

ALESSANDRA VASCONCELLOS NUNES

**Estudo do papel das proteínas mitocondriais
desacopladoras na tolerância aos estresses
abióticos empregando diferentes abordagens**

Botucatu-SP

2010

ALESSANDRA VASCONCELLOS NUNES

**Estudo do papel das proteínas mitocondriais
desacopladoras na tolerância aos estresses
abióticos empregando diferentes abordagens**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista - Campus
de Botucatu (SP), para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Genética).

Orientador: Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu-SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Nunes, Alessandra Vasconcellos.

Estudo do papel das proteínas mitocondriais desacopladoras na tolerância aos estresses abióticos empregando diferentes abordagens / Alessandra Vasconcellos Nunes. - Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Botucatu, 2010.

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Assunto CAPES: 20203004

1. Genética vegetal. 2. Proteína – Análise. 3. Alimentos geneticamente modificados. 4. Fumo – Cultivo.

Palavras-chave: Expressão gênica; Estresses; Germinação; Proteínas desacopladoras, Transgênicos.

Dedico essa dissertação aos meus pais:
Antonio José e Josiane

Agradecimentos

- À **Deus**;

- Ao meu orientador, Prof. Dr. **Ivan de Godoy Maia**, pelo profissionalismo, competência, dedicação e paciência durante meu aprendizado;

- Aos companheiros de laboratório: **Juliana, Carol, Layra, Cíntia, Edmarcia, Rodrigo, Márcio, Bonsai e Fábio** pelas ajudas, conversas, risadas e companheirismo;

- A **Regiane Degan Fávaro, Andréa Akemi e Juliana Bravo** pela colaboração no trabalho, ensinamentos e paciência;

- Ao grupo de pesquisa do **Prof. André Sampaio Pupo** pelos ensaios fluorimétricos e esclarecimentos;

- A colega **Agnes** pela ajuda com as fotos;

- A amiga **Taty** pelas conversas, companheirismo, correções e todos os momentos vividos em Botucatu;

- Ao **Fred** pelo apoio, conversas e companheirismo;

- Aos colegas **Julio e Vanusa** pelas conversas e ajuda;

- À **Universidade Estadual Paulista**, em especial ao Departamento de Genética pela estrutura e oportunidade;

- Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro;

- A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho;

- Por fim, agradeço **meus pais, minhas irmãs, meus avós**, pelo amor, dedicação e confiança

RESUMO

As proteínas desacopladoras pertencem à família de carreadores aniônicos mitocondriais. De maneira geral, as proteínas desacopladoras dissipam o gradiente eletroquímico de prótons gerados na respiração na forma de calor, sendo dependentes de ácidos graxos e sensíveis aos nucleotídeos purínicos. O presente estudo visou investigar o comportamento de plantas transgênicas de tabaco que expressam de forma constitutiva o gene *AtUCP1*, frente aos estresses osmótico e salino, bem como analisar a atividade das regiões promotoras dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* de *Arabidopsis thaliana*, em resposta aos estresses osmótico e de baixa temperatura, e ao ácido abscísico. Numa primeira abordagem foram utilizadas sementes selvagens e de duas linhagens transgênicas, germinadas em meio MS adicionados ou não de NaCl e Manitol. O teste de germinação revelou que as linhagens transgênicas apresentam uma maior tolerância aos referidos estresses. Quando o crescimento radicular foi analisado, uma maior inibição foi constatada no controle não transgênico em relação às duas linhagens transgênicas testadas. Adicionalmente, quando submetidas aos estresses, uma maior acumulação de ânion superóxido foi verificada nas folhas de plântulas não transgênicas em relação às plântulas das linhagens transgênicas. Quanto à quantificação de GUS nas plantas transformadas com os promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2*, nenhuma alteração significativa foi observada em nenhum dos tratamentos testados.

Palavras-chave: Proteínas desacopladoras, expressão gênica, transgênicos

ABSTRACT

The uncoupling proteins belong to the mitochondrial anion carrier family. In general, the uncoupling proteins dissipate the proton electrochemical gradient generated in respiration as heat, being dependent on fatty acids and sensitive to purine nucleotides. In the present study, we investigated the behavior of transgenic tobacco plants that overexpress the *AtUCP1* gene when subjected to osmotic and saline stress, as well as the activity of the promoters of the *AtUCP1* and *AtUCP2* genes of *Arabidopsis thaliana*, in response to osmotic and cold stress, and abscisic acid. In the first approach, seeds from wild type and two transgenic lines were germinated in MS medium containing (or not) NaCl and mannitol. The germination test showed that the transgenic lines have a higher stress tolerance. When root growth was analyzed, a greater inhibition was observed in non-transgenic control seedlings as compared to seedlings of the two transgenic lines tested. Additionally, when subjected to stress, a greater superoxide anion accumulation was detected in leaves of non-transgenic seedlings as compared to seedlings of transgenic lines. Quantification of GUS activity in the plants transformed with the tested promoters, revealed no treatment-specific differences.

Keywords: Uncoupling proteins; gene expression; transgenic plants

SUMÁRIO

Resumo	iii
Abstract.....	iv
I - INTRODUÇÃO	07
I.1- Proteínas desacopladoras mitocondriais	07
I.2- Proteínas desacopladoras mitocondriais em plantas.....	12
I.3- As pUCPs e a resposta a estresses	15
II – OBJETIVOS.....	22
III – MATERIAL E MÉTODOS	23
III.1- Material Vegetal e cultivo das sementes	23
III.2- Descrição dos ensaios realizados	24
III.2.1- Ensaios usando as linhagens transgênicas contendo as regiões promotoras do gene <i>AtUCP1</i> e <i>AtUCP2</i>	24
III.2.1.1- Quantificação da atividade GUS.....	24
III.2.2- Ensaios de germinação usando as plantas transgênicas que superexpressam o gene <i>AtUCP1</i>	26
III.2.2.1 - Testes de Germinação	26
III.2.2.2 – Detecção de espécies reativas de oxigênio	27
III. 2.2.3 – Análise do crescimento das raízes.....	28
IV – RESULTADOS	29
IV.1 – Quantificação de GUS	29
IV.2 – Teste de germinação	31
IV.3 – Detecção de espécies reativas de oxigênio	37
IV.4 – Análise de crescimento radicular	40
V – Discussão	43
V.1 – Análise de germinação de sementes que expressam constitutivamente o gene <i>AtUCP1</i>	43
V.2 – Quantificação da atividade de GUS em plantas contendo os promotores dos genes <i>AtUCP1</i> e <i>AtUCP2</i>	47
VI – Conclusão.....	51
VII - Referências	52

I- Introdução

I.1- Proteínas desacopladoras mitocondriais

Todas as funções celulares dependem de um suprimento de energia proveniente do catabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos. Em células eucarióticas, o processo de formação de energia inicia-se no compartimento citosólico e tem continuidade nas mitocôndrias.

As mitocôndrias são organelas celulares que convertem a energia em uma forma biologicamente utilizável nas reações celulares. Essas organelas são formadas por duas membranas, uma externa, responsável por controlar o fluxo de íons e metabólitos para o espaço intermembranas, e a membrana interna, altamente especializada e rica em proteínas, dentre as quais, componentes da cadeia respiratória e proteínas responsáveis pelo transporte de metabólitos.

A oxidação dos combustíveis como lipídios e carboidratos produz CO_2 , o qual é liberado como subproduto, gerando energia na forma de elétrons que é então conservada nos compostos NADH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo) e FADH_2 (Flavina-Adenina-Dinucleotídeo). Estes compostos são transferidos para a membrana mitocondrial interna, onde entram na cadeia transportadora de elétrons, doando elétrons. Nessa doação de elétrons, NADH é oxidado a NAD^+ e FADH_2 a FADH. Essa cadeia, também conhecida por cadeia respiratória, contém mais de 40 proteínas, das quais aproximadamente 15 estão diretamente envolvidas no transporte de elétrons. A maioria das proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons está agrupada em três grandes complexos enzimáticos respiratórios:

complexo I ou NADH desidrogenase, complexo III ou citocromo bc_1 e complexo IV ou citocromo c oxidase.

Em organismos aeróbicos, o destino final dos elétrons que se movimentam pela cadeia respiratória é o oxigênio molecular, o qual é reduzido a H_2O . No processo de transporte dos elétrons ao longo da cadeia acontece a liberação de energia, sendo uma parte desta dissipada na forma de calor, e a outra utilizada para transportar prótons (H^+) da matriz mitocondrial (região com baixa concentração de H^+) para o espaço intermembrana da mitocôndria (região com alta concentração de H^+), estabelecendo assim um gradiente de prótons. Os prótons tendem a voltar para a matriz atravessando a ATP-sintetase, um complexo protéico da membrana mitocondrial interna que sintetiza ATP a partir de ADP mais fosfato. Este acoplamento depende da impermeabilidade da membrana interna aos prótons, que permite o estabelecimento de um gradiente eletroquímico através da membrana. Tal acoplamento, entretanto, não é perfeitamente ligado à síntese de ATP, visto que os prótons podem retornar para a matriz mitocondrial através de outras proteínas também presentes na membrana interna. Dentre essas, as proteínas denominadas proteínas desacopladoras mitocondriais (UCP- uncoupling protein mitochondrial) catalisam o desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa. Como consequência, o potencial de membrana é ligeiramente reduzido e a energia derivada da oxidação dos substratos é perdida na forma de calor.

As UCPs formam uma classe dentro da família de carreadores aniônicos mitocondriais (MACF), que apresentam estrutura tripartida consistindo de três domínios repetidos, cada qual contendo duas regiões hidrofóbicas que formam α -hélices transmembranas, e também um motivo altamente conservado denominado *Energy Transfer Proteins Signature* – P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY]

(Borecký *et al.*, 2001). De maneira geral, as proteínas desacopladoras dissipam o gradiente eletroquímico de prótons gerados na respiração na forma de calor (Nicholls, 1999), sendo dependentes de ácidos graxos e sensíveis aos nucleotídeos purínicos. Apesar de todo conhecimento sobre as funções fisiológicas das UCPs, o mecanismo através do qual os ácidos graxos ativam o transporte de prótons via UCP ainda não foi totalmente elucidado. Em função da inexistência de um consenso sobre a questão, dois modelos têm sido propostos para explicar esse mecanismo: o primeiro deles chamado de modelo tamponante (Winkler e Klingenberg, 1994), propõe uma ligação entre os ácidos graxos e sítios localizados junto ao canal de prótons da proteína, criando grupos aceptores/doadores de elétrons que facilitariam o transporte de H^+ . O segundo, chamado de modelo protonofórico (Garlid *et al.*, 1996; 1998; 2000) propõe que as proteínas desacopladoras mitocondriais funcionariam como carreadoras de ânions, exportando ácidos graxos livres desprotonados para a monocamada externa da membrana mitocondrial interna, os quais posteriormente penetram na monocamada interna na forma protonada por um mecanismo denominado “flip-flop”, deixando um próton na matriz mitocondrial para cada ciclo de transporte (Garlid *et al.*, 1996, 1998; 2000; Ježek *et al.*, 1997). Apesar da pouca compreensão sobre a real necessidade dos ácidos graxos para o funcionamento das UCPs, ou qual seria o mecanismo de transporte induzido por eles, existem fortes argumentos fisiológicos e experimentais mostrando que os nucleotídeos purínicos (PN; do inglês *purine nucleotides*) inibem a atividade das UCPs. O sítio de ligação da UCP aos PNs está voltado para o espaço intermembrana contendo “solução citosólica”, logo, a concentração dos PNs nessa solução é que irá permitir o desacoplamento (Dlasková *et al.*, 2006).

As UCPs foram inicialmente denominadas de termogenina ou proteína de ligação ao GDP (guanosina-difosfato) (Nicholls, 2001). Porém, após a sua devida caracterização em tecido adiposo marrom de camundongos por Ricquier e Kader em 1976, a sigla UCP (uncoupling protein) passou a ser oficialmente empregada, sendo esta chamada de UCP1 (uncoupling protein 1). A UCP1 está diretamente envolvida com a principal função fisiológica do tecido adiposo marrom que é de termogênese (sem tremor). A função termogênica da UCP1 foi caracterizada em mamíferos hibernantes (Nicholls *et al.*, 1999), em mamíferos recém-nascidos adaptados ao frio (Argyropoulos *et al.*, 2002; Mozo *et al.*, 2005), e durante a termogênese induzida por dieta em pequenos roedores (Erlanson-Albertsson *et al.*, 2003). A UCP1 não é específica de tecido adiposo marrom, sendo expressa também no timo de ratos e camundongos, onde sua função fisiológica ainda não foi muito investigada, no músculo liso do aparelho digestivo, do útero, e do aparelho reprodutor masculino, onde desempenha um importante papel na termogênese, bem como relaxamento das camadas longitudinais de músculo liso (Nibbelink *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 2005).

De 1997 a 2000 foram descobertas quatro UCPs homólogas a UCP1, sendo as mesmas numeradas de acordo com a ordem de descoberta. A UCP2 e a UCP3 apresentam 59 e 57% de identidade com a UCP1, respectivamente, e 73% de identidade quando comparadas entre si (Krauss *et al.*, 2005); já as UCP4 e UCP5 são altamente expressas no sistema nervoso central (Sanchis *et al.*, 1998; Mão *et al.*, 1999), apresentando uma baixa identidade com a UCP1.

A UCP2 foi clonada em 1997, sendo ubiquamente encontrada em vários tecidos. Acredita-se que ela desempenhe um papel importante na manifestação de doenças como diabetes e obesidade, bem como na resposta a infecções (Fleury *et*

al., 1997; Gimeno *et al.*, 1997). Seus transcritos estão amplamente distribuídos, sendo encontrados em maior quantidade no baço, timo, células pancreáticas, coração, pulmão, tecido adiposo marrom e branco, estômago, testículos e macrófagos, e em menores quantidades no cérebro, rins, fígado, e músculo (Nedergaard *et al.*, 2003; Mattiasson *et al.*, 2006). Apesar da UCP2 ser expressa em muitos órgãos/tecidos, a quantidade de proteína detectada não é aparentemente proporcional ao nível de transcritos, uma vez que ela não está presente onde o mRNA é facilmente observado, como por exemplo, nos tecidos do coração, músculo esquelético e tecido adiposo marrom (Pecqueur *et al.*, 2001). Por outro lado, os transcritos do gene *UCP3* e sua proteína foram encontrados no tecido adiposo marrom de roedores, tecidos cardíacos, sendo altamente específicos de músculo esquelético. A UCP3 está provavelmente envolvida na respiração.

As UCP4 e UCP5 (Sanchis *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 2000, Yu *et al.*, 2000) possuem 30% de identidade com a sequência de aminoácidos da UCP1, e são bastante divergentes das demais isoformas encontradas em mamíferos. Como estão filogeneticamente localizadas a uma maior distância das outras proteínas desacopladoras já descritas, elas estão mais relacionadas com os carreadores oxoglutaratos (Borecky *et al.*, 2001). A UCP5 é idêntica a proteína carreadora mitocondrial de cérebro (BMCP1) com exceção do aminoácido Val-180. Em humanos, o gene *UCP5* é expresso nos rins, útero, coração, pulmão, estômago, fígado e músculo esquelético, sendo seus transcritos particularmente abundantes no cérebro e nos testículos, diferentemente do gene *UCP4*, que é expresso de forma específica no cérebro (Sanchis *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 1999; Kim-Han *et al.*, 2001).

Em 1995, Vercesi e colaboradores constataram a presença de uma atividade desacopladora em mitocôndrias isoladas de batata muito parecida com a atividade

da UCP1 em tecido adiposo marrom, sugerindo a existência de uma proteína desacopladora nos vegetais. Os autores chamaram a proteína evidenciada de PUMP (plant uncoupling mitochondrial protein), mas a denominação pUCP (de plant UCP) vem sendo empregada atualmente. Após a sua descoberta em batata, iniciou-se uma intensa procura por UCPs homólogas em diferentes espécies vegetais e em outros eucariontes.

Assim, a ampla distribuição das UCPs no reino dos eucariontes pode ser evidenciada pela sua presença em plantas (Vercesi *et al.*, 1995; Maia *et al.*, 1998; Brandalise *et al.*, 2003a), pássaros (Raimbault *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2003; Vianna *et al.*, 2001), vertebrados exotérmicos, como *Xenopus* (Keller *et al.*, 2005) e peixes (Stuart *et al.*, 1999), em *Drosophila* (Fridell *et al.*, 2004), e em eucariontes primitivos como *Caenorhabditis elegans* (Vercesi *et al.*, 2006), *Acanthamoeba castellanii* (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999), *Dictyostelium discoideum* (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2002), fungos (Cavalheiro *et al.*, 2004; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2000), e no parasita *Plasmodium berghei* (Uyemura *et al.*, 2000). Essa ampla distribuição sugere diferentes papéis fisiológicos para as UCPs que extrapolam a função termogênica descrita inicialmente para a UCP1.

I.2- Proteínas desacopladoras mitocondriais em plantas

A análise detalhada da taxa respiratória de mitocôndrias de tubérculo de batata, bem como o efeito acoplador da BSA (Albumina de Soro Bovino) associada ao ATP, levaram Beavis e Vercesi (1992) a propor a existência de um fator semelhante à UCP1 em plantas. Eles demonstraram que mitocôndrias de batata possuem um canal aniônico semelhante ao canal aniônico de membrana de mitocôndria de

animais (IMAC), sugerindo que sua alta permeabilidade aniônica se deve à presença dos IMACs, denominados em plantas de PIMAC (*Plant Inner Membrane Anion Channel*). Além deste canal aniônico, também foi proposto que estas mitocôndrias possuem uma permeabilidade a H^+ independente de alterações estruturais (Beavis e Vercesi, 1992).

Como já mencionado, a efetiva existência de uma proteína mitocondrial desacopladora em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) foi demonstrada por Vercesi e colaboradores em 1995, sendo esta denominada PUMP (plant uncoupling mitochondrial protein). Utilizando o protocolo de isolamento da UCP1 de mamíferos (Klingenberg e Winkler, 1986), os autores conseguiram isolar esta proteína e, após incorporá-la em lipossomos, puderam constatar a alcalinização do meio externo em lipossomos carregados com a proteína isolada. Esta observação sugeriu que a PUMP poderia facilitar o transporte de H^+ , na presença de ácidos graxos livres, sendo fisiologicamente inibida por ATP, GDP e GTP, da mesma forma que a UCP1, o que foi comprovado experimentalmente empregando sistemas reconstituídos (Vercesi *et al.*, 1995; Ježek *et al.*, 1997).

Dois anos mais tarde, Laloj e colaboradores (1997) clonaram um cDNA em batata (denominado *StUCP*) codificando um peptídeo com alta similaridade à proteína desacopladora de mamíferos. Um segundo clone de cDNA codificando uma proteína mitocondrial desacopladora também foi isolado em *Arabidopsis thaliana* (Maia *et al.*, 1998). Nesse caso, o polipeptídeo deduzido apresentava 81% de identidade (e 89% de similaridade) com a *StUCP* clonada por Laloj e colaboradores (1997). O alinhamento da sequência de aminoácidos das pUCPs de *Solanum tuberosum* (*StUCP*) e de *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP*) com a sequência das UCPs de animais evidencia uma similaridade de 41% com a UCP1, e de 43% (*StPUMP*) e

46% (*AtPUMP*) com a UCP2 (Ricquier *et al.*, 2000; Laloi, 1999; Jesek e Urbankova, 2000).

Desde então, vários homólogos passaram a ser identificados em diferentes espécies vegetais. Em 1999, um segundo cDNA codificando pUCP foi clonado e caracterizado em *Arabidopsis thaliana*, sendo este denominado *AtUCP2* (Watanabe *et al.*, 1999). Posteriormente, genes codificando proteínas desacopladoras foram identificados tanto em plantas dicotiledôneas [*SfUCP* em repolho (Ito *et al.*, 1999) e *HmUCPa* em *Helicoverpa muscivorus* (Ito *et al.*, 2003)] como em monocotiledôneas [*WhUCP* em trigo (Murayama *et al.*, 2000), *OsUCP* em arroz (Watanabe *et al.*, 2002) e *ZmUCP* em milho (Brandalise *et al.*, 2003)].

Em 2006, a análise detalhada do genoma de *Arabidopsis thaliana* permitiu a identificação de uma família gênica de pUCPs composta por seis membros (chamados de *AtPUMP1-6*; Borecký *et al.*, 2006). Em uma análise similar que incluía esses seis genes de *Arabidopsis* como isca, os autores conseguiram identificar no transcriptoma de cana de açúcar, cinco sequências não redundantes (denominadas *SsPUMP1-5*) contendo regiões codificadoras cujos produtos eram altamente similares às UCPs/PUMP já descritas (Borecký *et al.*, 2006).

A disponibilidade da sequência completa do genoma de *A. thaliana* permitiu localizar esses seis genes nos diferentes cromossomos: *AtUCP1* está localizado no cromossomo 3, *AtUCP2* e *AtUCP6* no cromossomo 5, *AtUCP3* no cromossomo 1, *AtUCP4* no cromossomo 4 e *AtUCP5* no cromossomo 2 (Nogueira *et al.*, 2005; Borecký *et al.*, 2006). Adicionalmente, o perfil expressão desses genes em diferentes órgãos/tecido foi investigado. Dos seis genes descritos, *AtUCP1*, *AtUCP4* e *AtUCP5* apresentaram expressão ubíqua, sendo os genes *AtUCP4-5* os mais abundantes, *AtUCP2* foi expresso exclusivamente em sílica verde e *AtUCP3*

detectado exclusivamente em raiz. Em contrapartida, transcritos do gene *AtUCP6* não foram detectados.

Em cana de açúcar, uma análise no banco de dados do SUCEST (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br>) mostrou que os transcritos dos genes que codificam *SsUCPs* se acumulam mais em tecidos proliferativos ou altamente fotossintetizante (gemas laterais ou flores imaturas), o que sugere uma importância funcional nesses tecidos (Borecký *et al.*,2006).

A presença desses homólogos levou a um grande aumento no número de estudos dedicados a esta família de proteínas, não obstante, o papel fisiológico das mesmas ainda não está totalmente elucidado.

I.3- As pUCPs e a resposta a estresses

Um dos primeiros autores a definir estresses biológicos partindo de um conceito físico foi Levitt em 1972. Ele sugeriu que o estresse biológico poderia ser definido como condições ambientais que induzem um organismo a entrar num estado de tensão, definindo tensão como determinadas alterações no metabolismo e na fisiologia do organismo. O estresse está intimamente ligado ao processo de aclimação resultando em alterações transientes da expressão gênica e na produção de compostos específicos durante a exposição da planta a condições adversas. No entanto, cada planta responde de uma maneira quando exposta ao estresse, já que uma determinada condição ambiental pode ser desfavorável para uma determinada espécie vegetal, mas não para outra (Taiz e Zeiger, 1998; Nogueira, 2004).

Estresses abióticos e bióticos podem alterar o funcionamento das organelas celulares, exercendo uma pressão sobre o organismo e exigindo o desenvolvimento de estratégias gerais e específicas de proteção. Em resposta a essas alterações, num processo de aclimatação às novas condições impostas, as células são induzidas a aumentar ou diminuir a expressão de um determinado gene ou de um conjunto de genes (Cherry, 1994; Nogueira, 2004). Por essa razão, não causa surpresa o fato de que as respostas celulares, moleculares e bioquímicas das plantas sejam extremamente complexas (Keegstra e Thomashow, 2002).

Condições de estresse ambiental tais como déficit hídrico, salinidade e extremos de temperatura são altamente limitantes para o desenvolvimento vegetal (Zhu, 2001). Como consequência, determinados estresses ambientais podem provocar um aumento rápido e excessivo das espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células, que podem por sua vez promover lesões oxidativas em qualquer biomolécula. O dano oxidativo é especialmente importante nas mitocôndrias, já que as EROs são continuamente geradas pela cadeia respiratória (em dois sítios principais: os complexos I e III) ou produzidas pelo metabolismo de compostos endógenos dessa organela. São consideradas como as principais formas de EROs: o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (OH) e o óxido nítrico (NO) (Mittler, 2002). Tais espécies parecem contribuir para o declínio na capacidade de produção de energia das mitocôndrias durante o processo de envelhecimento (Bartels, 2001; Zhu, 2001; Vercesi, 2003).

Nesse cenário, diversos estudos sugerem que as UCPs desempenham um papel importante na defesa celular contra o estresse oxidativo mitocondrial, uma vez que o desacoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa mediado por essas proteínas seria capaz de aumentar a velocidade respiratória, levando a uma

significativa redução na geração mitocondrial de EROs (Kowaltowski *et al.*, 1998; Skulachev, 1996; Boveris e Chance, 1973; Popov *et al.*, 1997; Houron-Cabassa *et al.*, 2002). Em condições adversas, portanto, a atividade dissipativa das UCPs auxiliaria a reduzir o estresse oxidativo prevenindo a formação de superóxido que é a fonte primária de EROs na mitocôndria (Maxwell *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 2009).

Em consonância, diversos estudos foram capazes de demonstrar que as UCPs são ativadas pelas EROs, sugerindo que o principal papel fisiológico dessas proteínas, especialmente em tecidos não termogênicos, seja o de moderar a produção desses radicais durante a ocorrência do estresse (Vercesi *et al.*, 2006; Fernie *et al.*, 2004; revisto em Pastore *et al.*, 2007). Por exemplo, em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, a adição de ácido linoléico, que aumenta a atividade da StUCP, resulta em um decréscimo da produção de H₂O₂ (Kowaltowski *et al.*, 1998). Da mesma maneira, resultados obtidos por Pastore e colaboradores (2000) demonstram que a pUCP é ativada pela produção de EROs em mitocôndrias isoladas de trigo.

Trabalhos adicionais empregando mitocôndrias isoladas de batata indicam que a completa inibição da atividade da StUCP por nucleotídeos é dependente de radicais superóxido (O₂⁻) (Considine *et al.*, 2003), sendo tal dependência constatada também para as UCP1-3 de mamíferos (Echtay *et al.*, 2002; Talbot *et al.*, 2003). Murphy e colaboradores (2003) sugerem que o superóxido presente na matriz mitocondrial é capaz de estimular as UCPs pela inativação de enzimas que contém centros ferro-enxofre (FeS) como a aconitase, promovendo a liberação de Fe⁺². Na presença de peróxido de hidrogênio, os íons de ferro reagem formando radicais hidroxilas (OH[•]), os quais geram radicais no carbono central dos fosfolípidos

iniciando o processo de peroxidação lipídica. Produtos da peroxidação lipídica, como 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE), seriam então capazes de ativar as UCPs de mamíferos e plantas por um mecanismo de *feedback* negativo (Vercesi *et al.*, 2006), diminuindo assim a produção de espécies reativas de oxigênio. Em suma, a sensibilidade das UCPs ao estado redox sugere a existência de um mecanismo de *feedback* capaz de controlar a produção mitocondrial de EROs pela ativação de um desacoplamento controlado (Kowaltowski *et al.*, 2009).

Em mitocôndrias isoladas de trigo, a atividade da WhUCP em resposta a estresse osmótico demonstrou ser modulada por EROs através de um mecanismo de retroalimentação, sugerindo assim que as pUCPs devem atuar de forma indireta como um sistema antioxidante de defesa (Pastore *et al.*, 2007). Corroborando tais observações, em um estudo pioneiro *in planta* foi possível verificar que a expressão constitutiva do gene *AtUCP1* em plantas transgênicas de tabaco promove um aumento da tolerância ao estresse oxidativo induzido de forma exógena (Brandalise *et al.*, 2003b). Em contrapartida, Sweetlove e colaboradores (2006) verificaram que o nocaute desse mesmo gene em *Arabidopsis thaliana* resulta em um estresse oxidativo localizado, mas que não afeta a capacidade da planta em suplantar alguns estresses abióticos (baixa temperatura, exposição a metal pesado e tratamento com herbicida). Esses autores, entretanto, não levaram em consideração a existência de uma possível complementação funcional por parte das outras isoformas presentes em *Arabidopsis* e descritas por Borecký *et al.* (2006).

O papel indutor das EROs também foi observado em estudos de expressão gênica. Em milho, Brandalise e colaboradores (2003a) observaram a indução da expressão do gene *ZmUCP* em resposta a estresse oxidativo gerado pela aplicação de menadiona ou peróxido de hidrogênio. Ainda em milho, Dlasková e colaboradores

(2006) verificaram que em sementes germinadas em condições de estresse salino houve um aumento da transcrição do gene *ZmUCP*, e propuseram, com base nos resultados obtidos, que os níveis elevados dessa proteína estariam neutralizando o aumento da produção de EROs sob condições de estresse.

Diferenças na expressão gênica das pUCPs são observadas em resposta à exposição à baixa temperatura, estresse que é normalmente associado ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio celular. Nesse caso, dois grupos distintos de genes puderam ser identificados em plantas: os que apresentam indução por baixa temperatura como os genes *StUCP* em batata (Laloi *et al.*, 1997), *AtUCP1*, *AtUCP4* e *AtUCP5* em *A. thaliana* (Borecký *et al.*, 2006), *SsUCP4* e *SsUCP5* em cana-de-açúcar (Borecký *et al.*, 2006) e *SfUCP* em repolho (Ito *et al.*, 1999); e os que não respondem ao estresse de baixa temperatura como os genes *WhUCP* em trigo (Murayma e Handa, 2000), *AtUCP2* em *A. thaliana* (Watanabe *et al.*, 1999; Borecký *et al.*, 2006), *OsUCP* em arroz (Watanabe e Hirai, 2002), *SsUCP1*, *SsUCP2* e *SsUCP3* em cana-de-açúcar (Borecký *et al.*, 2006) e *ZmUCP* em milho (Brandalise *et al.*, 2003).

O fato de que alguns genes que codificam pUCPs sejam responsivos a baixas temperaturas fornece evidências para um possível envolvimento dessas proteínas com a geração de calor em plantas termogênicas. Entretanto, até o momento, nenhuma função termogênica foi evidenciada para as pUCPs, exceção feita a um estudo recente que relata que a co-expressão das proteínas dissipadoras de energia [representadas aqui pela oxidase alternativa (AOx) e pela pUCP] nas espádices de *Symplocarpus* seria responsável pela geração de calor nesse órgão termogênico (Onda *et al.*, 2008). Outras evidências experimentais, todavia, associam esses dois

sistemas dissipadores de energia com o mecanismo de prevenção da formação de EROs e, conseqüentemente, na tolerância a estresses.

Dados de expressão gênica em larga escala disponíveis na literatura relatam alguns genes que codificam pUCPs em espécies modelo como sendo induzidos em diferentes situações de estresse como fermento (Cheong *et al.*, 2002), ataque por patógeno (Van Wess *et al.*, 2003; Whithan *et al.*, 2003), programa de morte celular induzido por calor (Swidzinski *et al.*, 2002), estresse salino e osmótico (Trono *et al.*, 2006), bem como em resposta a fitohormônios como o ABA (ácido abscísico) (Seki *et al.*, 2002). É importante salientar que situações ambientais adversas como as descritas acima normalmente estimulam a produção celular de EROs pelos aparatos fotossintéticos e pela respiração mitocondrial, sendo bastante provável que os genes que codificam pUCPs sejam induzidos em tais situações.

Em um estudo objetivando investigar os efeitos do estresse oxidativo na transcrição dos genes *AtUCP1-5*, Fávaro (2008) submeteu plântulas de *Arabidopsis thaliana* a estresse salino e osmótico, respectivamente, e avaliou a expressão relativa dos referidos genes por PCR em Tempo Real. Embora nenhuma variação significativa no perfil de expressão dos genes analisados em resposta a NaCl pode ser constatada, um aumento significativo na expressão relativa de dois genes (*AtUCP1* e *AtUCP5*) foi observado em plântulas tratadas com manitol, indicando que tais genes são responsivos ao estresse osmótico. O maior aumento na expressão relativa dos genes *AtUCP1* e *AtUCP5* foi observado 12 horas após o tratamento, com posterior queda nos níveis de expressão.

Em um estudo semelhante, Trono e colaboradores (2006) observaram que em plântulas de trigo submetidas a estresse salino e osmótico não ocorre um significativo aumento no nível de expressão dos dois genes de pUCP presentes

nessa espécie. Entretanto, um aumento na atividade desacopladora dos produtos gênicos correspondentes foi observado, indicando que os estresses em questão devem modular a atividade protéica e não a expressão dos genes relacionados. Esses dados sugerem ainda um envolvimento de mecanismos pós-transcricionais e/ou traducionais de regulação. Segundo esses autores, a modulação da atividade catalítica parece ocorrer em resposta a ativadores específicos (EROS, ácidos graxos) que não afetariam a taxa de transcrição do gene relacionado. Tais discrepâncias sugerem um padrão complexo de regulação das pUCPs que requer uma investigação mais aprofundada. Porém, pelos dados aqui relatados fica evidente que a resposta adaptativa das plantas a determinadas situações de estresse envolve, dentre outros fatores, a ação das pUCPs.

II – Objetivos

Os objetivos gerais do presente trabalho foram:

- Investigar o comportamento de plantas transgênicas de tabaco que expressam de forma constitutiva o gene *AtUCP1* (Brandalise *et al.*,2003) frente aos estresses osmótico e salino.
- Analisar a atividade das regiões promotoras dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* em resposta aos estresses osmótico e de baixa temperatura, e ao ácido abscísico.

III- Material e Métodos

III.1- Material Vegetal e cultivo das sementes

Foram utilizadas sementes de *Nicotiana tabacum* SR1 selvagens (não transformadas) bem como de quatro linhagens transgênicas transformadas com cassetes de expressão contendo, respectivamente, as regiões promotoras dos genes *AtUCP1* (chamadas de 1.5.1 e 1.6.2) e *AtUCP2* (chamadas de 2.1.2 e 2.2.3), e de duas linhagens transgênicas (P07 e P49) que expressam de maneira constitutiva o gene *AtUCP1*, sendo que a linhagem P07 apresenta um maior nível de expressão quando comparada com a linhagem P49 (Brandalise *et al.*, 2003b). Todas as sementes foram inicialmente esterilizadas, e colocadas para germinar visando à obtenção de plântulas estéreis para serem utilizadas nas análises de germinação, detecção de espécies reativas de oxigênio, determinação do comprimento das raízes e nos ensaios fluorimétricos.

Para esterilização as sementes foram inicialmente embebidas em água Milli-Q pelo período de uma hora, sendo em seguida colocadas em etanol 70% por 1 minuto e lavadas 2x com água Milli-Q autoclavada. Posteriormente foram incubadas em solução de hipoclorito 70% por 10 minutos e lavadas 5x com água Milli-Q autoclavada. Após esterilização, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1992) e 0,23% de Phytigel (Sigma), e mantidas em câmara climatizada com fotoperíodo de 16 horas de luz artificial e temperatura entre 20-22°C.

III.2- Descrição dos ensaios realizados

III.2.1- Ensaio usando as linhagens transgênicas contendo as regiões promotoras do gene *AtUCP1* e *AtUCP2*

Três semanas após a germinação, as plântulas das linhagens transgênicas em estudo foram transferidas para placas de Petri contendo meio MS, e em seguida submetidas aos tratamentos com frio, manitol e ABA (ácido abscísico). As placas contendo as plântulas submetidas ao tratamento com frio foram acondicionadas a 4 °C. No caso do tratamento com ABA, as plântulas foram transferidas para placas contendo meio MS adicionado de ABA 0,1 mM, enquanto que aquelas tratadas com manitol foram transferidas para placas contendo meio MS adicionado de manitol 250 mM. Em ambos os casos, as placas foram acondicionadas a temperatura de 20-22°C. As plântulas foram coletadas nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas para posterior análise. As concentrações de ABA e manitol foram definidas em testes preliminares realizados por Hussein (2008).

III.2.1.1- Quantificação da atividade GUS

Para a realização dos ensaios fluorimétricos, as plântulas submetidas aos tratamentos citados acima foram maceradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 1,0 ml do tampão de extração de GUS [Na₂HPO₄ 50mM,

pH7,0; DTT (Dithiothreitol) 5mM; EDTA 10mM, pH 8,0; Sarcosil 0,1%, Triton X 0,1%]. Em seguida, foram centrifugadas a 18000 x g por 15 minutos a 4°C. O extrato obtido foi utilizado tanto para a determinação da concentração total de proteína através do método de Bradford (Bradford, 1976), como para a análise da atividade de GUS.

Para a determinação da atividade enzimática foram utilizadas três repetições de cada amostra contendo, 25 µl do tampão de ensaio de GUS [Na₂HPO₄ 50mM, pH7,0; DTT (Dithiothreitol) 5mM; EDTA 10mM, pH 8,0; Sarcosil 0,1%, Triton X 0,1%; MUG (4-metil umbeliferil glucoronideio) 1mM] mais 25 µl do extrato obtido anteriormente para iniciar a reação. A mistura foi incubada no escuro a 37°C, e após 30 minutos adicionou-se 950 µl de carbonato de sódio (Na₂CO₃ 2%). A atividade enzimática foi determinada no Fluorímetro Sinergy 4 (BioTek), utilizando o *software gen5*.

A fórmula matemática (1) utilizada para calcular a atividade de GUS foi baseada em Jefferson, *et al* (1987), sendo a atividade GUS expressa em pmol/min/mg de proteína.

(1)

Leitura em fluorescência (pmoles)

Proteína (mg/ml) x 4 x 10⁻³ ml x tempo de reação (minutos)

III.2.2- Ensaio de germinação usando as plantas transgênicas que superexpressam o gene *AtUCP1*

III.2.2.1 - Testes de Germinação

O teste de germinação foi realizado dispendo 30 sementes de cada linhagem transgênica em estudo (P07 e P49) em placa de Petri contendo meio MS, sendo realizado três repetições de 30 sementes para cada linhagem. Para efeito de comparação, sementes não transgênicas (SR1WT) foram usadas como controle. Para avaliar a germinação das sementes em condições variadas de estresse osmótico e salino, as mesmas foram colocadas para germinar em placas contendo diferentes concentrações [50 mM, 100 mM, 150 mM e 200 mM (Brini, *et al*, 2007)] de NaCl ou manitol. Placas sem tratamento foram usadas como testemunha (controle não tratado).

Após 20 dias da semeadura, as sementes germinadas foram contadas e expressas como porcentagem do número total de sementes plaqueadas. Os valores encontrados foram analisados utilizando o teste de Tukey e a análise de variância (ANOVA), comparando a germinação entre as linhagens bem como a germinação das sementes da mesma linhagem nas diferentes concentrações de NaCl e manitol testadas.

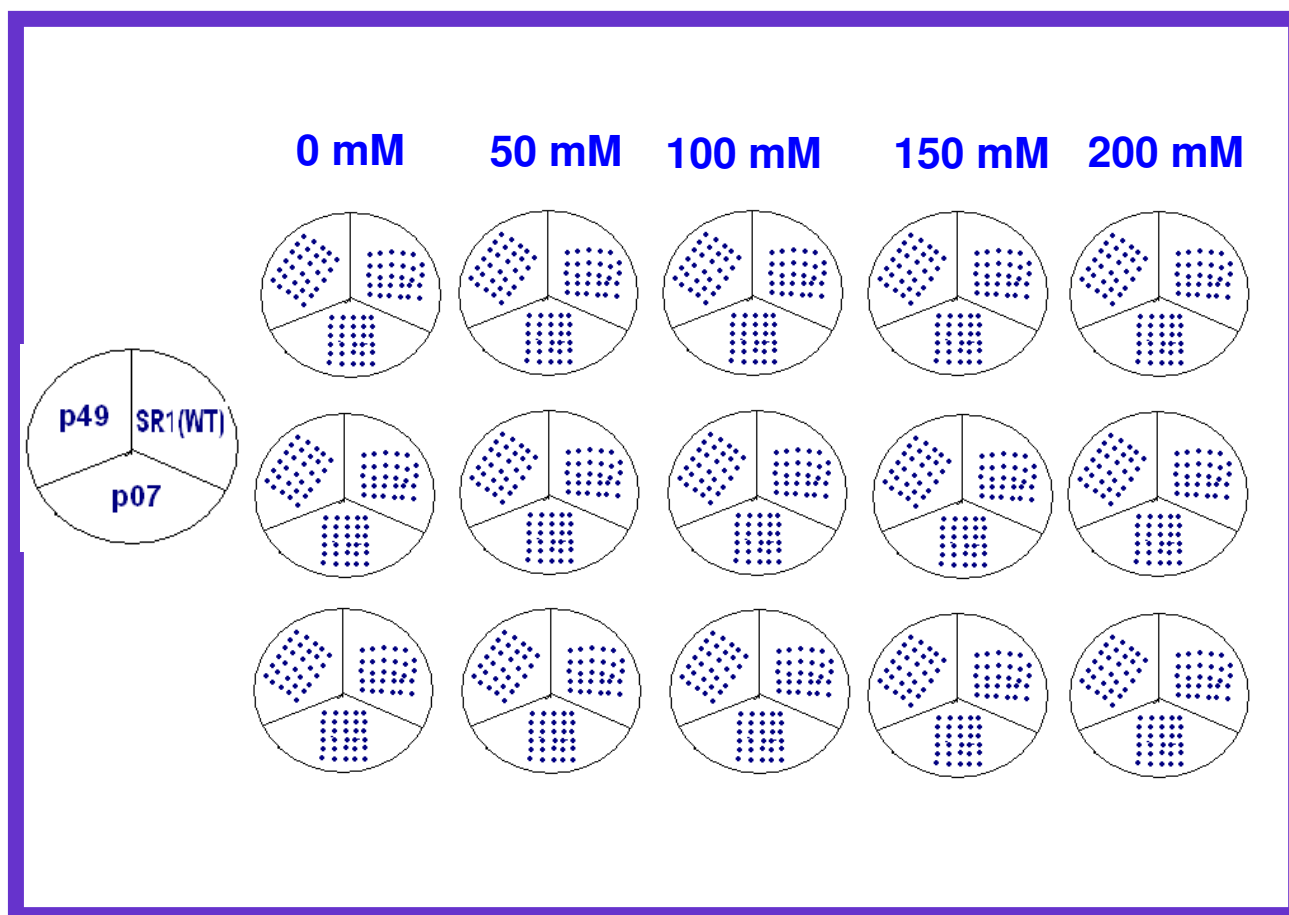


Figura 1 – Representação esquemática da disposição das sementes das linhagens transgênicas P07 e P49, e do controle não transgênico (SR1WT), nas placas de Petri tratadas com diferentes concentrações de NaCl e Manitol. O nível zero corresponde à testemunha não tratada.

III. 2.2.2 - Detecção de espécies reativas de oxigênio em plântulas de tabaco

Para a detecção de superóxido (O_2^-), plântulas das linhagens transgênicas em estudo foram inicialmente germinadas em placas de Petri contendo meio MS, e três semanas após a germinação, submetidas aos tratamentos com Manitol e NaCl de duas maneiras diferentes. Primeiramente, no caso de tratamento com NaCl, as plântulas foram transferidas para placas de Petri contendo meio MS adicionado de NaCl 150 mM, enquanto que no tratamento com manitol, as plântulas foram transferidas para placas contendo meio MS adicionado de manitol 250 mM.

Plântulas mantidas em placas com meio MS sem tratamento foram usadas como controle. Em todos os casos, as placas foram acondicionadas a temperatura de 20-22°C e coletadas após 7 e 14 dias para análise.

Concomitantemente, após três semanas de germinação, aproximadamente 10 plântulas de cada linhagem transgênica, e do controle não transgênico, foram pulverizadas com NaCl (150 mM) ou manitol (250 mM). Todas as plântulas foram mantidas em condições de alta umidade por um período de três horas, sendo em seguida coletadas e submetidas à coloração com NitroBlue Tetrazolium (NBT).

Para tal, as plântulas coletadas foram infiltradas a vácuo em uma solução contendo 0,5 mg/ml de NBT em tampão HEPES 25 mM, pH 7,6. Como controle, 10 mM de $MnCl_2$ foi adicionado à solução tampão contendo NBT. As amostras foram então incubadas em temperatura ambiente e no escuro por duas horas. Para retirar a clorofila da amostra, após a reação, as plântulas foram lavadas em álcool 80% por diversas vezes.

III.2.2.3 - Análise do crescimento das raízes

Para a análise do crescimento das raízes de plântulas submetidas a estresse osmótico e salino, sementes selvagens (não transgênicas) e das duas linhagens transgênicas em estudo foram inicialmente germinadas em placas de Petri contendo meio MS. As placas foram posicionadas verticalmente em câmara de crescimento, até as raízes atingirem aproximadamente 0,5 cm de comprimento. Em seguida, as plântulas foram transferidas para o mesmo meio, porém, adicionado de manitol (250 mM) e NaCl (150 mM), respectivamente, sendo as placas mantidas novamente na posição vertical em câmara de crescimento. Dez dias após o tratamento, o comprimento das raízes foi registrado e as plântulas fotografadas.

IV – Resultados

IV.1 - Quantificação de GUS

Com o objetivo de estudar a funcionalidade dos promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* sob condições de estresse, ensaios biológicos utilizando plantas transgênicas de tabaco transformadas com cassetes de expressão contendo o gene repórter GUS sob controle de tais promotores foram empregados (Fávaro, 2008). Para tal, determinou-se atividade enzimática de GUS nos extratos das plântulas tratadas com manitol, frio e ABA. A atividade de GUS foi avaliada fluorimetricamente vinte dias após a germinação das plântulas. Foram avaliadas duas linhagens transgênicas contendo o promotor do gene *AtUCP1* (denominadas 1.6.2 e 1.5.1) e duas contendo o promotor do gene *AtUCP2* (denominadas 2.1.2 e 2.2.3).

Quando os dados obtidos para as linhagens 1.6.2 e 1.5.1 (promotor *AtUCP1*) são comparados, verifica-se que a atividade GUS nos diferentes tratamentos e tempos amostrais (0, 6, 12 e 24h) apresentou um padrão bastante semelhante (Figura 2). Nesse caso, embora sejam constatadas alterações na atividade enzimática em função do tempo e tratamento empregado, essas alterações não são estatisticamente significativas (teste t, com nível de significância $p < 0,05$). Portanto, a atividade GUS não apresenta variação significativa nos tempos e tratamentos estudados. Por outro lado, devido ao baixo nível de expressão observado em um ensaio histoquímico de GUS realizado por Fávaro (2008) nas linhagens contendo o promotor do gene *AtUCP2*, a atividade GUS não foi detectada nas linhagens 2.1.2 e 2.2.3 impedindo qualquer análise posterior.

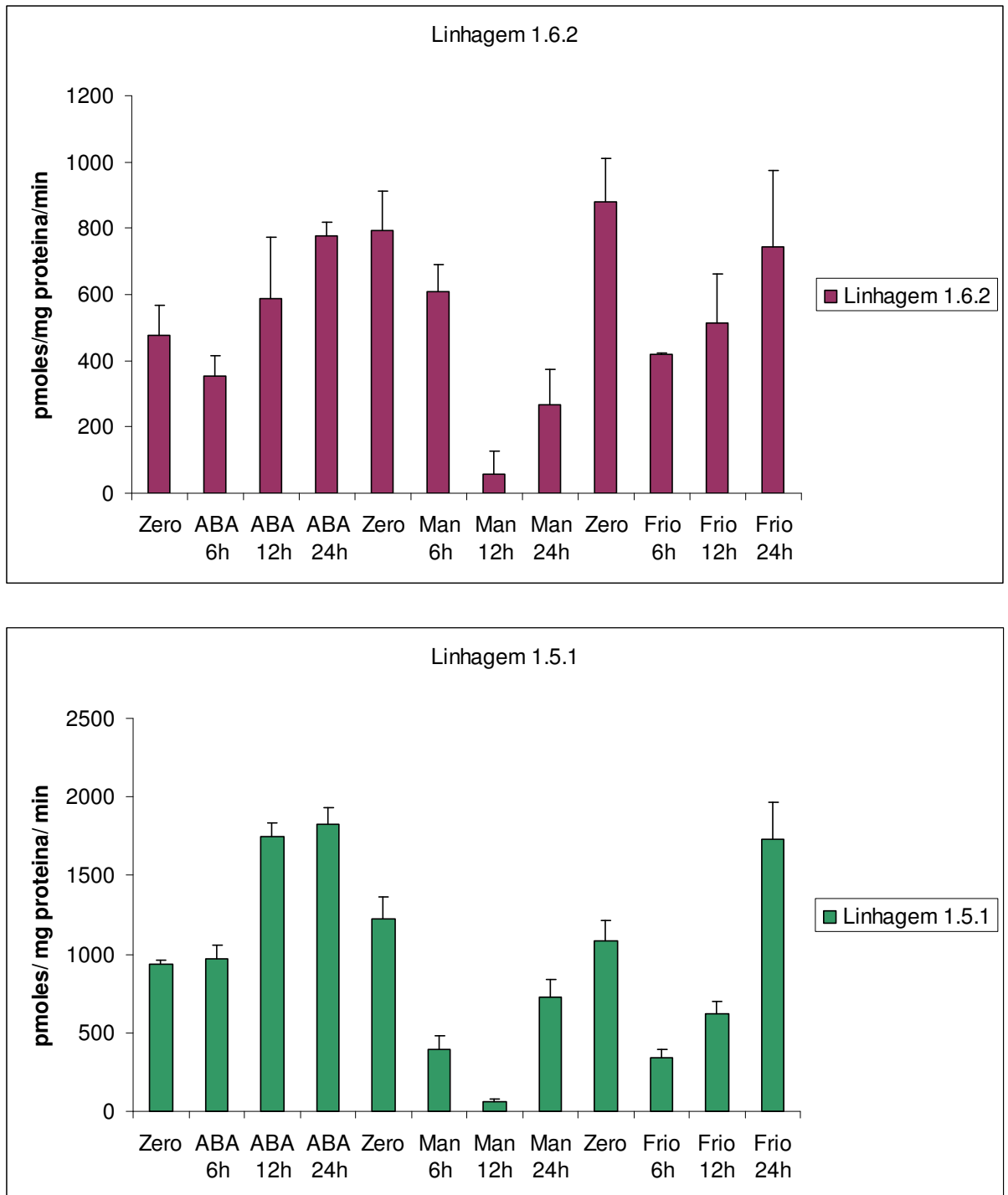


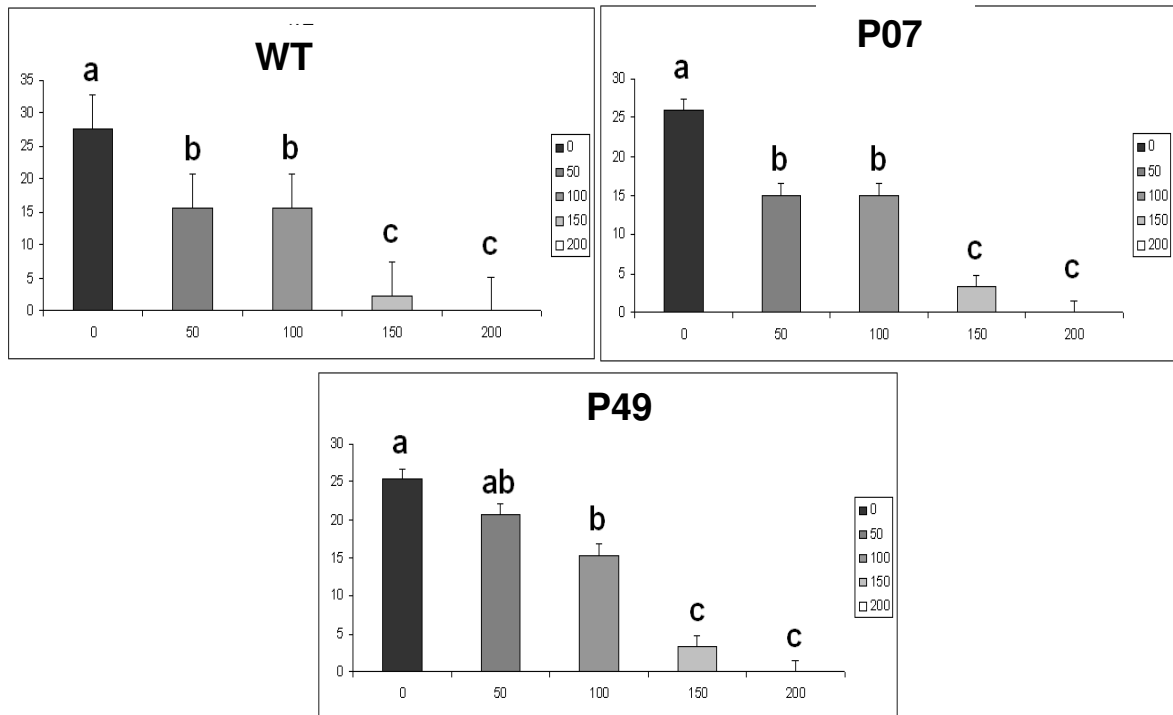
Figura 2: Atividade GUS nas linhagens transgênicas 1.6.2 e 1.5.1, ambas contendo o gene repórter GUS sob controle do promotor do gene *AtUCP1*. As barras correspondem ao desvio padrão.

IV.2 - Testes de Germinação

O desempenho germinativo das linhagens transgênicas de tabaco (P07 e P49) que expressam constitutivamente o gene *AtUCP1* sob estresse osmótico e salino foi avaliado. Para tal, utilizou-se um delineamento experimental totalmente casualizado com três repetições de trinta sementes de cada linhagem em estudo por tratamento. Sementes de plantas não transformadas (WT) foram usadas como controle. Os tratamentos consistiram de quatro concentrações diferentes de NaCl e manitol (0, 50, 100, 150 e 200 mM). O número de sementes germinadas foi contado 20 dias após a disposição das mesmas nas placas de Petri contendo meio MS. Nas análises subsequentes buscou-se comparar o número de sementes germinadas nos diferentes tratamentos para cada uma das linhagens analisadas, bem como comparar essas linhagens entre si num dado tratamento.

Na Figura 3 encontra-se representado o número de sementes germinadas de cada linhagem nas diferentes concentrações de NaCl e manitol empregadas. Já nas Figuras 4 e 5 é possível encontrar uma comparação entre o número de sementes germinadas de cada linhagem numa determinada concentração de NaCl ou manitol.

A) Manitol



B) NaCl

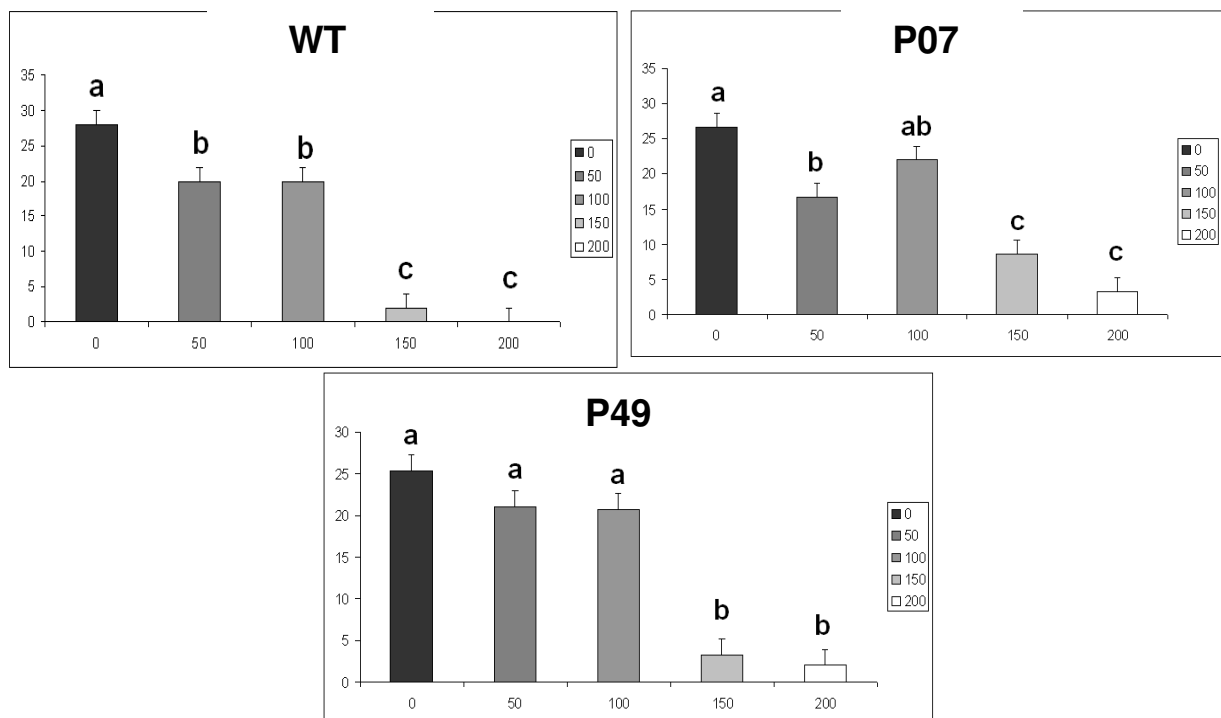


Figura 3: Comparação do número médio de sementes germinadas de cada linhagem transgênica (e controle) nas diferentes concentrações de Manitol (A) e NaCl (B). As siglas p49 e p07 representam as duas linhagens transgênicas em estudo, e SR1(WT) ao controle não transgênico. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As barras correspondem ao erro padrão da média.

Pela análise dos dados apresentados na Figura 3 é possível constatar a germinação das sementes selvagens não transgênicas [SR1(WT)] é bastante prejudicada na presença de Manitol e NaCl. Em ambos os casos, uma diferença significativa entre o número médio de sementes germinadas na ausência do agente indutor do estresse (0 mM) em relação às demais concentrações testadas (50 mM, 100 mM, 150 mM e 200 mM) pode ser observada. O efeito negativo observado revela uma intolerância das sementes não transgênicas ao aumento da concentração do agente indutor do estresse.

Um comportamento semelhante ao das sementes do lote controle pode ser observado quando as sementes da linhagem transgênica P07 foram submetidas aos tratamentos com Manitol e NaCl. Observa-se, pelos resultados obtidos, que o aumento da concentração dos agentes indutores de estresse provocou uma redução no número médio de sementes germinadas, exceção feita à concentração de 100 mM de NaCl, onde a média obtida não diferiu estatisticamente do controle não tratado (0 mM).

Em contrapartida, a linhagem transgênica P49 apresentou certa tolerância ao estresse osmótico e salino, respectivamente. Para essa linhagem, em condições de estresse osmótico, o número médio de sementes germinadas na concentração de 50 mM de Manitol não diferiu estatisticamente do valor médio obtido na ausência do agente indutor (0 mM), indicando certa tolerância. Por outro lado, uma redução significativa no número de sementes germinadas ocorreu nas concentrações mais elevadas. Em condições de estresse salino foi possível constatar que as médias obtidas nas concentrações de 50 mM e 100 mM, respectivamente, não diferiram estatisticamente da média obtida na ausência de NaCl (0 mM), mostrando que esta linhagem é capaz de suportar concentrações salinas relativamente elevadas. Nesse

caso, a germinação das sementes só começou a ser reduzida de forma significativa nas concentrações de 150 e 200 mM de NaCl.

Quando as linhagens em estudo foram comparadas entre si dentro de cada tratamento foi possível notar que o número médio de sementes germinadas decresce com o aumento das concentrações de NaCl e Manitol. Com relação ao estresse gerado empregando manitol (Figura 4), uma diferença significativa entre as linhagens só pode ser observada na concentração de 150 mM, na qual a linhagem P49 mostrou-se superior ao controle não transgênico SR1(WT), porém, sem diferir significativamente da linhagem P07. Nos gráficos referentes ao estresse salino (Figura 5) essa diferença só foi observada na concentração de 100 mM de NaCl, na qual a linhagem P07 apresentou um número médio de sementes germinadas significativamente superior às demais.

MANITOL

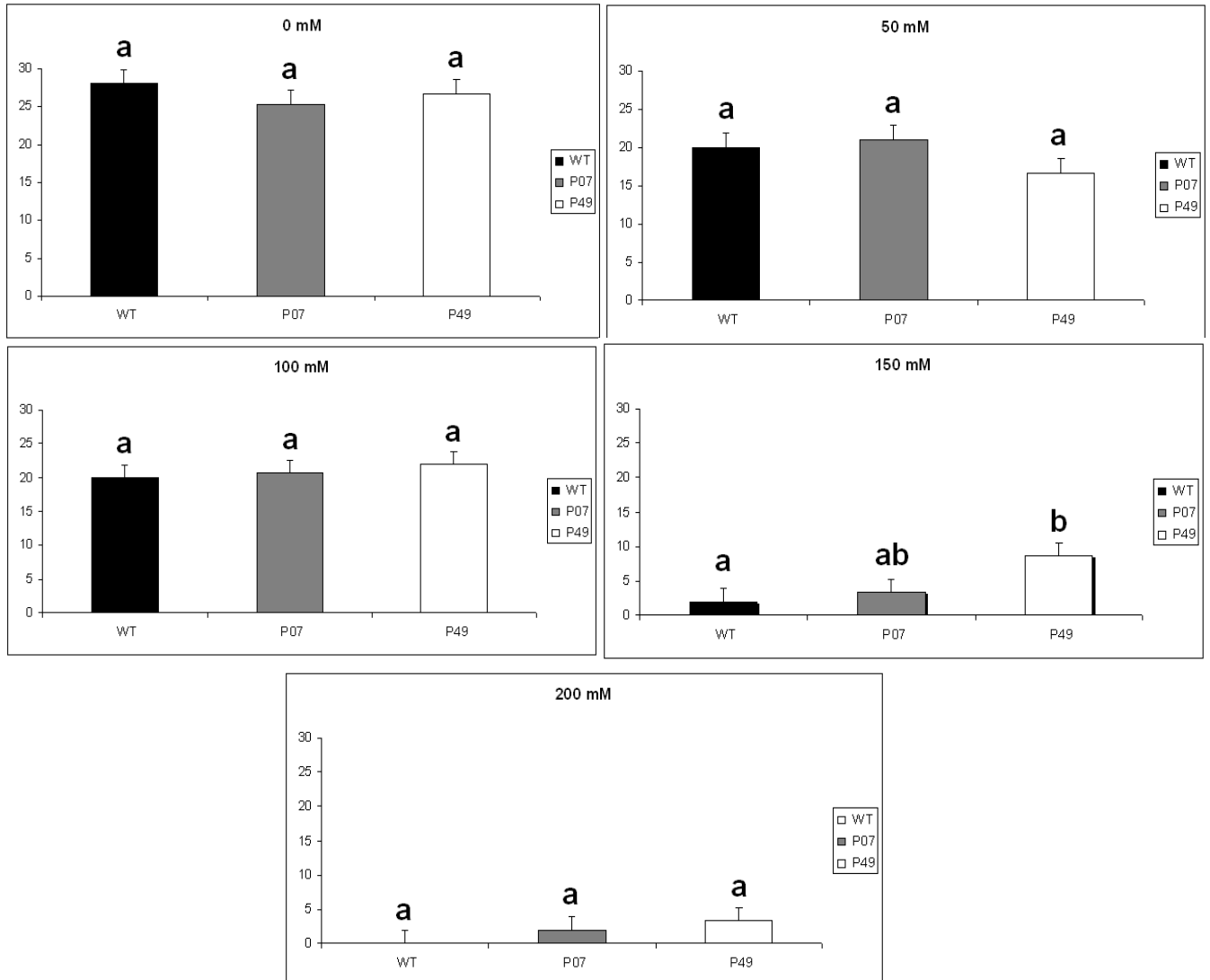


Figura 4: Número médio de sementes germinadas de cada linhagem numa dada concentração de Manitol. As siglas p49 e p07 representam as duas linhagens transgênicas em estudo, e SR1(WT) ao controle não transgênico. Letras iguais representam médias estatisticamente iguais segundo o teste de Tukey ao nível de 5 %. As barras correspondem ao erro padrão das médias.

NaCl

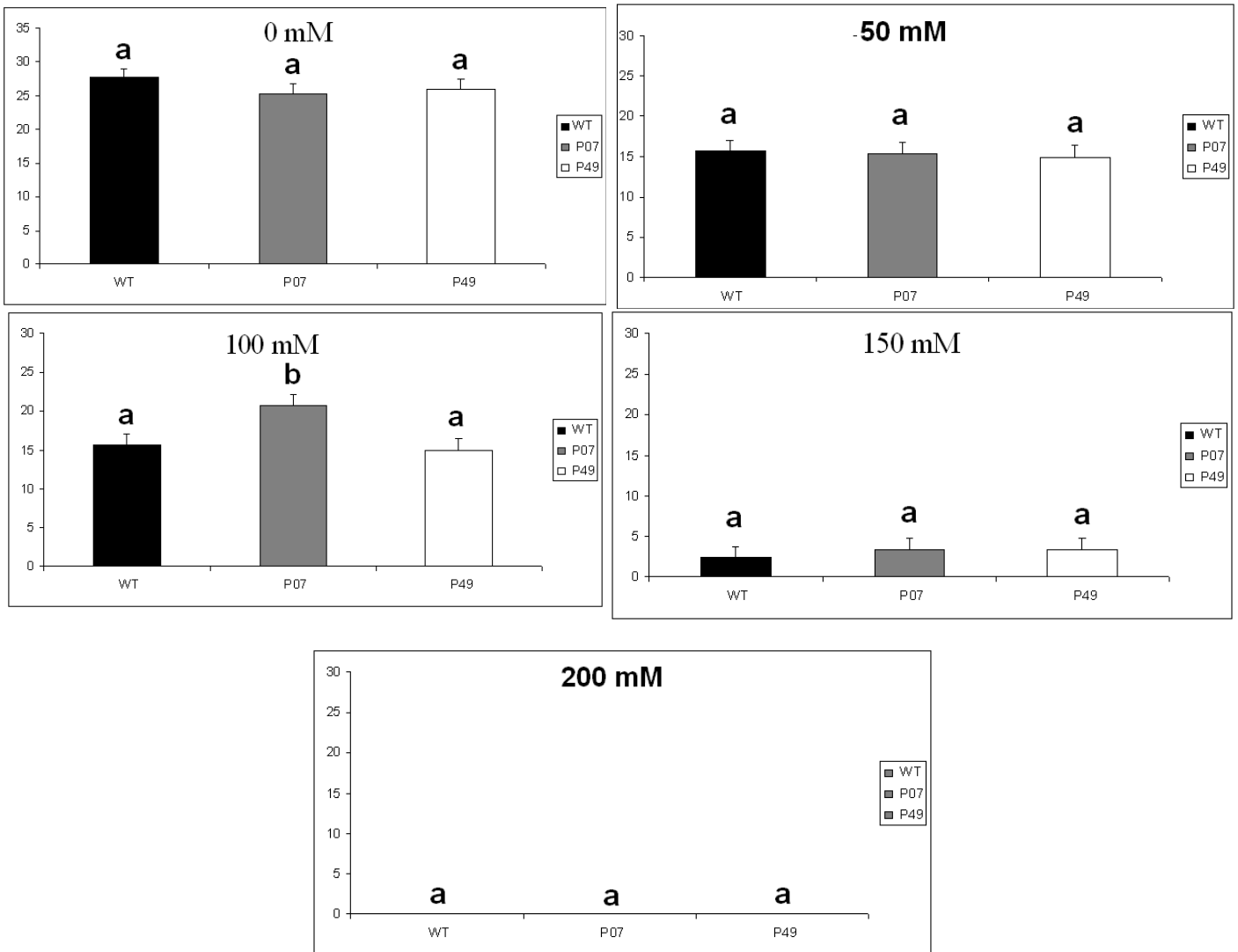


Figura 5: Número médio de sementes germinadas de cada linhagem numa dada concentração de NaCl. As siglas p49 e p07 representam as duas linhagens transgênicas em estudo, e SR1(WT) ao controle não transgênico. Letras iguais representam médias estatisticamente iguais segundo o teste de Tukey ao nível de 5%. As barras correspondem ao erro padrão das médias.

IV.3 - Detecção de espécies reativas de oxigênio

Buscando relacionar a produção de espécies reativas de oxigênio com o comportamento, sob condição de estresse osmótico e salino, das linhagens transgênicas de tabaco (P07 e P49) que expressam constitutivamente o gene *AtUCP1*, plântulas foram tratadas com Manitol (250 mM) e com NaCl (150 mM) de duas maneiras diferentes para posterior verificação da acumulação *in situ* de superóxido (O_2^-), que é a fonte primária de estresse oxidativo nas mitocôndrias.

Num primeiro momento os agentes indutores de estresse (NaCl ou Manitol) foram aplicados diretamente ao meio MS, sendo as plântulas mantidas nas placas de Petri e amostradas aos 7 e 14 dias após o tratamento. Os resultados obtidos nessa condição não evidenciaram diferença significativa na acumulação de superóxido nas diferentes linhagens testadas após 7 ou 14 dias da aplicação do tratamento (Figura 6). Tal fato pode ser constatado pela intensa coloração azul (presença de formazana) observada tanto nas plântulas das linhagens transgênicas como nas selvagens (não transgênicas). A intensa reação observada indica que o tempo de exposição ao estresse foi intenso e prolongado, não sendo possível detectar possíveis diferenças.

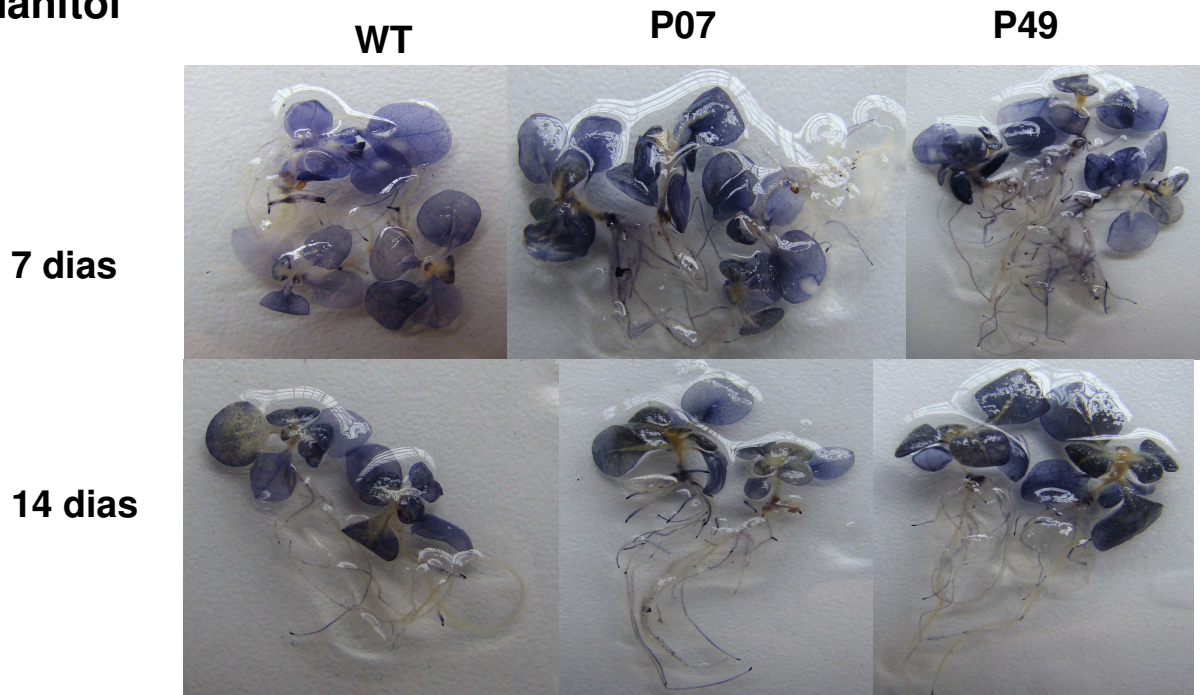
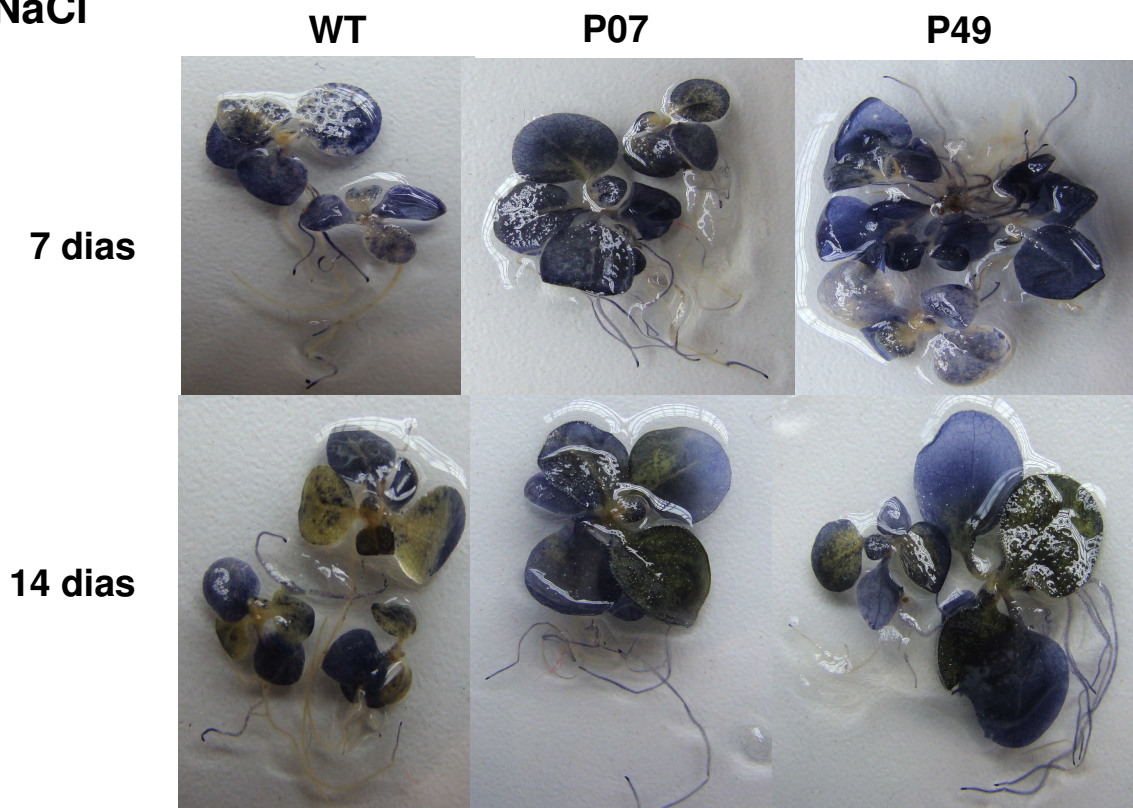
A) Manitol**B) NaCl**

Figura 6: Detecção histoquímica do ânion superóxido em plântulas das linhagens transgênicas (P07, P49) e do controle não transgênico (WT) após 7 e 14 dias de exposição aos estresses osmótico (Manitol - 250 mM) (A) e salino (NaCl - 150 mM) (B). A coloração foi realizada empregando NBT.

Numa segunda abordagem, a fim de diminuir o tempo de exposição ao estresse, a detecção de superóxido foi realizada três horas após a pulverização de NaCl ou Manitol diretamente nas folhas das plântulas das linhagens em estudo. Nesta análise, diferenças claras na intensidade da coloração azul das folhas, a qual está relacionada com a deposição de formazana, puderam ser observadas em ambos os tratamentos realizados (Figura 7 e 8). Nesse caso, a presença de formazana, que é indicadora da presença de superóxido, foi mais intensa nas folhas das plântulas não transgênicas (WT) do que nas folhas das plântulas das linhagens transgênicas P07 e P49. Esses resultados sugerem que a menor acumulação de superóxido nas linhagens transgênicas esteja relacionada com a presença da proteína desacopladora (*AtUCP1*) em suas mitocôndrias.

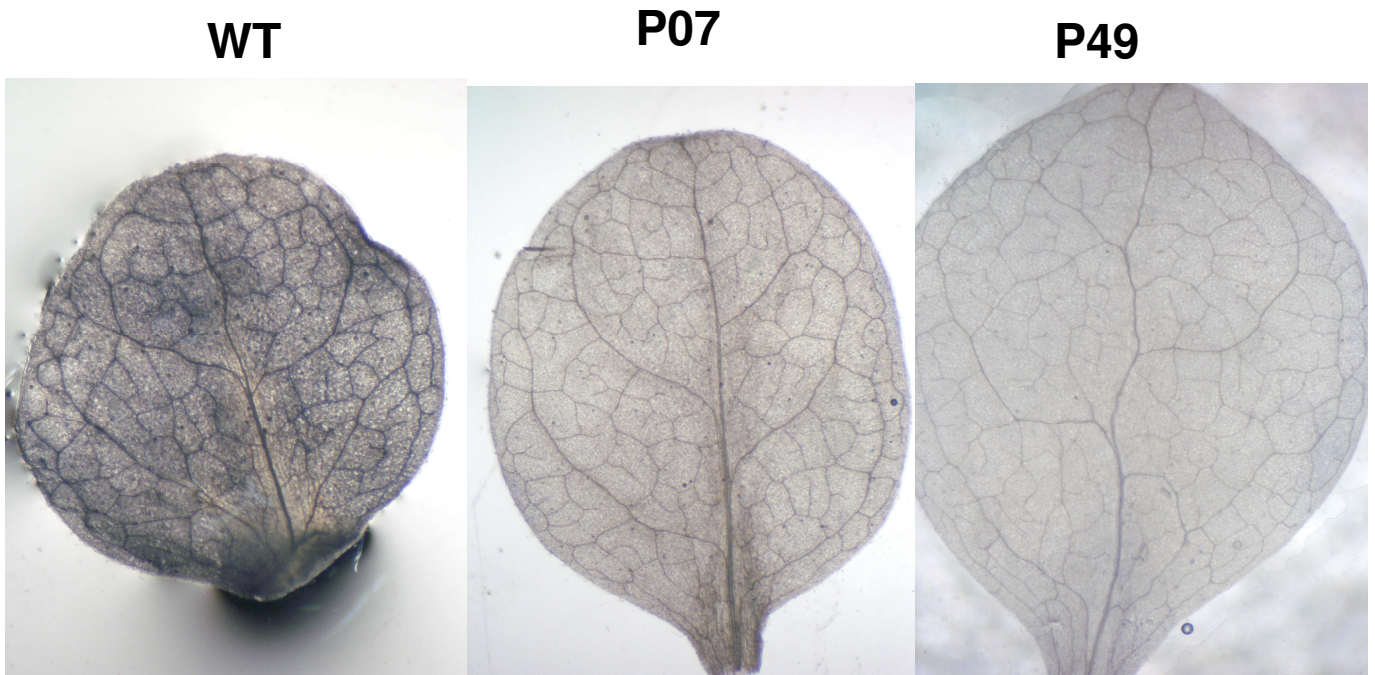
A) Manitol

Figura 7: Detecção histoquímica do ânion superóxido em plântulas das linhagens transgênicas (P07, P49) e do controle não transgênico (WT) após 3 horas de tratamento com Manitol (250 mM). A coloração foi realizada empregando NBT. A folha fotografada é representativa de um lote de 10 plântulas analisadas.

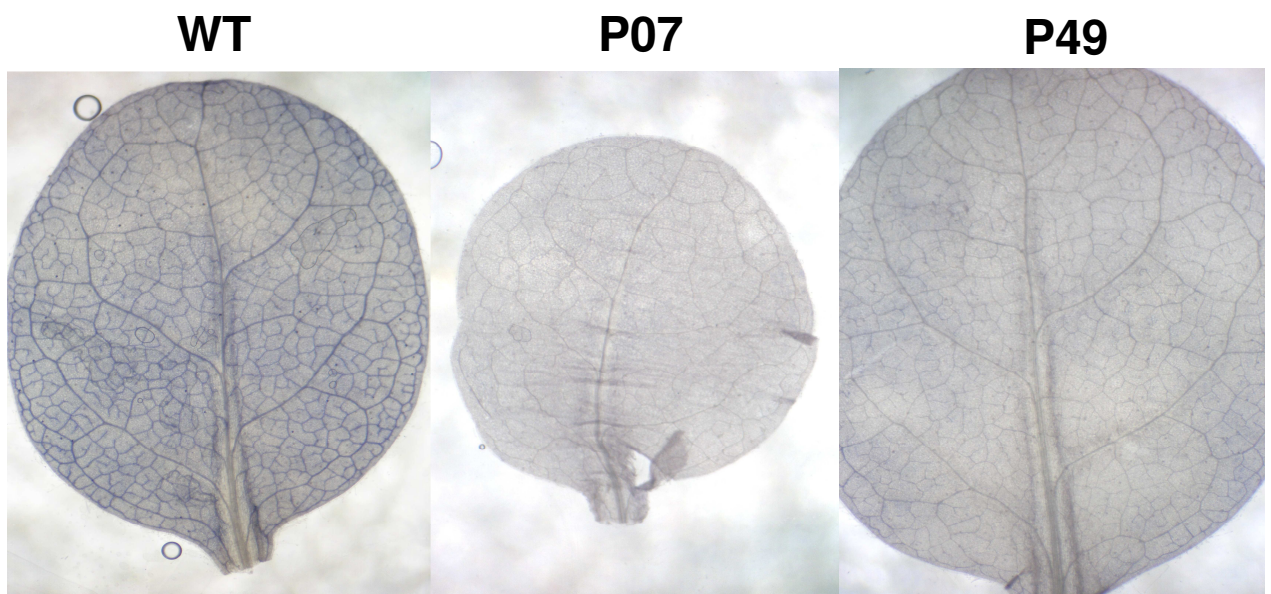
B) NaCl

Figura 8: Detecção histoquímica do ânion superóxido em plântulas das linhagens transgênicas (P07 e P49) e do controle não transgênico (WT) após 3 horas de tratamento com NaCl (150 mM). A coloração foi realizada empregando NBT. A folha fotografada é representativa de um lote de 10 plântulas analisadas.

IV.4 - Análise de crescimento radicular

A fim de verificar a tolerância aos estresses osmóticos e salino nas linhagens transgênicas que expressam constitutivamente a AtUCP1 (P07 e P49) o crescimento radicular de plântulas submetidas ao tratamento com NaCl e Manitol (150 e 250 mM, respectivamente) foi avaliado, e comparado com o crescimento radicular de plântulas de tabaco não transformadas (WT) submetidas às mesmas condições. O comprimento da raiz principal foi registrado 10 dias após a disposição das plântulas na posição vertical em placas de Petri com meio MS não tratado ou contendo NaCl ou manitol.

Pela análise global dos resultados obtidos (Figuras 9, 10 e 11) é possível constatar que o crescimento radicular foi afetado de forma diferencial pelos estresses salino e osmótico, sendo as raízes das plântulas não transgênicas as mais afetadas pelos tratamentos. Na Figura 9 estão representadas as plântulas das linhagens transgênicas, e do controle não transgênico, crescidas por 10 dias em placas de Petri contendo somente meio MS. Nesse controle não tratado, como esperado, não foi possível constatar diferença no comprimento das raízes das plantas selvagens e transgênicas. Por outro lado, em presença dos estresses, uma diferença no comprimento das raízes das plântulas das linhagens transgênicas em relação às plântulas selvagens pode ser observada (Figuras 10 e 11). Em presença de Manitol (250 mM), o comprimento das raízes das plântulas transgênicas, em relação ao controle não transgênico foi 45,77% superior a linhagem P07, e 37% a linhagem P49. Em presença de 150 mM de NaCl, as raízes das plântulas transgênicas da linhagem P49 apresentaram o dobro do tamanho das raízes das plântulas não transgênicas, enquanto que o comprimento das raízes de plântulas da

linhagem P07 foi 88.8% superior em relação às selvagens (Tabela 1). Nesse último caso, observa-se a presença de um maior número de raízes laterais nas plântulas transgênicas em relação ao controle não transgênico.

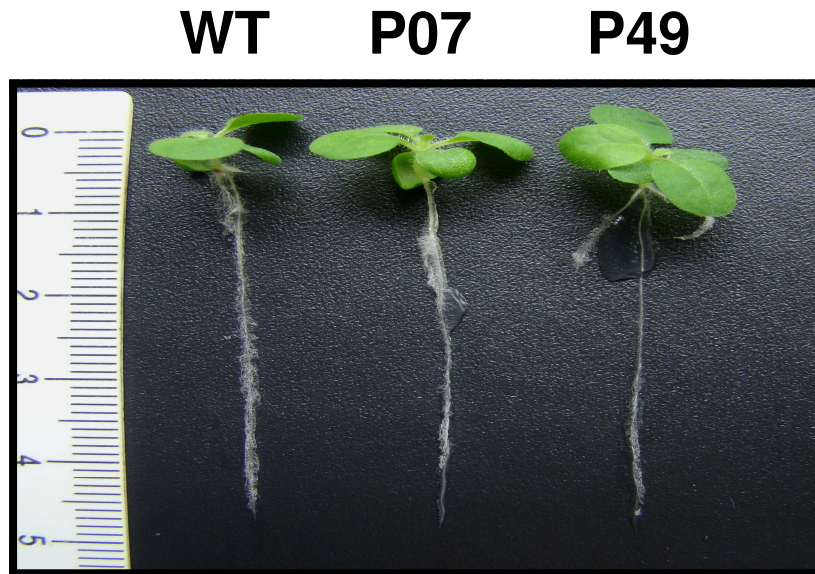


Figura 9: Comprimento das raízes de plântulas das linhagens transgênicas (P49 e P07) em comparação com o controle não transgênico (WT) após 10 dias de crescimento em meio MS sem adição de tratamento.

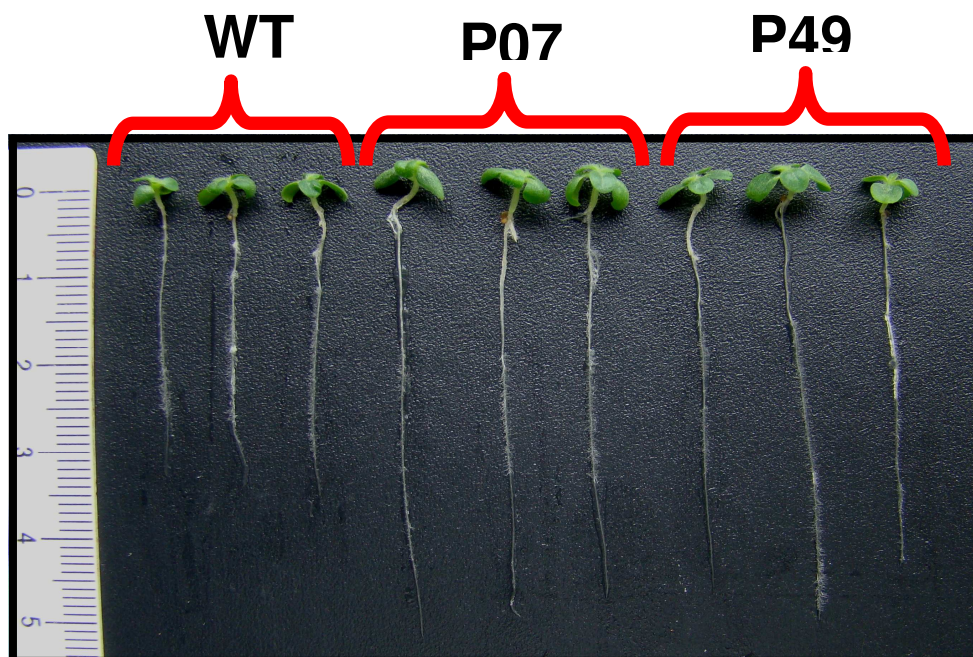


Figura 10: Comprimento das raízes de plântulas das linhagens transgênicas (P07 e P49) em comparação ao controle não transgênico (WT) após 10 dias de crescimento em meio MS adicionado de manitol (250 mM).

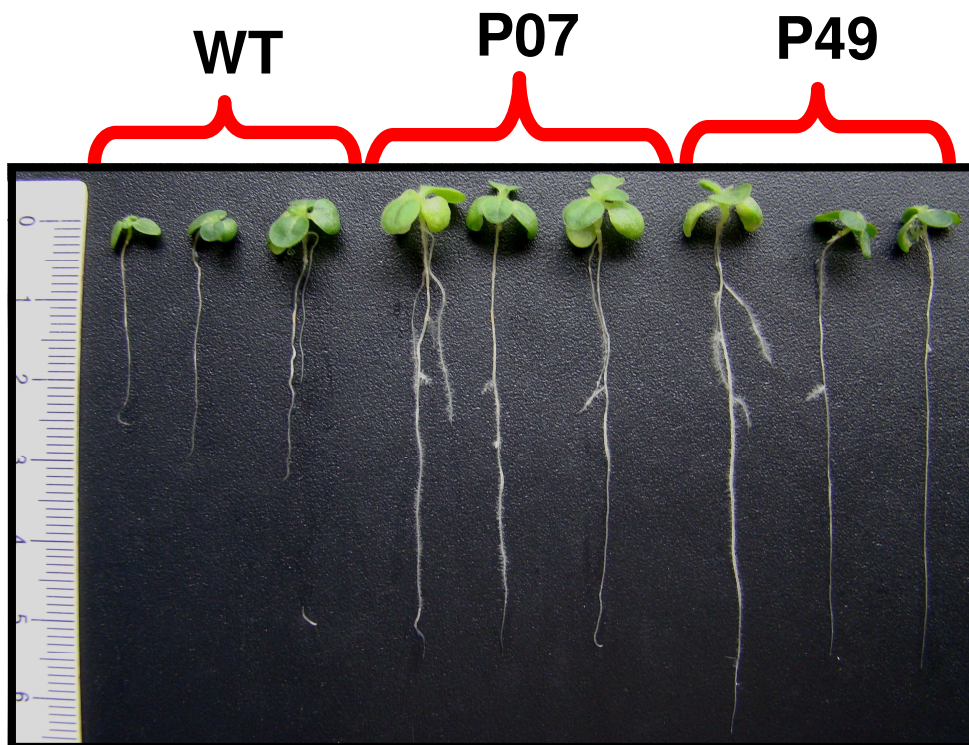


Figura 11: Comprimento das raízes de plântulas das linhagens transgênicas (P07 e P49) em comparação com o controle não transgênico (WT) após 10 dias de crescimento em meio MS adicionado de NaCl (150 mM).

Tabela 1: Média (\pm SD) do comprimento das raízes, em cm, de plântulas das linhagens transgênicas ou selvagem (wt) submetidas ao estresse osmótico e salino.

	WT	P07	P49
Manitol	3,43 \pm 0,15	5 \pm 0,2	4,6 \pm 0,26
NaCl	2,93 \pm 0,35	5,46 \pm 0,15	5,8 \pm 0,52

V – Discussão

V.1 – Análise de germinação de sementes que expressam constitutivamente o gene *AtUCP1*

Evidências sugerem que as UCPs desempenham um importante papel na defesa celular contra o estresse oxidativo mitocondrial, uma vez que o desacoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa mediado por essas proteínas seria capaz de aumentar a velocidade respiratória, levando a uma significativa redução na geração mitocondrial de EROs (Kowaltowski *et al.*, 1998; Skulachev, 1996; Boveris e Chance, 1973; Nègre-Salvayre *et al.*, 1997; Popov *et al.*, 1997; Houron-Cabassa *et al.*, 2002).

A investigação da função dessas proteínas empregando plantas transgênicas de tabaco capazes de expressar de forma constitutiva uma proteína desacopladora de *A. thaliana* (*AtUCP1*) (Brandalise *et al.*, 2003b) corroborou tais observações, trazendo evidências concretas sobre a sua participação no aumento da tolerância ao estresse oxidativo. Tais plantas foram mais tolerantes ao estresse gerado pela aplicação exógena de H₂O₂. Esse e outros resultados sugerem um papel relevante das pUCPs em situações de estresse em que a geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio é elevada, já que se acredita que a produção endógena de EROs pela cadeia respiratória é provavelmente diminuída devido ao desacoplamento exacerbado provocado pela super expressão da *AtUCP1*. Acredita-se que nestas condições, o sistema antioxidante de tais plantas transgênicas estaria mais disponível para promover a inativação de EROs de origem exógena.

Neste estudo, para melhor investigar o comportamento das plantas transgênicas citadas anteriormente frente a estresses geradores de EROs, uma análise de germinação em condições de estresses salino e osmótico foi efetuada. Sabe-se que estresses abióticos promovem severas consequências na função mitocondrial, tendo sido demonstrado, por exemplo, que o estresse salino promove disfunção mitocondrial, acumulação de EROs e apoptose em tabaco e uva (Skopelitis et al., 2006; Andronis & Roubelakis-Angelakis, 2010). Da mesma maneira, evidências experimentais demonstram que a mitocôndria é o principal alvo de dano oxidativo em folhas de cevada submetidas a condições de seca (Bártoli et al., 2004). Em tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. SR1), Maxwell et al. (1999), usando sondas fluorescentes sensíveis a EROs e o marcador mitocondrial Mitotracker Red, demonstraram que o principal sítio de formação/acumulação de EROs intracelular é a mitocôndria.

A escolha da etapa de germinação para a realização de tais análises deve-se ao fato que durante esse processo ocorre um aumento da respiração, que de valores ínfimos sobe a níveis bem elevados algum tempo após o início da embebição (Popinigis, 1977; Ferreira e Borghetti, 2004). Assim, uma vez que a atividade respiratória é alta nesse período, o presente estudo procurou correlacionar a atividade da proteína desacopladora com o aumento da tolerância aos referidos estresses *in planta*.

Para tal, foram utilizadas duas linhagens transgênicas, denominadas respectivamente P07 e P49, que expressam o gene *AtUCP1* de maneira constitutiva, sendo que a linhagem P07 apresenta um maior nível de expressão do que a linhagem P49 (Brandalise et al., 2003). Tais linhagens foram germinadas em presença de agentes indutores de estresse salino e osmótico em diferentes

concentrações, sendo que sementes de plantas selvagens não transformadas foram usadas como controle. Para realizar tais análises, as sementes foram contadas aos vinte dias após a germinação e uma análise de variância foi aplicada.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a concentração de 200 mM, tanto de Manitol como de NaCl, foi extremamente drástica já que, independente da linhagem testada, a germinação observada foi próxima de zero. Já na concentração de 150 mM de Manitol, a linhagem P49 apresentou tolerância ao estresse, enquanto que a linhagem P07 não diferiu significativamente do controle não transgênico. Por outro lado, quando analisamos a germinação sob estresse salino, uma diferença estatística no número de sementes germinadas foi encontrada somente na concentração de 100 mM, onde a linhagem P07 foi mais tolerante, tendo um total de vinte sementes germinadas. Esses resultados foram corroborados pela análise do crescimento radicular das plântulas submetidas aos estresses salino e osmótico, na qual se verificou uma inibição do crescimento radicular das plântulas não transgênicas, refletindo assim uma menor tolerância aos referidos estresses.

Apesar de representarem evidências indiretas, esses resultados reforçam ainda mais o conceito que envolve a pUCP na resposta ao estresse oxidativo. Nesse caso, a observada tolerância aos estresses osmótico e salino ocorre em uma fase importante do desenvolvimento vegetal sendo a mesma proporcionada pela expressão constitutiva da AtUCP1 nas linhagens transgênicas. Embora o mecanismo diretamente responsável pela referida tolerância ainda tenha que ser demonstrado experimentalmente, uma hipótese para tal foi proposta com base no conhecimento atual sobre como as EROs são geradas nas células, sobre as condições que inibem e estimulam a sua produção, e a maneira pela qual o sistema antioxidante celular protege as células contra o estresse oxidativo (Kowaltowski *et*

al.,1998; Pastore *et al.*, 2000). O desacoplamento mitocondrial e/ou a ativação das vias dissipadoras de energia respiratória, como UCPs e AOX, diminuem, por mecanismos distintos, a produção de EROs devido ao aumento da taxa respiratória. Uma vez acelerada a respiração celular, ocorre diminuição tanto da tensão do oxigênio nos tecidos como da meia vida da semiubiquinona. Esse estado fisiológico reduz significativamente a doação do elétron da semiubiquinona (UQ) ao O_2 celular. Portanto, se uma menor quantidade de EROs for gerada endogenamente, maior será a eficiência do sistema antioxidante na proteção contra espécies reativas de oxigênio geradas de maneira exógena. Adicionalmente, Goglia e Skulachev (2003) propuseram que a UCP é capaz de promover o translocamento de ácidos graxos hidroperóxidos da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. Esse processo garante que o DNA mitocondrial e as proteínas da matriz não permaneçam em contato com produtos de peroxidação lipídica.

Coletivamente, esses resultados sustentam a ideia de que os mecanismos propostos acima são mais eficientes nas plantas transgênicas que expressam de maneira constitutiva a AtUCP1, o que provavelmente deve resultar em maior tolerância aos estresses estudados.

É cada vez mais evidente que, nas células vegetais, os estresses abióticos geram estresse oxidativo por provocar um desbalanço entre a geração e a remoção de EROs (revisto em Blokhina & Fagerstedt, 2009). Assim, sob condições de estresse, a homeostase pré-existente é quebrada e a planta passa a acumular mais EROs. Em perfeita sintonia com tais observações, os resultados aqui obtidos empregando um estresse de curta duração (três horas após a aplicação do agente indutor), demonstram que uma maior acumulação de O_2^- ocorre nas folhas das plântulas não transgênicas em relação às plântulas das linhagens transgênicas.

Esse resultado confirma que, quando submetidas ao estresse salino ou osmótico, as plântulas não transgênicas acumulam mais superóxido que as linhagens transgênicas submetidas aos mesmos tratamentos. Nessa situação, a menor acumulação de EROs nas folhas das plântulas das linhagens transgênicas está diretamente relacionada com a expressão constitutiva da *AtUCP1*, e parece não estar correlacionada com o nível de expressão da proteína, já que nas nossas condições a linhagem P49 teve um melhor comportamento que a P07.

V.2 - Quantificação da atividade GUS em plantas contendo os promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2*

Como mencionado, as mitocôndrias representam a maior fonte de geração de EROs em células submetidas a estresse. Evidências experimentais têm demonstrado que os dois sistemas dissipadores presentes em plantas, UCPs e AOXs, atuam na regulação da produção de EROs mitocondrial, e nos últimos anos, diversos estudos têm relacionado a função fisiológica das pUCPs e AOx com a proteção celular contra o estresse oxidativo (Jarmuszkiewicz *et al.*,1998; Almeida *et al.*,1999; Maxwell *et al.*, 1999; Bransalise *et al.*,2003).

Ensaio procurando desvendar os efeitos potenciais de estresses abióticos (osmótico, salino e de baixa temperatura) na expressão gênica em larga escala indicam que mecanismos transcricionais estariam envolvidos no controle da expressão das pUCPs (revisto em Vercesi *et al.*,2006). Cabe ressaltar, no entanto, que na maioria destes estudos a detecção do acúmulo de proteína não foi empreendida. Alguns estudos bioquímicos têm demonstrado, em contrapartida, que a atividade catalítica de determinadas pUCPs pode ser ativada sem a necessidade

de um correspondente aumento na expressão gênica e acúmulo de proteína, sugerindo o envolvimento de mecanismos de regulação pós-transcricionais e/ou traducionais (Trono *et al.*,2006; Pastore *et al.*,2007). Segundo esses autores, a modulação da atividade catalítica parece ocorrer em resposta a ativadores específicos (EROS, ácidos graxos) que não afetariam a taxa de transcrição do gene relacionado. Tais discrepâncias sugerem um padrão complexo de regulação das pUCPs que requer uma investigação mais aprofundada.

Na busca de um maior entendimento sobre a ativação transcricional dos genes que codificam pUCPs em *Arabidopsis thaliana*, as seqüências promotoras de dois desses genes (*AtUCP1* e *2*) foram clonadas em nosso laboratório, fusionadas ao gene repórter GUS (que codifica a β -Glucuronidase) e inseridas estavelmente em plantas de tabaco (linhagens AtP1 e AtP2; Fávaro, 2008). Cabe ressaltar que as referidas regiões promotoras foram selecionadas para caracterização funcional em função da grande quantidade de dados relativos à expressão desses genes acumulada na literatura.

No presente estudo, plântulas das referidas linhagens transgênicas foram submetidas a tratamentos de baixa temperatura, ABA e Manitol, com posterior quantificação de GUS, a fim de verificar a existência de controle transcricional a partir dos referidos promotores. A escolha desses estresses foi feita com base em resultados anteriores obtidos em nosso grupo (Fávaro, 2008) e em relatos da literatura demonstrando uma expressão diferencial dos genes *AtUCP1* (indução) e *AtUCP2* (repressão) em resposta a baixas temperaturas (Maia *et al.*,1998; Watanabe *et al.*, 1999; Borecký *et al.*, 2006). Da mesma maneira, evidências na literatura sugerem que a expressão de alguns genes que codificam pUCPs é induzida pelo fitohormônio ABA (ácido abscísico) (Seki *et al.*, 2002).

Os resultados preliminares obtidos não evidenciaram alterações na atividade GUS (Figura 5) quando plântulas da linhagem AtP1 (contendo o promotor do gene *AtUCP1*) foram expostas à baixa temperatura (4°C). Esse dado não corrobora resultados anteriores que demonstram uma indução da expressão do gene *AtUCP1* em resposta a baixa temperatura (Maia *et al.*, 1998; Borecký *et al.*, 2006). Já nenhuma atividade GUS foi detectada quando extratos das plântulas da linhagem AtP2 (contendo o promotor do gene *AtUCP2*) expostas à baixa temperatura foram empregados, o que é indicativo de baixa expressão.

Dados da literatura demonstram que alguns genes que codificam pUCPs também são induzidos em diferentes situações de estresse incluindo os estresses salino e osmótico. Segundo Trono e colaboradores (2006), plântulas jovens de trigo quando submetidas a estresse salino ou osmótico não demonstraram um relevante aumento no nível de expressão gênica das duas isoformas de pUCPs presentes no trigo. Entretanto, um aumento na atividade desacopladora dos produtos gênicos correspondentes foi observado, indicando que o estresse em questão deve modular a atividade e não a expressão dos genes relacionados. De maneira similar, nenhuma diferença significativa foi encontrada na atividade GUS em plântulas tratadas com manitol, um agente indutor de estresse osmótico. Esses resultados corroboram os dados obtidos por Fávoro (2008) que não constatou alterações no perfil de expressão dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* em *A. thaliana* tratadas com manitol.

Dados de expressão gênica em larga escala evidenciam que a expressão de alguns genes que codificam pUCPs é induzida pelo fitohormônio ABA (ácido abscísico). O ABA é um hormônio vegetal que desempenha um importante papel na defesa de muitas espécies vegetais, sendo relacionado com a proteção das plantas

a estresse hídrico, dormência das sementes e da gema. Em *Arabidopsis*, Seki e colaboradores (2002) evidenciaram, empregando análises de microarranjo, a indução de duas isoformas da AtUCP, denominadas respectivamente *AtUCP4* e *AtUCP5*, em resposta ao tratamento com ABA. Em 2008, análises de qPCR foram realizadas com o objetivo de verificar a indução dos diferentes genes que codificam pUCP em *Arabidopsis* (*AtUCP1-6*) em resposta a diferentes tratamentos. Os resultados obtidos revelam que as isoformas *AtUCP2*, *AtUCP5* e *AtUCP6* são induzidas pelo ABA (Fávaro, 2008). Por outro lado, os resultados aqui obtidos não mostraram alterações significativas na atividade GUS mediante tratamento das plântulas com ABA.

As discrepâncias observadas podem estar relacionadas a dois principais fatores que requerem melhor investigação: tamanho da região promotora clonada (2085 pb para o promotor do gene *AtUCP1* e 2016 pb para o promotor do gene *AtUCP2*) e ausência de elementos *cis*-regulatórios no tabaco. Além disso, cabe ressaltar que todas as análises descritas foram realizadas empregando plântulas da geração R1, fato que pode ter interferido nos resultados tornando-os inconstantes.

VI – Conclusões

Em condições de estresse, as sementes das linhagens transgênicas de tabaco expressando de maneira constitutiva o gene *AtUCP1* de *Arabidopsis thaliana* apresentam uma maior tolerância ao estresse salino e osmótico, fato confirmado pela maior inibição do crescimento radicular das plântulas da linhagem não transgênicas quando comparada com as plântulas das linhagens transgênicas.

Plântulas não transgênicas submetidas aos estresses salino e osmótico acumulam mais superóxido que as plântulas das linhagens transgênicas, indicando que tolerância observada está relacionada a uma menor acumulação de EROs nas linhagens com expressão constitutiva do gene *AtUCP1*.

Plântulas transgênicas contendo os promotores dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* fusionadas ao gene GUS não apresentaram diferenças significativas no perfil de expressão quando expostas ao fitohormônio ABA e aos estresses por baixa temperatura e osmótico.

VII - REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; KHOMSI, H.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit, **Plant Physiol**, v.119, p.1323-1329, 1999.

ANDRONIS, E.A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Short-term salinity stress in tobacco plants leads to the onset of animal-like PCD hallmarks in planta in contrast to long-term stress, **Planta**, v.2, p.437-448, 2010.

ARGYROPOULOS, G.; HARPER, M-E. Molecular Biology of Thermoregulation. Invited review: uncoupling proteins and thermoregulation, **J Appl Physiol**, v.92, p.2187-2198, 2002.

BARTELS, D. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance?, **Trends Plant Sci**, v. 6, p.284–286, 2001.

BARTOLI, C.G.; GÓMEZ, F.; MARTÍNEZ, D.E.; GUIAMET, J.J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.), **J Exp Bot**, v.403, p.1663-1669, 2004.

BEAVIS, A.D. AND VERCESI, A.E. Anion uniport in plant – mitochondria is mediated by a Mg²⁺ – insensitive inner membrane anion channel, **J. Biol. Chem**, v. 267, p. 3079–3087, 1992.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K.V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems, **Physiol Plant**, v.138, p.447-462, 2010.

BORECKÝ J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P. Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants, **Biosci Rep**, v.21, p.201-212, 2001.

BORECKÝ, J.; NOGUEIRA, F.T.S.; DE OLIVEIRA, K.A.P.; MAIA, I.G.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots, **J Exp Bot**, v.57, p.849-864, 2006.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide, **J. Biochem**, v.128, p.617-630, 1973.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding, **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRANDALISE, M.; MAIA, I.G.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. ZmPUMP encodes a maize mitochondrial uncoupling protein that is induced by oxidative stress, **Plant Sci**, v.165, p.329-335, 2003a.

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 Biomembr Bioenerg.**, v.35, p.203-209, 2003b.

CARROLL, A.M.; HAINES, L.R.; PEARSON, T.W.; FALLON, P.; WALSH, C.; BRENNAN, C.M.; BREEN, E.P.; PORTER, R.K. Identification of a Functioning Mitochondrial Uncoupling Protein 1 in Thymus, **J Biol Chem**, v.280, p.15534-15543, 2005.

CAVALHEIRO, R.A.; FORTES, F.; BORECKÝ, J.; FAUSTINONI, V.C.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*, **Br J Med Biol Res**, v.37, p.1455–1461, 2004.

CHEONG, Y.H.; CHANG, H.S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*, **Plant Physiol**, v.129, p.661–677, 2002.

CHERRY, J.H. Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in Plants, **Berlin: Springer-Verlag**, v.86, p.604, 1994.

COSIDINE, 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.

DLASKOVÁ, A.; ŠPACEK, T.; ŠKOBISOVÁ, E.; ŠANTOROVÁ, J.; JEŽEK, P. Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling proteins in vitro and in vivo, **Biochim Biophys Acta**, v.1757, p.467-473, 2006.

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

ERLANSON-ALBERTSSON, C.; The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism, **Acta Physiol Scand**, v.178, p.405-412, 2003.

FÁVARO, R.D. Análise bioquímica, estudos da relação estrutura-função e de expressão da proteína desacopladora mitocondrial de plantas. 2008. 94p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C.; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M.F.; SURWIT, R.S.; RICQUIER, D.; WARDEN, C.H. Uncoupling protein2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia, **Nat Genet**, v.15, p.269-272, 1997.

FRIDELL, Y-W.C.; SÁNCHEZ-BLANCO, A.; SILVIA, B.A.; HELFAND, S.L. Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein, **J Bioenerg Biomembr**, v.36, p.219–228, 2004.

GARLID, K.D.; JABUREK, M.; JEŽEK, P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins, **FEBS Lett**, v.438, p.10-14, 1998.

GARLID, K.D.; JABUREK, M.; JEŽEK, P.; VARECHA, M. How do uncoupling proteins uncouple?, **Biochim Biophys Acta**, v.1459, p.383-389, 2000.

GARLID, K.D.; OROSZ, D.E.; MODRIANSKÝ, M.; VASSANELLI, S.; JEŽEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein, **J Biol Chem**, v.271, p.2615-2620, 1996.

GIMENO, R.E.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; SHYJAN, A.W.; GIMENO, C.J.; IRIS, F.; ELLIS, S.J.; WOOLF, E.A.; TARTAGLIA, L.A. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis, **Diabetes**, v.46, p.900-906, 1997.

GOGLIA, F.; SKULACHEV, V.P. A function for novel uncoupling proteins: Antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet, **J. FASEB**, v. 17, p.1585-1591, 2003.

HOURON-CABASSA, C.; MESNEAU, A.; MIROUX, B.; ROUSSAUX, J.; RICQUIER, D.; ZACHOWSKI, A.; MOREAU, F. Alteration of plant mitochondrial proton conductance by free fatty acids. Uncoupling protein involvement, **J. Biol. Chem**, v.277, p.41533-41538, 2002.

HUSSEINI, N.M. Análise da expressão dos genes que codificam a proteína mitocondrial desacopladora em *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP1-6*), estudos in vivo empregando plantas transgênicas e mapeamento do sinal de endereçamento da proteína AtUCP1. 2008. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ITO, K. Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*), **Plant Sci**. v.149, p.167-173, 1999.

ITO, K.; ABE, Y.; JOHNSTON, S.D.; & SEYMOUR, R.S. Ubiquitous expression of a gene encoding for uncoupling protein isolated from the thermogenic inflorescence of the dead horse arum *Helicodiceros muscivorus*, **J Exp Bot**, v.54, p.1113-1114, 2003.

JARMUSZKIEWICZ, W.; ALMEIDA, A.M.; SLUSE-GOFFART, C.M.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration, **J Biol Chem**, v.273, p.34882-34886, 1998.

JARMUSZKIEWICZ, W.; BEHRENDT, M.; NAVET, R.; SLUSE, F.E. Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties

and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development, **FEBS Lett**, v.532, p.459–464, 2002.

JARMUSZKIEWICZ, W.; MILANI, G.; FORTES, F.; SCHREIBER, A.Z.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*, **FEBS Lett**, v.467, p.145–149, 2000.

JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; HRYNIEWIECKA, L.; SLUSE, F.E. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*, **J Biol Chem**, v.274, p.23198–23202, 1999.

JEŽEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, 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.

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

KELLER, P.A.; LEHR, L.; GIACOBINO, J.P.; CHARNAY, Y.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.; GIOVANNINI, N. Cloning, ontogenesis, and localization of an atypical uncoupling protein 4 in *Xenopus laevis*, **Physiol. Genomics**, v.22, p.339–345, 2005.

KIM-HAN, J.S.; REICHERT, S.A.; QUICK, K.L.; DUGAN, L.L. BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production, **J. Neurochem**, v.79, p.658–668, 2001.

KLINGENBERG, M.; ECHTAY, K.S. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view, **Biochim Biophys Acta**, v.1504, p.128–143, 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.J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHOB, R.F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v.47, p. 333–343, 2009.

KRAUSS, S.; ZHANG, C.Y.; LOWELL, B.B. The mitochondrial uncoupling protein homologues, **Nature Reviews**, v.6, p.248–261, 2005.

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

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

LEVITT, J. Stress and strain terminology. In LEVITT, J Chilling, freezing and high temperature stress, **Academic press**, v.1, p.3–10, 1981.

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

MAO, W.; XING, Y.X.; ZHONG, A.; LI, W.; BRUSH, J.; SHERWOOD, S.W.; ADAMS, S.H.; PAN, G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells, **FEBS Letters**, v. 443, p. 326-330, 1999.

MATTIASSON, G.; SULLIVAN, P.G. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics, **Antioxid. Redox Signal**, v.8, p.1-38, 2006.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, **Trends Plant Sci**, v.9, p.405-10, 2002.

MIZUNO, T.; MIURA-SUZUKI, T.; YAMASHITA, H.; MORI, N. Distinct regulation of brain mitochondrial carrier protein-1 and uncoupling protein-2 gene in rat brain during cold exposure and aging, **Biochem Biophys Res Commun**, v.278, p.691-697, 2000.

MOZO, J.; EMRE, Y.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; CRISCUOLO, F. Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds, **Biosci. Rep**, v.25, p.227-249, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiol Plant**, v.15, p.473-497, 1962.

MURAYAMA, S.; HANDA, H. Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondria uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature, **Mol Gen Genet**, v.264, p.112-118, 2000.

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

NEDERGAARD, J. AND CANNON, B. The novel uncoupling proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions, **Exp Physiol**, v.88, p.65-84, 2003.

NEGRE-SALVAYRE, A.; HIRTZ, C.; CARRERA, G.; CAZENAVE, R.; TROLY, M.; SALVAYRE, R.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation, **J FASEB**, v. 11, p. 809-815, 1997.

NIBBELINK, M.; MOULIN, K.; ARNAUD, E.; DUVAL, C.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells, **J Biol Chem**, v.276, p.47291–47295, 2001.

NICHOLLS, D.G. A history of UCP1, **Biochem Soc Trans**, v.29, p.751-755, 2001.

NICHOLLS, D.G.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1, **J Bioenerg Biomembr**, v.31, p.399-406, 1999.

NOGUEIRA, F. T. S.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A. E.; ARRUDA, P. Genomic structure and regulation of mitochondrial uncoupling protein genes in mammals and plants. **Bioscience Reports**, v.25, p.209-26, 2005.

NOGUEIRA, F.T.S. Identificação e Caracterização de Genes Expressos em Resposta ao Estresse por Baixas Temperaturas em Cana-de-açúcar. 2004. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

ONDA, Y.; KATO, Y.; ABE, Y.; ITO, T.; MOROHASHI, M.; ITO, Y.; ICHIKAWA, M.; MATSUKAWA, K.; KAKIZAKI, Y.; KOIWA, H.; ITO, K. Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage, **Plant Physiol**, v.146, p.636-645, 2008.

PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria, **FEBS Letters**, v.470, p.88-92, 2000.

PASTORE, D.; TRONO, D.; LAUS, M.N.; DI FONZO, N.; FLAGELLA, Z. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria, **J. Exp. Bot.**, v.58, p.195-210, 2007.

PECQUEUR, C.; BUI, T.; GELLY, C.; HAUCHARD, J.; BARBOT, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; MIROUX, B.; THOMPSON, C.B. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization, **FASEB J.**, v.22, p.9-18, 2008.

POPOV, V.N.; SIMONIAN, R.A.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria, **FEBS Letters**, v.415, p. 87-90, 1997.

RAIMBAULT, S.; DRIDI, S.; DENJEAN, F.; LACHUER, J.; COUPLAN, E.; BOUILLAUD, F.; BORDAS, A.; DUCHAMP, C.; TAOUIS, M.; RICQUIER, D. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds, **Biochem J**, v.353, p.441–44, 2001.

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.

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

SANCHIS, D.; FLEURY, C.; CHOMIKI, N.; GOUBERN, M.; HUANG, Q.; NEVEROVA, M.; GRÉGOIRE, F.; EASLICK, J.; RAIMBAULT, S.; LÉVIMEYRUEIS, C.; MIROUX, B.; COLLINS, S.; SELDIN, M.; RICHARD, D.; WARDEN, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast, **J Biol Chem**, v.273, p.34611-34615, 1998.

SEKI, M.; ISHIDA, J.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; NANJO, T.; UMEZAWA, T.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray, **Funct. Integr Genomics**, v.2, p.282-291, 2002.

SKOPELITIS, D.S.; PARANYCHIANAKIS, N.V.; PASCHALIDIS, K.A.; PLIAKONIS, E.D.; DELIS, I.D.; YAKOUMAKIS, D.I.; KOUYARAKIS, A.; PAPADAKIS, A.K.; STEPHANOY, E.G.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine, **Plant Cell**, v. 10, p. 2767-2781, 2006.

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

STUART, J.A.; HARPER, J.A.; BRINDLE, K.M.; BRAND, M.D. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates, **Biochim Biophys Acta**, v.1413, p.50–54, 1999.

SWEETLOVE, L.J.; LYTOVCHENKO, A.; MORGAN, M.; NUNES-NESE, A.; TAYLOR, N.L.; BAXTER, C.J.; EICKMEIER, I.; FERNIE, A.R. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, p.19587-19592, 2006.

SWIDZINSKI, J.A.; SWEETLOVE, L.J.; LEAVER, C.J. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*, **Plant J**, v.30, p.431–446, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3a edição. Artmed, 2006. 720p.

TALBOT, D.A.; HANUISE, N.; REY, B.; ROUANET, J-L.; DUCHAMP, C.; BRAND, M.D. Superoxide activates a GDP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes patagonicus*), **Biochem Biophys Res Commun**, v.312, p.983–988, 2003.

TRONO, D.; SOCCIO, M.; MASTRANGELO, A.M.; DE SIMONE, V.; DI FONZO, N.; PASTORE, D. The transcript levels of two plant mitochondrial uncoupling protein (pUCP) – related genes are not affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings showing an increased level of pUCP activity, **Biosci Rep**, v.26, p.251-261, 2006.

- UYEMURA, S.A.; LUO, S.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria, **J Biol Chem**, v.275, p.9709–9715, 2000.
- VAN WEES, S.C.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; GLAZEBROOK, J. Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling, **Plant Physiol**, v.132, p.606–617, 2003.
- VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.P.A.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants, **Nature**, v. 375, p. 24-25, 1995.
- VERCESI, A.E.; BORECKÝ, J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. Plant uncoupling mitochondrial proteins, **Annu Rev Plant Biol**, v. 57, p.385-404, 2006.
- VERCESI, A. E. Mitocôndria: ATP, calor e morte celular, **Ciência hoje**, v.34, p.16-23, 2003.
- VIANNA, C.R.; HAGEN, T.; ZHANG, C-Y.; BACHMAN, E.; BOSS, O.; GEREBEN, B.; MORISCOT, A.S.; LOWELL, B.B.; BICUDO, J.E.; BIANCO, A.C. Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds, **Physiol Genomics**, v.5, p.137–45, 2001.
- 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 heatgenerating proteins of the subtropical cereal, **Planta**, v.215, p.90-100, 2002.
- WATANABE, A.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A. AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*, **Plant Cell Physiol**, v.40, p.1160-1166, 1999.
- WHITHAM, S.A.; QUAN, S.; CHANG, H.S.; COOPER, B.; ESTES, B.; ZHU, T.; WANG, X.; HOU, Y-M. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants, **Plant J**, v.33, p.271–283, 2003.
- WINKLER, E.; KLINGENBERG, M. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein, **J Biol Chem**, v.269, p.2508-2515, 1994.
- YU, X.X.; MAO, W.; ZHONG, A.; SCHOW, P.; BRUSH, J.; SHERWOOD, S.W.; ADAMS, S.H.; PAN, G. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation, **FASEB J**, v.14, p.1611-1618, 2000.
- ZHU, J-K. Plant salt tolerance, **Trends in Plant Science – Review**, v. 6, 2000.