seria garantida por outras mitocôndrias não atingidas.

Contrariando a opinião de alguns autores (Bantandier *et al.*, 2004) os quais afirmam que a abertura do poro de transição de permeabilidade induz a formação de espécies reativas de oxigênio, Kowaltowsky *et al.*, 2001, afirmam que a transição de permeabilidade mitocondrial ocorre em resposta à formação de ERO. Assim sendo, durante este processo se abririam megacanaís na membrana mitocondrial interna, também denominados de poros de transição de permeabilidade, o que resultaria no desacoplamento momentâneo da respiração e eliminação das ERO. Caso isso acontecesse, ocorreria o fechamento dos poros e a retomada da respiração normal. Se, entretanto, tais espécies continuassem se acumulando, os poros de transição continuariam abertos resultando no inchamento e posterior rompimento da organela. Tal

rompimento, por sua vez, levaria à liberação no citosol de proteínas “suicidas”, descritas na literatura como fatores indutores da apoptose (AIF) ou fatores ativadores das caspases (APAF) (SUSIN *et al.*, 1998). A transição de permeabilidade mitocondrial em plantas foi descrita pela primeira vez em 1995 em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (DALOCE, 1995) e ervilhas (VIANELLO *et al.*, 1995) e mais recentemente em citrus (SAVIANI *et al.*, 2002). Nos estudos feitos em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, a TPM se diferencia da observada em mamíferos pela insensibilidade a baixas concentrações de ciclosporina-A ($0,5 - 2 \mu\text{mol.L}^{-1}$), cujo efeito inibitório sobre a TPM de mitocôndrias animais tem sido descrito como comprovante da existência do poro (FORTES *et al.*, 2001; LEMASTERS *et al.*, 1998). A participação de proteínas de membrana (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001) na TPM é claro, já que o processo é parcialmente reversível (CASTILHO *et al.*, 1996), mediado por oxidação de grupos SH de proteínas de membrana e inibido por ciclosporina-A (ZORATTI e SZABÒ, 1995).

Apesar de existirem muitas pesquisas nesta área, questões ainda permanecem em aberto, como por exemplo, a ausência de inibição da TPM em mitocôndrias vegetais pela ciclosporina-A (Fortes *et al.*, 2001).

1.1.7. Transporte mitocondrial de Ca^{2+}

Na década de 60 foi demonstrado em mitocôndrias de mamíferos que o Ca^{2+} é captado por mitocôndrias de modo dependente de energia (VASHINGTON e MURPHY, 1962). Em seguida foi estabelecido que o acúmulo do íon era direcionado pelo gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial ($\Delta\mu\text{H}^+$) gerado pela cadeia respiratória (MITCHELL, 1966). O sistema de transporte mitocondrial responsável pelo acúmulo de Ca^{2+} unidirecional ocorre através de um mecanismo *uniporter* (SELWYN *et al.*, 1970). Nessas mitocôndrias a captação de Ca^{2+} é aumentada pela presença de ânions como acetato, fosfato inorgânico, bicarbonato e β -hidroxibutirato) (GUNTER *et al.*, 1994; DERYABINA *et al.*, 2004). A atividade do *uniporter* é influenciada por fatores como concentração de Ca^{2+} , pH externo, temperatura, $\Delta\psi$ e a presença

de inibidores, como o vermelho de rutênio (SILVA *et al.*, 1992; AKERMAN e NICHOLLS, 1993). A inibição da via de influxo por este último agente, permite a visualização da saída de Ca^{2+} pela via de efluxo (LUFT, 1971), que opera continuamente em oposição ao influxo, por mecanismos independentes deste. Sob condições fisiológicas, a via de efluxo opera independentemente do $\Delta\psi$ (AKERMAN e NICHOLLS, 1983; GUNTER e PFEIFFER, 1990). Por outro lado, a presença de protonóforos como o FCCP estimula a liberação de Ca^{2+} , consistente com o conhecido efeito destes agentes desacopladores que, agindo como condutores de prótons suprimem o gradiente transmembrana de H^+ (SCARPA e GRAZIOTI, 1973). O Ca^{2+} neste caso, seria liberado da mitocôndria pelo reverso da *via uniporter*. Portanto, a velocidade total de efluxo observada seria a soma do efluxo através de qualquer caminho independente do influxo, acrescido da contribuição pelo reverso do *uniporter*.

A captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de plantas foi primeiramente demonstrado em mitocôndrias de milho (*Zea mays* L.) em 1965 (HANSON e HODGES, 1967). Posteriormente, sistemas de transporte de Ca^{2+} foram descritos em mitocôndrias de batata doce (CHEN e LEHNINGER, 1973), hipocótilos de abóbora e células cultivadas de cenoura (DIETER e MARME, 1980). Utilizando um novo procedimento para isolar mitocôndrias funcionalmente intactas de plantas (MARTINS e VERCESI, 1985) demonstrou-se que mitocôndrias de coleótilos de milho (MARTINS *et al.*, 1986; CARNIERI *et al.*, 1987) são muito mais ativas no acúmulo de Ca^{2+} acoplado a respiração que aquelas utilizadas nos estudos anteriores e ficou demonstrado que esse transporte é dependente de fosfato apesar de formar alto $\Delta\psi$ na presença de acetato (MARTINS *et al.*, 1986). O vermelho de rutênio inibiu a captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de milho (*Zea mays* L.) (MARTINS *et al.*, 1986), soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e café (*Coffea arabica*) (CARNIERI *et al.*, 1987) e *Jerusalem artichoke* (RUGOLO *et al.*, 1990). Apesar da capacidade de formar um alto $\Delta\psi$ mitocôndrias isoladas de folhas brancas de repolho (*Brassica oleracea*), tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) e raízes de beterraba (*Beta vulgaris*) não se mostraram capazes de captar Ca^{2+} , indicando não possuírem o *uniporter* (MARTINS *et al.*, 1993).

Até o presente trabalho não havia sido demonstrado o transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias de gimnospermas. Dessa forma este estudo poderá colaborar de forma significativa na compreensão do mecanismo envolvido.

2. JUSTIFICATIVAS

A transição de permeabilidade em mitocôndrias de tubérculos batata segue um perfil distinto do observado em mitocôndrias animais. Para que o fenômeno de TPM ocorra em mitocôndrias de mamíferos há a necessidade da entrada prévia de Ca^{2+} para o interior da organela. O processo de inchamento ainda é favorecido pela presença de agentes indutores de transição como, por exemplo, a diamida e o mersalil, ambos agentes oxidantes de grupos tiólicos. Em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, até o presente momento, não foi descrita a presença de transportador específico para o influxo do íon cálcio. Entretanto, a adição de Ca^{2+} provoca um inchamento em mitocôndrias de batata, dependente da concentração do íon e também favorecido pela presença de mersalil ou diamida. Isso leva a crer que os efeitos do Ca^{2+} possam estar ocorrendo no lado externo da membrana mitocondrial interna, já que não existe um transportador para tal (MARTINS *et al.*, 1993).

Mitocôndrias de plantas apresentam enzimas alternativas na cadeia transportadora de elétrons. Estas enzimas são a oxidase alternativa (AOX) e as NAD(P)H desidrogenases insensíveis a rotenona. Duas destas desidrogenases estão localizadas na face externa da membrana mitocondrial interna: a NADH desidrogenase externa e a NADPH desidrogenase externa, ambas dependentes de Ca^{2+} . Tem-se proposto (MØLLER, 2001) que essas desidrogenases alternativas desempenhariam um papel de defesa contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) por evitar uma sobrecarga sobre o complexo I, que constitui um importante sítio para formação de ERO. Além disso, a concentração de Ca^{2+} no citoplasma, em situações de estresse, é aumentada (APEL e HIRT, 2004) ativando assim as NAD(P)H desidrogenase externas (MØLLER, 2001). A NADH desidrogenase externa está totalmente estimulada em concentração de Ca^{2+} capaz de provocar a transição de permeabilidade mitocondrial em mitocôndrias de tubérculos de batata. Deste modo, constitui-se de grande relevância desenvolver condições experimentais para avaliar as possíveis relações entre o fenômeno de TPM e o transporte de elétrons em mitocôndrias de plantas.

Além disso, nada se conhece sobre os efeitos do frio sobre a transição de permeabilidade mitocondrial. Desta forma, uma avaliação dos efeitos do tratamento de tubérculos de batata pelo frio contribui para a compreensão do fenômeno. Como o estresse pelo frio é um conhecido indutor da AOX em mitocôndrias de batata (CALEGARIO *et al.*, 2003), a determinação dos efeitos do seu inibidor específico – ácido salicilhidroxâmico (SHAM) – sobre o inchamento mitocondrial constitui-se como um importante ponto para ser avaliado. Uma forma de facilitar o estudo da transição de permeabilidade é através da utilização de FCCP (protonóforo) e AA (inibidor do complexo III) pois nestas condições todo o gradiente de íon e o $\Delta\psi$ são dissipados e a abertura do poro de transição de permeabilidade ocorre somente pela presença de Ca^{2+} (DEDOV *et al.*, 1999).

É importante mencionar que, embora o tratamento dos tubérculos de batata aumente a expressão da PUMP (CALEGARIO *et al.*, 2003), a atividade desta enzima não interfere nos experimentos quando as suspensões mitocondriais são preparadas e testadas na presença de BSA, uma condição que inativa a PUMP pela remoção dos ácidos graxos.

As únicas mitocôndrias gimnospermas estudadas até o presente momento foram isoladas em 1995 por Kumar *et al.* a partir de uma cultura em suspensão embriogênica de um híbrido (*Larix x leptoeuropaea*), pertencente à família Pineaceae. Estes autores estudaram principalmente o DNA mitocondrial e realizaram comparações com outras plantas. Portanto, pouco se conhece sobre o comportamento de mitocôndrias de gimnospermas em comparação as mitocôndrias de angiospermas. Assim sendo, o isolamento de mitocôndrias de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* e a determinação de suas propriedades é de fundamental importância, pois pouco se conhece sobre este assunto. Além disso, a *A. angustifolia* pertence a uma família evolutivamente ancestral de gimnospermas, a Araucariaceae, a qual têm origem no período Triássico. Deste modo, o estudo destas mitocôndrias, bem como a comparação com mitocôndrias de angiospermas (mitocôndrias de tubérculos de batata) contribuiria para a compreensão dos mecanismos de manutenção destas espécies.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar efeitos do estresse, oxidantes de grupos –SH e Ca^{2+} sobre os componentes alternativos da cadeia respiratória de mitocôndrias de tubérculos de batata, bem como a transição de permeabilidade mitocondrial, além de isolar e caracterizar mitocôndrias de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quanto aos objetivos específicos:

Comparar os resultados dos experimentos realizados com mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados e estressados pelo frio em relação à oxidação de NADH e succinato por mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, verificando:

- a) Os efeitos da concentração de Ca^{2+} ,
- b) Os efeitos da adição de diamida ou mersalil,
- c) Os efeitos da adição de SHAM,
- d) Os efeitos da adição de cianeto.

Considerando que não são relatados na literatura os efeitos do SHAM ou mesmo do estresse promovido pelo frio em relação ao inchamento mitocondrial em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata induzido pela presença de Ca^{2+} pretende-se:

- a) Demonstrar os efeitos do tratamento dos tubérculos de batata pelo frio,

- b) Determinar os efeitos da presença dos agentes protetores (EGTA, DTT e catalase),
- c) Determinar os efeitos da adição de SHAM.

Considerando também que não são encontrados relatos na literatura sobre isolamento de mitocôndrias a partir de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* neste trabalho pretende-se:

- a) Desenvolver a metodologia de isolamento destas mitocôndrias,
- b) Caracterizar as mitocôndrias isoladas em relação a:
 - controle respiratório,
 - potencial elétrico de membrana,
 - transporte de cálcio,
 - presença de enzimas alternativas como: NADPH desidrogenases insensíveis à rotenona, oxidase alternativa e proteína desacopladora.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. TRATAMENTO DOS TUBÉRCULOS DE BATATA PELO FRIO

Os tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L., cv. Bintje) a serem submetidos ao estresse pelo frio foram deixados por quatro dias a uma temperatura de 5°C (± 1) em uma sala refrigerada, na ausência da luz, e posteriormente utilizados para o isolamento de mitocôndrias. Os tubérculos foram estressados para analisar os efeitos provocados pelo frio na oxidação de substratos da cadeia respiratória (NADH e succinato), transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) e potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$), na presença e ausência de SHAM, diamida, mersalil e/ou Ca^{2+} .

4.2. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULO DE BATATA

As mitocôndrias foram isoladas de tubérculos de batata (2 kg) sob uma temperatura de 2 a 4°C. As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços, lavadas com água deionizada gelada e trituradas em processador de alimentos Wallita, usando-se 1000 mL de meio de extração gelado contendo: sacarose 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 8), EGTA 1 mmol.L⁻¹, cisteína 2 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%. O material assim obtido foi filtrado em gaze e o pH ajustado para 7,2 com solução de KOH 5 mol.L⁻¹. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 1.500 x g por 10 minutos. O sobrenadante então foi centrifugado a 10.400 x g por 10 minutos e o precipitado, contendo as mitocôndrias, foi ressuspensão em meio de isolamento contendo: sacarose 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), EGTA 0,1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g% e então submetido a duas centrifugações de 1.500 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi submetido a centrifugação de 10.400 x g por 10 minutos. A fração mitocondrial foi suspensa em meio de isolamento sem EGTA e BSA, de modo a obter uma suspensão correspondente a aproximadamente 30 mg de proteína por mL (técnica de FORTES *et al.*, 2001, modificada). Com o objetivo de se preservar a atividade da oxidase alternativa (AOX) foram adicionados aos

meios de extração e isolamento, ácido pirúvico 1 mmol.L^{-1} e ácido succínico 5 mmol.L^{-1} conforme descrito por WAGNER *et al.* (1995).

4.3. MANUTENÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia*

As culturas embriogênicas foram originadas a partir de tecido de embrião zigótico de *A. angustifolia*, e foram cultivados em meio de cultura básico BM, suplementado com: mio-inositol $,55 \text{ mmol.L}^{-1}$, ácido nicotínico 8 nmol.L^{-1} , piridoxina-HCl 5 nmol.L^{-1} , glicina 50 nmol.L^{-1} , tiamina-HCl 6 nmol.L^{-1} , glutamina $6,8 \text{ mmol.L}^{-1}$, ácido 2,4-diclorofenóxiacético $2 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, benzilaminopurina $0,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, cinetina $0,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, sacarose a 3% (m/v), caseína a 0,5 % (m/v) e ágar a 0,7% (m/v) (SANTOS *et al.*, 2002). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com KOH antes de ser autoclavado a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos. As soluções de L-glutamina e de hidrolisado de caseína foram filtradas através de membrana esterilizante e adicionadas ao meio de cultura autoclavado.

A manutenção do tecido vegetal foi realizada deixando as culturas embriogênicas crescer por 20 dias, no escuro com temperatura de $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar igual a $70\% \pm 5$. A cada 20 dias as culturas foram repicados e transferidos para placas de Petri contendo o meio BM. Este procedimento foi realizado pela Prof. Juliana Maurer-Menestrina.

4.4. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE *Araucaria angustifolia*

Mitocôndrias foram isoladas de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* gentilmente fornecidos pela Prof. Juliana Maurer-Menestrina, através de centrifugações diferenciais através de uma técnica de isolamento de mitocôndrias de tubérculos de batata (Fortes *et al.*, 2001) modificada para esta finalidade, conforme descrito abaixo.

Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de 15 – 17 dias foram transferidos para um béquer na presença do meio de extração gelado contendo

sacarose 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,6), EGTA 2 mmol.L⁻¹, cisteína 3 mmol.L⁻¹ e BSA 0,2 g%. Utilizando uma tesoura o material foi reduzido a pequenos fragmentos. Após uma completa padronização do tamanho, 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 rompidos em homogeneizador Turrattec através de ciclos de 4 segundos na presença de meio de extração gelado. A proporção de meio utilizado foi 200 mL para 35 g de tecido. O homogenato foi filtrado através de tecido e o pH foi ajustado para 7,2 com NaOH. O filtrado foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 x g. O sobrenadante foi centrifugado por 10 minutos a 15.000 x g e os precipitados de diferentes tubos foram ressuspensos em meio de isolamento (sacarose 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), EGTA 0,25 mM, BSA 0,2 g%) e transferidos para um único tubo que foi centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 x g por 10 minutos. A fração mitocondrial foi ressuspensa em uma gota do meio de isolamento de modo a obter uma suspensão correspondente a aproximadamente 15–20 mg de proteína por mL. Um esquema do isolamento de mitocôndrias de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* está representado na Figura 2.

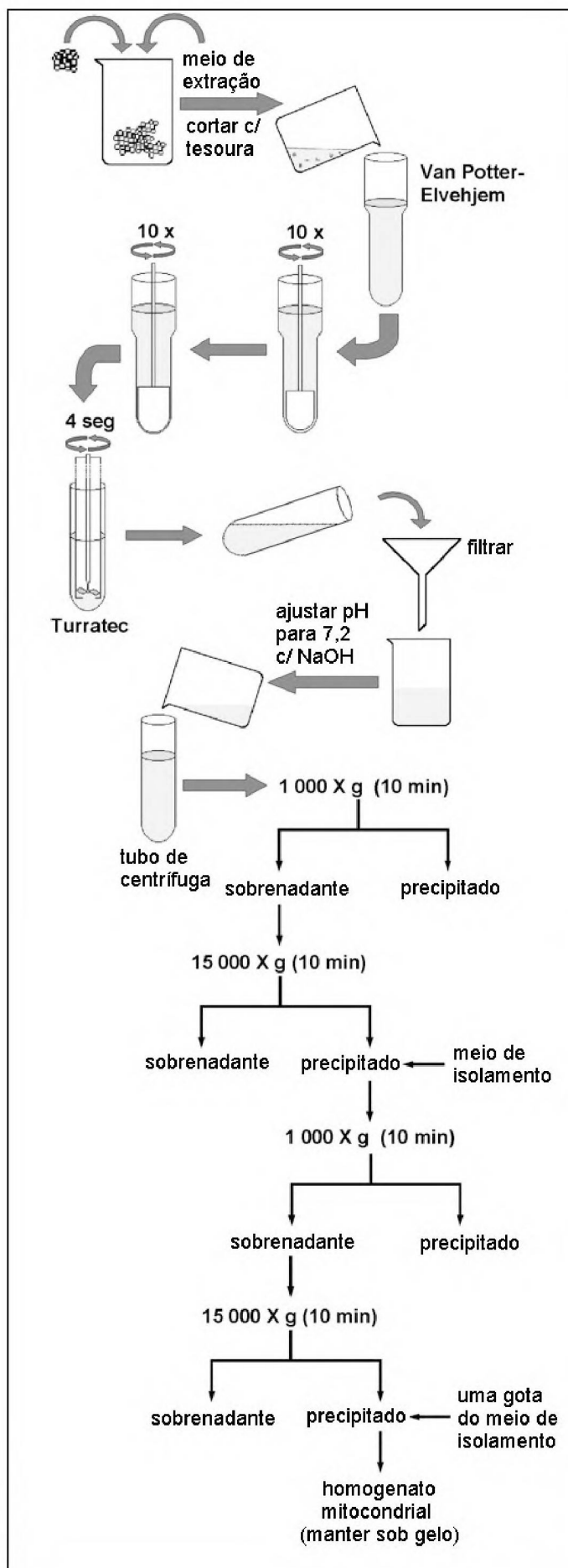


Figura 2. Isolamento de mitocôndrias de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*

4.5. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

O consumo de O_2 foi determinado a uma temperatura de $28^\circ C$ com eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) em polarógrafo Gilson. O sistema de reação em volume final de 1,2 ou 1,3 mL foi denominado meio de reação padrão e foi constituído de sacarose 250 mmol.L^{-1} , KCl 2 mmol.L^{-1} , HEPES 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), BSA 0,2 g% e rotenona $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (exceto quando indicado) e proteína mitocondrial em quantidades adequadas para cada experimento. Este meio foi suplementado com os substratos malato 1 mmol.L^{-1} / glutamato 5 mmol.L^{-1} , succinato 5 mmol.L^{-1} ou NADH 2 mmol.L^{-1} conforme indicado. Coeficiente de controle respiratório (RC) foi calculado após obtenção das mitocôndrias, e serviu como determinante da qualidade da preparação. O valor de RC, foi obtido pela razão entre velocidade de respiração no estado 3 e estado 4 (CHANCE e WILLIAMS, 1955). Neste caso o meio foi suplementado com Pi 2 mmol.L^{-1} , succinato de potássio 5 mmol.L^{-1} , ADP 100 nmol e 200 nmol por mg de proteína.

Para a determinação da capacidade de oxidação de NAD(P)H por mitocôndrias de *A. angustifolia*, foram utilizadas mitocôndrias rompidas em nitrogênio líquido depois de 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

As velocidades respiratórias foram expressas em ng átomo de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, considerando-se que a solubilidade do oxigênio na água a $28^\circ C$ e 1 atmosfera foi de 235 μmoles por litro (ESTABROOK, 1967)

4.6. DETERMINAÇÃO DA TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

O sistema de incubação foi composto por sacarose 250 mmol.L^{-1} , HEPES 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), FCCP $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e AA $0,15 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, e suplementado com 0,15 mg de proteína mitocondrial em um volume final de 1 mL. O FCCP e a AA foram utilizados porque nessas condições o $\Delta\psi$ é dissipados por ionóforos e a abertura do poro de transição de permeabilidade

ocorre somente pela presença de Ca^{2+} (DEDOV *et al.*, 1999). Foram avaliados os efeitos dos agentes indutores e protetores da transição de permeabilidade mitocondrial. O grau de inchamento mitocondrial foi monitorado espectrofotometricamente a 540 nm e a 28 °C, utilizando-se espectrofotômetro Hitachi modelo 2001 acoplado a uma impressora Epson LX.

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

O potencial eletroquímico de membrana foi acompanhado fluorometricamente em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC acoplado a uma impressora. O sistema de incubação consistiu em sacarose 250 mmol.L^{-1} , HEPES- K^+ (pH 7,2) 10 mmol.L^{-1} , BSA 0,1 g%, NaH_2PO_4 1 mmol.L^{-1} , rotenona 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e safranina O 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 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 mmol.L^{-1} ou NADH 2 mmol.L^{-1} . Utilizaram-se mitocôndrias de tubérculos não estressados e estressados pelo frio. Foram avaliados os efeitos de mersalil e SHAM.

4.7.1. Calibração

A calibração dos experimentos de potencial elétrico de membrana mitocondrial encontra-se representada na Figura 3, que mostra as variações na fluorescência causadas pelas adições consecutivas de KCl. O potencial elétrico de membrana mitocondrial foi calculado em função das concentrações de KCl adicionadas (0,15–4,65 mmol.L^{-1}) e a concentração mitocondrial interna de K^+ de 120 mmol.L^{-1} através da Equação de Nernst: $\Delta\psi = \log 60 \cdot [\text{K}^+_{\text{in}}] \cdot [\text{K}^+_{\text{ext}}]^{-1}$ (ÅKERMAN e WIKSTRÖM, 1976). A partir desses dados foi possível construir um gráfico correlacionando o potencial elétrico de membrana (mV) com a variação de fluorescência (Figura 4), onde se observa a relação inversa entre as grandezas. A Figura 4 mostra a melhor reta traçada através

dos pontos, a equação da reta e o $R^2 = 0,9885$. Resultados idênticos foram obtidos com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata estressados pelo frio, bem como com mitocôndrias isoladas culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*.

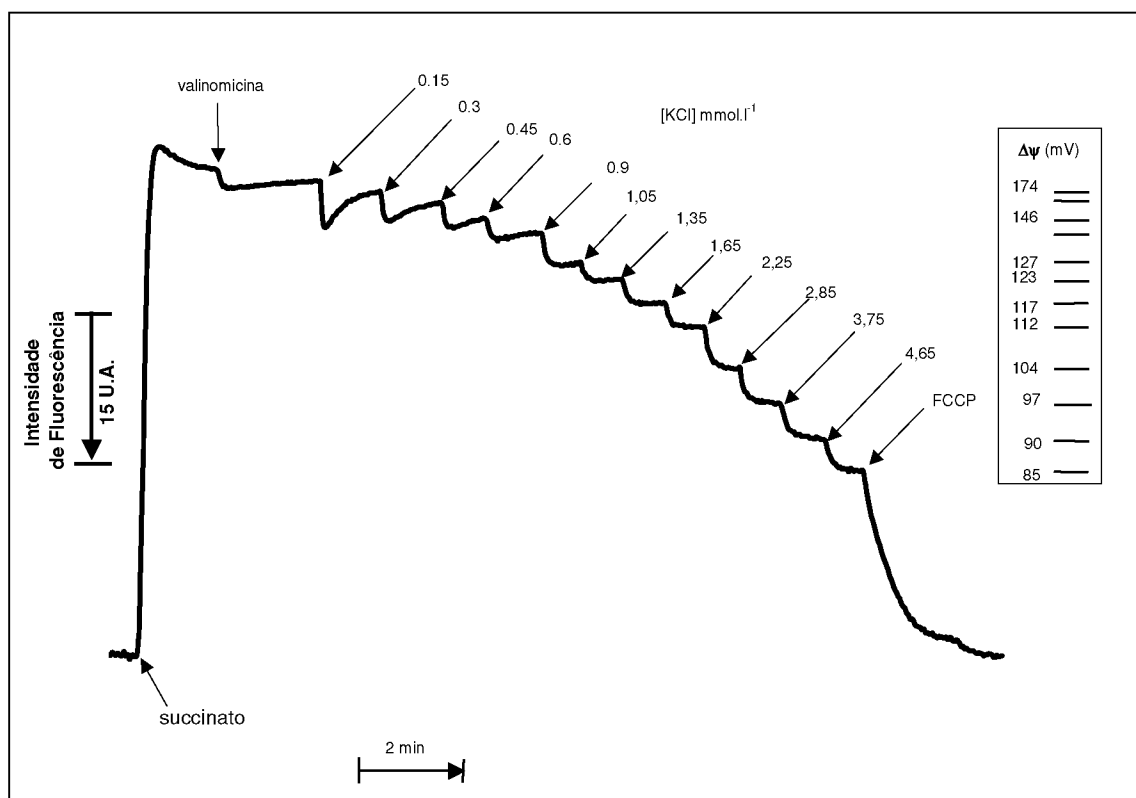


Figura 3 – Calibração do potencial elétrico de membrana em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados

Suspensão mitocondrial ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi adicionada em meio de reação padrão (item 3.7 de Materiais e Métodos) sem K^+ e BSA, suplementado com safranina O $5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, NaH_2PO_4 2 mmol.L^{-1} e rotenona $5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, num volume final de 2 mL a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. A reação foi iniciada pela adição de succinato 2 mmol.L^{-1} . Após o substrato, adicionou-se valinomicina $0,2 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ e concentrações crescentes de KCl ($0,15 - 4,65 \text{ mmol.L}^{-1}$) conforme indicado. $\Delta\psi$ foi colapsado pela adição de FCCP $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. Esta figura é representativa de 10 experimentos.

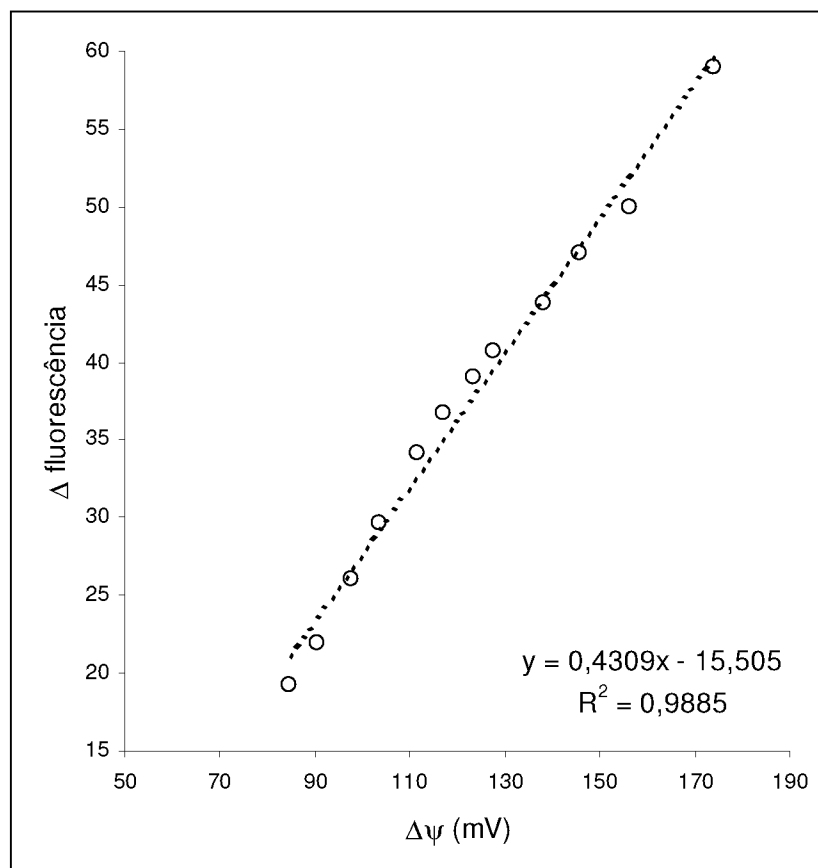


Figura 4 – Relação entre o potencial elétrico de membrana (mV) e a variação de fluorescência em experimentos realizados em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados. Gráfico construído a partir dos dados demonstrados na Figura 3.

4.8. 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.

4.9. DETERMINAÇÃO DO TRANSPORTE DE Ca^{2+}

As variações na concentração de Ca^{2+} livre foram seguidas pela medida das mudanças no espectro de absorbância do indicador metalocrômico arsenazo III, usando o espectrofotômetro MultiSpec 1501 Shimadzu acoplado a registrador, nos comprimentos de onda de 675–685 nm a 25 °C (SCARPA, 1979) do Laboratório de Bioquímica de Plantas coordenado pela Prof. Ione Salgado no Departamento de Bioquímica na Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

O meio de reação foi composto por sacarose 250 mmol.L^{-1} , BSA 0,1 g%, tampão fosfato (pH 7,2) 10 mmol.L^{-1} (menos quando indicado), rotenona 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, arsenazo III 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, para um volume final de 1,3 mL. Foram realizadas adições de Ca^{2+} (5 – 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), vermelho de rutênio 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e espermina 0,5 mmol.L^{-1} e/ou FCCP 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores \pm desvio padrão (média \pm dp), submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para a comparação das médias de experimentos independentes nos experimentos de velocidade de oxidação de NADH e succinato. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDO COM MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULO DE BATATA

5.1.1. Oxidação de NADH externamente adicionado

A Figura 5 compara os efeitos do Ca^{2+} , mersalil e diamida na oxidação de NADH externamente adicionado a mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados (Figura 5A) e estressados pelo frio (Figura 5B). Também foram avaliados os efeitos do inibidor da AOX, ácido salicilhidroxâmico (SHAM).

Em mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados pelo frio, conforme pode ser observado na Fig 5A, a adição de SHAM não afetou significativamente o consumo de oxigênio durante a oxidação de NADH (controle), indicando que essas mitocôndrias apresentam baixos níveis de atividade AOX, como será demonstrado posteriormente. Na presença de Ca^{2+} (1 mmol.L^{-1}) a velocidade respiratória foi estimulada em ~40% em relação ao controle na presença e ausência de SHAM, provavelmente devido à atividade da NADH desidrogenase externa dependente de Ca^{2+} , como descrito por outros pesquisadores (MØLLER *et al.*, 1981; MØLLER e LIN, 1986). A velocidade de oxidação do NADH em presença de Ca^{2+} não foi afetada pela adição de SHAM. Contudo mersalil ($20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) diminuiu em ~15% a velocidade respiratória, independentemente da presença ou ausência de SHAM. Mersalil ($75 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) inibiu a respiração em ~80%, quando as mitocôndrias não foram pré-incubadas com SHAM. Entretanto, na presença do inibidor da AOX a inibição foi de ~18%. A adição de diamida não afetou a velocidade de oxidação de NADH em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batatas não estressados, tanto na presença como na ausência de SHAM.

Em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata estressados pelo frio (Figura 5B) o consumo de oxigênio devido à oxidação de NADH externamente adicionado foi maior ($\sim 135 \text{ ng } \text{átomo O.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) quando comparada com mitocôndrias de tubérculos sem estresse ($\sim 85 \text{ ng } \text{átomo O.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, Figura 5A). Esses resultados sugerem que o tratamento dos tubérculos pelo frio

aumenta a atividade da NADH desidrogenase externa. Nessas mitocôndrias isoladas de tubérculos estressados pelo frio (Figura 5B) observou-se aproximadamente o mesmo efeito estimulatório do Ca^{2+} , na oxidação de NADH externo encontrado em mitocôndrias de tubérculos sem estresse. Os valores observados para o consumo de oxigênio na presença de Ca^{2+} não foram afetados pela presença de SHAM. Mersalil, nas concentrações de 20 e 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, também causou efeito inibitório, provocando diminuições de ~40 e 70% nas velocidades de oxidação de NADH na ausência de SHAM. Esse efeito inibitório do mersalil quando presente na concentração de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, não foi observado quando as mitocôndrias foram pré-incubadas com SHAM, ao contrário do que ocorreu com mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados. A adição de diamida não alterou a oxidação de NADH, seja na presença ou na ausência de SHAM.

É importante salientar que não houve diferença significativa entre as velocidades de oxidação de NADH quando rotenona foi adicionada ao meio de reação. Esses resultados indicam que as mitocôndrias não estavam rompidas e, deste modo, estavam funcionalmente intactas (dados não mostrados). Assim sendo, as velocidades de oxidação de NADH por mitocôndrias de batata obtidas se deram devido à atividade da cadeia respiratória, oxidando o substrato pela NADH desidrogenase externa.

Também é importante mencionar que Ca^{2+} , mersalil e diamida, nas concentrações e condições utilizadas nesses experimentos somente induziram a transição de permeabilidade mitocondrial quando as mitocôndrias foram pré-incubadas na presença de FCCP (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e antimicina A (150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e na ausência de substrato (Figuras 10–14).

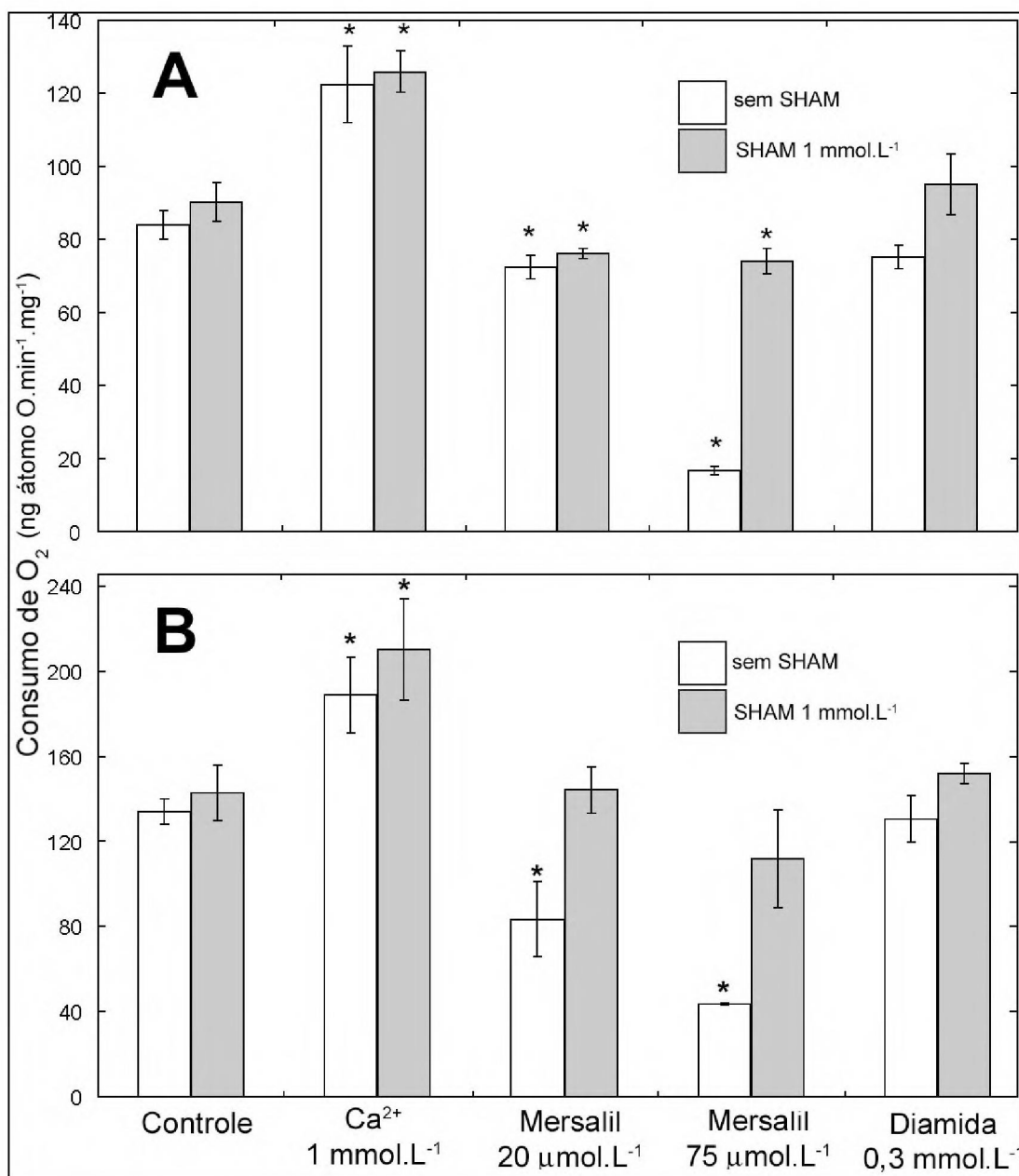


Figura 5. Efeitos do Ca²⁺, mersalil e diamida sobre a oxidação de NADH externo em mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados (A) e estressados pelo frio (B) na ausência e presença de SHAM

Suspensão mitocondrial (1 mg.mL⁻¹) foi adicionada ao meio de reação padrão descrito no item 4.5. de Materiais e Métodos, em um volume final de 1,3 mL a 28 °C. A reação foi iniciada com NADH 2 mmol.L⁻¹. O consumo de oxigênio foi medido na ausência e presença de SHAM 1 mmol.L⁻¹. Ca²⁺ 1 mmol.L⁻¹, mersalil 20 µmol.L⁻¹, mersalil 75 µmol.L⁻¹ ou diamida 0,3 mmol.L⁻¹ foram adicionados conforme indicado na Figura. *Os experimentos são diferentes do controle ($p < 0,05$). Os resultados são média \pm DP de 6 experimentos independentes.

5.1.2. Oxidação do succinato

Os efeitos do Ca^{2+} , mersalil e diamida na oxidação de succinato por mitocôndrias isoladas de mitocôndrias de batata estão demonstrados na Figura 6. Assim como no caso da oxidação de NADH, os experimentos foram realizados na presença e ausência de SHAM e com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata estressados e não estressados pelo frio. Em mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados (Figura 6A), Ca^{2+} não afetou a respiração, tanto na presença quanto na ausência de SHAM. Além disso, nenhuma inibição no consumo de oxigênio foi observada pela adição de mersalil (20 e 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) ou diamida (0,3 mmol.L^{-1}). Resultados similares foram obtidos utilizando tubérculos estressados (Figura 6B). Esses resultados, portanto, sugerem fortemente que o efeito estimulatório do Ca^{2+} e o efeito inibitório de mersalil no consumo de oxigênio em mitocôndrias oxidando NADH, como mostra a Figura 5, resultam da ação direta destas substâncias na NADH desidrogenase externa. Também é importante observar que a velocidade de consumo de oxigênio em mitocôndrias energizadas com succinato foi de ~ 90 ng átomos $\text{O.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (Figura 6A) e este valor não foi alterado pelo tratamento dos tubérculos pelo frio (Figura 6B), indicando que o complexo II não foi afetado. Estes resultados sugerem que o aumento da velocidade respiratória observada pela oxidação de NADH externo devido ao tratamento pelo frio, como mostra a Figura 5, resulta principalmente do aumento na atividade da NADH desidrogenase externa.

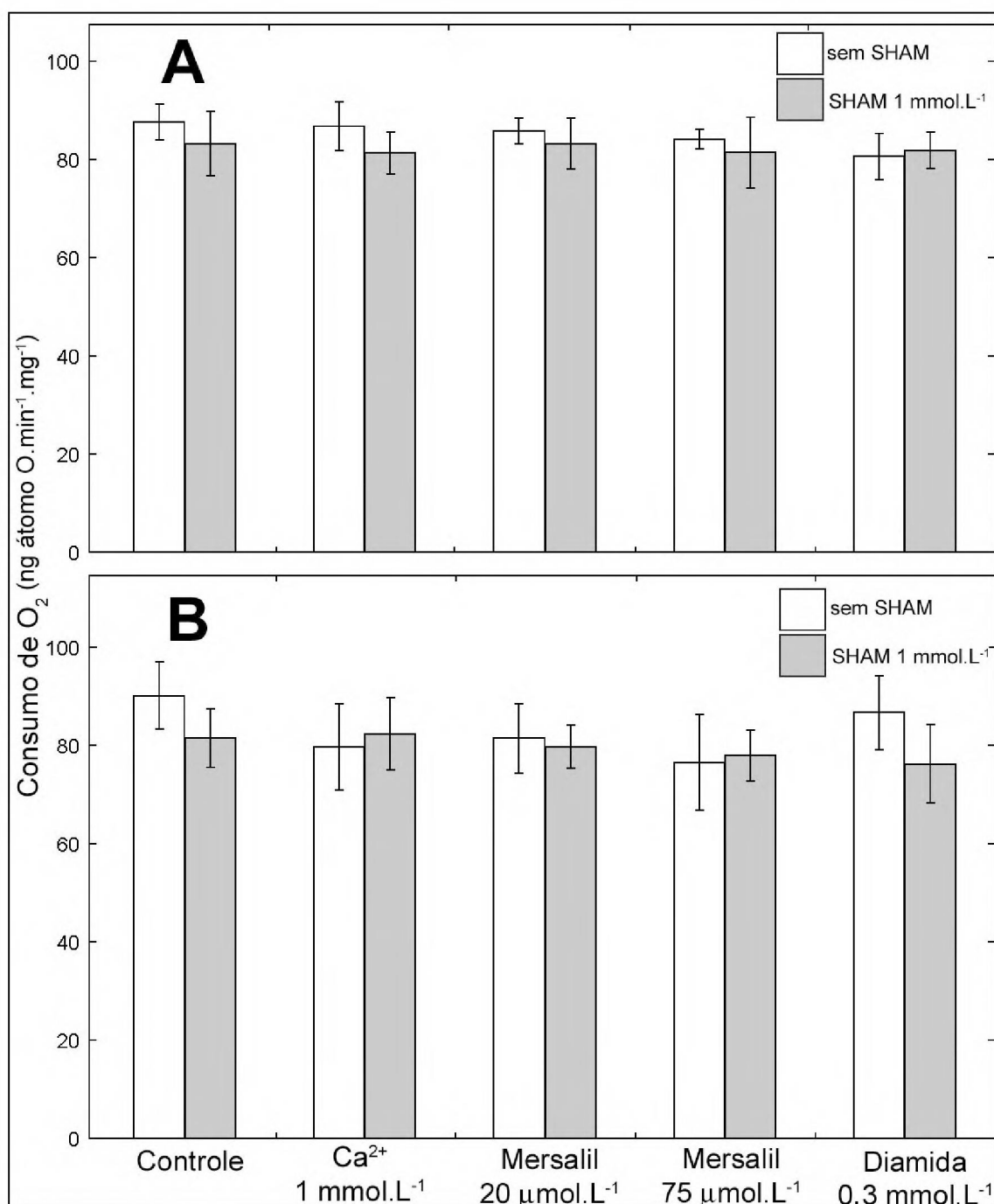


Figura 6. Efeitos do Ca²⁺, mersalil e diamida na oxidação de succinato em mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados (A) e estressados pelo frio (B) na ausência e presença de SHAM

Determinação do consumo de oxigênio em mitocôndrias de batata (1 mg.mL⁻¹) foi realizada como descrito na Figura 5 em meio de reação padrão descrito no item 4.5. de Materiais e Métodos, utilizando succinato 2 mmol.L⁻¹ como substrato. Os resultados são média ± DP de 6 experimentos independentes.

5.1.3. Respiração resistente ao cianeto

Com o objetivo de avaliar os efeitos de Ca^{2+} , mersalil e diamida na atividade da AOX sem a interferência da *via* do citocromo, adicionou-se cianeto ao meio de reação, condição na qual somente a *via* alternativa é funcional (VANLERBERGHE e McINTOSH, 1997). Dessa forma, foi verificada a atividade AOX em mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados. A velocidade de respiração para mitocôndrias oxidando NADH foi de 6,4 ng átomos $\text{O}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ e 6,0 ng átomos $\text{O}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para mitocôndrias oxidando succinato. Após o tratamento dos tubérculos pelo frio a velocidade aumentou para 19,4 e 24 ng átomos $\text{O}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente. É importante mencionar que as suspensões mitocondriais foram preparadas na presença de piruvato e succinato no meio de extração, com o objetivo de manter a AOX na sua conformação ativa (WAGNER *et al.*, 1995). Entretanto, nenhum indutor da AOX como o piruvato ou DTT foi adicionado ao meio de reação. Portanto, as diferenças observadas aqui são devidas a distintos níveis de expressão da AOX, resultado do tratamento dos tubérculos pelo frio.

Como mostra a Figura 7A, na presença de cianeto, a respiração induzida pela oxidação de NADH externamente adicionado foi inibida entre 30 e 40% pela adição de Ca^{2+} 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ tanto em mitocôndrias de tubérculos não estressadas quanto de tubérculos estressados pelo frio. Resultados similares foram obtidos para a oxidação do succinato. Neste caso o Ca^{2+} causou ~35 % de inibição da respiração nas condições de estresse e não estresse (Figura 7B). Esses resultados, em conjunto com aqueles mostrados pela Figura 6, na qual a oxidação de succinato não foi afetada pela adição de Ca^{2+} , indicam que o Ca^{2+} na concentração utilizada é capaz de inibir a *via* alternativa, sendo este efeito observado somente quando a *via* do citocromo estava inibida. Esta é a primeira vez que este efeito inibitório do Ca^{2+} sobre a AOX é descrito.

Quando mitocôndrias foram energizadas com NADH externamente adicionado, na presença de cianeto, a adição de mersalil na concentração de 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ não inibiu a *via* alternativa nas condições com e sem estresse (Figura 7A). Entretanto, uma inibição de ~15% na condição de estresse pelo frio foi

observada na presença de $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de mersalil (Figura 7A), provavelmente devido à intensa inibição causada por mersalil, nesta concentração, na NADH desidrogenase externa (Figura 5B). Nenhum efeito do mersalil (20 ou $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi observado quando as mitocôndrias de batata foram energizadas com succinato na presença de cianeto (Figura 7B).

Em contraste com os resultados mostrados na Figura 5, nos quais a diamida não apresentou efeito significativo sobre a oxidação de NADH, a via AOX, verificada na presença de cianeto, foi completamente inibida na presença deste reagente tiol, tanto nas condições de estresse pelo frio como sem estresse (Figura 7A). Diamida também inibiu ($\sim 75\%$) a oxidação de succinato por mitocôndrias de batata estressadas e não estressadas pelo frio (Figura 7B). Tendo em vista os resultados mostrados nas Figuras 5 e 6, bem como aqueles apresentados na Figura 7, pode-se afirmar que a diamida estaria promovendo inibição da atividade da AOX.

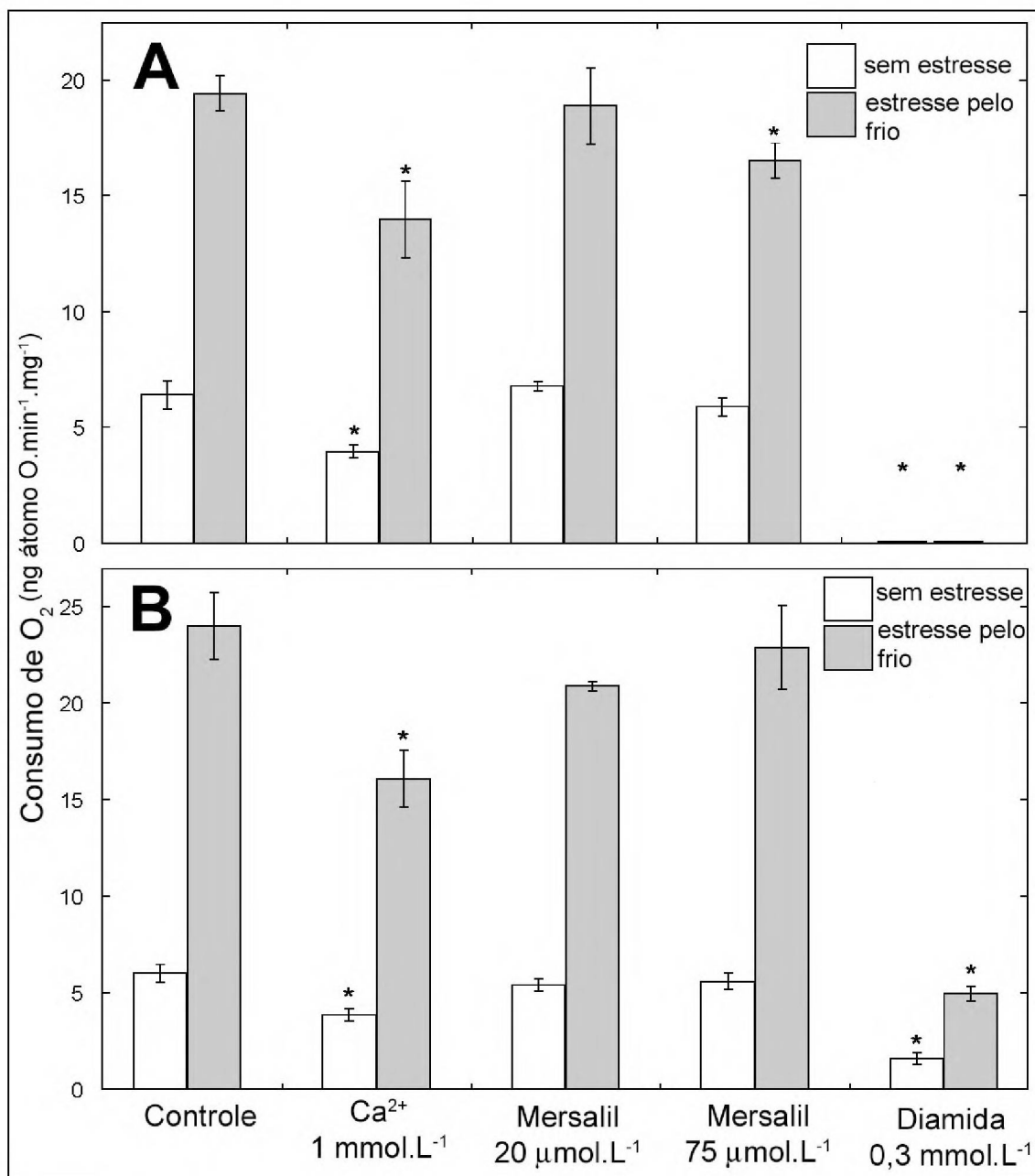


Figura 7. Efeitos do Ca²⁺, mersalil e diamida sobre a oxidação de NADH externo e succinato em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados e estressados pelo frio

Determinação do consumo de oxigênio em mitocôndrias de batata (1 mg.mL⁻¹) foi realizada como descrito na Figura 5 em meio de reação padrão descrito no item 4.5. de Materiais e Métodos, com suplementação de cianeto 1 mmol.L⁻¹, utilizando NADH 2 mmol.L⁻¹ (A) ou succinato 2 mmol.L⁻¹ (B) como substratos. O consumo de oxigênio foi medido com mitocôndrias de tubérculos de batata não estressados e estressados pelo frio. * Os experimentos são diferentes do controle ($p < 0,05$). Os resultados são média \pm DP de 6 experimentos independentes.

5.1.4. Efeitos de diferentes concentrações de Ca^{2+} sobre a oxidação de NADH e succinato

A presença de Ca^{2+} 1 mmol.L^{-1} causou um estímulo na oxidação de NADH (Figura 5A) e, quando na presença de cianeto, uma inibição tanto na oxidação de NADH como na de succinato (Figura 7A,B). Como estes resultados sugerem que na presença de Ca^{2+} os elétrons fluem preferencialmente através da via do citocromo, novos experimentos foram realizados. A Figura 8A mostra a oxidação de NADH em mitocôndrias de tubérculos de batata não estressados na presença de concentrações crescentes de Ca^{2+} ($0,1 - 1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) na ausência de cianeto. O máximo de estímulo na oxidação de NADH ($\sim 32\%$) foi observado para a concentração de Ca^{2+} 1 mmol.L^{-1} . A Figura 8B mostra o efeito inibitório provocado por Ca^{2+} ($0,1 - 1 \text{ mmol.L}^{-1}$) na oxidação de NADH e succinato em mitocôndrias de tubérculos não estressados e estressados pelo frio, na presença de cianeto. O maior efeito inibitório ($\sim 30\%$) ocorreu na presença de Ca^{2+} $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$.

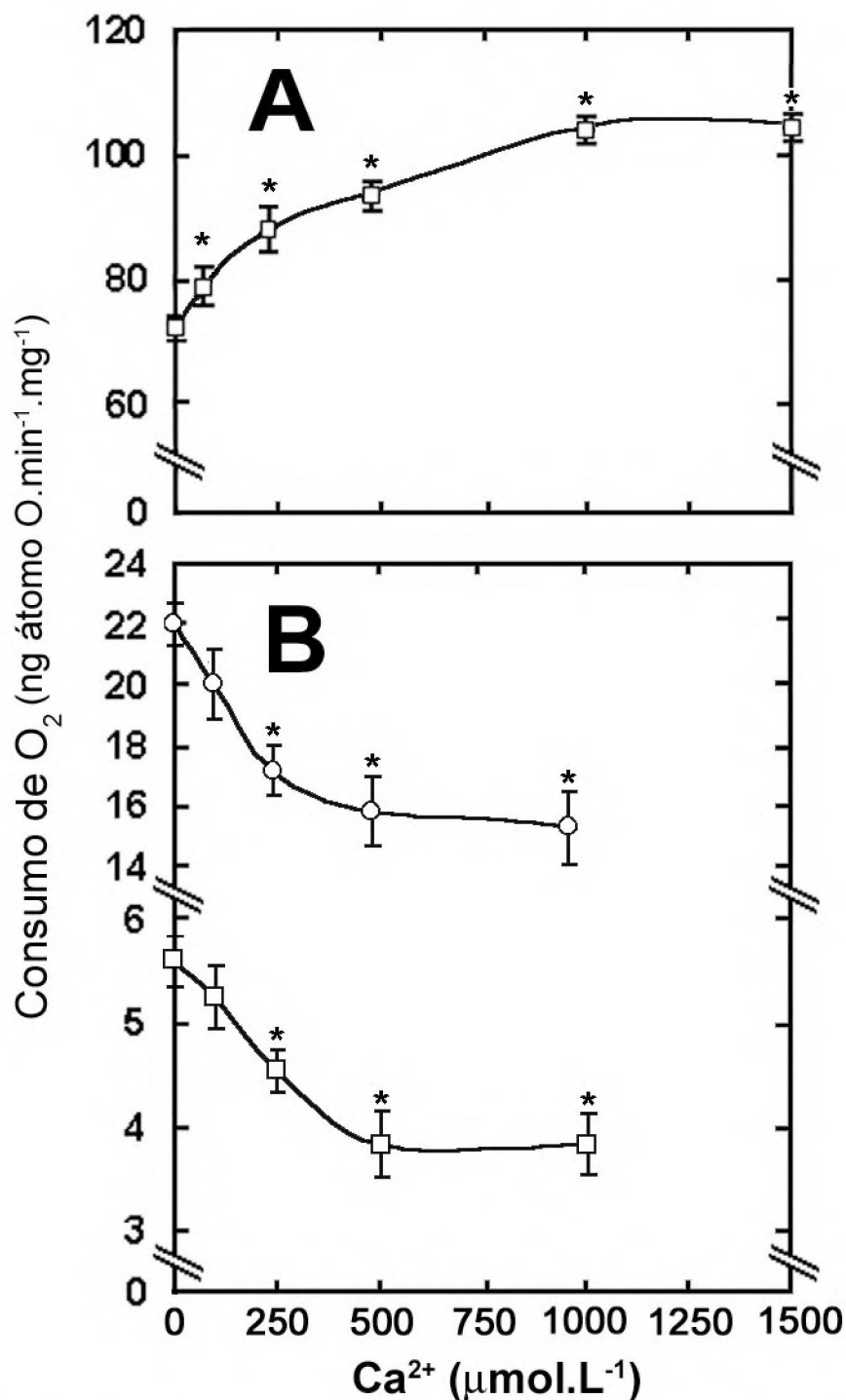


Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de Ca²⁺ na velocidade de oxidação do NADH e succinato

Suspensão mitocondrial (1 mg.mL⁻¹) de tubérculos não estressados (□) e estressados pelo frio (○) foi adicionada ao meio de reação padrão descrito no item 4.5. de Materiais e Métodos, antes de iniciar a reação com NADH 2 mmol.L⁻¹ (□) ou succinato 2 mmol.L⁻¹ (○), em um volume final de 1,2 mL a 28 °C. Os experimentos foram realizados na ausência (A) ou presença (B) de cianeto 1 mmol.L⁻¹. * Os experimentos são diferentes do controle ($p < 0,05$). Os resultados são média ± DP de 4 experimentos independentes.

5.1.5. Determinação do Potencial Elétrico de Membrana

Com a finalidade demonstrar que os efeitos do mersalil realmente são devidos a inibição da NADH desidrogenase externa e não devidos a alteração do $\Delta\psi$, foram realizados experimentos (Figura 9) onde o potencial elétrico de membrana de mitocôndrias isoladas de tubérculos estressados pelo frio foi formado a partir da oxidação de NADH (Figura 9a) e succinato (Figura 9b). Estes resultados indicam que a inibição de ~40% causada por mersalil na oxidação de NADH mostrados na Figura 5B não resulta de despolarização. A pré-incubação com SHAM 1 mmol.L^{-1} não alterou o $\Delta\psi$ (Figura 9b,d). O completo colapso do $\Delta\psi$ provocado pela adição de FCCP é mostrado em (Figura 9e).

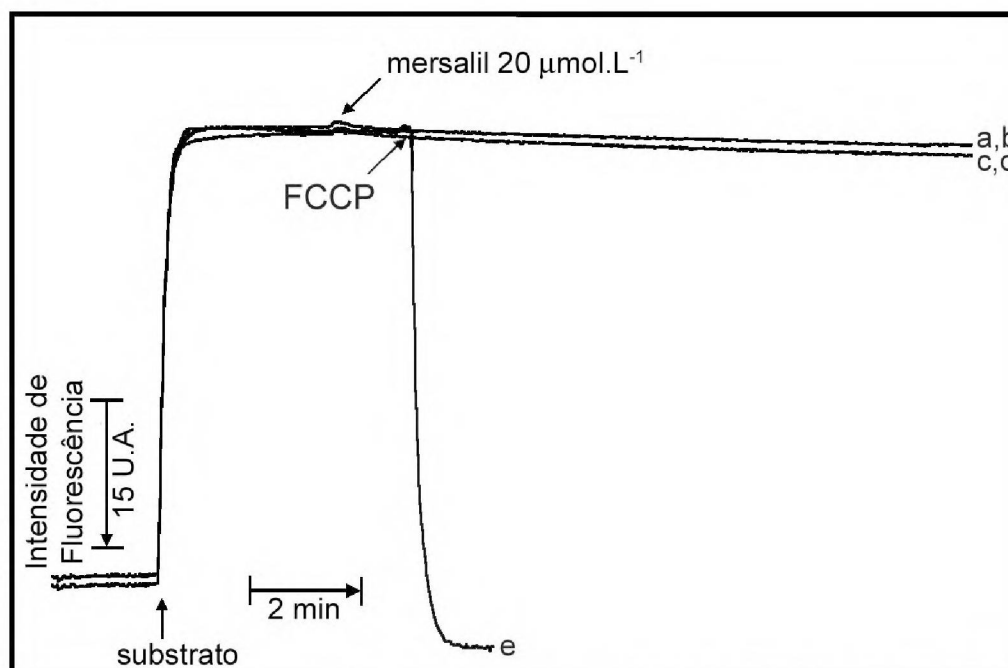


Figura 9. Efeitos da adição de mersalil, SHAM e FCCP no $\Delta\psi$ em mitocôndrias isoladas de tubérculos estressados pelo frio

Suspensão mitocondrial ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reação descrito no item 4.7. de Materiais e Métodos. As adições, conforme indicado na Figura, foram: NADH 1 mmol.L^{-1} (**a,b,e**) ou succinato 2 mmol.L^{-1} (**c,d**), mersalil 20 μmol.L^{-1} (**a,b,c,d**) e FCCP 1 μmol.L^{-1} (**e**). Em (**b,d**) as mitocôndrias foram pré-incubadas com SHAM 1 mmol.L^{-1} por 1 minuto.

5.1.6. Transição de Permeabilidade Mitocondrial

Até o presente momento não foi possível demonstrar o transporte de Ca^{2+} para o interior de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata. Entretanto, a adição deste íon provoca um amplo inchamento mitocondrial, mesmo na ausência de agentes indutores de transição de permeabilidade. No presente estudo, o efeito do estresse pelo frio sobre os tubérculos de batata, no inchamento mitocondrial, foi avaliado pela primeira vez. Os experimentos de inchamento foram realizados na presença de FCCP e antimicina A para eliminar os efeitos do $\Delta\psi$ e do transporte de elétrons sobre o fenômeno observado.

A Figura 10A representa experimentos realizados com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não submetidos ao estresse. Neste experimento foi avaliado o efeito provocado pela adição de Ca^{2+} 1 mmol.L^{-1} (Figura 10A–linha b), concentração do íon que provocou o maior estímulo na velocidade de oxidação de NADH (Figuras 5 e 7). Pode-se perceber que a adição do íon causa um rápido aumento da absorbância, seguido de um amplo inchamento mitocondrial, em comparação ao controle (Figura 10A–linha a). A pré-incubação da suspensão mitocondrial na presença de EGTA 1 mmol.L^{-1} (Figura 10A–linha c), um quelante de Ca^{2+} , demonstra que o efeito observado se deve à presença do íon livre. O envolvimento de grupamentos SH da membrana no fenômeno de inchamento induzido pela presença de Ca^{2+} fica claro ao observarmos o experimento onde as mitocôndrias foram pré-incubadas com DTT 1 mmol.L^{-1} (Figura 10A–linha d). A presença desse agente redutor de SH protegeu as mitocôndrias do efeito provocado por Ca^{2+} . A adição de catalase (Figura 10A–linha e) provocou uma demora para que o inchamento pela adição de Ca^{2+} ocorresse, indicando um possível envolvimento de H_2O_2 .

Os efeitos do Ca^{2+} e dos agentes protetores de transição de permeabilidade sobre o inchamento mitocondrial foram avaliados pela primeira vez em mitocôndrias de tubérculos de batata submetidas ao estresse pelo frio (Figura 10B). A Figura 10B (linha b) mostra que essas mitocôndrias de tubérculos estressados são mais susceptíveis aos efeitos do Ca^{2+} já que é

possível observar que nessas mitocôndrias o inchamento induzido pelo íon ocorre numa velocidade maior que em mitocôndrias de tubérculos não estressados. Foi possível observar a ausência de inchamento mitocondrial devido à proteção exercida pela presença de EGTA (Figura 10 – linha c), DTT (Figura 10 – linha d) e catalase (Figura 10 – linha e), indicando que apesar de as mitocôndrias estressadas estarem mais suscetíveis aos efeitos do Ca^{2+} , os fenômenos observados em ambas as situações são decorrentes da presença do íon livre e envolvimento de grupamentos SH e de espécies reativas de oxigênio.

Em alguns experimentos o inchamento mitocondrial induzido pelo Ca^{2+} demorou um tempo maior para acontecer (>15 minutos) mostrando uma sensibilidade variada de mitocôndrias de diferentes preparações ao íon. Como mostrado na Figura 10A,B (linhas e), a presença de catalase atrasou o inchamento. Portanto, a utilização de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata com um diferente conteúdo de enzimas protetoras pode interferir no experimento e explicaria a diferente sensibilidade das mitocôndrias ao Ca^{2+} . Isso é possível porque o estresse abiótico como o frio provoca aumento das enzimas antioxidantes (APEL e HIRT, 2004).

Segundo Kowaltowski *et. al* (2001) a adição de Ca^{2+} em suspensões mitocondriais provoca um deslocamento de Fe^{2+} presente em proteínas, catalisando assim a formação de radicais hidroxila a partir de H_2O_2 pela reação de Fenton. Além disso, segundo estes autores, Ca^{2+} aumenta a formação de radical superóxido pela cadeia respiratória, o qual é convertido para H_2O_2 pela superóxido dismutase Mn. Portanto, todos os radicais hidroxilas formados indiretamente pela ação do Ca^{2+} levariam à oxidação de grupamentos SH e de lipídios de membrana culminando na transição de permeabilidade mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001). Deste modo, segundo esses autores, a formação de H_2O_2 ocorre previamente ao fenômeno de TPM. Assim sendo, a adição de catalase (Figura 10) previniu a formação de H_2O_2 decorrente da ação do Ca^{2+} , impedindo o inchamento mitocondrial (Figura 10 – linha e).

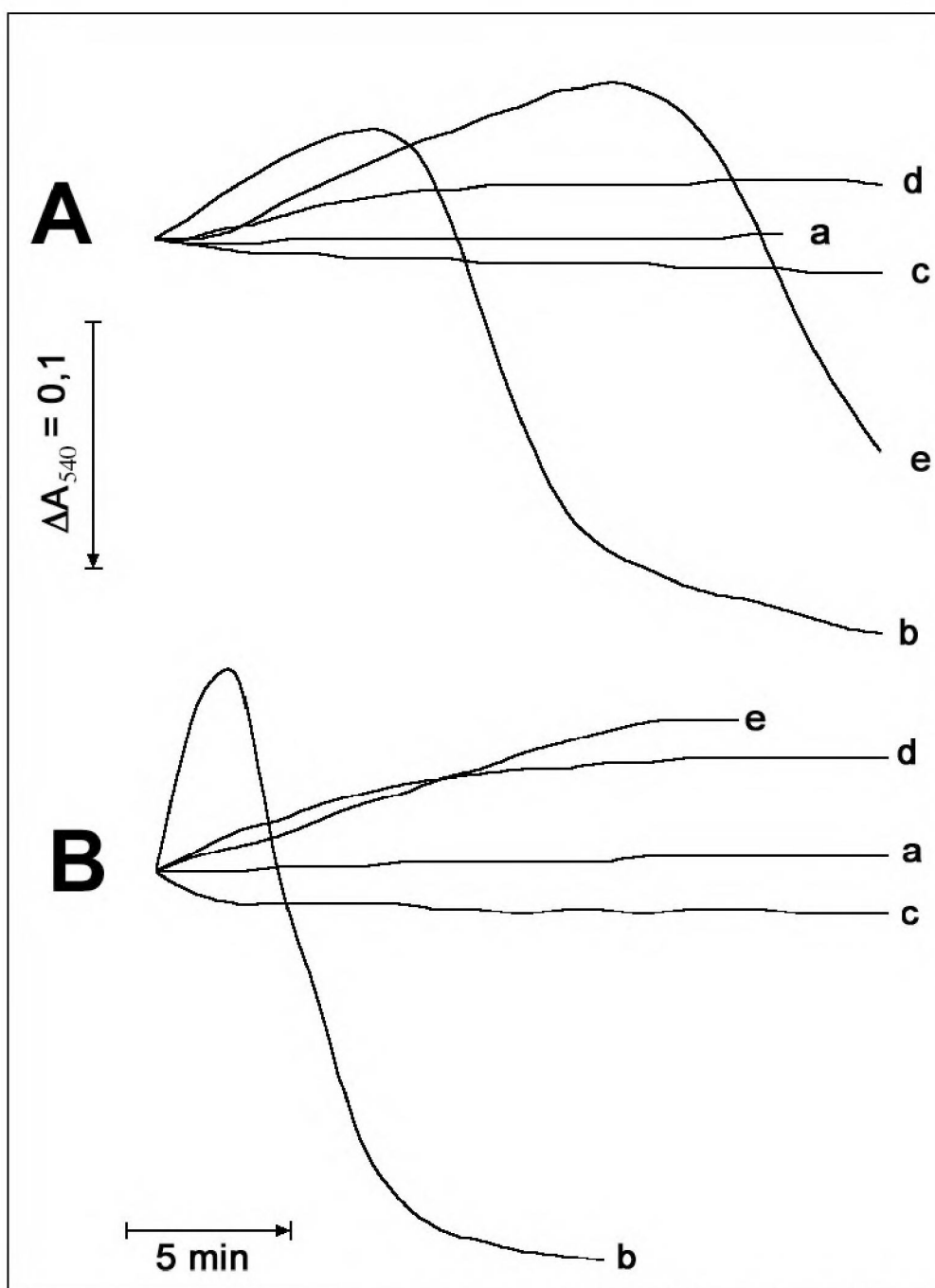


Figura 10. Inchamento mitocondrial induzido pela adiç3o de Ca^{2+} em mitoc3ndrias isoladas de tub3rculos de batata n3o estressados (A) e estressados (B) pelo frio

Suspens3o mitocondrial ($150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reaç3o contendo sacarose $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, HEPES- K^+ $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7,2), FCCP $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, AA $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em um volume final de 1 mL, a 28°C como mostrado em (a).

Em (b) o inchamento foi iniciado pela suplementaç3o de Ca^{2+} $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Em (c), (d) e (e) mitoc3ndrias em meio de reaç3o foram pr3-incubadas por 1 minuto com EGTA $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, DTT $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ e catalase $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente, e em seguida adicionado Ca^{2+} $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Além dos efeitos do estresse pelo frio não existiam relatos anteriores referentes aos efeitos da adição do SHAM no inchamento mitocondrial de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata. Como observado anteriormente, a adição de SHAM nos experimentos de consumo de oxigênio provocou uma proteção contra os efeitos de mersalil $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em mitocôndrias de batatas não estressadas, além de proteger contra os efeitos de mersalil 20 e $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em mitocôndrias de batata estressadas pelo frio oxidando NADH (Figura 5A,B). Como já foi mencionado, este efeito não pode estar relacionado à inibição da AOX, tendo em vista que o perfil observado com a adição de SHAM não foi diferente do experimento controle até mesmo na situação de batata estressada. Deste modo os efeitos do SHAM foram avaliados pela primeira vez nos inchamentos mitocondriais provocados por Ca^{2+} e/ou mersalil, bem como Ca^{2+} e diamida, utilizando para isso mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata.

A Figura 11 mostra os efeitos provocados pelo SHAM no inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} em mitocôndrias de batatas sem estresse. Como se pode observar, os efeitos são dependentes da concentração de SHAM utilizada, sendo que SHAM $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ causa a maior proteção (Figura 11 linhas b,c,d), podendo ser observado pela menor velocidade de inchamento. Como nessas mitocôndrias o nível de AOX é muito baixo (ver Figura 7), o efeito do SHAM observado pode estar relacionado às suas propriedades de ligação com o ferro. O uso de outro inibidor da AOX, o ácido benzilhidroxâmico (BHAM), teve o mesmo efeito (Figura 11 linha e).

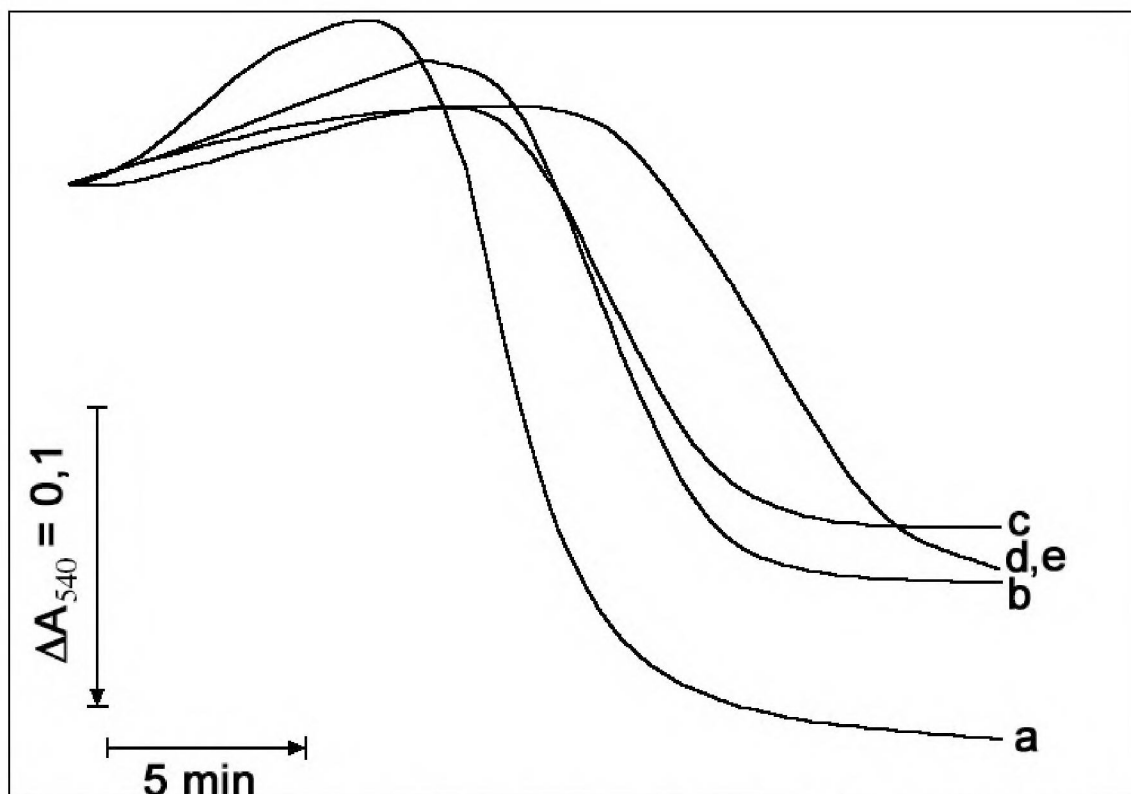


Figura 11. Efeitos do SHAM e BHAM sobre o inchamento mitocondrial induzido pela adição de Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados

Suspensão mitocondrial ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reação contendo sacarose 250 mmol.L^{-1} , HEPES- K^{+} 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), FCCP $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, AA $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em um volume final de 1 mL, a 28°C .

Em **(a)** o inchamento foi iniciado pela adição de Ca^{2+} 1 mmol.L^{-1} .

Em **(b)**, **(c)**, **(d)** e **(e)** as mitocôndrias em meio de reação foram pré-incubadas por 1 minuto com SHAM 1 mmol.L^{-1} , SHAM 2 mmol.L^{-1} , SHAM 3 mmol.L^{-1} e BHAM 3 mmol.L^{-1} , respectivamente, e em seguida adicionado Ca^{2+} .

Com a finalidade de continuar os estudos em relação aos efeitos de SHAM em outra situação indutora de inchamento mitocondrial, realizaram-se experimentos nos quais os efeitos de Ca^{2+} e diamida ($0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$) foram avaliados. Além de proteger as mitocôndrias do inchamento provocado somente por Ca^{2+} (Figura 11), a sua pré-incubação com SHAM também afetou o inchamento induzido por Ca^{2+} e diamida, como pode ser visto na Figura 12. Devido ao efeito da diamida em aumentar o inchamento mitocondrial utilizou-se Ca^{2+} numa concentração menor ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$). Assim sendo, a adição de Ca^{2+} $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ não provocou inchamento das mitocôndrias (Figura 12 linha a). Entretanto, a adição de Ca^{2+} $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diamida $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ causou um inchamento (Figura 12 linha b) que foi protegido pela presença de SHAM 1 mmol.L^{-1} (Figura 12 linha c). Até mesmo na presença de diamida $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ e de maior concentração de Ca^{2+} 1 mmol.L^{-1} houve proteção pela presença de SHAM 3 mmol.L^{-1} (Figura 12 linha e). Na Figura 12 (linha f) observou-se o efeito redutor do DTT 1 mmol.L^{-1} impedindo o inchamento mitocondrial mesmo em presença de Ca^{2+} 1 mmol.L^{-1} e diamida. Este resultado está de acordo com o observado por FORTES *et al.* (2001), onde se verificou também em mitocôndrias de tubérculos de batata a proteção do inchamento mitocondrial induzido por $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ de diamida e $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ de Ca^{2+} pelo uso de DTT 2 mmol.L^{-1} , reafirmando assim o importante papel que a oxidação de grupamentos SH de membrana desempenham para a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Além disso, estes dados mostrando proteção contra o inchamento na presença de SHAM indicam fortemente que ERO estão envolvidos no fenômeno de TPM já que a adição deste quelante de Fe^{2+} afeta negativamente o inchamento mitocondrial provavelmente por diminuir a formação de radicais superóxido através da diminuição da reação de Fenton.

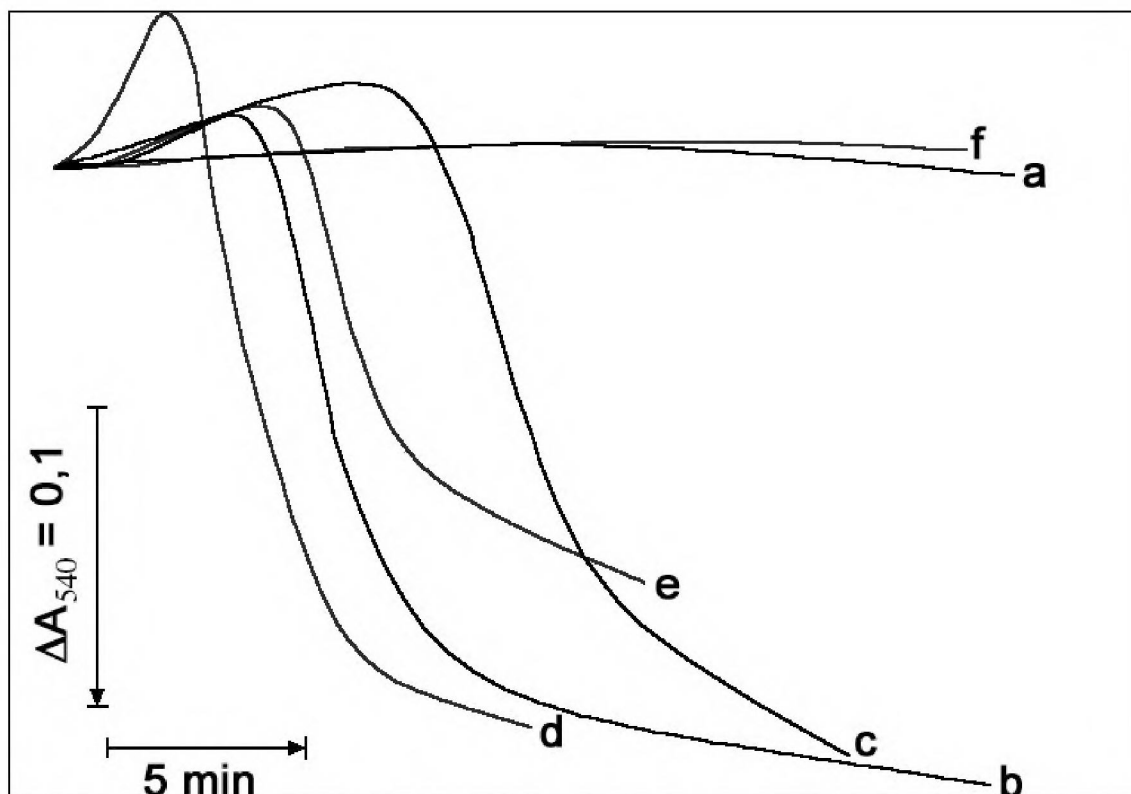


Figura 12. Efeitos do SHAM sobre o inchamento mitocondrial induzido pela adição de Ca^{2+} e diamida em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados

Suspensão mitocondrial ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reação contendo sacarose 250 mmol.L^{-1} , HEPES- K^+ 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), FCCP $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, AA $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em um volume final de 1 mL, a 28°C .

Em **(a)** foi adicionado Ca^{2+} $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e em **(b)** Ca^{2+} $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diamida $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Em **(c)** as mitocôndrias em meio de reação foram pré-incubadas por 1 minuto com SHAM 1 mmol.L^{-1} e em seguida adicionado Ca^{2+} $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diamida $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Em **(d)** foi adicionado Ca^{2+} 1 mmol.L^{-1} e diamida $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Em **(e)** e **(f)** as mitocôndrias em meio de reação foram pré-incubado por 1 minuto com SHAM 1 mmol.L^{-1} e DTT 1 mmol.L^{-1} , respectivamente, em seguida adicionado Ca^{2+} 1 mmol.L^{-1} e diamida $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Ainda para avaliar os efeitos do SHAM sobre o inchamento mitocondrial, realizaram-se experimentos para verificar a ação do inibidor da AOX sobre a ação do mersalil, tendo em vista a proteção sobre a ação deste agente tiólico nos experimentos de consumo de oxigênio induzido por NADH (Figura 5A,B). Desta forma podemos observar na Figura 13 que mitocôndrias de batata sem estresse apresentam um rápido inchamento mitocondrial na presença de mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 13 linha a). Este inchamento foi pouco afetado pela presença de SHAM 1mmol.L^{-1} (Figura 13 linha b). Os efeitos do mersalil são totalmente impedidos pela adição de DTT (Figura 13 linha c), mostrando que o mecanismo de ação envolve a participação de grupamentos SH. Além disso, a proteção exercida pela adição de EGTA 1mmol.L^{-1} (Figura 16 linha d) mostra a dependência do mersalil por baixas concentrações de Ca^{2+} contaminante para o desenvolvimento de sua ação, já que não houve adição do íon durante o experimento. Desta forma foram testados os efeitos do mersalil em uma baixa concentração de Ca^{2+} ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$), bem como a presença de EGTA $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para eliminar a presença de Ca^{2+} contaminante. O inchamento provocado por mersalil $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 13 linha e) é aumentado pela adição de Ca^{2+} $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 13 linha f). Na ausência de Ca^{2+} contaminante (EGTA $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e na presença de Ca^{2+} em baixa concentração (Ca^{2+} $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) a adição de mersalil $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ não provocou inchamento mitocondrial (Figura 13 linha g) mostrando a necessidade da presença do íon para a observação do fenômeno de inchamento.

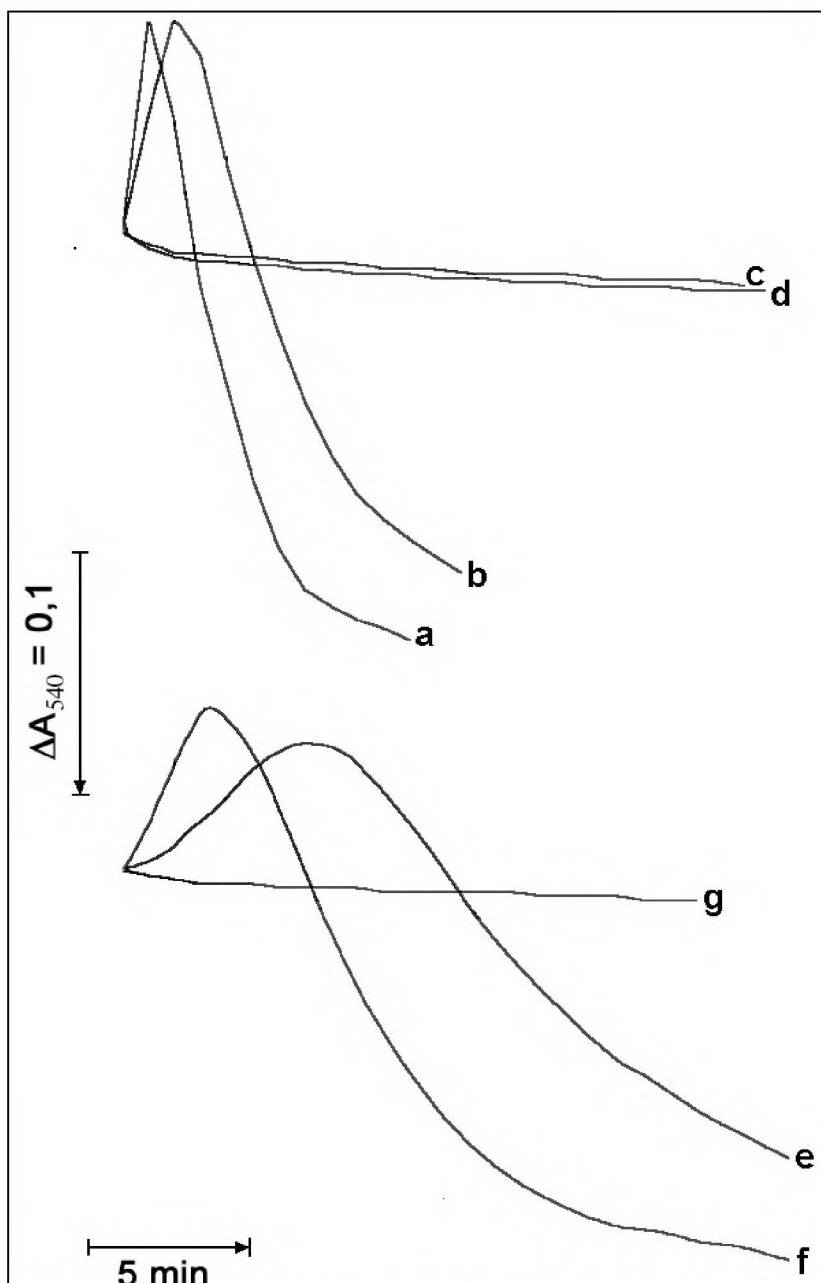


Figura 13. Efeitos do SHAM sobre o inchamento mitocondrial induzido pela adição de mersalil em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata não estressados

Suspensão mitocondrial ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reação contendo sacarose 250 mmol.L^{-1} , HEPES- K^+ 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), FCCP $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, AA $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em um volume final de 1 mL, a 28°C .

Em (a) foi adicionado mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Em (b), (c) e (d) as mitocôndrias em meio de reação foram pré-incubadas por 1 minuto com SHAM 1 mmol.L^{-1} , DTT 1 mmol.L^{-1} e EGTA 1 mmol.L^{-1} , respectivamente, e em seguida adicionado mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Em (e) adicionado mersalil $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e em (f) Ca^{2+} $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e mersalil $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Em (g) as mitocôndrias em meio de reação foram pré-incubadas por 1 minuto com EGTA 25 mmol.L^{-1} e em seguida adicionado Ca^{2+} $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e mersalil $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

For fim, os efeitos protetores do SHAM também foram observados em mitocôndrias isoladas de tubérculos estressados pelo frio (Figura 14), verificando assim outra condição não estudada anteriormente. A pré-incubação da suspensão mitocondrial com SHAM 1 mmol.L^{-1} (Figura 14 linha b) e DTT 1 mmol.L^{-1} (Figura 14 linha c) atrasou e impediu o inchamento induzido por mersalil $20 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 14 linha a), respectivamente, assim como aconteceu com as mitocôndrias sem estresse (Figura 13). Na presença de EGTA $25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, uma condição onde o Ca^{2+} contaminante não interfere nos experimentos, mersalil $20 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ não provocou inchamento mitocondrial (Figura 14 linha d). Mersalil $20 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ e Ca^{2+} $50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ foram capazes de provocar o inchamento mitocondrial na presença de EGTA $25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 14 linha e), que foi parcialmente protegido pela presença de catalase (Figura 14 linha g) e impedido pela presença de SHAM 1 mmol.L^{-1} (Figura 14 linha f). Essa proteção total do inchamento induzido por mersalil $20 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, devido a presença de SHAM, em uma condição de baixa concentração de Ca^{2+} (Figura 14 linha f), mostra que o SHAM na concentração de 1 mmol.L^{-1} é suficiente para quelar todo o ferro livre presente, impedindo seus efeitos indiretos pela formação de ERO, além de evitar os efeitos do mersalil, os quais são dependentes da presença do Ca^{2+} .

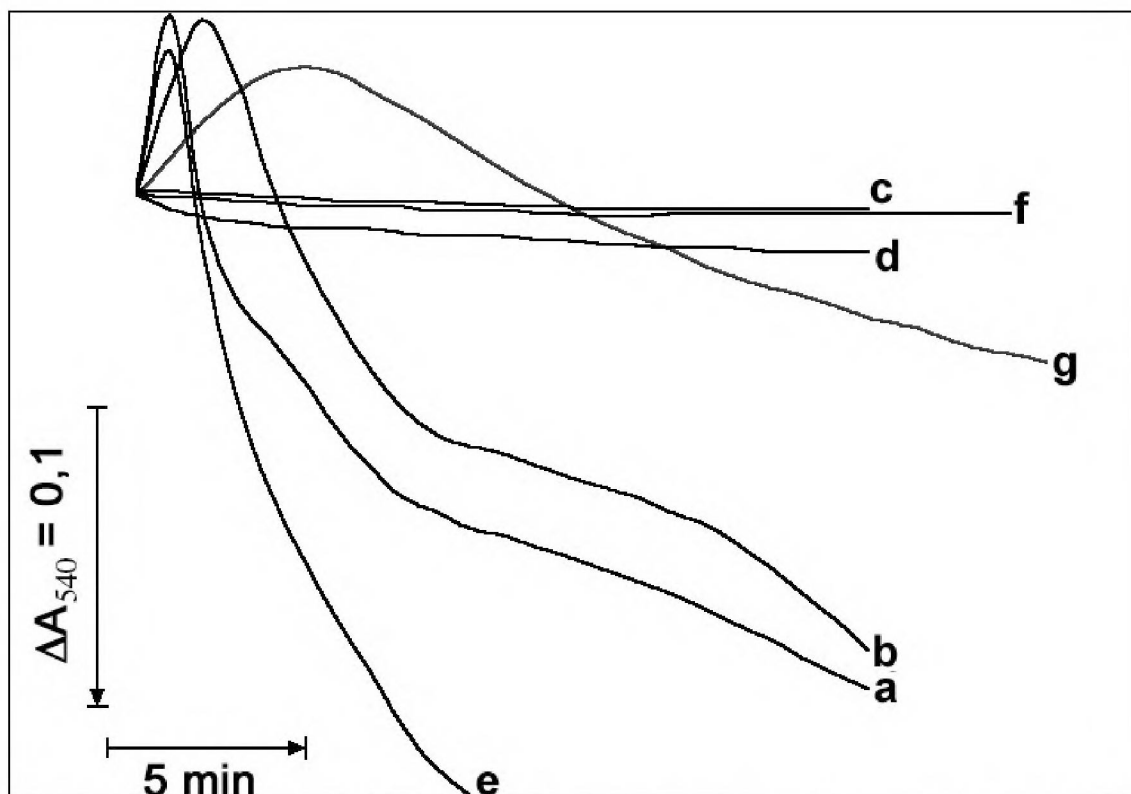


Figura 14. Efeitos do SHAM sobre o inchamento mitocondrial induzido pela adição de mersalil em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata estressados

Suspensão mitocondrial ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reação contendo sacarose 250 mmol.L^{-1} , HEPES- K^+ 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), FCCP $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, AA $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em um volume final de 1 mL, a 28°C .

Em (a) foi adicionado mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Em (b), (c) e (d) as mitocôndrias em meio de reação foram pré-incubadas por 1 minuto com SHAM 1 mmol.L^{-1} , DTT 1 mmol.L^{-1} e EGTA $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente, e em seguida adicionado mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Em (e) as mitocôndrias em meio de reação foram pré-incubadas por 1 minuto com EGTA $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e em seguida adicionado Ca^{2+} $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Em (f) e (g) as mitocôndrias em meio de reação foram pré-incubadas por 1 minuto com EGTA $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e em seguida pré-incubado por 1 minuto SHAM 1 mmol.L^{-1} e catalase $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente, seguido da adição de Ca^{2+} $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

5.2 ESTUDO COM MITOCÔNDRIAS DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*

5.2.1. Isolamento de mitocôndrias de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*

Esta é a primeira vez que mitocôndrias foram isoladas de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. Como nada se conhece das funções mitocondriais desta gimnosperma ancestral, a comparação com a angiosperma *Solanum tuberosum* poderá elucidar possíveis diferenças fundamentais tanto em relação às funções, efeito de ERO, assim como semelhanças quanto às enzimas específicas de plantas, reconhecidamente antigas na escala evolutiva, como é o caso da AOX.

5.2.2. Determinação do controle respiratório (CR)

A Figura 15 representa o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* na presença de vários substratos oxidáveis. A Figura 15A mostra o consumo de oxigênio em mitocôndrias respirando com succinato como substrato, na presença de fosfato. Pela adição de 75 nmol de ADP a velocidade respiratória aumentou de 30 para 75 ng átomos O.mg⁻¹.mL⁻¹ (estado 3) e voltou para o estado de repouso (estado 4) com velocidade de 33 ng átomos O.mg⁻¹.mL⁻¹ depois que todo o nucleotídeo de adenina adicionado foi consumido. Após nova adição de ADP ao meio de reação foram observados novamente os estados 3 e 4 da respiração, evidenciando a capacidade fosforilativa das mitocôndrias. Os controles respiratórios calculados para as duas adições de ADP foram 2,3 e 2,5, ou seja, bons índices para mitocôndrias vegetais, levando em consideração a dificuldade do isolamento mitocondrial e também a presença da AOX, o que será discutido adiante.

Na Figura 15B observa-se nestas mitocôndrias o consumo de oxigênio induzido pela oxidação da mistura malato / glutamato. As velocidades dos

estados 3 e 4 foram 66 e 38 ng átomos $O \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente. Na segunda adição de ADP as velocidades dos estados 3 e 4 foram 84 e 45 ng átomos $O \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Os controles respiratórios calculados foram de 1,7 e 1,9.

A Figura 15C mostra também com mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* o consumo de oxigênio pela oxidação de NADH. O fato de essas mitocôndrias consumirem oxigênio pela oxidação de NADH na presença de rotenona demonstra a presença de NADH desidrogenase externa. Além disso, como foi possível determinar o controle respiratório (CR = 2,1), demonstra-se o acoplamento entre o consumo de O_2 e a fosforilação oxidativa, ou seja, que os elétrons estão sendo transportados para os complexos III e IV, e que o potencial elétrico de membrana gerado está sendo usado para a síntese de ATP pela ATP sintase a partir de ADP e P_i . A adição de FCCP causou um estímulo da respiração durante a oxidação de NADH. Isto mostra o desacoplamento do $\Delta\psi$, já que a respiração é dependente do potencial elétrico de membrana.

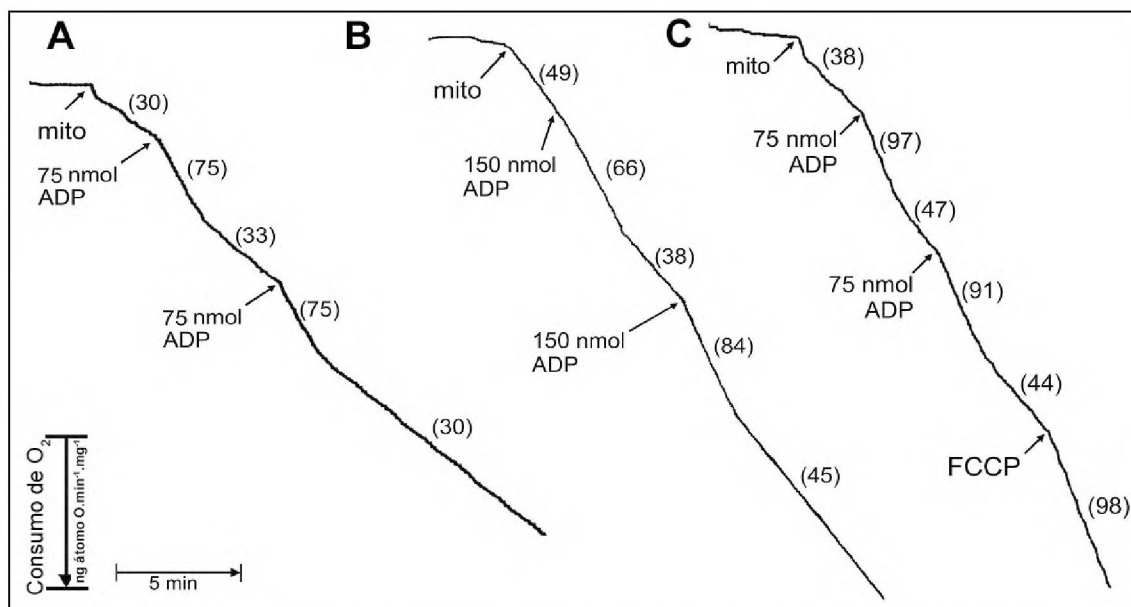


Figura 15. Consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* utilizando succinato, malato / glutamato ou NADH como substratos oxidáveis

O meio de reação continha sacarose 0,25 M, K-Hepes 10 mM (pH 7,2), KCl 2 mM, BSA essencialmente livre de ácidos graxos 0,2 g%, Pi 2 mM, e succinato 5 mmol.L⁻¹ (A), malato 1 mmol.L⁻¹ / glutamato 5 mmol.L⁻¹ (B) ou NADH 2 mmol.L⁻¹ (C), num volume final de 1,2 mL a 28 °C. O consumo de oxigênio foi iniciado pela adição de 0,3 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial. Outras adições foram rotenona 10 μmol.L⁻¹ (A,C), ADP 75 ou 150 nmol e FCCP 1 μM, como indicado nas Figuras. A Figura é representativa de 3 experimentos independentes.

5.2.3. Capacidade de oxidação de NAD(P)H

Utilizando mitocôndrias de *A. angustifolia* rompidas em nitrogênio líquido, foi realizado um experimento de consumo de oxigênio induzido pela oxidação de NADH ou NADPH na presença e ausência de rotenona e Ca^{2+} , que está representado na Tabela 2. Assim fica demonstrada a presença de NADH e NADPH desidrogenases insensíveis à rotenona. Além disso, as oxidações de NADH e NADPH foram estimuladas 18 e 28%, respectivamente, pela adição de Ca^{2+} 1 mM, mostrando que nas mitocôndrias dessa gimnosperma existe um controle destas enzimas na presença deste íon, bem como ocorre em mitocôndrias de batata (MELO *et al.*, 1999).

Tabela 2. Capacidade de oxidação de NAD(P) em mitocôndrias de *A. angustifolia* rompidas em nitrogênio líquido:

	Atividade (ng átomo O.min ⁻¹ .mg ⁻¹)		
	Total	insensível à rotenona	sensível à rotenona*
NADH	54,6 ± 4,9	38,5 ± 1,6	16,1 ± 4,3
+ Ca ²⁺	62,2 ± 10,2	45,6 ± 2,1	16,6 ± 8,1
NADPH	34,5 ± 1,1	31,4 ± 0,5	3,1 ± 0,7
+ Ca ²⁺	46,1 ± 1,6	44,0 ± 0,7	2,1 ± 0,9

– O meio de reação continha sacarose 0,25 M, K-Hepes 10 mM (pH 7,2), KCl 2 mM, BSA essencialmente livre de ácidos graxos 0,2 g%, Pi 2 mmol.L⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹ da suspensão de mitocôndrias rompidas em nitrogênio líquido.. As concentrações finais foram NADH 2 mM, NADPH 2 mM, Ca^{2+} 1 mM e rotenona 10 µM. O sinal + indica adição consecutiva. * O meio foi suplementado com rotenona 10 µmol.L⁻¹. ** Atividade calculada pela diferença entre Atividade Total e Atividade Insensível à rotenona. Cada valor representa média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes.

5.2.4. Determinação do Potencial Elétrico de Membrana

A capacidade fosforilativa das mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, demonstrada pelos experimentos de consumo de oxigênio, foi confirmada nos experimentos de determinação do potencial elétrico de membrana. A Figura 16 mostra a geração de potencial de membrana ($\Delta\psi$) a partir da energização por succinato ou NADH na presença de rotenona. Na Figura 16A, onde o $\Delta\psi$ foi gerado a partir da adição de succinato, a adição de ADP 30 nmol provocou uma queda e retorno ao potencial elétrico de membrana previamente estabelecido. 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 15). Nesse experimento a adição de Ca^{2+} 100 μM provocou a queda do $\Delta\psi$. Esse fato é compatível com o influxo de Ca^{2+} , que utiliza o potencial elétrico de membrana para realizar essa tarefa. A capacidade de transporte de Ca^{2+} pelas mitocôndrias de *A. angustifolia* foi confirmada através de experimentos de transporte de Ca^{2+} utilizando a variação espectral do arsenazo III, e será mostrado adiante. Ainda na Figura 16A observa-se que a adição de FCCP provoca o colapso do $\Delta\psi$. A Figura 16B mostra queda de $\Delta\psi$ provocada por ADP e Ca^{2+} em mitocôndrias energizadas com NADH. A queda do $\Delta\psi$ devido a adição de ADP é acompanhado de um aumento da velocidade respiratória (Figura 15C), mostrando o desacoplamento da respiração e fosforilação oxidativa. A energização das mitocôndrias por malato/glutamato, succinato e NADH mostra como que estes efeitos são independentes do substrato utilizado. A energização por NADH externo (Figura 16C e 17B) confirma a presença de uma NADH desidrogenase, presente na membrana mitocondrial interna, capaz de transferir elétrons para a ubiquinona e o restante da cadeia respiratória, de modo a produzir potencial elétrico de membrana.

Na Figura 16C, na presença prévia de oligomicina, um inibidor da ATPase, não ocorreu queda do $\Delta\psi$ depois da segunda adição de ADP, confirmando o consumo do potencial elétrico de membrana por esta enzima durante a fosforilação. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando

succinato como substrato, ou ainda, adicionando-se oligomicina previamente à adição de NADH ou succinato (dados não mostrados).

Nos experimentos representados pela Figura 16D, a presença do inibidor do *uniporter* de Ca^{2+} , vermelho de rutênio, evitou a queda do $\Delta\psi$ provocado na presença de Ca^{2+} , indicativo mais uma vez da presença de um transportador do íon cálcio para o interior da mitocôndria, dependente do potencial elétrico de membrana, como observado para mitocôndrias isoladas de *Jerusalem artichoke* (RUGOLO *et al.*, 1990), milho (*Zea mays* L.) (MARTINS *et al.*, 1986), soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e café (*Coffea arábica*) (CARNIERI *et al.*, 1987; MARTINS *et al.*, 1993).

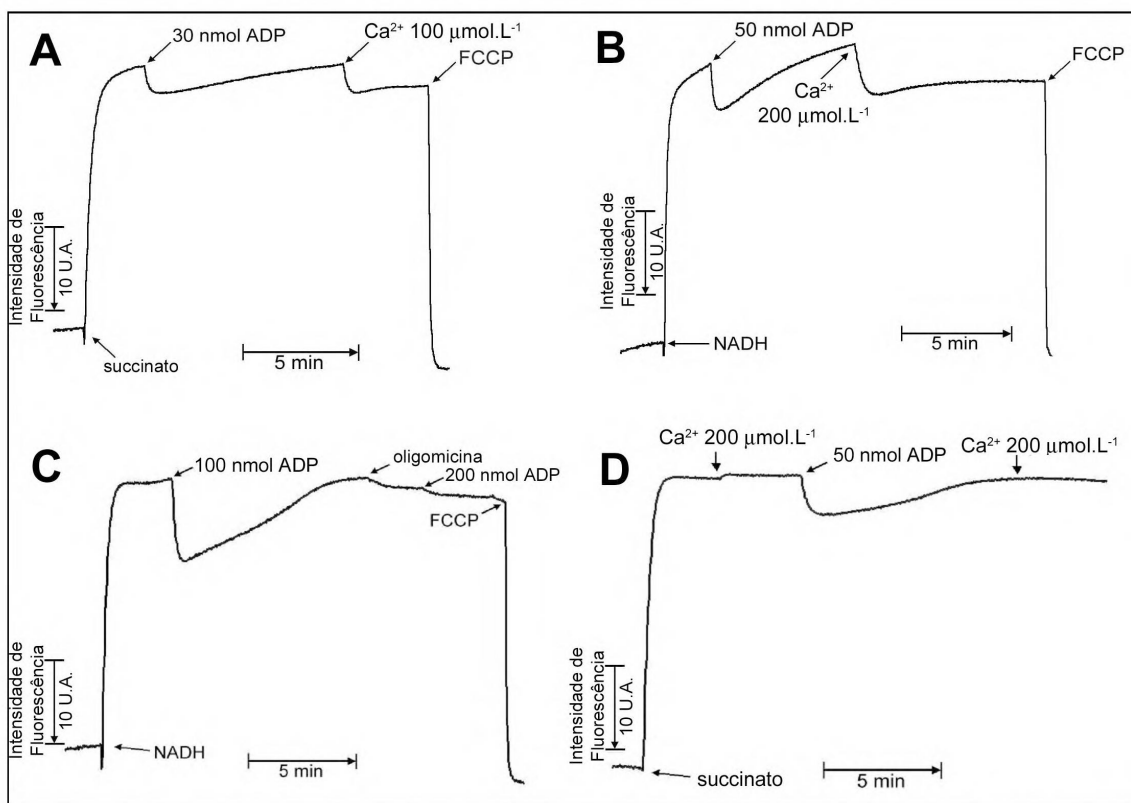


Figura 16. Efeitos da adição de Ca^{2+} , ADP, oligomicina, FCCP e/ou vermelho de rutênio sobre o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*

Suspensão mitocondrial ($300 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reação padrão descrito na Figura 5 suplementado com Pi 2mmol.L^{-1} , rotenona $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e safranina O $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, num volume final de 2 mL a 28°C . A reação foi iniciada pela adição de succinato (**A,D**) ou NADH (**B,C**). Outras adições foram ADP (30, 50 ou 100 nmol), Ca^{2+} (100 ou $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), oligomicina O $2,5 \mu\text{g.mg}^{-1}$ e FCCP $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, conforme indicado nas Figuras. As mitocôndrias foram pré-incubadas por 2 minutos na presença de vermelho de rutênio $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em (**D**). A Figura é representativa de 3 experimentos independentes.

5.2.5. Transporte de Ca^{2+}

A capacidade de transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* foi confirmada com os experimentos representados pela Figura 17. Nesses experimentos foi utilizado o arsenazo III, um corante que muda sua absorvância em diferentes comprimentos de onda na presença de Ca^{2+} . Na Figura 17A observa-se o aumento de ΔA decorrente de adições consecutivas de Ca^{2+} . Após a adição de succinato ocorre uma diminuição do ΔA , indicando que o Ca^{2+} está sendo transportado para a matriz mitocondrial utilizando para isso o $\Delta\psi$. Em experimentos realizados na ausência de Pi, a adição de succinato não resultou em diminuição no ΔA , ou seja, não ocorreu a captação de Ca^{2+} (dados não mostrados). Na Figura 17B, demonstra-se que o NADH também gera potencial elétrico de membrana capaz de captar Ca^{2+} , também somente após a adição de Pi. Desta forma comprova-se que o influxo de Ca^{2+} é dependente da presença de Pi e utiliza o potencial elétrico de membrana para ocorrer. A adição de FCCP após todo o Ca^{2+} ter sido captado, resulta em liberação do íon pelo reverso da via *uniporter*. Nos experimentos representados pela Figura 17C a adição de vermelho de rutênio, um inibidor do *uniporter* de Ca^{2+} em mitocôndrias de plantas e mamíferos, também resulta em efluxo do íon, porém pela via de efluxo. Deste modo percebe-se que a velocidade de influxo é maior que a velocidade de efluxo, e que a saída do íon ocorre por uma via independente da entrada, como já constatado para outras mitocôndrias isoladas de mamíferos e plantas (MARTINS e VERCESI, 1985; MARTINS *et al.*, 1986; VERCESI, 1993). Não ocorreu influxo de Ca^{2+} quando o inibidor vermelho de rutênio foi adicionado antes do substrato, conforme pode ser observado na Figura 17D.

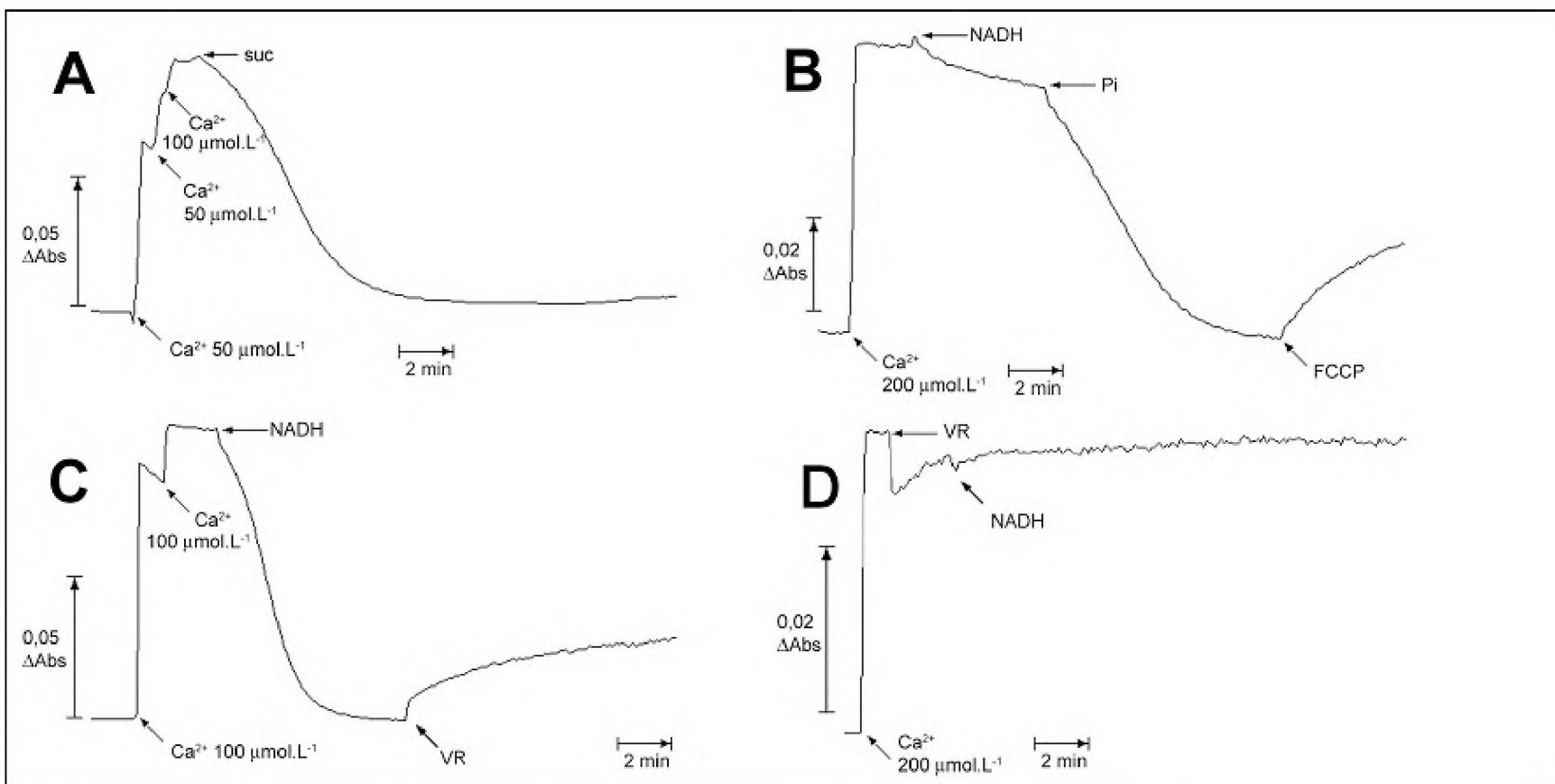


Figura 17. Transporte de Ca^{2+} em mitocôndrias de *Araucaria angustifolia*.

Suspensão mitocondrial ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reação contendo sacarose $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, HEPES- K^+ 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), BSA $0,1\%$, Pi 2 mmol.L^{-1} (exceto em **B**), rotenona $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e arsênio III $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, em um volume final de $1,5 \text{ mL}$ a 25°C . Ca^{2+} foi adicionado ao meio conforme indicado. A captação de Ca^{2+} foi iniciada pela adição de succinato 5 mmol.L^{-1} ou NADH 2 mmol.L^{-1} conforme indicado. Outras adições foram Pi 2 mmol.L^{-1} , FCCP $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ou vermelho de rutênio $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ conforme indicado. O par de comprimentos de onda utilizado foi $675/685 \text{ nm}$. A Figura é representativa de 2 experimentos independentes.

5.2.6. Determinação da respiração insensível ao cianeto e sensível ao SHAM

Além da presença de NAD(P)H desidrogenases insensíveis à rotenona foi possível demonstrar em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* a presença da oxidase alternativa e da proteína desacopladora (PUMP).

A Figura 18 mostra através do consumo de oxigênio em mitocôndrias de *Araucaria angustifolia* uma respiração insensível ao cianeto e sensível ao SHAM. Foram adicionados diferentes substâncias com o objetivo de se estimular ao máximo a AOX nestas organelas:

- ATP foi utilizado para estimular a succinato desidrogenase, já que succinato foi o substrato oxidável.
- Propranolol estava presente para inibir o canal aniônico de plantas (MARTINS *et al.*, 1993).
- Utilizou-se DTT e piruvato diretamente no meio de reação com o objetivo de estimular a oxidase alternativa (WAGNER *et al.*, 1995).

Dessa forma foi possível determinar uma respiração pela *via* alternativa que foi equivalente a ~34 % da respiração total. Entretanto, experimentos utilizando anticorpo anti-AOX são necessários para a confirmação destes resultados.

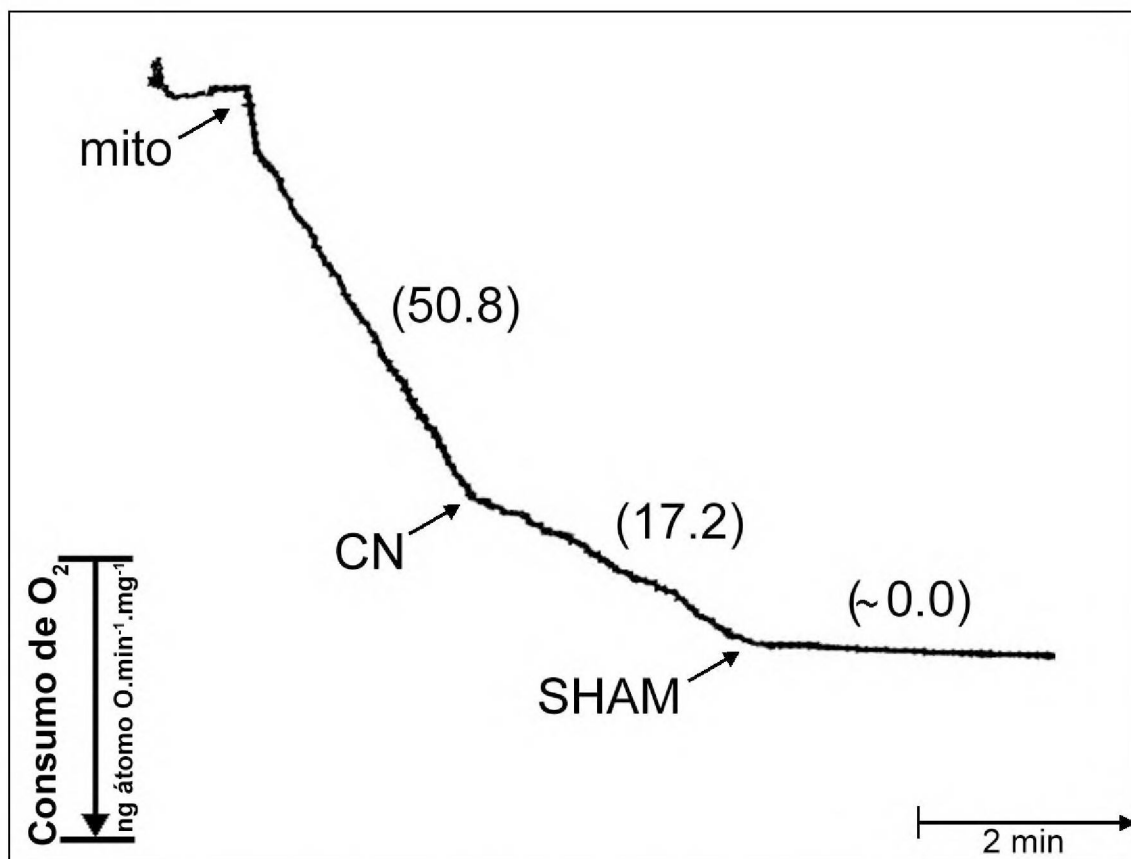


Figura 18. Respiração insensível ao cianeto e sensível ao SHAM em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*:

Suspensão mitocondrial ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi adicionada ao meio de reação padrão descrito na Figura 5, suplementado com rotenona $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, propranolol 300 mmol.L^{-1} , piruvato $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$, ATP $0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$, DTT 1 mmol.L^{-1} e succinato 2 mmol.L^{-1} , num volume final de $1,2 \text{ mL}$ a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Outras adições foram cianeto 1 mmol.L^{-1} e SHAM 1 mmol.L^{-1} , conforme indicado. A Figura é representativa de 6 experimentos independentes.

5.2.7. Desacoplamento provocado por ácido oléico

A presença da PUMP foi determinada através da determinação do potencial elétrico de membrana e do consumo de oxigênio conforme a Figura 19. Durante o consumo de oxigênio o meio de reação foi suplementado com propranolol e ATP pelas mesmas razões descritas para a Figura 18. Além disso, foram adicionados BHAM e atractilosídeo, para eliminar as interferências da AOX e da ATP-sintase, respectivamente. Dessa forma, foi possível demonstrar um aumento da velocidade respiratória (Figura 19A) e desacoplamento (Figura 19B) na presença de ácido oléico, um indutor da proteína desacopladora em mamíferos e plantas. Quando o ácido oléico estava presente previamente à adição do succinato (Figura 19C) não houve formação de $\Delta\psi$. A adição de BSA na concentração de 0,1 g% provocou uma diminuição da velocidade respiratória (Figura 19A) e um aumento do $\Delta\psi$ (Figura 18B,C), devido à sua capacidade de se ligar aos ácidos graxos, de modo que novas adições de BSA ou ainda ATP (1 mmol.L⁻¹) não se mostraram capazes de acoplar as mitocôndrias. Na Figura 19A pode-se observar que a adição do protonóforo FCCP na concentração de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ aumentou a velocidade respiratória da mesma forma que a adição de ácido oléico, indicando que na presença do ácido graxo a mitocôndria estava desacoplada. Isso pode ser confirmado pelo experimento representado na Figura 19C, onde o $\Delta\psi$ não foi gerado pela adição de succinato. Neste caso, houve formação de $\Delta\psi$ somente após a adição de BSA. Contudo, a presença de PUMP nessas mitocôndrias só pode ser confirmada pelo uso de anticorpos anti-PUMP.

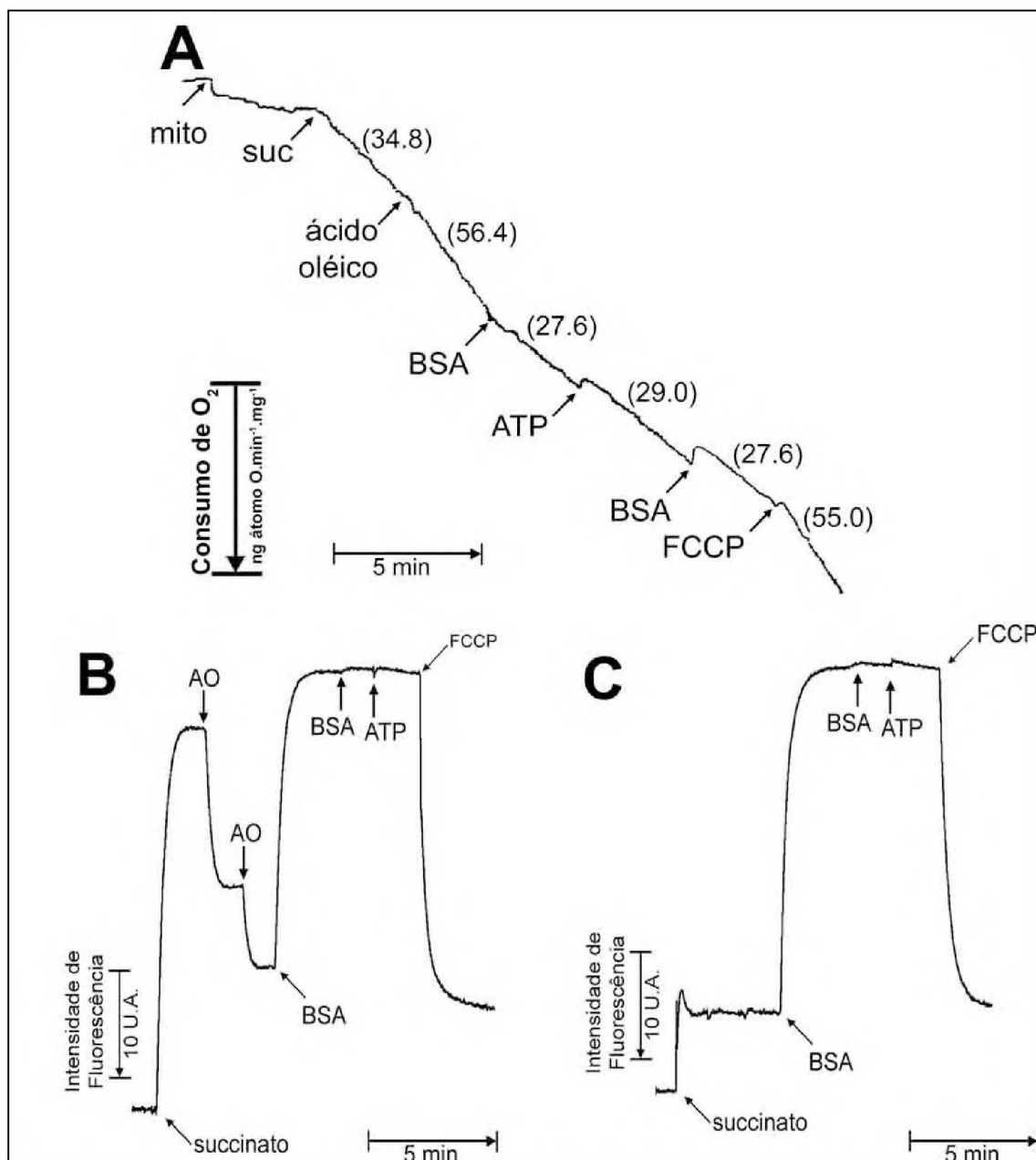


Figura 19. Consumo de oxigênio (A) e $\Delta\psi$ (B,C) demonstrando a presença da PUMP em mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*:

(A) Suspensão mitocondrial ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi adicionada em meio de reação padrão descrito no item 4.5 de Materiais e Métodos, sem BSA, suplementado com P_i $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, rotenona $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, oligomicina $2,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, ATP $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, atractilósídeo $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, propranolol $300 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e BHAM $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, num volume final de $1,2 \text{ mL}$ a $28 \text{ } ^\circ\text{C}$. Outras adições foram: ácido oléico $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BSA $0,1 \text{ g}\%$, ATP $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ e FCCP $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. (B) Suspensão mitocondrial ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi adicionada em uma solução idêntica a (A) suplementado com safranina O $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Outras adições foram: ácido oléico $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2 adições), BSA $0,1 \text{ g}\%$, ATP $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ e FCCP $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. (C) Suspensão mitocondrial ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi adicionada em uma solução idêntica a (A) suplementado com safranina O $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido oléico. Outras adições foram idênticas a (B). As reações foram iniciadas pela adição de succinato $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. A Figura é representativa de 3 experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO

6.1. ESTUDO COM MITOCÔNDRIAS DE TUBÉRCULO DE BATATA

Neste estudo os efeitos de Ca^{2+} , mersalil e diamida foram avaliados em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata submetidos ou não ao estresse pelo frio. O tratamento pelo frio leva a um aumento da atividade/expressão da NADH desidrogenase externa e AOX, como pode ser observado pelo aumento das velocidades respiratórias dos experimentos representados pelas Figuras 5 e 7, mas não do complexo II, como mostra a Figura 6. Piruvato foi adicionado aos meios de extração e isolamento para estimular AOX (VANLERBERGHE & MCINTOSH, 1997), mas não ao meio de reação, para evitar interferências com os reagentes tiólicos utilizados. O agente protetor de tióis, DTT, o qual muda a AOX para sua conformação totalmente ativa, foi também evitado devido sua interação com mersalil e diamida. Dessa forma, utilizando DTT e piruvato no meio de reação, Calegario e colaboradores (2003) mostraram que o aumento da velocidade respiratória de mitocôndrias de batata devido ao estresse dos tubérculos pelo frio é devido ao aumento da via insensível ao cianeto, diferentemente dos dados representados na Figura 6 e 7, os quais foram realizados na ausência dos indutores da AOX. Além disso, é importante mencionar que, embora o tratamento dos tubérculos pelo frio possa também aumentar a expressão da PUMP (CALEGARIO *et al.*, 2003), a atividade desta enzima não interferiu nos resultados apresentados porque as suspensões mitocondriais de batata foram estudadas na presença de BSA essencialmente livre de ácidos graxos, uma condição que inativa a PUMP (SMITH *et al.*, 2004).

Os parâmetros avaliados e interpretados foram o consumo de oxigênio e $\Delta\psi$ medidos durante a oxidação de NADH externamente adicionado ou de succinato. As condições experimentais incluíram a presença de SHAM ou cianeto. SHAM sendo um inibidor seletivo da *via* alternativa, permitiu que as oxidações de NADH e succinato através da *via* citocromo pudessem ser estudadas sem a interferência da AOX. Inversamente, a presença de cianeto

permitiu a investigação dos efeitos do Ca^{2+} , mersalil e diamida na atividade AOX sem a interferência da *via* do citocromo.

Um resultado importante do presente estudo foi que Ca^{2+} inibiu a *via* AOX em mitocôndrias de batata energizadas com NADH ou succinato, e este efeito somente foi experimentalmente verificado quando a *via* do citocromo estava inibida por cianeto. Além disso, o tratamento pelo frio não mudou este efeito (Figura 7A,B). Quando a *via* do citocromo estava funcional, como anteriormente demonstrado (MØLLER & LIN, 1986; MØLLER *et al.*, 1993), Ca^{2+} estimulou diretamente a NADH desidrogenase externa, como demonstrado pelo aumento de aproximadamente 50% no consumo de oxigênio durante a oxidação de NADH (Figura 5), mas não afetou a oxidação de succinato. Até onde se conhece, o efeito inibitório do Ca^{2+} sobre a atividade AOX não havia ainda sido descrito. Além disso, nossos resultados mostram claramente que o estímulo provocado pelo Ca^{2+} na atividade da NADH desidrogenase externa afeta negativamente a *via* alternativa (Figuras 5, 7 e 8). Levando-se em consideração o fato de que estas enzimas desempenham um importante papel de proteção da planta durante condições adversas, são necessários estudos adicionais a respeito do possível papel fisiológico da regulação das enzimas mitocondriais alternativas pelo íon cálcio.

Os resultados também mostram que o reagente oxidante de grupos tiol, diamida, é um potente inibidor da AOX e seu efeito foi somente observado quando a *via* do citocromo estava inibida, bem como aconteceu para o íon cálcio. Portanto, quando os experimentos foram realizados na presença de cianeto, a diamida causou inibição total do consumo de oxigênio decorrente da oxidação de NADH externamente adicionado (Figura 7A) e também uma diminuição pronunciada na respiração induzida pela oxidação de succinato (Figura 7B). Diferentemente, a adição de diamida não causou nenhum efeito significativo no consumo de oxigênio mitocondrial através da *via* do citocromo, em mitocôndrias de tubérculos não estressados oxidando NADH, na presença ou ausência de SHAM (Figura 5A), quando comparado com os controles respectivos. Na condição de estresse não ocorreu nenhuma mudança na velocidade respiratória decorrente da oxidação de NADH devido à adição de

diamida (Figura 5B). Os mesmo resultados foram obtidos para mitocôndrias oxidando succinato (Figura 6A,B). Dessa forma, estes resultados sugerem que a diamida não afeta a *vía* do citocromo em mitocôndrias de batata, mesmo depois do tratamento dos tubérculos pelo frio. A diamida é um conhecido formador de pontes dissulfeto entre os homodímeros da AOX, mudando a proteína para a sua conformação menos ativa (VANLERBERGHE e MCINTOSH, 1997). Os resultados apresentados sugerem que a ação da diamida só pode ser observada em mitocôndrias de tubérculos de batata quando a *vía* do citocromo está inativada, ou ainda porque a via alternativa está presente em baixos níveis nessas mitocôndrias. Além disso, já que nenhuma diferença pode ser observada entre as condições sem estresse e com estresse pelo frio, os resultados também mostram que este efeito específico da diamida sobre a AOX não é afetado pelo tratamento dos tubérculos pelo frio, o qual mostrou-se alterar a atividade da AOX (Figura 7).

Os resultados dos experimentos representados pela Figura 1A,B mostram que o tratamento dos tubérculos pelo frio modifica a sensibilidade mitocondrial pelo mersalil, e sugere que esse reagente tiólico tem um efeito inibitório direto sobre a NADH desidrogenase externa. Um possível efeito do mersalil sobre a AOX pode ser descartado, já que os experimentos na presença de cianeto mostraram que a *vía* alternativa não foi inibida em condições sem estresse ou com estresse provocado pelo frio (Figura 7A,B). De fato, a ausência de efeitos do mersalil na oxidação do succinato, na presença ou ausência de SHAM, em condições sem estresse (Figura 6A) ou com estresse pelo frio (Figura 6B), confirmam que esse reagente tiólico age diretamente sobre a NADH desidrogenase externa. Além disso, os efeitos inibitórios causados por mersalil em mitocôndrias de tubérculos estressados não estão relacionados a uma possível ação sobre o $\Delta\psi$, já que a adição de mersalil não alterou o potencial elétrico de membrana nessas mitocôndrias (Figura 9).

Os experimentos de $\Delta\psi$ mostraram que a adição de mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ não provocou queda de potencial elétrico de membrana em mitocôndrias energizadas por NADH ou succinato. Deste modo, pode-se dizer que a inibição

observada no consumo de O_2 pelo mersalil $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 5B), não está relacionada ao $\Delta\psi$ e sim ao seu efeito inibitório sobre a NADH desidrogenase externa.

Esses resultados revelam novos aspectos em relação aos efeitos do mersalil e diamida sob condições de estresse em mitocôndrias de plantas. Contudo, estes efeitos demonstrados nos experimentos de respiração não estão relacionados à transição de permeabilidade mitocondrial, a qual requer tanto a presença de Ca^{2+} , ausência de substrato e um maior tempo para ocorrer. Com o objetivo de reavaliar o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial em mitocôndrias de batata, tendo em vista o efeito do tratamento dos tubérculos pelo frio, envolvimento de ERO bem como os efeitos do SHAM, experimentos de inchamento mitocondrial foram realizados. Para eliminar os efeitos da cadeia respiratória e do $\Delta\psi$, os estudos foram realizados na presença de antimicina A e FCCP, respectivamente, bem como na ausência de substratos. Observamos que, nessas condições, $Ca^{2+} 1 \text{ mmol.L}^{-1}$ foi capaz de provocar um amplo inchamento em mitocôndrias isoladas de tubérculos sem estresse. Concentrações menores de Ca^{2+} não provocaram inchamento mitocondrial durante o tempo em análise (até 35 minutos). A presença de DTT e catalase causaram proteção da mitocôndria contra os efeitos do Ca^{2+} , mostrando o envolvimento de grupos SH e ERO, respectivamente. Mitocôndrias isoladas de tubérculos estressados pelo frio foram mais sensíveis aos efeitos do Ca^{2+} , com amplo inchamento mitocondrial que ocorreu praticamente após a adição do íon. Mesmo nestas condições de estresse houve proteção pela presença de DTT e catalase indicando que os mesmos mecanismos estão envolvidos.

Em alguns experimentos (dados não mostrados) as adições de $Ca^{2+} (1 \text{ mmol.L}^{-1})$ demoraram um tempo maior para provocar o inchamento das mitocôndrias (mais que 20 minutos). Como as suspensões mitocondriais são preparadas a partir de diferentes lotes de tubérculos de batata, uma variação na composição das enzimas protetoras contra ERO explicaria a diferente sensibilidade ao Ca^{2+} observado ao longo do estudo, decorrente de diferentes

concentrações de espécies reativas de oxigênio (APEL e HIRT, 2004; MITTLER *et al.*, 1999).

A adição de SHAM foi capaz de proteger as mitocôndrias dos inchamentos induzidos por diamida e Ca^{2+} e por mersalil e/ou Ca^{2+} . A proteção exercida pelo mersalil não pode estar relacionada com a inibição da oxidase alternativa, visto que os efeitos foram também observados em mitocôndrias de batata não estressadas, situação de baixo nível de AOX nestas organelas. Assim sendo a ação do SHAM sobre as mitocôndrias pode estar acontecendo principalmente pela sua capacidade de quelar ferro. Ca^{2+} em alta concentração desloca o ferro ligado a proteínas (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001) e dessa forma, através da reação de Fenton forma radicais hidroxila. Portanto, a interação do SHAM com ferro livre diminuiria a ação deletéria decorrente da ação do Ca^{2+} . Como mitocôndrias de batata não transportam Ca^{2+} , a ação do íon ocorre no lado externo da membrana mitocondrial. Isto reforça a necessidade da presença de espécies reativas de oxigênio para que o fenômeno ocorra. O ácido salicilhidroxâmico atuaria diminuindo a formação de espécies reativas através da ligação ao ferro livre responsável pela catalização da reação de Fenton. Além de afetar o inchamento de mitocôndrias de batata, o SHAM foi capaz de impedir o inchamento induzido por Ca^{2+} e mersalil em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (dados não mostrados), confirmando que o mecanismo de ação é independente da inibição da AOX. Este comportamento semelhante observado em mitocôndrias animais indica que os mecanismos que induzem o inchamento mitocondrial são semelhantes aos observados em mitocôndrias vegetais.

6.2. ESTUDO COM MITOCÔNDRIAS DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE ARAUCARIA

Um novo modelo experimental para o estudo da transição de permeabilidade mitocondrial consiste nas mitocôndrias de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* que foram isoladas pela primeira vez neste presente estudo. Essas mitocôndrias transportam Ca^{2+} e são de uma família de plantas cujas mitocôndrias ainda não foram estudadas. Este fato permitirá a continuidade destes estudos de TPM em plantas.

Assim como as angiospermas, mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* isoladas neste trabalho, apresentam na sua cadeia transportadora de elétrons enzimas alternativas amplamente distribuídas entre as plantas, fungos e protozoários. As mitocôndrias destas gimnospermas apresentaram evidências da presença de NAD(P)H desidrogenases alternativas, oxidase alternativa e proteína desacopladora (PUMP).

Mitocôndrias de gimnospermas foram isoladas previamente por Kumar e colaboradores em 1995, a partir de tecido cultivado de uma espécie híbrida *Larix x leptoeuropae* e cujo principal objetivo foi o isolamento e caracterização de DNA mitocondrial. Até o presente momento mitocôndrias de *Araucaria angustifolia* nunca haviam sido isoladas. Esta é uma importante espécie de gimnosperma de distribuição ao sul do Brasil e de grande interesse econômico (GUERRA *et al.*, 2000; ZANDAVALLI *et al.*, 2004). Utilizando a metodologia desenvolvida neste trabalho foi possível isolar mitocôndrias funcionalmente intactas capazes de oxidar os substratos malato/glutamato, succinato e NADH.

As mitocôndrias de *A. angustifolia* foram capazes de oxidar NADH externamente adicionado de forma insensível a rotenona. A verificação da capacidade de oxidação de NAD(P)H foi realizada e demonstrou-se evidências da presença de NAD(P)H alternativas devido à oxidação de NAD(P)H de forma insensível a rotenona utilizando-se mitocôndrias rompidas em nitrogênio líquido. Além disso foi possível demonstrar um estímulo da oxidação de

NAD(P)H na presença de Ca^{2+} , uma característica comum a essas enzimas (MØLLER, 2001; RASMUSSEN *et al.*, 1999).

As mitocôndrias de *A. angustifolia* foram capazes de consumir oxigênio na presença de cianeto de forma sensível ao SHAM. Assim sendo, evidencia-se a presença da *via* alternativa nessas mitocôndrias, caracteristicamente decorrente da atividade da oxidase alternativa. Portanto, é possível perceber que a AOX encontra-se também distribuída entre as gimnospermas, mostrando-se tratar de uma enzima importante no metabolismo vegetal. Como tem-se proposto que a oxidase alternativa possui importante papel na prevenção contra a formação de ERO em mitocôndrias de plantas, o estudo desta enzima em *A. angustifolia* é de fundamental importância já que esta espécie encontra-se distribuída principalmente nas regiões frias do sul do Brasil (ZANDAVALLI *et al.*, 2004) e sabe-se que baixas temperaturas provocam um estresse nas plantas de modo a aumentar a formação de ERO (APEL & HIRT, 2004).

As mitocôndrias de *A. angustifolia* também apresentaram queda no potencial de membrana na presença de ácido oléico que foi revertido e prevenido pela adição de BSA essencialmente livre de ácidos graxos. As velocidades respiratórias foram as mesmas na presença de ácido graxo e FCCP, evidenciando um mecanismo desacoplador altamente eficiente. Além disso demonstrou-se que as mitocôndrias não foram capazes de gerar $\Delta\psi$ na presença de ácido oléico previamente a adição de BSA. A proteína desacopladora destas mitocôndrias ainda requer uma melhor caracterização com a utilização de anticorpos anti-PUMP.

Mitocôndrias de *A. angustifolia* foram também capazes de captar Ca^{2+} de maneira sensível ao vermelho de rutênio utilizando para isso o potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) assim como constatado com outras mitocôndrias vegetais (milho, soja, feijão, café) e diferentemente do observado com mitocôndrias isoladas de folhas brancas de repolho, cana de açúcar, beterraba e batata. Os experimentos mostraram também nestas mitocôndrias, que o transporte de Ca^{2+} somente ocorreu na presença de fosfato. Além disso foi possível observar que a adição de FCCP provocou liberação de Ca^{2+} pelo

reverso da via uniporter. Já com a adição de vermelho de rutênio é possível observar a saída de Ca^{2+} pela via eletroneutra de efluxo, insensível ao $\Delta\psi$ (Fig 20D).

Como a presença de Ca^{2+} na matriz mitocondrial é considerado essencial para o fenômeno de TPM, o estudo destas mitocôndrias poderá ser fundamental para a compreensão do fenômeno, através da comparação com mitocôndrias que transportam Ca^{2+} como as isoladas de milho, soja, café e mamíferos bem como aquelas incapazes de captar o íon como as de tubérculos de batata.

7. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais utilizadas neste estudo conclui-se que:

Em relação à oxidação de NADH e succinato por mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata:

- Efeitos do Ca^{2+} :
 - Ca^{2+} 1 mmol.L⁻¹ provoca o máximo de estímulo no consumo de O_2 induzido por NADH sem afetar a oxidação de succinato.
 - Na presença de cianeto observa-se a inibição provocada por Ca^{2+} na oxidação de NADH e succinato, podendo se tratar de uma regulação sobre a AOX.

- Efeitos da diamida e mersalil:
 - Diamida inibe o consumo de O_2 induzido por NADH e succinato somente na presença de cianeto devido a sua ação inibitória sobre AOX.
 - Mersalil inibe o consumo de O_2 induzido por NADH devido a inibição da NADH desidrogenase externa sem afetar o $\Delta\psi$.

- Efeitos do SHAM:
 - SHAM previne os efeitos inibitórios do mersalil sobre o consumo de oxigênio induzido por NADH em mitocôndrias isoladas de tubérculos não estressados e estressados pelo frio.
 - SHAM não afeta o estímulo provocado por Ca^{2+} no consumo de O_2 induzido por NADH.

- Efeitos do tratamento dos tubérculos pelo frio:
 - Não afeta o estímulo do Ca^{2+} sobre o consumo de oxigênio induzido por NADH.

- Não afeta a inibição provocada pelo Ca^{2+} sobre o consumo de oxigênio induzido por NADH e succinato na presença de cianeto.
- Aumenta os efeitos inibitórios do mersalil sobre o consumo de O_2 induzido por NADH.

Em relação ao inchamento mitocondrial em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata provocados pela presença de Ca^{2+} :

- Conclui-se pela primeira vez que o tratamento dos tubérculos pelo frio:
 - Provoca um inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} mais rápido que em mitocôndrias de tubérculos sem estresse.
 - Não afeta a proteção exercida por EGTA e DTT.
 - Aumenta a proteção exercida pela catalase.
- Efeitos do SHAM:
 - Protegeu contra o inchamento induzido por Ca^{2+} , Ca^{2+} e mersalil, Ca^{2+} e diamida.

Em relação às mitocôndrias isoladas a partir de culturas embriogênicas cultivados de *Araucaria angustifolia*:

- Foram isoladas pela primeira vez neste trabalho:
- Caracterização:
 - Oxidaram malato / glutamato, succinato e NADH com controles respiratórios de 1,7 – 2,5.
 - Foram capazes de captar Ca^{2+} de modo sensível ao vermelho de rutênio e dependentes de Pi e $\Delta\psi$, ocorrendo efluxo do íon tanto pelo reverso da via de influxo (pela adição de FCCP) como pela via de efluxo com vermelho de rutênio.

- Apresentaram evidências da presença de oxidase alterativa, NADH desidrogenases alternativas estimuladas por Ca^{2+} e proteína desacopladora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERMAN, K.E.; NICHOLLS, D.G. Physiological and bionergetic aspects of mitochondrial calcium transport. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 95, p. 150–187, 1983.

AKERMAN, K.E.; WIKSTRÖM, M.K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, v. 68(2), 191–197, 1976.

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

BANTANDIER, C.; LEVERVE, X.; FONTAINE, E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 17197–17204, 2004.

BEAVIS, A.D.; 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.

BERNARDES, C.F.; FERREIRA-DA-SILVA, L.; VERCESI, A.E. *t*-butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and ATP. **Biochim Biophys. Acta.**, v. 850, p. 41–48, 1986.

BERTRAND, H.; ARGAN, C.A.; SZAKACS, N.A. Genetic control of the biogenesis of cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*, em R.J. SCHEWEYEN, R.J.; WOLF, K.; KAUDEWITZ, F. **Mitochondria**, Ed. Walter de Gruyter, Berlin, p. 495–507, 1983.

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

BRANDALISE, M.; MAIA, I.G.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 35, p. 203–209, 2003.

CALEGARIO, F.F.; COSSO, R.G.; FAGIAN, M.M.; ALMEIDA, F.V.; JARDIM, W.F.; JEZEK, P.; ARRUDA, P.; 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.; BERNAL-LUGO, I. Control of superoxide production in mitochondria from maize mesocotyls. **FEBS Lett.**, v. 570, p. 52–56, 2004.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 28, p. 523–529, 1996.

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

CHEN, C.H.; LEHNINGER, A.L. Ca^{2+} transport activity in mitochondria from some plant tissues. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 157, p. 183–196, 1973.

CLARKE, S.J.; MCSTAY, G.P.; HALESTRAP, A.P. (2002) Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion

injury of the heart by binding to cyclophilin–D at a different site from cyclosporin A, **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 34793–34799, 2002.

CONSIDINE, M.J.; GOODMAN, M.; ECHTAY, K.S.; LALOI, M.; WHELAN, J.; BRAND, M.D.; SWEETLOVE, L.J. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 22298–22302, 2003.

CREISSEN, G.; FIRMIN, J.; FRYER, M.; KULAR, B.; LEYLAND, N. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. **Plant Cell**, v. 11, p. 1277–1292, 1999.

CROMPTON, M.; COSTI, A.; HAYAT, L. Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. **Biochem. J.**, v. 245, p. 915–918, 1987.

DALOCE, E. J. **Permeabilização de membrana mitocondrial interna por citrina e Ca^{2+}** . Curitiba. Tese de Mestrado em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1995.

DAY, D.A., WISKICH J.T. Regulation of alternative oxidase activity in higher-plants. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 27, n. 4, p. 379–385, 1995.

DERYABINA, Y.I.; ISAKOVA, E.P.; ZVYAGILSKAYA, R.A. Mitochondrial calcium transport systems: properties, regulation, and taxonomic features. **Biochemistry**, v. 69(1), p. 92–102.

DEDOV, V.N.; DEMIN, O.V.; CHERNYAK, V.YA.; CHERNYAK, B.V. Induction of nonselective permeability of the inner membrane in deenergized mitochondria, **Biokhimiya**, v. 64, n. 7, p. 965–973, 1999.

DIETER, P.; MARME, D. Ca^{2+} transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher-plants. **Planta**, v. 150, n. 1, p. 1–8, 1980.

ECHTAY, K.S.; ROUSSEL, D.; ST-PIERRE, J.; JEKABSONS, M.B.; CADENAS, S.; STUART, J.A.; HARPER, J.A.; ROEBUCK, S.J.; MORRISON, A.; PICKERING, S.; CLAPHAM, J.C.; BRAND, M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. **Nature**, v. 415, pp. 96–99, 2002.

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

FONSECA, F.N.; FERREIRA, A.J.S.; SARTORELLI, P.; LOPES, N.P.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; 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^{2+} 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.

GROEN, B.H.; VANMIL H.G.J.; BERDEN, J. A. The efficiency of oxidative-phosphorylation in potato-tuber mitochondria is different for succinate and external NADH, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1140, n. 1, p. 37–44, 1992.

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.

GUNTER, T.E.; PFEIFFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.** v. 258, p. C755–C786, 1990.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S., GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium–transport – physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. c313–c339, 1994.

HANAK, P.; JEZEK, P. Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis – UCP4 as the ancestral uncoupling protein. **FEBS Lett.**, n. 495, v. 137–141, 2001.

HANSON, J.B.; HODGES, T.K. Energy–linked reaction of plant mitochondria. **Curr. Top. Bionerg.**, v. 2, p. 65–98, 1967.

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

HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The Ca^{2+} –induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 195, p. 453–459, 1979.

IKUMA, H. Electron transport in plant respiration. **Ann. Rev. Plant. Physiol.**, v. 23, p. 419–36, 1972.

JABS, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, n. 3, p. 231–245, 1999.

JEZEK, P.; COSTA, A.D.; 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.; GARLID, K.D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1365, p. 319–327, 1998.

JEZEK, P.; ZACKOVA, M.; KOSAROVA, J.; RODRIGUES, E.T.S.; MADEIRA, V.M.C.; 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.

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

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

KEYHANI, J.; KEYHANI, E. Cytochrome–c oxidase biosynthesis and assembly in candida–utilis yeast–cells – Subunit structure and molecular–weight determination. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 167, n. 2, p. 588–595, 1975.

KOKOSZKA, J.E.; WAYMIRE, K.G.; LEVY, S.E.; SLIGH, J.E.; CAL, JLYANG, C.; JONES, D.P.; MacGREGOR, G.R.; WALLACE, D.C. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. **Nature**, v. 427, p. 461–465, 2004.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 495, p. 12–15. 2001.

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

KOWALTOWSKI, A.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biol. & Med.**, v. 26, n. 3/4, p. 463–471, 1999.

KUMAR, A.M.; SOLL, D. *Arabidopsis* alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 10842–10846, 1992.

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.

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

LAM, E.; PONTIER, D.; DEL POZO, O. Die and let live – programmed cell death in plants, **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 2, n. 6, p. 502–507, 1999.

LAMB, C.; DIXON, R. The oxidative burst in plant disease resistance, **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v. 48, p. 251–275, 1997.

LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A.L.; QIAN, T. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy, **BBA–Bioenergetics**, v. 1366, p. 177–196. 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C.; 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.; 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.

LUFT, J. H. Ruthenium red and Violet; chemistry purification methods of use for electron microscopy and mechanism of action. **Anat. Rec.**, v. 171, p. 347–368, 1971.

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

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

MARIANO, A.B.; OLIVEIRA, M.B.M.; CARNIERI, E.G.S. Effects of Ca²⁺ on enzyme activities of the respiratory chain, **SBBq XXVII^a Reunião Anual**, Caxambú – MG, 1998

MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. Some characteristics of Ca²⁺ transport in plant mitochondria, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 129, p. 943–948, 1985

MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Characteristics of Ca²⁺ transport by corn mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 850, p. 49–56, 1986.

MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Mechanisms of Ca²⁺ and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. **Curr. Top. Plant Physiol.**, v. 1, p. 211–217, 1993.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; McINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 14, p. 8271–8276, 1999.

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., DUARTE, M.; 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.

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.

MENZ, R.I.; GRIFFITH, M.; DAY, D.A.; WISKICH, J.T. Matrix NADH dehydrogenases of plant mitochondria and sites of quinone reduction by complex I, **Eur. J. Biochem.**, v. 208, p. 481–485, 1992.

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

MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. **Biol. Rev.**, v. 41, n. 3., 455–502, 1966.

MITTLER, R.; HERR, E.H.; ORVAR, B.L.; VAN CAMP, W.; WILLEKENS, H. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen

intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 14165–14170, 1999.

MIWA, S.; 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.

MØLLER, I.M.; LIN, W. Membrane-Bound NAD(P)H Dehydrogenases in Higher-Plant Cells, **Annu. Rev. Plant Phys.**, v. 37, p. 309–334, 1986.

MØLLER, I.M.; RASMUSSEN, A.G.; FREDLUND, K.M. NAD(P)H-Ubiquinone Oxidoreductases In Plant-Mitochondria, **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 25, n. 4, p. 377–384, 1993.

MOORE, A.L.; SIEDOW, J.N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1059, n. 2, 121–140, 1991.

MURPHY, M.P.; ECHTAY, K.S.; BLAIKIE, F.H.; ASIN-CAYUELA, J.; COCHEME, H.M.; GREEN, K.; BUCKINGHAM, J.; TAYLOR, E.R.; HURRELL, F.; HUGHES, G.; MIWA, S.; COOPER, C.E.; SVISTUNENKO, D.A.; SMITH, R.A.; BRAND, M.D. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation. **Biol. Chem.**, v. 278, p. 48534–48545, 2003.

NOVGORODOV, S.A.; GUDZ, T.I.; KUSHNAREVA, Y.E.; ZOROV, D.B.; KUDRJASHOV, Y.B. Effect of cyclosporine A and oligomycin on non-specific

permeability of the inner mitochondrial membrane. **FEBS Lett.**, v. 270, p. 108–110, 1990.

PUNTARULO, S.; SANCHEZ, R.A.; BOVERIS, A. Hydrogen–peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. **Plant Physiol.**, v. 86, n. 2, p. 626–630, 1988.

RASMUSSEN, A.G.; 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.

RASMUSSEN, A.G.; SVENSSON, A.S.; KNOOP, V.; GROHMANN, L., BRENNICKE, A. Homologues of yeast and bacterial rotenone–insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. **Plant J.**, v.20, n. 1, p. 79–87, 1999.

RHOADS, D.M.; McINTOSH, L. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 2122–2126, 1991.

RHOADS, D.M.; UMBACH, A.L.; SWEET, C.R.; LENNON, A.M.; RAUCH, G.S.; SIEDOW, J.N. Regulation of the cyanide–resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in alpha–keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 30750–30756, 1998.

RICQUIER, D.; KADER, J.C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoretic study. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 73, p. 577–583, 1976.

ROBERTS, T.H.; FREDLUND, K.M.; 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

RUGOLO, M.; PISTOCCHI, R.; ZANNONI, D. Calcium–ion transport in higher–plant mitochondria (*Helianthus tuberosus*). **Physiol. Plant.**, v. 79, p. 297–302, 1990.

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

SAKAJO, S.; MINAGAWA, N.; KOMIYAMA, T.; YASHIMOTO, A. Molecular cloning of cDNA for antimycin A–inducible mRNA and its role in cyanide–resistant respiration in *Hansenula anomala*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 142, p. 165–174, 1991.

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

SAVIANI, E.E.; ORSI, C.H.; OLIVEIRA, J.F.P.; PINTO–MAGLIO C.A.F.; SALGADO, I. Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide–induced plant cell death, **FEBS Lett.**, v. 510, n. 3, p. 136–140, 2002.

SCARPA, A.; GRAZIOTII, P. Mechanism for intracellular calcium regulation in heart. **J. Gen Physiol.**, v. 62, p. 756–772, 1973.

SCARPA, A. Measurement of cation transport with metalochromic indications. **Methods Enzymol.**, v. 61, p. 301–358, 1979.

SELWYN, M.J.; DAWSON, A.P.; DUNNET, S.J. Calcium transport in mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 1970.

SIEDOW, J.N.; DAY, D.A. In: **Biochemistry; Molecular Biology of Plants**, B. Buchana, W. Gruissem, R. Jones, Eds. p. 676–728, 2000.

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

SIEDOW, J.N.; UMBACH, A.L.; 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.

SILVA, M.A.P.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Calcium-transport by corn mitochondria – evaluation of the role of phosphate. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 452–457, 1992.

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.

SMITH, A.M.O.; RATCLIFFE, R.G.; SWEETLOVE, L.J. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 50, p. 51944–51952, 2004.

SOLOMOS, T. Cyanide-resistant respiration in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 28, p. 279–97, 1977.

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

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim Biophys Acta**, v. 1–2, p. 151–165, 1998.

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 seedlings. **Plant, Cell and Environ.**, v. 27, p. 437–448, 2004.

TSUGANE, K.; KOBAYASHI, K.; NIWA, Y.; OHBA, Y.; WADA, K.; KOBAYASHI, H. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. **Plant Cell**, v. 11, p. 1195–1206, 1999.

UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 845–54, 1993.

VALLE, V.G.R.; FAGIAN, M.M.; PARENTONI, L.S.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. The participation of reactive oxygen species and protein thiol in the mechanism of mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants. **Arch. Biochim. Biophys.**, v. 307, p. 1–71, 1993.

VANACKER, H.; CARVER, T.L.W.; FOYER, C.H. Early H_2O_2 accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley–powdery mildew interaction. **Plant Physiol.**, v. 123, p. 1289–1300, 2000.

VANLERBERGHE, G.C.; McINTOSH, L. Alternative oxidase, **Annu. Ver. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 703–734, 1997.

VANLERBERGHE, G.C.; DAY, D.A.; WISKICH, J.T.; VANLERBERGHE, A.E.; McINTOSH, L. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria:

depende on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 353–61, 1995.

VASHINGTON, F.D.; MURPHY, J.V. Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 237, p. 2670–2676, 1962.

VERCESI, A.E. Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, n. 5, p. 441–457, 1993.

VERCESI, A.E. Dissociation of NAD(P)^+ stimulated mitochondrial Ca^{2+} efflux from swelling and membrane damage. **Arch. Biochim. Biophys.**, v. 232, n. 1, p. 86–91, 1984.

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

VIROLAINEN, E.; BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. Ca^{2+} -induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. **Annals of Botany**, v. 90, p. 509–516, 2002.

VIANELLO, A.; MACRI, F.; BRAIDOT, E.; MOKHOVA, E.N. Effect of cyclosporin A on energy coupling in pea stem mitochondria **FEBS Lett.**, v. 371, p. 258–260, 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.

WATANABE, A.; HIRAI, A. Two uncoupling protein genes of rice (*Oryza sativa* L.): molecular study reveals the defects in the pre-mRNA processing for the

heat-generating proteins of the subtropical cereal. **Planta**, v. 215, p. 90–100, 2002.

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

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

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.

ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 17, p. 139–76, 1995.

ANEXO I



Original article

Sensitivities of the alternative respiratory components of potato tuber mitochondria to thiol reagents and Ca^{2+}

André B. Mariano, Caroline Valente, Silvia M.S.C. Cadena, Maria E.M. Rocha, Maria B.M. de Oliveira, Eva G.S. Carnieri *

Laboratório de Oxidações Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, 81.531-990 Curitiba, PR, Brazil

Received 12 July 2004; accepted 14 December 2004

Available online 01 February 2005

Abstract

Plant mitochondria differ from those of mammals, since they incorporate an alternative electron transport pathway, which branches at ubiquinol to an alternative oxidase (AOX), characteristically inhibited by salicylhydroxamic acid (SHAM). Another feature of plant mitochondria is that besides complex I (EC 1.6.5.3) they possess alternative NAD(P)H-dehydrogenases insensitive to rotenone. Many stress conditions are known to alter the expression of the alternative electron transport pathway in plant mitochondria. In the present study we investigated the effects of some thiol reagents and Ca^{2+} on potato mitochondrial respiratory chain presenting different activities of the alternative respiratory components AOX and external NADH dehydrogenase, a condition induced by previous treatment of potato tubers (*Solanum tuberosum* L., cv. Bintje) to cold stress. The results showed that Ca^{2+} presented an inhibitory effect on AOX pathway in potato mitochondria energized with NADH or succinate, which was only now observed when the cytochrome pathway was inhibited by cyanide. When the cytochrome pathway was functional, Ca^{2+} stimulated the external NADH dehydrogenase. Diamide was a potent AOX inhibitor and this effect was only now observed when the cytochrome pathway was inactive, as was the case for the calcium ion. Mersalyl inhibited the externally located NADH dehydrogenase and had no effect on AOX activity. The results may represent an important function of Ca^{2+} on the alternative mitochondrial enzymes NADH-DH_{ext} and AOX.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Ca^{2+} ; Cold-stress; Plant mitochondria; Potato tubers; -SH active reagents; SHAM

1. Introduction

The complexity of the respiratory chain of plant mitochondria is partly due to the presence of an alternative pathway that, along with the conventional respiratory chain via cytochromes, catalyses electron reduction of oxygen to water. This alternative electron transport pathway branches at ubiquinone to a homodimer called alternative oxidase (AOX) that is independent of complexes III and IV, insensitive to inhibitors of

these complexes, and sensitive to salicylhydroxamic acid (SHAM) [12,23]. This alternative pathway does not pump protons through the inner membrane and thus can be used to dissipate energy as heat, instead of ATP generation [18,21,24]. Indeed, the high expression of AOX in specific plant thermogenic tissues (e.g. *Sauromatum guttatum*) lead to the thought that this pathway was related only to heat production [24]. However, the presence of this pathway in other tissues has also been described [6,7,9,11,16,19,20,22], and AOX has been shown to be induced by stress conditions, such as pathogen attack [7,20], senescence and fruit ripening [17], and chilling [2,5,23]. It has thus been suggested that the AOX pathway also operates to prevent the formation of reactive oxygen species in respiring mitochondria [9,12,17].

The expression of the AOX pathway in non-thermogenic plant tissues was firstly suggested to operate as an energy overflow mechanism when the cytochrome pathway is satu-

Abbreviations: AOX, alternative oxidase; FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxyphenyl)-hydrazone; HEPES, *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid); NADH-DH, NADH dehydrogenase; PUMP, plant uncoupling mitochondrial protein; SHAM, salicylhydroxamic acid.

* Corresponding author. Tel.: +55 41 361 1664; fax: +55 41 266 2042.

E-mail address: egscarnieri@ufpr.br (E.G.S. Carnieri).

0981-9428/\$ - see front matter © 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.plaphy.2004.12.008

rated [12]. However, this pathway has also been shown to be active even when the cytochrome pathway is not saturated. This led to the proposition that both pathways are regulated in concert [3].

Plant mitochondria also diverge from mammalian mitochondria by the presence of four additional rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases that, like the AOX enzyme, do not have the ability to pump protons across the inner membrane. Two of the dehydrogenases [NAD(P)H-DH_{int}] are located inside the inner membrane and two [NAD(P)H-DH_{ext}] are outside. The external NAD(P)H-DH are Ca²⁺ dependent and, as well as the other internal alternative NAD(P)H-DH, bypasses Complex I (EC 1.6.5.3) [10,12].

Energy dissipation in plant mitochondria can also be mediated by the plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) [25] and, as proposed by Møller [12] the three energy-dissipating processes, NAD(P)H-DH_{ext}, AOX and PUMP [12,25], should work in conjunction to protect mitochondria from damage caused by reactive oxygen species (ROS). In support to this proposition, Michalecka et al. [10] have recently shown that when *Solanum tuberosum* L., cv. Desiree *ndb1* gene, a homologue of bacterial and fungal type II NAD(P)H dehydrogenases, was overexpressed in *Nicotiana sylvestris*, increased protein levels for AOX and PUMP was also detected, as compared with the wild type. Moreover, it was recently shown that cold-stress treatment of potato tubers (*S. tuberosum* L., cv. Bintje) increased the level of expression and activity of AOX, as well as that of for PUMP [2].

Ca²⁺, mersalyl and diamide are frequently implicated in mitochondrial permeability transition (MPT) in mammalian mitochondria. Ca²⁺ is usually considered an indispensable ion for membrane permeabilization, while the thiol-oxidant reagents, such as mersalyl and diamide, are known as inducers or inhibitors of MPT, depending on their concentrations [27]. Although these agents can affect the functionality of mitochondria by their direct effects in its permeability transition, these effects could also result from the direct interaction of the reagents with components of the mitochondrial respiratory chain.

The aim of the present study was to investigate the effects of some thiol reagents and Ca²⁺ on the alternative components of potato mitochondrial respiratory chain, such as AOX and the NADH-DH_{ext}. We also analyzed the effect of cold-stress on the sensitivity of potato mitochondria to Ca²⁺, mersalyl and diamide since this treatment is supposed to alter the expression of the alternative electron transport pathway in plant mitochondria.

2. Results

2.1. Oxidation of externally added NADH

Fig. 1 compares the effects of Ca²⁺, mersalyl and diamide on the oxidation of externally added NADH by mitochondria obtained from unstressed (Fig. 1A) and cold-stressed (Fig. 1B)

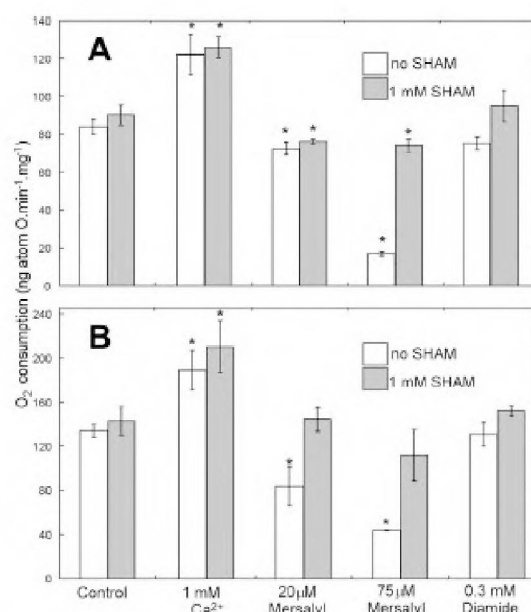


Fig. 1. Oxidation of externally added NADH in mitochondria isolated from unstressed (A) and cold-stressed (B) potato tubers. Mitochondria (1.3 mg) were added to 1.3 ml of standard medium containing 0.25 M sucrose, 10 mM HEPES-K⁺ (pH 7.2), 2 mM KCl, 0.2 g% essentially fat free BSA, and 10 μM rotenone. The reaction was initiated with 2 mM NADH. Oxygen uptake was measured in the absence (white bars) or presence of 1 mM SHAM (light gray bars). Where indicated, 1 mM Ca²⁺, 20 μM mersalyl, 75 μM mersalyl or 0.3 mM diamide was added.

* The experiment is different from control with significance level of $P < 0.05$.

potato. The effects of the AOX inhibitor SHAM in these oxidations were also evaluated.

In mitochondria isolated from unstressed tubers, as can be observed in Fig. 1A, SHAM did not interfere significantly in the oxygen consumption during NADH oxidation indicating that these mitochondria present very low levels of AOX activity, as will be shown later. In the presence of Ca²⁺ (1 mM) a respiratory rate stimulation of ~50% was seen, probably because of the Ca²⁺-dependent activity of the NADH-DH_{ext} as already reported by other investigators [14,15]. In the presence of SHAM, no difference was observed on the stimulatory effect of Ca²⁺ on the rate of NADH oxidation. Mersalyl, at 20 μM, decreased ~15% the respiratory rate, whether in the presence or in the absence of SHAM. Mersalyl at 75 μM inhibited by ~80% the respiratory rate, but only when the mitochondria were not pre-incubated with SHAM. Differently from the observed stimulatory effect of Ca²⁺ and of the inhibitory effect of mersalyl, diamide did not affect the rate of NADH oxidation by potato mitochondria isolated from unstressed tubers, either in the presence or in the absence of SHAM.

In mitochondria isolated from cold-stressed tubers (Fig. 1B) the rate of oxygen consumption imposed by externally added NADH was higher (~135 ng atom O min⁻¹ mg⁻¹) when compared with that of unstressed tubers (~85 ng atom

$\text{O min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, Fig. 1A). These results suggest that cold treatment increased AOX and/or $\text{NADH-DH}_{\text{ext}}$ activity. In these mitochondria isolated from cold-stressed tubers (Fig. 1B), the same stimulatory effect by Ca^{2+} on externally added NADH oxidation was found. Mersalyl, at 20 and 75 μM , was also inhibitory and caused ~40% and ~70% inhibition, respectively, on the rate of NADH oxidation. This inhibitory effect of mersalyl was not observed when in the presence of SHAM, differently to what occurred in mitochondria isolated from unstressed tubers. Diamide had no effect on NADH oxidation in the presence or absence of SHAM.

It must be emphasized that there were no significant differences between NADH oxidation rates when rotenone was added to the incubation medium. These results indicate that mitochondria were not disrupted and were thus functionally intact (data not shown), and thus the rates of NADH oxidation by potato mitochondria described here were exclusively due to the activity of the respiratory chain beginning in the $\text{NADH-DH}_{\text{ext}}$.

It is also important to emphasize that Ca^{2+} , mersalyl or diamide, at concentrations and conditions used in our experiments, only induced the mitochondrial permeability transition (MPT) when they had been pre-incubated in the presence of 1 μM FCCP and 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ antimycin and in the absence of substrate (data not shown).

2.2. Succinate oxidation

The effects of Ca^{2+} , mersalyl and diamide on succinate oxidation by isolated potato mitochondria are shown in Fig. 2. As in the case for NADH oxidation, the experiments were carried out in the presence and in the absence of SHAM and with mitochondria isolated from unstressed and cold-stressed potato tubers. In mitochondria isolated from unstressed potato (Fig. 2A), Ca^{2+} did not stimulate respiration, either in the presence or in the absence of SHAM. In addition, no inhibition of O_2 consumption was observed by the addition of mersalyl (20 or 75 μM) or diamide (0.3 mM). Similar results were obtained for stressed conditions (Fig. 2B). These results therefore strongly suggest that the stimulatory effect of Ca^{2+} and the inhibitory effect of mersalyl on oxygen consumption, when potato mitochondria were energized with externally added NADH, as shown in Fig. 1, would result from an action of these reactants directly on external NADH-DH. It is also important to note that the rate of oxygen consumption by potato mitochondria energized with succinate was ~90 $\text{ng atom O min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Fig. 2A) and this value was not altered after cold-stress treatment (Fig. 2B) indicating that complex II was not affected. These results suggest that the increased respiratory rates observed for external NADH oxidation following cold treatment, as shown in Fig. 1, resulted mainly from an increase in $\text{NADH-DH}_{\text{ext}}$ activity.

2.3. Cyanide-resistant respiration

In order to evaluate the effects of Ca^{2+} , mersalyl and diamide on AOX activity, without interference of the conven-

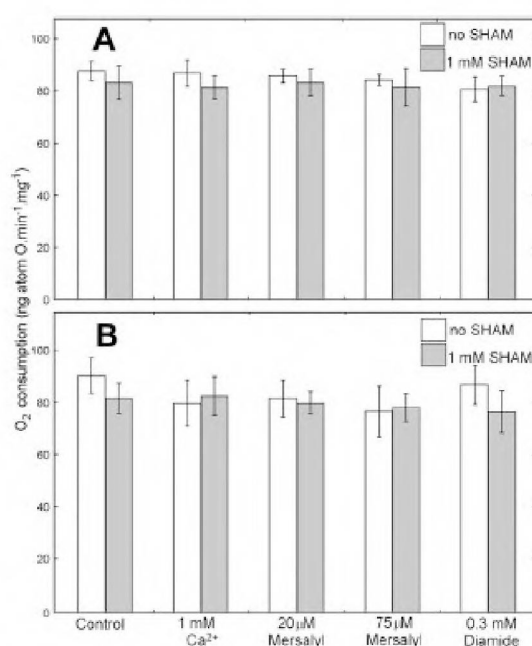


Fig. 2. Succinate oxidation in mitochondria isolated from unstressed (A) and cold-stressed (B) potato tubers. Mitochondria (1.3 mg) were added to 1.3 ml of the standard medium described in Fig. 1 before initiating the reaction with 2 mM succinate. Oxygen uptake was measured in the absence (white bars) or presence (light gray bars) of 1 mM SHAM. Where indicated, 1 mM Ca^{2+} , 20 μM mersalyl, 75 μM mersalyl or 0.3 mM diamide was added.

tional respiratory chain, experiments were performed in a medium containing cyanide, a condition in which only the AOX pathway is functional. Using this approach it was verified that the level of AOX activity in mitochondria isolated from unstressed tubers was very low (6.4 and 6.0 $\text{ng atom O min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) and, after the cold treatment, it was increased to 19.4 and 24.0 $\text{ng atom O min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, for NADH or succinate energization, respectively. It is important to mention that mitochondrial suspensions were prepared in the presence of pyruvate and succinate in the extraction medium in order to maintain the AOX in the active conformation as reported by Wagner et al. [26]. However, no other AOX inducer such as pyruvate or dithiothreitol was added to the reaction medium. Therefore, the differences observed here, regarding the rates of oxygen consumption in the presence of KCN are due to different levels of AOX expression, resulting from tuber cold treatment.

As shown in Fig. 3A, in the presence of KCN, the respiration induced by oxidation of externally added NADH was 30–40% inhibited by Ca^{2+} under stressed and unstressed conditions. Similar results were obtained for succinate oxidation in which, under both stressed and unstressed conditions, Ca^{2+} caused ~35% inhibition of respiration (Fig. 3B). These results, along with those of Fig. 2, in which succinate oxidation was

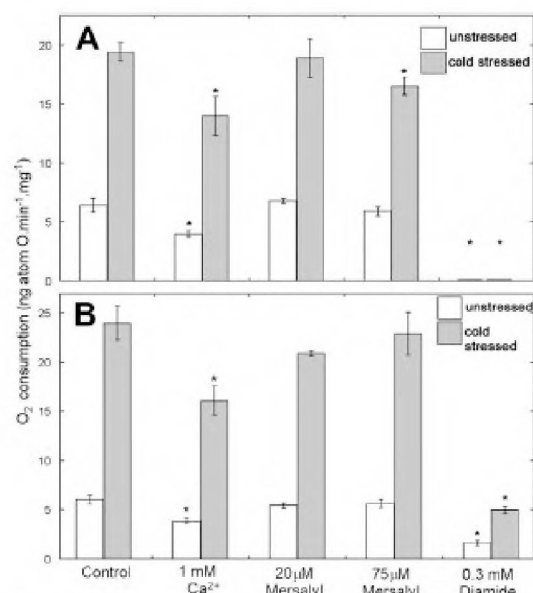


Fig. 3. Oxidation of externally added NADH or succinate in mitochondria isolated from unstressed and cold-stressed potato tubers in the presence of 1 mM cyanide. Mitochondria (1.3 mg) were added to 1.3 ml of the standard medium described in Fig. 1. The reactions were initiated with 2 mM NADH (A) or 2 mM succinate (B). White and light gray bars represent oxygen uptake in mitochondria isolated from unstressed and cold-stressed potato tubers, respectively. Where indicated, 1 mM Ca²⁺, 20 μM mersalyl, 75 μM mersalyl or 0.3 mM diamide were added where indicated.

* The experiment is different from control with significance level of $P < 0.05$.

not affected by Ca²⁺, indicated that Ca²⁺ was able to inhibit the AOX pathway, and that this effect could only now be observed when the cytochrome pathway was inactive.

When mitochondria were energized with externally added NADH, in the presence of KCN, mersalyl did not inhibit the AOX pathway under unstressed or stressed conditions when applied at 20 μM (Fig. 3A). However, an inhibition of ~15% in cold-stress condition was seen in the presence of 75 μM mersalyl (Fig. 3A), probably because of the intense inhibition already imposed by mersalyl in this concentration on external NADH-DH (see Fig. 1B). No effect of mersalyl (20 or 75 μM) was observed when potato mitochondria were energized with succinate, in the presence of KCN (Fig. 3B).

In contrast with the results shown in Fig. 1, in which diamide had no significant effect on the external NADH oxidation, the AOX pathway, tested by the presence of KCN, was completely inhibited in the presence of this thiol reagent, under stressed or unstressed conditions (Fig. 3A). Diamide also inhibited by ~75% succinate oxidation, both under stressed and unstressed conditions (Fig. 3B). These results, in the light of those of Figs. 1 and 2, indicate that diamide was acting only on AOX activity.

2.4. Effects of different Ca²⁺ concentrations on NADH and succinate oxidation

The presence of 1 mM Ca²⁺ caused a stimulation in NADH oxidation (Fig. 1A) and an inhibitory effect on NADH and succinate oxidation in the presence of KCN (Fig. 3A, B). As these results suggest that with Ca²⁺ the electrons flow preferentially via the cytochrome pathway, we carried out experiments with a series of different Ca²⁺ concentrations to evaluate the amount of Ca²⁺ necessary to cause this effect. Fig. 4A shows NADH oxidation in mitochondria from non-stressed potato tubers in the presence of increasing Ca²⁺ concentrations (0.1–1.5 mM). Maximum stimulation of NADH oxidation was found in the presence of 1 mM Ca²⁺. Fig. 4B shows inhibitory effects imposed by Ca²⁺ in the oxidation of NADH and succinate in non-stressed and stressed mitochondria, in the presence of KCN at different Ca²⁺ concentrations (0.1–1 mM). A maximum inhibitory effect occurred in the presence of 500 μM Ca²⁺.

2.5. Inner membrane electrical potential ($\Delta\psi$)

Fig. 5 shows the establishment of the membrane electrical potential in mitochondria isolated from cold-stressed tubers. The addition of 20 μM mersalyl did not change $\Delta\psi$ in mitochondria energized by either NADH (trace a) or succinate (trace c). These results indicate that the ~40% inhibition

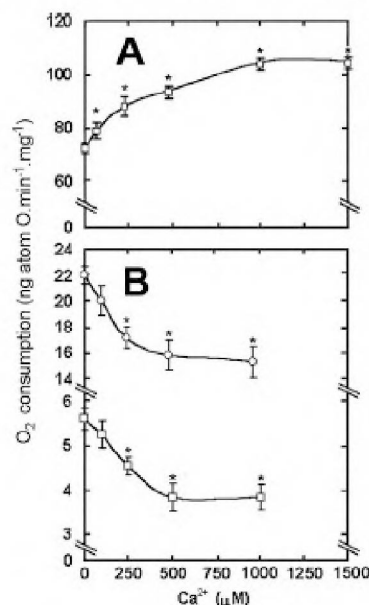


Fig. 4. Effects of different Ca²⁺ concentrations in NADH and succinate oxidation. Mitochondria from non-stressed (open squares) and cold-stressed (open circles) potato tubers (1.3 mg protein) were added to 1.3 ml of standard reaction medium, as described in Fig. 1, before starting the reaction with NADH (open squares) or succinate (open circles). The experiment was performed in the absence (A) and presence (B) of 1 mM cyanide.

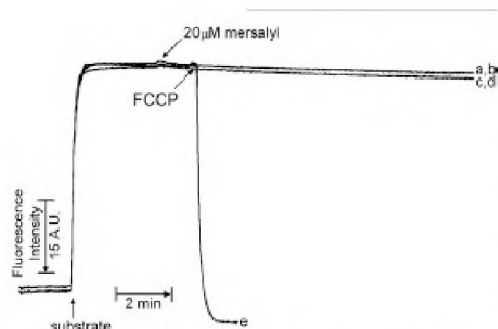


Fig. 5. Membrane potential in mitochondria isolated from cold-stressed potato tubers. Mitochondria (0.3 mg protein) were added to 2 ml of standard reaction medium supplemented with 2 mM NaH_2PO_4 , 5 μM rotenone and 5 μM safranin O. Additions were as indicated: 1 mM NADH (a, b, e) or 2 mM succinate (c, d), 20 μM mersalyl (a–d) and FCCP (e). In traces (b, d) mitochondria were pre-incubated with 1 mM SHAM for 1 min.

caused by mersalyl in the oxidation of NADH shown in Fig. 1B did not result from depolarization. Pre-incubation with 1 mM SHAM did not alter the membrane potential (traces b, d). The complete collapse of $\Delta\psi$ by FCCP is shown in trace e.

3. Discussion

In the present study the effects of Ca^{2+} , mersalyl, and diamide were evaluated in mitochondria isolated from potato tubers submitted or not to cold-stress. The cold treatment led to an increased external NADH dehydrogenase and AOX activity/expression, as shown by the increased respiratory rates shown in Figs. 1 and 3, but not in complex II, as shown in Fig. 2. Pyruvate was added to the extraction and wash media to stimulate AOX [24], but not to the reaction medium to avoid interference with the studied thiol reagents. The thiol protectant DTT, which changes AOX to a fully active conformation, was also avoided because of its interaction with mersalyl and diamide. This fact explains differences in respiratory rates under distinct experimental conditions [2]. It is important to say that, although cold treatment can also increase PUMP expression [2] the activity of this enzyme did not interfere with the present results because the potato mitochondrial suspensions were prepared and assayed in the presence of BSA, a condition that turns PUMP inactive [2].

The parameters examined and interpreted were oxygen consumption and $\Delta\psi$ measurements during oxidation of externally added NADH or succinate. Experimental conditions included the presence of SHAM or KCN. SHAM is a selective inhibitor of AOX activity, so that NADH and succinate oxidations via the cytochrome pathway could be evaluated without interference of AOX. Conversely, the presence of KCN allowed the investigation of the effects of Ca^{2+} , mersalyl, and diamide on AOX activity without interference of the cytochrome pathway.

An interesting finding of the present study was that Ca^{2+} inhibited the AOX pathway in potato mitochondria energized with NADH or with succinate, and this effect could only experimentally be observed when cytochrome pathway was inhibited by cyanide. Furthermore, cold treatment did not change this effect (Fig. 3A, B). When the cytochrome pathway was functional, as has already been demonstrated [13–15], Ca^{2+} directly stimulated the external NADH-DH, as shown by the ~50% increase in oxygen consumption in NADH oxidation, but not in succinate-energized mitochondria. So far as we know, the inhibitory effect of Ca^{2+} on AOX activity has not been previously reported. Moreover, our results show clearly that stimulation by Ca^{2+} on the activity of external NADH-DH negatively affects the AOX pathway (Figs. 1, 3 and 4). Considering that these enzymes are important in protecting the plant under adverse conditions, further studies concerning the possible physiological role of a regulation of alternative mitochondrial enzymes by calcium ions are required.

Our results also show that the thiol-oxidant reagent diamide is a potent AOX inhibitor and this effect is only observed when the cytochrome pathway is inactive, as was the case for the ion calcium. Diamide caused a total inhibition of the oxygen consumption through oxidation of externally added NADH (Fig. 3A) and also a pronounced decrease in respiration with succinate oxidation, when the experiments were performed in the presence of cyanide (Fig. 3B). Differently, diamide caused no significant effect on mitochondrial oxygen consumption via normal cytochrome pathway of unstressed tubers that oxidize NADH, both in the presence or in the absence of SHAM (Fig. 1A), when compared to their respective controls. Under stressed conditions there was also no change in the mitochondrial respiratory rate by NADH oxidation, when diamide was added (Fig. 1B). The same results were obtained with the oxidation of succinate, depending on whether AOX was inhibited or not, and similarly under stressed or unstressed conditions, under which diamide caused no change in respiration (Fig. 2A, B). Our results thus suggest that diamide does not impair the cytochrome pathway in potato mitochondria, even after cold-stress treatment. Diamide is known to form disulfide bonds between AOX homodimers, changing the protein to its less active conformation [24] and the present results suggest that this action of diamide can be observed in potato tuber mitochondria only when the cytochrome pathway is inactive. In addition, since no difference could be observed between stressed and unstressed conditions, these results also show that this specific effect of diamide on AOX does not depend on the cold treatment of the tubers that was shown to alter AOX expression/activity (Fig. 3).

The net results (Fig. 1A, B) show that cold-treatment of the tubers modifies the sensitivity of mitochondria to mersalyl, and suggest that mersalyl has a direct inhibitory effect on external NADH-DH. An action of mersalyl on AOX could be ruled out, since experiments in the presence of cyanide showed that the cyanide-resistant pathway was not inhibited under

unstressed or stressed conditions (Fig. 3A, B). In fact, the absence of effects on succinate oxidation by mersalyl, in the absence or presence of SHAM, and under stressed (Fig. 2B) or unstressed (Fig. 2A) conditions, confirms that mersalyl was acting directly on externally located NADH-DH.

The results of this work reveal new effects of mersalyl and diamide concerning stress conditions in plant mitochondria. These are not related to MPT which requires both the presence of calcium ions and a higher time-span.

4. Methods

4.1. Plant material and cold treatment

Potato tubers (*S. tuberosum* L., cv. Bintje) were obtained from a commercial source and maintained at room temperature. When cold-stressed, they were stored for 5 days in a dark room at 5 ± 1 °C, before mitochondrial isolation.

4.2. Preparation of mitochondria

Mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation, as previously described [4], with some modifications. The extraction and isolation medium contained 1 mM pyruvate to induce AOX activity. The washed mitochondria were subsequently purified on a Percoll™ gradient according to the procedure previously described [4]. Using the crude mitochondrial fraction, experiments gave qualitatively similar values to those performed with Percoll™-purified mitochondria. The protein content of samples was estimated according to the method of Lowry et al. [8].

4.3. Determination of oxygen uptake

Oxygen uptake was measured using a Clark-type electrode connected to a Gilson oxygraph using a standard reaction medium containing 0.25 M sucrose, 10 mM HEPES–KOH (pH 7.2), 2 mM KCl, 0.2 g% essentially fat free BSA, 10 μ M rotenone, and 1.3 mg mitochondria, in a final volume of 1.3 ml at 28 °C. SHAM (1 mM), diamide (0.3 mM), mersalyl (20 or 75 μ M) or Ca^{2+} (1 mM) were added as indicated in the legends of Figs. 1–4 after the mitochondria, and 1 min before addition of NADH (2 mM) or succinate- K^+ (2 mM). In succinate oxidation experiments, there was no difference between the presence or absence of ATP, showing that in our preparations the maximal rate of succinate oxidation was obtained.

4.4. Determination of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was measured fluorometrically with a Shimadzu RF-5301 PC spectrofluorophotometer. The incubation system consisted of standard reaction medium supplemented with 2 mM NaH_2PO_4 , 5 μ M rotenone and 5 μ M safranine O, using the wavelength pair at

495 nm (excitation) and 586 nm (emission) with 3 nm slits width (excitation and emission) [1]. Membrane potential measurements were initiated with 5 mM succinate- Na^+ or 2 mM NADH. Relative changes of membrane potential were expressed in arbitrary fluorescence units (A.U.) and were not converted into potential values.

4.5. Statistical analysis

Data in the graphs are the mean results obtained with three independent mitochondrial preparations (presented as mean \pm S.D.) were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) and, if there were obtained probability values (*P*) lower than 0.05, pair-wise comparisons were performed using Tukey's test. Differences among means were considered significant with *P* < 0.05.

4.6. Chemicals

NADH, BSA, rotenone, succinate, HEPES, FCCP, safranine O, SHAM, mersalyl and diamide were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). All other reagents were commercial products of the highest purity available.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Ione Salgado for helpful comments and reading of the manuscript and the funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX and FINEP for their support. A.B.M. is a graduate student supported by a CNPq scholarship. C.V. is an undergraduate student at Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

References

- [1] K.E.O. Åkerman, M.K.F. Wikström, Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential, *FEBS Lett.* 68 (1976) 191–197.
- [2] F.F. Calegario, R.G. Cosso, M.M. Fagian, F.V. Almeida, W.F. Jardim, P. Jezek, et al., 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.* 35 (2003) 211–220.
- [3] M.J. Consideine, D.O. Daley, J. Whelan, The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango, *Plant Physiol.* 126 (2001) 1619–1629.
- [4] F. Fortes, R.F. Castilho, R. Catisti, E.G.S. Camieri, A.E. Vercesi, Ca^{2+} induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species, *J. Bioenerg. Biomembr.* 33 (2001) 43–51.
- [5] M.A. González-Meler, M. Ribas-Carbo, L. Giles, J.N. Siedow, The effect of growth and measurement temperature on the alternative respiratory pathway, *Plant Physiol.* 120 (1999) 765–772.
- [6] M.H.N. Hoefnagel, P.R. Rich, Q. Zhang, J.T. Wiskich, Substrate kinetics of the plant mitochondrial alternative oxidase and the effects of pyruvate, *Plant Physiol.* 115 (1997) 1145–1153.

ANEXO II

Improved Method for Isolation of Coupled Mitochondria of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze

André Bellin Mariano¹, Leonardo Kovalhuk¹, Caroline Valente¹, Juliana Maurer-Menestrina¹, Aداucto Bellarmino Pereira-Netto², Miguel Pedro Guerra³ and Eva Gunilla Skare Carnieri^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular; Universidade Federal do Paraná; C. P. 19046; 81.531-990; egscarnieri@ufpr.br; Curitiba - PR - Brazil. ² Departamento de Botânica; Universidade Federal do Paraná; Curitiba - PR - Brazil. ³ Departamento de Fitotecnia; Universidade Federal de Santa Catarina; 88.040-900; Florianópolis - SC - Brazil

ABSTRACT

A method for the isolation of coupled mitochondria from the callus of *Araucaria angustifolia* is described for the first time. Mitochondria were isolated from embryogenic callus of *A. angustifolia*. They were metabolically active, able to sustain oxidative phosphorylation as shown by respiratory control ratio values, which were about 2.4 when respiring on succinate as substrate. Oxygen uptake experiments, using freeze-thawed disrupted mitochondria, showed the presence of alternative rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases, which were stimulated by Ca^{2+} . The procedure now described for the isolation of *A. angustifolia* mitochondria is an important new tool, allowing the investigation of mitochondrial bioenergetics and metabolism and physiology of plants.

Key words: *Araucaria angustifolia*, callus, plant mitochondria, respiratory chain

INTRODUCTION

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze, known as "Paraná pine" or "Pinheiro do Paraná" is a conifer species belonging to the Araucariaceae family, which is widespread in southern Brazil, especially in the cold highlands of the States of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul (Guerra et al., 2000; Zandavalli et al., 2004). Several studies have been carried out both with the callus and with tissues of *A. angustifolia* at different developmental stages of differentiation (Fonseca et al., 2000; Guerra et al., 2000), including the extraction of flavones from the latter, but mitochondria of *A. angustifolia* have never been isolated before. In contrast to mammals, the

respiratory chain in plant mitochondria has been shown to possess at least four alternative rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases in the inner mitochondrial membrane for transferring electrons to ubiquinone (Melo et al., 1996; Møller, 2001). These enzymes are non-proton pumping, energetically wasteful, and might avoid the production of reactive oxygen species by preventing over-reduction in the respiratory chain (Melo et al., 2001). Two of these alternative NAD(P)H dehydrogenases are found on the outer surface of the inner mitochondrial membrane, facing the intermembrane space and two on the inner surface facing the matrix, similar to what happens with complex I (EC 1.6.5.3) (Møller, 2001). The two external NAD(P)H and the internal

* Author for correspondence

NADPH dehydrogenases are Ca^{2+} dependent (Melo et al., 1996). The two external enzymes oxidize the cytosolic pyridine nucleotides and possibly operate *in vivo* mainly under stress conditions, activated by increased cytosolic concentrations of free Ca^{2+} that occurs under such situations. The functions of the two internal enzymes are not known, although it has been hypothesized that the internal, rotenone-insensitive NADH dehydrogenase acts as an overflow mechanism when complex I (EC 1.6.5.3) is overburdened (Møller and Palmer, 1982). We now report for the first time an efficient procedure for the isolation of mitochondria from the callus of *A. angustifolia* and also demonstrate its functionality by oxidative phosphorylation. The presence of alternative rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases is reported as well.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The embryogenic callus of *A. angustifolia* (Astarita and Guerra, 2000), grown on BM culture medium (Gupta and Pullman, 1991; Santos et al., 2002) supplemented with 2 mg.L^{-1} glycine, 0.5 mg.L^{-1} pyridoxine.HCl, 0.5 mg.L^{-1} nicotinic acid, 1 mg.L^{-1} thiamine.HCl, 500 mg.L^{-1} casein hydrolysate, 100 mg.L^{-1} *myo*-inositol, 1 g.L^{-1} L-glutamine, 30 g.L^{-1} sucrose, 7 g.L^{-1} Phytagar (Gibco®), 2 μM 2,4 dichlorophenoxyacetic acid, 0.5 μM benzylaminopurine and 0.5 μM kinetin, was used as the source of mitochondria. The pH of the culture medium was adjusted to 5.8 with KOH prior to autoclaving at 121°C for 20 min. Casein hydrolysate and L-glutamine solutions were filter sterilized and added to the medium after autoclaving.

Oxygen Uptake

Oxygen consumption by isolated mitochondria was measured using a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments) connected to a Gilson oxygraph using a standard reaction medium containing 0.25 M sucrose, 10 mM K-HEPES (pH 7.2), 2 mM KCl, 0.2 g% essentially fat free bovine serum albumin (BSA), 2 mM Pi (NaH_2PO_4), 10 μM rotenone and 2 mM succinate, in a final volume of 1.2 mL at 28°C. No difference in oxygen uptake was found for mitochondria regardless of the presence or absence of ATP,

showing that in our preparations the maximal rate of succinate oxidation was obtained. The respiratory rates are expressed in $\text{ng atom O.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, considering the oxygen solubility in water at 28°C and 1 atm as 233 μM (Estabrook, 1967).

NAD(P)H Oxidation Capacity

The oxidation of NAD(P)H was measured indirectly by oxygen consumption in 1.2 mL of standard reaction medium at 28°C in the presence of 0.3 mg.mL^{-1} of mitochondrial protein, disrupted by 3 cycles of freeze-thawing in liquid nitrogen in the presence or absence of 1 mM Ca^{2+} . The oxygen consumption was induced by the addition of 2 mM NADH or NADPH. The rotenone-insensitive NAD(P)H oxidation capacity was measured in the presence of 10 μM rotenone. The rotenone-sensitive activity was determined as the difference between oxygen consumption in the presence and absence of rotenone. The NAD(P)H oxidation capacity is expressed in $\text{ng atom O.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.

Protein Analysis

Protein concentration were determined by the method of Lowry et al. (1951) using BSA as standard.

Ultrastructural Analysis

Samples (0.2 g) of *A. angustifolia* callus (20 days old), grown in the same culture medium, were fixed by immersion overnight in 4% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, and submitted to low vacuum during the first 2 h. Post-fixation was carried out in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 (1 h), and dehydrated in an acetone series. Samples were embedded in Spurr resin. The samples were analyzed using a JEOL JEM-1200 EXII transmission electron microscope. Embedded tissue samples were sectioned and stained with 1% uranyl acetate in absolute ethanol for 20 min and then lead citrate for 5 min.

Chemicals

NADH, NADPH, ADP, EGTA, BSA, rotenone, succinic acid, pyridoxine, nicotinic acid, thiamine, Hepes [N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)], glycine, casein hydrolysate, *myo*-inositol, L-glutamine and FCCP (carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone), were purchased from Sigma Chemical Co.

(St. Louis, USA). Phytagar was purchased from Gibco (Rockville, USA). All other reagents were commercial products of the highest purity available.

RESULTS AND DISCUSSION

We now present for the first time an effective procedure for the isolation of functionally intact mitochondria from the callus of *A. angustifolia*. Fig. 1 shows an electron micrograph of a thin *A. angustifolia* callus section in which the abundance of mitochondria can be seen.

Isolation of Mitochondria from the Callus of *Araucaria angustifolia*

In Fig. 2, a scheme showing the procedure used for the isolation of mitochondria from the callus of *A. angustifolia*, is presented. Mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation, as previously described for the

isolation of potato tuber mitochondria (Beavis and Vercesi, 1992 modified by Fortes et al., 2001) with modifications, as described below. The callus was first cut with scissors, then smoothly homogenized in a van Potter-Elvehjem homogenizer and after that disrupted in a Turratec homogenizer by 4 s bursts in the presence of a cold extraction medium containing 0.25 M sucrose, 3 mM cystein, 2 mM EGTA, 0.2 g% BSA, 10 mM Na-Hepes, pH 7.6, (35 g of fresh callus/200 mL medium). The homogenate was filtered through nylon cloth, and the pH was adjusted to 7.2. The filtrate was centrifuged for 10 min at 1000Xg. The supernatant was centrifuged for 10 min at 15000Xg and each pellet was resuspended in wash medium (0.25 M sucrose, 0.25 mM EGTA, 0.2 g% BSA, 10 mM Na-Hepes, pH 7.2) and transferred to a single tube and centrifuged for 10 min at 1000Xg. The supernatant was centrifuged for 10 min at 15000Xg. Mitochondria, found as a beige coloured pellet, were resuspended in one drop of wash medium and kept on ice until use.

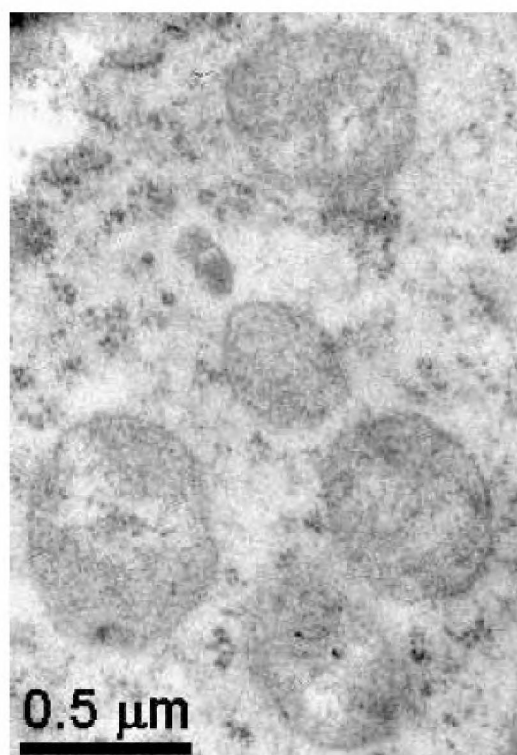


Figure 1 - Electron micrograph of a *A. angustifolia* callus cell (20 days old) showing the abundance of mitochondria.

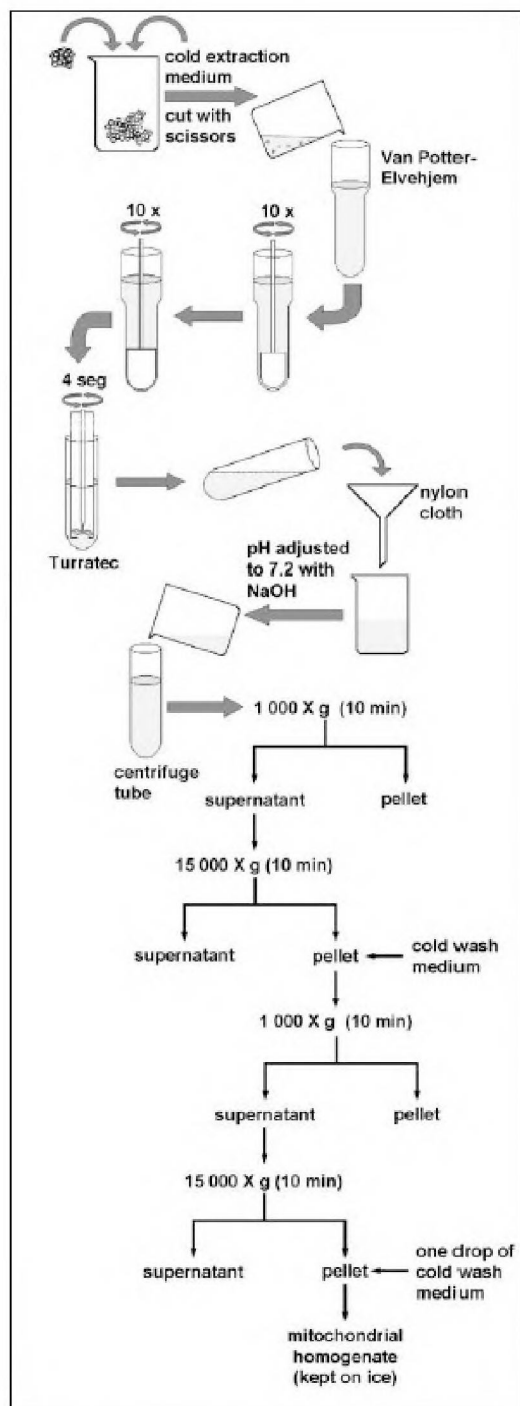


Figure 2 - Scheme demonstrating the procedure used for the isolation of mitochondria from callus of *A. angustifolia*.

Oxygen Uptake by *A. angustifolia* Mitochondria

Fig. 3 shows the oxygen consumption in mitochondria of *A. angustifolia* respiring on succinate in the presence of 1 mM phosphate. By addition of 150 nmol ADP a respiration rate of 78 ng atom.mg⁻¹.mL⁻¹ was attained (state 3 respiration) and recovery of the respiration to the resting state (state 4 respiration) of 36 ng atom.mg⁻¹.mL⁻¹ was obtained after exhaustion of the added adenine nucleotide.

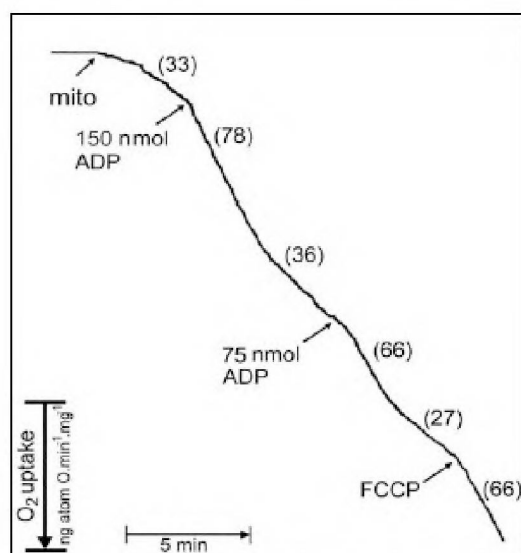


Figure 3 - Measurement of the respiration rate of isolated mitochondria from *Araucaria angustifolia* callus. The reaction medium contained 0.25 M sucrose, 10 mM K-HEPES (pH 7.2), 2 mM KCl, 0.2 g% essentially fat-free BSA, 2 mM Pi, 10 μM rotenone and 2 mM succinate, in a final volume of 1.2 mL, at 28°C. The O₂ uptake was induced by the addition of 0.3 mg.mL⁻¹ mitochondrial protein. Other additions were: 150 and 75 nmol ADP and 1 μM FCCP as indicated. This figure is representative of 6 independent experiments.

There was state 3 and state 4 respiration again after further addition of 75 nmol ADP to the incubation medium denoting the capability of the mitochondria to phosphorylation. The ratio between state 3 and state 4, the respiratory control ratio, is a good index for the integrity of mitochondria. Thus 2.16 and 2.44 are good

respiratory control indexes for plant mitochondria taking into consideration the possible presence of the ubiquitous alternative oxidase (AOX). AOX is an electron transferring oxidase, non-proton pumping, found in all plant mitochondria studied until now, which decreases considerably the respiratory control because of its uncontrolled respiration.

Fig. 3 also shows the increase in the oxygen consumption on addition of the protonophore FCCP, a well known uncoupler of mitochondria which acts causing the collapse of the mitochondrial internal membrane potential, through permeabilization of the membrane to protons.

Alternative NAD(P)H Dehydrogenase and Complex I (EC 1.6.5.3) Activity

Table 1 shows the oxygen consumption rate induced by the oxidation of NADH or NADPH in *A. angustifolia* mitochondria disrupted by freeze-thawing. Mitochondria show rotenone-insensitive NADH and NADPH oxidase activities that were increased by ~18% and 40%, respectively, by the addition of 1 mM Ca^{2+} . On the other hand, the rotenone-sensitive NAD(P)H oxidation was not affected by Ca^{2+} addition. This fact indicates the presence of the alternative NAD(P)H dehydrogenases in *A. angustifolia* mitochondria and also that their activities were modulated by the presence of Ca^{2+} , like the external NAD(P)H and internal NADPH dehydrogenases that occur in potato tuber mitochondria (Melo *et al.*, 1996). It could be concluded that complex I (EC 1.6.5.3) in these mitochondria was not affected by the addition of Ca^{2+} since this ion did not affect the rotenone-sensitive activity.

Table 1 - NAD(P)H oxidation capacity in freeze-thawed disrupted *A. angustifolia* mitochondria

	Total activity	Rotenone-insensitive activity	Rotenone-sensitive activity
NADH	54.6 (4.9)	38.5 (1.6)	16.1 (4.3)
+ Ca^{2+}	62.2 (10.2)	45.6 (2.1)	16.6 (8.1)
NADPH	34.5 (1.1)	31.4 (0.5)	3.1 (0.7)
+ Ca^{2+}	46.1 (1.6)	44.0 (0.7)	2.1 (0.9)

- Rates are in $ng\ atom\ O\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$ mitochondrial protein. Each value represents a mean \pm SD. Final concentrations were 2 mM NADH, 2 mM NADPH, 1 mM Ca^{2+} and 10 μ M rotenone. The plus sign indicates consecutive addition.

CONCLUSIONS

We now report an effective method for the isolation of mitochondria from the callus of *Araucaria angustifolia*. Using this protocol it was possible to measure the oxygen consumption by the mitochondria demonstrating that they were functionally intact and able to sustain oxidative phosphorylation, with a respiratory control of 2.4. The isolated mitochondria were sensitive to the protonophore FCCP, indicating that a transmembrane electrical potential was formed by energization and was sensitive to H^+ permeabilization. *A. angustifolia* mitochondria possess alternative rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases, which were stimulated by Ca^{2+} . However, the experiments on freeze-thawed mitochondria (Table 1) did not allow the identification of the alternative NAD(P)H dehydrogenases affected by Ca^{2+} and further studies with intact mitochondria are required.

The study of these alternative dehydrogenases and several other aspects of the respiratory chain of *A. angustifolia* mitochondria are of great importance, especially the study of AOX, as this is a conserved protein along evolution because of its occurrence in fungi, protozoa and plants (Siedow *et al.*, 1995). The Araucariaceae family has an ancient origin in the Triassic Period and the araucarians appear to have maintained a preference for subtropical or mesothermal conditions, illustrated by the present distribution of *A. angustifolia* in southern Brazil (Kershaw and Wagstaff, 2001). A comparison between this ancient gymnosperm and the much more studied angiosperm mitochondria (Beavis and Vercesi, 1992; Fortes *et al.*, 2001; Calegario *et al.*, 2003; Ruy *et al.*, 2004; Camacho *et al.*, 2004) could be of great importance.

This isolation of *A. angustifolia* mitochondria could be an important new tool in studying plants, allowing several investigations on the metabolism

and physiology of the plant and to understand the mechanisms for the maintenance of this species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PRONEX for their financial support. The authors also thank Vera Regina Fontana Pionteke (Centro de Microscopia Eletrônica - UFPR) for her technical assistance. A. B. M. is a graduate student supported by a CNPq scholarship. C. V. is an undergraduate student at Pontifícia Universidade Católica do Paraná and L. K. is a PIBIC/CNPq scholarship recipient.

RESUMO

Um procedimento de isolamento de mitocôndrias funcionalmente intactas de calos embriogênicos de *Araucaria angustifolia* foi desenvolvido pela primeira vez em nosso laboratório. Mitocôndrias isoladas por este método são metabolicamente ativas, capazes de sustentar fosforilação oxidativa como mostrado pelo controle respiratório de aproximadamente 2,4, respirando na presença de succinato como substrato. Através de experimentos de consumo de oxigênio com mitocôndrias rompidas em nitrogênio líquido foi demonstrada a presença de NAD(P)H desidrogenases alternativas, insensíveis à rotenona e estimuladas por Ca^{2+} . O isolamento de mitocôndrias de *A. angustifolia* é um novo e importante instrumento para estudar plantas, permitindo a execução de múltiplas investigações a respeito da bioenergética mitocondrial e fisiologia vegetal.

REFERENCES

- Astarita, L. V. and Guerra, M. P. (2000), Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, **36**, 194-200.
- Beavis, A. D. and Vercesi, A. E. (1992), Anion uniport in plant-mitochondria is mediated by a Mg^{2+} -insensitive inner membrane anion channel. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3079-3087.
- Calegario, F. F.; Cosso, R. G.; Fagian, M. M.; Almeida, F. V.; Jardim, W. F.; Jezek, P.; Arruda, P. and Vercesi, A. E. (2003), 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.*, **35**, 211-220.
- Camacho, A.; Moreno-Sanchez, R. and Bernal-Lugo, I. (2004), Control of superoxide production in mitochondria from maize mesocotyls. *FEBS Lett.*, **570**, 52-56.
- Chance, B. and Williams, G. R. (1955), The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.*, **217**, 383-393.
- Estabrook, R. W. (1967), Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymology*, **10**, 41-47.
- Fonseca, F. N.; Ferreira, A. J. S.; Sartorelli, P.; Lopes, N. P.; Floh, E. I. S.; Handro, W. and Kato, M. J. (2000), Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*, **55**, 575-580.
- Fortes, F.; Castilho, R. F.; Catisti, R.; Carnieri, E. G. S. and Vercesi, A. E. (2001), Ca^{2+} induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 43-51.
- Guerra, M. P.; Silveira, V.; Santos, A. L. W.; Astarita, L. V. and Nodari, R. O. (2000), Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: Jain, S.; Gupta, P. and Newton, R. (Eds.). *Somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers. v. 6. pp. 457-478.
- Kershaw, P and Wagstaff, B. (2001), The Southern conifer family Araucariaceae: history, status and value for paleoenvironmental reconstruction. *Annu. Ver. Ecol. Syst.*, **32**, 397-414.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951), Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Melo, A. M. P.; Roberts, T. H. and Möller, I. M. (1996), Evidence for the presence of two rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner membrane of potato tuber mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*, **1276**, 133-139.
- Melo, A. M. P.; Duarte, M.; Möller, I. M.; Prokisch, H.; Dolan, P. L.; Pinto, L.; Nelson, M. A. and Videira, A. (2001), The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **276**, 3947-3951.
- Möller, I. M. and Palmer, J. M. (1982), Direct evidence for the presence of a rotenone-resistant NADH dehydrogenase on the inner surface of the inner membrane of plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, **54**, 267-274.

Improved Method for Isolation of Coupled Mitochondria of *Araucaria angustifolia*

- Møller, I. M. (2001), Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 561-591.
- Ruy, F.; Vercesi, A. E.; Andrade, P. B. M.; Bianconi, M. L.; Chaimovich, H. and Kowaltowski, A. J. (2004), A highly active ATP-insensitive K^+ import pathway in plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **36**, 195-202.
- Santos, A. L. W.; Silveira, V.; Steiner, N.; Vidor, M. and Guerra, M. P. (2002), Somatic embryogenesis in Parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). *Braz. Arch. Biol. Tech.*, **45**, 97-106.
- Siedow, J. N.; Umbach, A. L. and Moore, A. L. (1995), The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett.*, **362**, 10-14.
- Zandavalli, R. B.; Dillenburg, L. R. and Souza, P. V. D. (2004), Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. *Applied Soil Ecology*, **25**, 245-255.

Received: February 20, 2004;

Revised: June 18, 2004;

Accepted: August 30, 2004.