

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



LUCAS FRUNGILLO LIMA

“MODULAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL PELA S-NITROSOGLUTATIONA REDUTASE EM RESPOSTA AO ESTRESSE NUTRICIONAL EM SUSPENSÕES CELULARES DE *Arabidopsis thaliana*”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) LUCAS FRUNGILLO LIMA
Ione Salgado
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F943m Frungillo, Lucas
Modulação da atividade mitocondrial pela S-nitrosoglutathione redutase em resposta ao estresse nutricional em suspensões celulares de *Arabidopsis thaliana* / Lucas Frungillo Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ione Salgado.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Óxido nítrico. 2. S-nitrosoglutathione. 3. S-nitrosoglutathione redutase. 4. Plantas - Mitocôndria. 5. Bioenergética. I. Salgado, Ione, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in response to nutritional stress in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions.

Palavras-chave em inglês: Nitric oxide; S-nitrosoglutathione; S-nitrosoglutathione reductase; Plant mitochondria; Bioenergetic.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Ione Salgado, Ivan de Godoy Maia, Michel Georges Albert Vincentz.

Data da defesa: 07/07/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 07 de julho de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ione Salgado (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Assinatura

Profa. Dra. Márcia Regina Braga

Assinatura

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Assinatura



Of. CIBio/IB 02/2009.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
16 de março de 2009.

Prof. Dr. CARLOS ALFREDO JOLY
Chefe do Departamento de Biologia Vegetal
Instituto de Biologia - UNICAMP

Prezada Professora:

Informamos que o projeto abaixo relacionado, envolvendo OGM do tipo I, sob responsabilidade do **Profa. Dra. Ione Salgado**, protocolado sob o número **2008/05**, foi aprovado pela CIBio-IB/Unicamp em sua 46ª. Reunião Ordinária, realizada no dia 16 de março de 2009, para ser desenvolvido nas dependências do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp:

No. Projeto (data da aprovação)	Data de recepção	Nome do Projeto	Prazo para envio de relatório à CIBio
2008/05 (16/03/2009)	26/11/2008	Estudo do efeito da elevação dos níveis endógenos de óxido nítrico nas características funcionais de mitocôndrias vegetais	Fevereiro/2010

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes transporte e contenção da OGMs, disponíveis na webpage da CTNBio <www.ctnbio.gov.br>.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Helena C. F. Oliveira".

Helena C. F. Oliveira
Presidente da CIBio-IB-Unicamp

C/C.: Profa. Dra. Ione Salgado (2ª. via emitida 31/08/2009)

**“Não importa o que fazem com você.
O que importa é o que você faz com o que fazem com você.”**

Jean Paul Sartre

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à Deus, por permitir o meu desenvolvimento pessoal, desenvolvimento no qual esse trabalho de alguma forma se insere.
- Aos meus pais João Candido e Maria José, por me formarem como pessoa e estudante de uma forma melhor do que a forma que puderam.
- À minha irmã, pela presença incondicional. Um exemplo ao irmão mais velho.
- À Livia, por mostrar que as idéias de planos platônicos estavam erradas.
- Aos meus avós, pela presença em minha infância, adolescência e sempre.
- Aos meus padrinhos, pelas conversas e conselhos sempre que precisei.
- À todos os meus familiares que participaram de alguma forma na construção do que sou hoje.
- Aos meus amigos, pelos momentos de descontração tão necessários. Em especial aos amigos que nunca se vão.
- À Prof.Dr. Ione Salgado, por todo apoio, incentivo e dedicação nestes anos de trabalho.
- Estendo meus agradecimentos aos companheiros de trabalho no Laboratório de Bioquímica de Plantas, Halley, Plínio, Pablo, Simone. Em especial à Jusceley e Elzira, que muito ajudaram no desenvolvimento do trabalho e de minha formação.
- Aos professores Dr. Paulo Mazzafera e Dra. Fernanda Ramos Gadelha pelas sugestões e disponibilidade.
- Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Embora o radical óxido nítrico (NO) seja um importante sinalizador em plantas, pouco se conhece sobre os mecanismos que controlam sua homeostase na célula. Acredita-se que a enzima *S*-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) tenha um papel relevante no metabolismo de *S*-nitrosotióis (SNO), e conseqüentemente na homeostase do NO, através do catabolismo da *S*-nitrosoglutationa (GSNO). Apesar de a mitocôndria ser um importante alvo do NO, o papel da GSNOR na funcionalidade de mitocôndrias vegetais ainda não foi descrito. Este trabalho teve como objetivo caracterizar mitocôndrias isoladas a partir de cultura celular líquida de *Arabidopsis thaliana* transgênicas com maior (L1) e menor (L5) expressão da GSNOR em relação ao tipo selvagem. O conteúdo de *S*-nitrosotióis e peróxido de hidrogênio e a emissão de NO, determinados espectrofotometricamente e fluorimetricamente com DAF-2, respectivamente, foram comparados entre células nas fases de crescimento linear (5 dias de cultivo) e estacionária (10 dias de cultivo; estresse nutricional). O consumo de oxigênio e a degradação de NO por mitocôndrias isoladas nas diferentes fases de cultivo celular foram determinados com eletrodos específicos. Na fase linear o L1 apresentou menor (81%) e o L5 maior (162%) conteúdo de *S*-nitrosotióis, em relação ao tipo selvagem. Na fase estacionária o conteúdo de *S*-nitrosotióis foi reduzido e o padrão foi invertido. A emissão de NO pelas células após 5 dias de cultivo foi maior no L5 e não diferiu estatisticamente entre o L1 e o selvagem. Após 10 dias de cultivo os três genótipos apresentaram incremento na emissão de NO, porém o L5 apresentou menor emissão que os outros genótipos. Após 5 dias de cultivo microcalos dos transgênicos L1 e L5 apresentaram menor conteúdo de peróxido de hidrogênio que o tipo selvagem. Porém, em uma condição de estresse nutricional o conteúdo de peróxido de hidrogênio foi estatisticamente igual para todos os genótipos. Ensaio com mitocôndrias isoladas mostraram que o transgênico L1 foi o único incapaz de aumentar a atividade da oxidase alternativa (AOX) e teve as atividades do complexo I e da NADH desidrogenase externa inibidas na situação de estresse. O L5 apresentou maior atividade da NADH desidrogenase externa de modo constitutivo e da proteína desacopladora (UCP) no décimo dia. Ainda, na situação de estresse a capacidade de degradação de NO foi aumentada nos transgênicos L1 e L5. Entretanto, o L5 apresentou maior resistência à inibição da respiração provocada pelo NO, provavelmente devido a maior atividade da AOX. O conjunto dos resultados sugere um importante papel da GSNOR em controlar as alterações funcionais de mitocôndrias de *A. thaliana* mediadas por NO.

ABSTRACT

Although the radical nitric oxide (NO) is an important sign in plants, little is known about the mechanisms that control its homeostasis in cell. It is believed that the enzyme S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) has an important role in the metabolism of S-nitrosothiols (SNO), and consequently of NO homeostasis through catabolism of S-nitrosogluthathione (GSNO). Although mitochondria are an important target of NO, the role of GSNOR on plant mitochondria functionality has not been described yet. This study aimed to characterize mitochondria isolated from liquid cell culture of transgenic *Arabidopsis thaliana* with higher (L1) and lower (L5) GSNOR expression relative to wild type. The content of S-nitrosothiols and hydrogen peroxide and the NO emissions, determined spectrophotometrically and fluorimetric with DAF-2, respectively, were compared between cells in the linear (5 days culture) and stationary (10 days culture, nutritional stress) growth phases. Oxygen uptake and NO degradation by mitochondria isolated at different stages of cell culture were determined with specific electrodes. In the linear phase L1 showed lower (81%) and L5 increased (162%) content of S-nitrosothiols compared to wild type. At stationary phase S-nitrosothiols contents has been reduced and the pattern was reversed. The emission of NO by the cells after 5 days of culture was higher in L5 and do not statistically different between the L1 and wild type. At 10 days culture the genotypes showed an increase in the NO emission, but L5 showed lower emissions than the other genotypes. At 5 culture transgenic lines L1 and L5 showed a lower content of hydrogen peroxide than the wild type. However, in a condition of nutritional stress, the content of hydrogen peroxide was statistically the same for all genotypes. Tests with isolated mitochondria showed that transgenic L1 was the only one unable to increase the activity of alternative oxidase (AOX) and had the activities of complex I and NADH dehydrogenase at stress. The L5 showed a constitutive higher activity of the external NADH dehydrogenase and uncoupling protein (UCP) activity at the tenth day. Furthermore, NO degradation capability by mitochondria at nutritional stress situation of NO was increased in transgenic L1 and L5. However, L5 mitochondria showed greater resistance to respiration inhibition caused by NO, probably due to increased activity of AOX. The overall results suggest an important GSNOR role in controlling the mitochondria functional changes of *A. thaliana* mediated by NO.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Óxido nítrico.....	2
1.2 Bioenergética vegetal.....	9
1.3 Modelo vegetal para estudo.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Reagentes.....	19
3.2 Material vegetal.....	19
3.3 Quantificação do conteúdo de S-nitrosotióis totais.....	20
3.4 Quantificação da emissão de óxido nítrico.....	21
3.5 Quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio.....	21
3.6 Preparação da suspensão mitocondrial.....	22
3.7 Medida do consumo de oxigênio e óxido nítrico pelas suspensões mitocondriais.....	23
3.8 Atividade respiratória.....	23
3.9 Determinação do controle respiratório.....	24
3.10 Determinação da atividade da oxidase alternativa.....	24
3.11 Análise de dados.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Caracterização da cultura líquida de microcalos.....	26
4.1.1 Estabelecimento da cultura líquida.....	26
4.1.2 Quantificação do conteúdo de S-nitrosotióis totais.....	27
4.1.3 Quantificação da emissão de óxido nítrico.....	29
4.1.5 Quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio.....	30
4.2 Caracterização de mitocôndrias isoladas a partir de microcalos.....	31
4.2.1 Análise do controle respiratório.....	31
4.2.2 Modulação da atividade da oxidase alternativa.....	34
4.2.3 Análise das velocidades de consumo de oxigênio.....	36
4.2.4 Análise da degradação do óxido nítrico.....	39
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	51
7. BIBLIOGRAFIA.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenóxiacético

ADH2: álcool desidrogenase 2

Anti-A: antimicina-A

AOX: oxidase alternativa

BSA: albumina de soro bovino

cDNA: DNA complementar

CitC: citocromo c

Complexo I: NADH-coenzima Q redutase

Complexo II: succinato-coenzima Q redutase

Complexo III: ubiquinol-citocrome C redutase

CoQ: coenzima Q

COX: citocromo C oxidase

CR: controle respiratório

CTE: cadeia transportadora de elétrons

DAF-2: 4,5-diaminofluoriceína

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA: ácido etileno glicol tetra-acético

eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial

FALDH: desidrogenase de formaldeído glutaciona dependente

GAL: n-propil galato

GSH/GSSG: glutaciona reduzida/oxidada

GSNO: S-nitrosoglutaciona

GSNOR: redutase de S-nitrosoglutaciona

HEPES: N-(2-hidroxietil)-1-piperazina-N-(ácido 2-etanosulfônico)

HR: resposta hipersensitiva

iNOS: sintase de óxido nítrico induzida

iRNA: RNA de interferência

MAL: malato

MS: meio básico de Murashige & Skoog

MT: vitaminas de Murashige & Tucker
nNOS: sintase de óxido nítrico neuronal
NO: óxido nítrico
NO⁻: íon nitroxil
NO⁺: íon nitrosônio
NO₂⁻: nitrito
NO₂: dióxido de nitrogênio
NOS: sintase de óxido nítrico
NR: redutase de nitrato
O₂⁻: ânion superóxido
ONOO⁻: peróxinitrito
RNS: espécies reativas de nitrogênio
ROS: espécies reativas de oxigênio
SAR: resistência sistêmica adquirida
SNO: S-nitrosotiol
SOD: superóxido dismutase
UCP: proteína desacopladora

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações químicas características do NO.....	3
Figura 2. Modificações pós-traducionais mediadas por NO	4
Figura 3. Formação e degradação do GSNO	7
Figura 4. Modelo esquemático da cadeia transportadora de elétrons	10
Figura 5. Perfil de crescimento celular em função do tempo cultivo de <i>A. thaliana</i> selvagem e dos transgênicos L1 e L5	27
Figura 6. Conteúdo de SNO totais em microcalos dos genótipos selvagem, L1 e L5 em cultura líquida após 5 e 10 dias de cultivo	28
Figura 7. Emissão de NO a partir de microcalos dos diferentes genótipos em cultura líquida após 5 e 10 dias de cultivo	29
Figura 8. Conteúdo de H ₂ O ₂ de microcalos dos diferentes genótipos em cultura líquida após 5 e 10 dias de cultivo	31
Figura 9. Valores de controle respiratório (CR) de mitocôndrias isoladas a partir de microcalos do tipo selvagem (A) e dos transgênicos L1 (B) e L5 (C) com 5 e 10 dias de cultivo	33
Figura 10. Traçados representativos dos valores de controle respiratório (CR) de mitocôndrias isoladas a partir de microcalos do tipo selvagem (A) e dos transgênicos L1 (B) e L5 (C) após 10 dias de cultivo	34
Figura 11. Modulação da atividade da AOX em mitocôndrias isoladas dos genótipos selvagem, L1 e L5.....	35
Figura 12. Traçados representativos da atividade da AOX em mitocôndrias isoladas dos genótipos selvagem (A), L1 (B) e L5 (C), após 10 dias de cultivo celular	35
Figura 13. Velocidades de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas dos genótipos selvagem, L1 e L5.....	38
Figura 14. Degradação do NO por mitocôndrias isoladas a partir da cultura líquida de microcalos do transgênico L1 após 5 dias (A) e 10 dias (B) de cultivo	41
Figura 15. Degradação do NO por mitocôndrias isoladas a partir da cultura líquida de microcalos do transgênico L5 após 5 dias (A) e 10 dias (B) de cultivo	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Óxido nítrico

O radical livre óxido nítrico (NO, monóxido de nitrogênio) é um importante sinalizador em todos os organismos superiores (Neil *et al.* 2008; Leiper *et al.* 2011). Sua primeira menção na literatura com ação sinalizadora foi em 1987, quando Palmer e colaboradores (1987) sugeriram que o NO seria o fator de relaxamento derivado do endotélio. Desde então, o NO tem sido relacionado a diversos processos metabólicos e fisiológicos em mamíferos, tais como o controle da pressão sanguínea, a contração muscular, a atividade neuronal e a resposta imune (revisado por Gao, 2010).

Em plantas, o NO também tem sido descrito como uma importante molécula sinalizadora endógena que medeia vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, como a germinação (Beligni e Lamattina, 2000; Bethke *et al.*, 2006), gravitropismo (Hu *et al.*, 2005), desenvolvimento do xilema (Gabaldon *et al.*, 2005), movimento estomático (Garcia-Mata *et al.*, 2003), transição e desenvolvimento floral (He *et al.*, 2004; Seligman *et al.*, 2008) e senescência (Guo e Crawford, 2005). Adicionalmente, o NO está envolvido na resposta a estresses bióticos e abióticos através da indução da resposta hipersensitiva (HR), ativação de genes de defesa e indução da produção de compostos antimicrobianos (Delledonne *et al.*, 2001; Modolo *et al.*, 2005).

A diversidade de efeitos do NO em processos metabólicos e fisiológicos é um reflexo de suas propriedades físico-químicas¹. O NO possui um elétron desemparelhado e pode ser reduzido ou oxidado, formando NO⁻ (íon nitroxil) ou NO⁺ (íon nitrosônio), respectivamente. Cada uma destas espécies reativas de nitrogênio é capaz de interagir diferentemente com moléculas biológicas (Gow e Ischiropoulos, 2001). O NO pode também reagir com o O₂ atmosférico produzindo nitrito (NO₂⁻, Wink *et al.*, 1996) e outras espécies reativas de nitrogênio, como o dióxido de nitrogênio (NO₂), ou com o ânion superóxido (O₂⁻) formando peroxinitrito (ONOO⁻, Radi *et al.*,

¹ A bioquímica do NO se mostra bastante complexa, abrangendo diversas reações potenciais. Uma divisão didática de seus efeitos, a fim de auxiliar na compreensão, é comumente feita entre diretos e indiretos. Esta divisão permite a consideração de tempo, local e fluxo de síntese do NO e seus alvos potenciais. De forma geral os efeitos diretos são reflexos da reação direta do NO com moléculas biológicas ou outros possíveis alvos; enquanto que os efeitos indiretos são mediados por moléculas derivadas do NO, como o ONOO⁻. Considera-se que os efeitos diretos sejam prevalentes em situações fisiológicas normais, já os efeitos indiretos em situações de estresse, quando há maior síntese do NO.

2002). Devido a sua baixa solubilidade, o óxido nítrico é altamente móvel nos sistemas celulares, se difundindo livremente através de membranas e pode facilmente vaporizar-se (Mur *et al.*, 2006). Assim, apesar da aparente simples estrutura, suas características químicas complexas em sistemas biológicos possibilitam a formação de produtos secundários e terciários múltiplos, aumentando muito a dificuldade de compreensão dos efeitos deste radical.

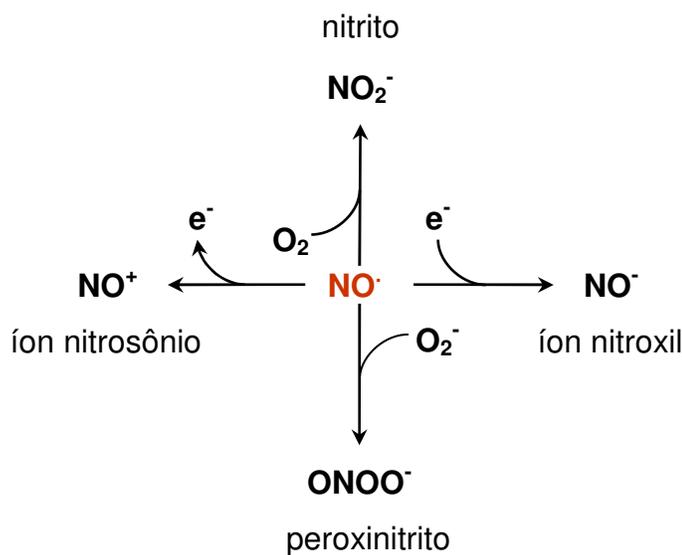


Figura 1. Reações químicas características do NO. O NO pode ser reduzido ou oxidado, formando NO^- (íon nitroxil) ou NO^+ (íon nitrosônio), respectivamente. O NO pode também reagir com o O_2 atmosférico produzindo nitrito (NO_2^-). Outra possível reação é com o ânion superóxido (O_2^-) formando o potente oxidante peroxinitrito (ONOO^-).

A função sinalizadora do NO é um reflexo de suas ações como modulador do estado redox e da atividade protéica. O NO é capaz de agir como antioxidante (reagindo com outros radicais) ou pró-oxidante (pela produção de espécies reativas de nitrogênio – Zaninotto *et al.*, 2006), alterando o estado redox celular. Já a modulação da atividade protéica pelo NO pode ser uma consequência de três tipos de reações. O NO pode reagir com o grupamento tiol (SH) de resíduos de cisteínas (Cys) presentes em proteínas, formando um S-nitrosotiol (SNO), reação chamada de S-nitrosação ou S-nitrosilação (Lindermayr *et al.*, 2005; Aracena-Parks *et al.*, 2006). Pode também se ligar

a íons metálicos de grupos heme ou centros de ferro-enzofre de proteínas, caracterizando neste caso uma reação de metal-nitrosilação (Besson-Bard *et al.*, 2008). Ainda, espécies reativas NO-relacionadas, como o peroxinitrito e o dióxido de nitrogênio, podem reagir com o átomo de carbono na posição 3 do anel fenólico de um resíduo de tirosina causando a nitração de proteínas (Zaninotto *et al.*, 2006). Devido a quantidade de reações e alvos possíveis do NO, a precisa determinação do mecanismo de ação deste radical em processos fisiológicos vegetais permanece um desafio.

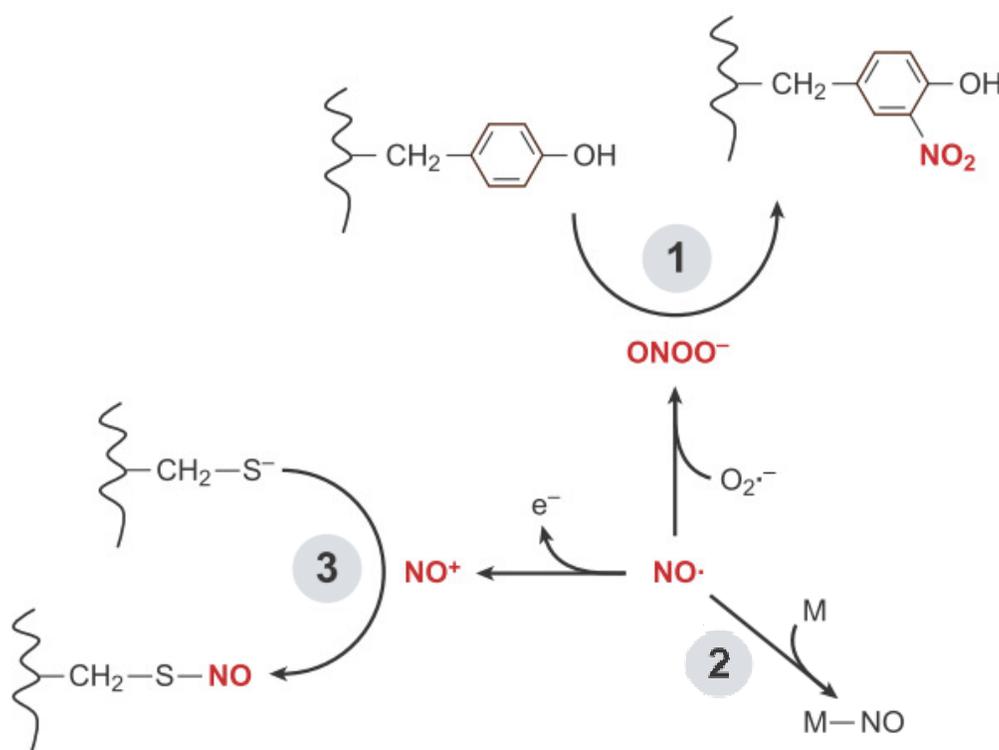


Figura 2. Modificações pós-traducionais mediadas por NO. 1. A S-nitrosilação de um resíduo de Cys em uma proteína leva a formação reversível de um SNO e é responsável pelo favorecimento ou inibição da formação de pontes dissulfeto entre os grupamentos tióis próximos. Mecanicamente, a reação de S-nitrosilação corresponde ao ataque eletrofílico do cátion nitrosônio ao grupamento tiol. Mecanismos alternativos têm sido propostos e serão discutidos oportunamente. 2. O radical NO pode doar elétrons e reagir com metais de transição. A interação covalente reversível entre o NO e centros de ferro-enzofre, grupamentos heme ou átomos de zinco presentes em proteínas leva a formação de metaloproteínas (MNO), caracterizando uma reação metal-nitrosilação. 3. A nitração de resíduos de tirosina é mediada por espécies derivadas do NO, especialmente o peróxinitrito (ONOO⁻), formadas na presença de ânion superóxido (O₂^{•-}). Essa reação é normalmente considerada irreversível, porém há controvérsias.

Adaptado de Besson-Bard *et al.*, 2008.

Um exemplo da complexa sinalização do NO em sistemas fisiológicos é sua ação moduladora da atividade da enzima redutase de nitrato (NR), uma enzima essencial no processo de assimilação de nitrogênio². Resultados recentes demonstraram que o NO é capaz de ativar a NR, porém esse efeito está inversamente relacionado com a concentração de nitrato (Jin *et al.*, 2009). Plantas de tomate pulverizadas com NO na presença de 5 mmol.L⁻¹ de nitrato apresentaram inibição da NR, enquanto que quando as plantas foram pulverizadas com NO na presença de 0,5 mmol.L⁻¹ de nitrato a atividade da NR foi estimulada. Interessantemente, quando o NO foi removido pelo concomitante fluxo de nitrogênio (N₂), o efeito modulador do NO apenas foi revertido na presença de baixa concentração de nitrato (Jin *et al.*, 2009).

A despeito de sua importância, ainda há controvérsias a respeito de como o NO é sintetizado em plantas. A NR tem sido apontada como uma enzima chave na síntese do NO. Esta síntese ocorreria através da sucessiva redução do nitrato a nitrito e, então, do nitrito a NO; ambas as reações ocorreriam através da catálise realizada pela NR (Yamasaki e Sakihama, 2000). Evidências indicam que o elétron necessário para a redução do nitrito a NO também pode ser provido pela cadeia respiratória mitocondrial (Planchet *et al.*, 2005) ou pelo sistema fotossintético (Jasid *et al.*, 2006).

Estudos de nosso grupo sugerem que durante a interação incompatível entre *Arabidopsis thaliana* e *Pseudomonas syringae* a redução de nitrito pelo sistema de transporte de elétrons mitocondrial seja o principal mecanismo responsável pela produção de NO (Modolo *et al.*, 2005). Neste caso, a NR seria responsável pelo fornecimento do substrato para esta síntese, ou seja, o nitrito. Acredita-se que a redução de nitrito a NO pela mitocôndria ocorra por ação de elétrons liberados na cadeia respiratória, já que a inibição do transporte de elétrons por mixotiazol, inibidor do complexo III, inibe tal redução, como demonstrado por nosso grupo (Wulff *et al.*, 2009).

Outra via proposta para a síntese de NO seria através de uma atividade sintase de óxido nítrico (NOS). Neste caso L-arginina seria convertida em citrulina, utilizando

² A nitrato redutase (NR) é uma importante enzima do processo de assimilação de nitrato pelas plantas. Esta enzima é responsável pela catálise da redução do nitrato (NO₃⁻) a nitrito (NO₂⁻) dependente de NAD(P)H. O nitrito é reduzido pela nitrito redutase (NiR) à amônia, que é então incorporada à estrutura dos aminoácidos através do sistema enzimático glutamina sintase-glutamina-2-oxoglutarato transaminase (GS-GOGAT).

NADPH como doador de elétrons e O₂ como co-substrato, produzindo NO e água. Em mamíferos três isoformas desta enzima foram descritas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS – revisado por Alderton *et al.*, 2001). No entanto, em plantas a existência de uma NOS permanece controversa (Guo *et al.*, 2003; ver também Zemojtel *et al.*, 2006). Recentemente foi descrito em duas espécies do gênero *Osteococcus* (algas verdes) uma enzima com atividade NOS (*O. tauri* NOS). Estudos filogenéticos da NOS de *O. tauri* demonstraram que há 45% de homologia com a NOS animal presente no endotélio (Foresi *et al.*, 2010). Interessantemente, a atividade da NOS de *O. tauri* parece ser modulada positivamente por alta irradiância luminosa. Em plantas superiores, no entanto, a enzima responsável por essa conversão ainda não foi determinada.

Atualmente a forma como o NO pode ter sua biodisponibilidade afetada pela reação com a glutathiona (GSH), um antioxidante presente em altas concentrações intracelulares (2-3 mmol.L⁻¹ em células vegetais), tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. A reação espontânea do NO com o grupamento tiol do GSH, formando S-nitrosoglutathiona (GSNO), é análoga à sua reação com resíduos de cisteína em polipeptídeos. Tem sido proposto que o GSNO apresente uma importante função na atividade regulatória do NO, agindo como um reservatório intracelular natural do NO e, particularmente, no processo de S-nitrosação³ de grupamentos tióis de proteínas através da transnitrosação (Ji *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001). A transnitrosação é uma reação caracterizada pela transferência do grupamento NO de um S-nitrosotiol para outro grupamento tiol formando S-nitrosotióis de meia vida mais longa. Um crescente número de proteínas vegetais tem sido descrito como alvos do processo reversível de nitrosação em resíduos de cisteínas (Perazzolli *et al.*, 2004; Lindermayr *et al.*, 2005, 2006; Belenghi *et al.*, 2007; Holzmeister *et al.*, 2011). Esta modificação reversível freqüentemente altera a atividade e a função enzimática e, assim, deve ocorrer em situações fisiológicas. Diferentemente, a nitração de resíduos de tirosina é uma modificação protéica permanente, favorecida em situações de altos níveis de NO e

³ Este tipo de modificação tem sido chamado de “a nova fosforilação”. Em bioquímica, fosforilação é um dos principais mecanismos de modulação covalente da atividade protéica e consiste na adição de um grupo fosfato à molécula. Porém, diferentemente da fosforilação, até o momento é desconhecido o concurso enzimático ou qualquer mediação protéica no processo de nitrosação.

espécies reativas de oxigênio (ROS); situação na qual há geração de espécies reativas de nitrogênio (RNS). O acúmulo RNS, resultantes do aumento da síntese ou da diminuição de degradação do NO, tem sido chamado de estresse nitrosativo (Ridnour, *et al.*, 2004) e a nitração de resíduos de tirosina vem sendo considerado um marcador deste estresse em animais (Ischiropoulos, 2003; Gow *et al.*, 2004) e plantas (Corpas *et al.*, 2009).

Neste contexto, a probabilidade de ocorrer a transnitrosação e, conseqüentemente, a nitrosação de proteínas é um reflexo dos níveis de GSNO intracelulares. O controle dos níveis intracelulares de GSNO é dado através de sua degradação e que é catalisada pela redutase de GSNO (Jensen *et al.*, 1998). Esta enzima apresenta duas atividades enzimáticas, sendo que a primeira a ser descrita foi a atividade formaldeído desidrogenase dependente de GSH (FALDH). De fato, tem sido proposto que a principal ação da enzima GSNOR/FALDH seja controlar os níveis de GSNO e nitrosotióis (SNO) em geral, em detrimento da desintoxicação celular por formaldeído (Liu *et al.*, 2001). A GSNOR cataboliza GSNO para uma mistura, dependendo das condições, de GSSG, hidroxilamina, NH₃ e GSH (Jensen *et al.*, 1998). O resultado da ação desta enzima é a depleção do nível de GSNO e a redução da probabilidade de formação de SNO pela reação de transnitrosação. Por tanto, a GSNOR desponta como uma promissora enzima responsável pela modulação de vias de sinalização mediadas pelo NO.

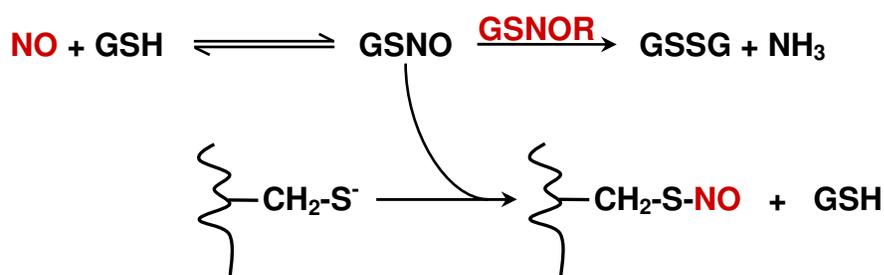


Figura 3. Formação e degradação do GSNO. O radical NO pode reagir com o grupamento tiol do antioxidante GSH espontaneamente, formando GSNO. O controle dos níveis intracelulares de GSNO é dado através de sua degradação catalisada pela enzima GSNOR. A GSNOR cataboliza GSNO em GSSG e NH₃, resultando na depleção do nível intracelular de GSNO e a redução da probabilidade de formação de SNO pelo processo de transnitrosação.

Em plantas, há um número limitado de estudos sobre a GSNOR, mesmo considerando sua atividade desintoxicadora de formaldeído (Uotila e Koivusalo, 1979; Giese *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1996; Dixon *et al.*, 1998; Achkor *et al.*, 2003) ou sua atividade redutora de GSNO (Sakamoto *et al.*, 2002; Feechan *et al.*, 2005; Rusterucci *et al.* 2007; Lee *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Em *Arabidopsis thaliana*, GSNOR é uma proteína citossólica codificada pelo gene (At5g43940), previamente denominado ALCOHOL DEHYDROGENASE2 (Martinez *et al.*, 1996). Este gene parece ser expresso em toda a planta e modulado positivamente por ácido jasmônico e negativamente por ácido salicílico (Diaz *et al.*, 2003).

Estudos sobre a suscetibilidade a patógeno em plantas com alterado nível de GSNOR produziram resultados contraditórios. Feechan e colaboradores (Feechan *et al.*, 2005) relataram que plantas mutantes para a enzima GSNOR apresentaram resistência R-mediada e basal comprometidas, sendo incapazes de estabelecerem uma resposta de defesa baseada na via de sinalização do ácido salicílico. Em contrapartida, as plantas transgênicas de *A. thaliana* com menor nível de GSNOR apresentaram maior resistência à *Peronospora parasítica* (Rusterucci *et al.*, 2007). Além disso, a resistência adquirida sistêmica (SAR) e a expressão do gene PR1 apresentaram-se aumentadas na planta antisense e comprometidas em plantas que superexpressavam a enzima GSNOR. Porém ambos os grupos encontraram um conteúdo, aproximadamente, duas vezes maior de SNO em plantas com reduzido nível de GSNOR, consistente com a ação desta enzima no metabolismo de nitrosotióis. Embora a disparidade nos resultados permaneça até a presente data sem uma explicação conclusiva, não há dúvida de que a GSNOR desempenhe um importante papel na resposta de defesa de plantas a patógenos.

Recentemente mutantes de *A. thaliana* incapazes de se aclimatar à alta temperatura e com níveis elevados de espécies NO-derivada (hot5) foram identificados como sendo mutantes para a GSNOR (Lee *et al.* 2008). Foi também recentemente identificado por clonagem posicional que plantas de *A. thaliana* resistentes ao herbicida paraquat (par2-1) são mutantes para o gene da GSNOR (Chen *et al.*, 2009). O paraquat é um herbicida não seletivo que favorece o vazamento de elétrons no fotossistema I, provocando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e,

conseqüentemente, resultando em um estresse fotooxidativo (Babbs *et al.*, 1989). Foi sugerido que a resistência ao herbicida paraquat observada no mutante par2-1 seria uma incapacidade de ativar a via de sinalização de morte celular NO-mediada (Chen *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que o controle da homeostase de nitrosotióis pela enzima GSNOR seja crucial para as respostas a estresses de origem abiótica, em adição ao seu papel na resistência a patógenos.

1.2 Bioenergética vegetal

Mitocôndrias são organelas presentes em todos os eucariotos compostas de duas membranas. Na membrana interna, altamente invaginada, localizam-se complexos protéicos, conjuntamente chamados de cadeia transportadora de elétrons (CTE), responsáveis pela oxidação de substratos e produção de energia na forma de ATP.

A aquisição das mitocôndrias por um evento endossimbiótico há 1,5 - 2 bilhões de anos é tido como um marco evolutivo no surgimento dos eucariotos. Sua capacidade de sintetizar ATP utilizando o O₂ atmosférico representou uma adaptação imprescindível para o desenvolvimento da multicelularidade. Não apenas sua manutenção nas células hospedeiras, mas a transferência de parte de seus genes, seguido do controle de sua divisão pela célula hospedeira, demonstram a estreita interação biótica desenvolvida ao longo dos anos. Porém as mitocôndrias não foram apenas colocadas sob o controle quase completo da célula hospedeira, elas também estão intimamente ligadas a processos de sinalização, como por exemplo, a indução de morte celular programada em todo o reino animal, fungi e vegetal.

Inicialmente descrito como uma seqüência de grupos prostéticos (flavinas e citocromos) embebidos em matriz protéica que transportavam elétrons em ordem crescente de potencial redox (Chance e Williams, 1995), a visão da cadeia transportadora de elétrons sofreu algumas alterações ao longo dos anos. Atualmente, a CTE é vista como uma seqüência funcional de, principalmente, quatro grandes complexos localizados aleatoriamente na membrana mitocondrial interna, denominados NADH-coenzima Q redutase (Complexo I), Succinato-coenzima Q redutase (Complexo II), Ubiquinol-citocromo C redutase (Complexo III) e Citocromo c oxidase (Complexo IV

ou COX). Nesta visão atual, os complexos estariam conectados por duas moléculas móveis (uma quinona lipofílica chamada de Coenzima Q – CoQ; e uma proteína-heme hidrofílica chamada Citocromo *c* – CitC; Lenaz *et al.*, 2010).

Contudo, são comumente encontradas grandes variações na CTE de diferentes organismos. A membrana mitocondrial interna possui, em quantidades inferiores, outros complexos protéicos que apresentam atividade de transferência de elétrons. Entre eles há flavoproteínas capazes de transferir elétrons à CTE por vias independentes do Complexo I (por exemplo, glicerol-3-fosfato desidrogenase ou flavoproteínas de transporte de elétrons – ubiquinona oxidoredutase), além de NAD(P)H desidrogenases alternativas em diversos organismos, especialmente em fungos e plantas. Ainda, há uma via alternativa (ou ramificação) que desvia o fluxo de elétrons a partir da CoQ em procariontes, fungos e plantas. Neste caso, os elétrons são doados diretamente para o O₂ pela Oxidase alternativa (AOX; Blokhina e Fagerstedt, 2010).

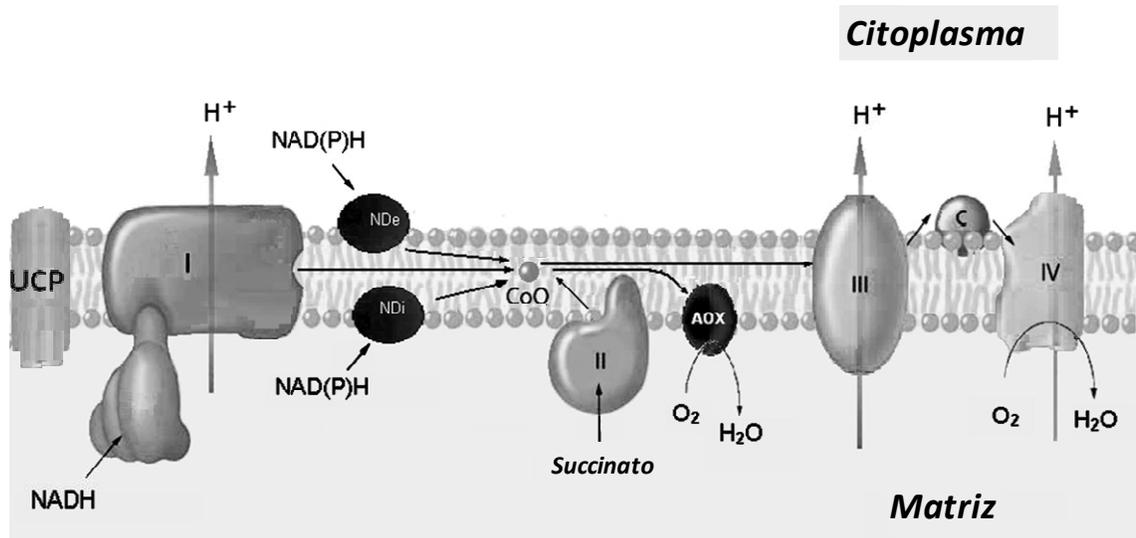


Figura 4. Modelo esquemático da cadeia transportadora de elétrons. Em detalhe os complexos protéicos e seus substratos localizados na membrana mitocondrial interna. I. NADH-coenzima Q redutase; II. Succinato-coenzima Q redutase; III Ubiquinol-citocromo C redutase; IV Citocromo C oxidase; NDe e NDi. NAD(P)H desidrogenase externa e interna, respectivamente; AOX. Oxidase alternativa; UCP. Proteína desacopladora; CoQ. Coenzima Q; C. Citocromo C. (Adaptado de Lenaz e Genova, 2009).

A transferência de elétrons pela CTE até o oxigênio molecular é realizada através de reações altamente exergônicas. Essa variação na energia livre é utilizada para bombear prótons da matriz para o espaço intermembranas. Esta energia eletroquímica inerente da diferença de concentração de prótons e da separação de cargas representa uma conservação temporária da energia de transferência de elétrons. A energia armazenada no gradiente eletroquímico é denominada força próton-motriz e dirige a síntese de ATP através do fluxo de prótons pela ATP sintase nas mitocôndrias. Este modelo foi sugerido pelo bioquímico Peter Mitchell⁴ e denominado modelo quimiosmótico (Mitchell, 1961).

As mitocôndrias são importantes alvos do NO, um potente inibidor do fluxo de elétrons na cadeia respiratória (revisado por Yamasaki *et al.*, 2001). Em concentrações nanomolares, o NO se liga reversivelmente aos sítios de ligação do oxigênio na COX, resultando em um decréscimo do consumo de oxigênio (Cleeter *et al.*, 1994). Esta competição pelo sítio ativo tem sido considerado um mecanismo fisiológico pelo qual o NO regula a respiração celular (Borutaite e Brown, 1996). Recentemente foi demonstrado que o Complexo I de mitocôndrias isoladas a partir de fígado de rato também pode ter sua atividade reduzida por S-nitrosação (Borutaite e Brown, 2006), aumentando a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O tratamento com agentes oxidantes ou com a exposição a luz reverteu a inibição, demonstrando que esse processo é facilmente reversível (Borutaite e Brown, 2006).

No entanto, em situações de estresse nítrico, a COX pode ser irreversivelmente inibida pelo NO, através de uma reação de nitração (Millar e Day, 1996). Ainda, a exposição prolongada ou a altas concentrações de NO acarreta a inibição permanente da respiração através da nitração do Complexo I (Clementi *et al.*, 1998). Frequentemente, estas alterações levam à indução da morte celular pelo efeito adverso que acarretam na organela.

⁴ A formulação da hipótese quimiosmótica por Peter Mitchell veio antes mesmo da descrição da ATP sintase e seu mecanismo de ação. A teoria quimiosmótica sofreu duras críticas até vencer o ceticismo científico. Mitchell, ao ser laureado com o Prêmio Nobel, disse em seu discurso: "O aspecto da presente posição de consenso que eu considero mais marcante e admirável, é o altruísmo e a generosidade de cada antigo oponente da hipótese quimiosmótica que não apenas vieram a aceitá-la, mas a promoveram ao status de teoria."

Diferentemente das mitocôndrias de mamíferos, em plantas, a membrana mitocondrial interna contém enzimas alternativas, como a oxidase alternativa (AOX) e as NAD(P)H desidrogenases, para o transporte de elétrons (Blokhina e Fagerstedt, 2010). Estas enzimas não são bombeadoras de prótons e, portanto, não contribuem para a conservação de energia na fosforilação oxidativa. Variações no nível de expressão destas enzimas em diferentes tecidos, assim como durante o desenvolvimento e floração, influenciam diversos processos celulares, como estado redox e assimilação de nitrogênio, sugerindo uma importante função destas enzimas em plantas (Hachiya e Noguchi, 2011; Zhu *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011). Diferentemente da COX, a AOX é insensível ao NO (Millar e Day, 1996) e estudos recentes de nosso grupo de pesquisa mostraram que as NAD(P)H desidrogenases externas são capazes de degradar o NO (de Oliveira *et al.*, 2008).

Em baixas concentrações de NO, a inibição da COX favorece o escape de elétrons da cadeia respiratória e a conseqüente degradação do radical, o que cessa a inibição da respiração (Wulff *et al.*, 2009). Ainda, a exposição de células de *Arabidopsis thaliana* ao NO é capaz de induzir a expressão da AOX (Huang *et al.*, 2002). Este aumento da expressão parece ser importante para o aumento da meia vida do NO (Wulff *et al.*, 2009), protegendo os tecidos dos efeitos deletérios da anoxia ou hipóxia. Como esta proteína é responsável pelo desacoplamento do transporte de elétrons da fosforilação oxidativa, sua atividade possibilita a contínua redução da tensão de oxigênio, necessária para a degradação do NO via reação com radicais de oxigênio. Interessantemente, parece existir uma regulação do nível de NO pela mitocôndria, sugerindo uma ação das enzimas alternativas na prevenção dos efeitos deletérios do radical NO na planta (Wulff *et al.*, 2009).

Ainda, a membrana mitocondrial interna apresenta proteínas desacopladoras (UCP) responsáveis pela dissipação do gradiente eletroquímico e, conseqüentemente, redução da eficiência de fosforilação (Vercesi *et al.*, 2006). Acredita-se que a atividade da UCP e AOX protejam as células da produção de espécies reativas de oxigênio durante estresses bióticos e abióticos (Maxwell *et al.* 1999; Brandalise *et al.* 2003; Van Aken *et al.* 2009). No entanto, não há relatos sobre a modulação da atividade UCP em mitocôndrias vegetais pelo NO até o momento.

Apesar da singularidade das mitocôndrias vegetais e da importância da regulação da respiração mitocondrial pelo NO, as alterações funcionais destas organelas quando expostas a uma situação de estresse nítrico têm sido pouco estudada. Modelos com níveis alterados de GSNO parecem adequados para este estudo, já que permitem uma análise comparativa das alterações funcionais da cadeia respiratória e possíveis conseqüências na homeostase do NO.

1.3 Modelo vegetal para estudo

Arabidopsis thaliana é uma angiosperma dicotiledônea herbácea pertencente à família das Brassicaceae, a mesma da mostarda, e se encontra distribuída por vários continentes, principalmente nas regiões temperadas do hemisfério Norte. Esta planta tem sido utilizada extensivamente em estudos genéticos e fisiológicos graças às vantagens de cultivo e manutenção em laboratórios, como pequeno porte, rápido ciclo de vida e alto grau de endogamia (Arabidopsis Home, 2006). Além de inúmeras informações disponíveis sobre essa espécie, seu genoma foi o primeiro seqüenciado dentre as plantas superiores. Foram descritos 5 cromossomos contendo 125 milhões de pares de bases e 26000 genes, a maioria dos quais ainda continuam sem função conhecida (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Desde sua primeira aparição na literatura não taxonômica em 1873 quando Alexander Braun (Arabidopsis Home, 2006) descreveu uma planta mutante provavelmente no gene AGAMOUS, relacionado com a regulação floral ABC, muito se tem descrito e estudado da fisiologia e genética vegetal. A partir da década de 1950 iniciou-se grande avanço na construção de uma coleção de mutantes, porém apenas em meados da década de 1980 foi publicado a primeira inserção de um gene exógeno (An, *et al.* 1986; Lloyd, *et al.* 1986), seguido da descrição da transformação extremamente eficiente pelo método de infiltração à vácuo (Bechtold e Pelletier 1998), o que abriu portas para diversos estudos de base genética.

Em 1996 Carmen Martínez e colaboradores (Martínez *et al.*, 1996) descreveram o gene ADH2, codificante para a enzima formaldeído desidrogenase dependente de glutationa (FALDH), presente no cromossomo 5 de *Arabidopsis thaliana* (Dolferus *et al.*,

1997). Esta enzima participa da principal via do metabolismo de formaldeído em plantas, sendo responsável pela primeira reação de oxidação da *S*-hidroximetilglutathione, com redução de NAD^+ e formação de *S*-formilglutathione. A *S*-formilglutathione é, então, majoritariamente hidrolisada a formato, que é oxidado a CO_2 em mitocôndrias e cloroplastos (Olson *et al.*, 2000). Neste mesmo artigo de Martínez (Martínez *et al.*, 1996), a FALDH foi caracterizada e seu cDNA clonado. A análise por *northern-blot* mostrou que esta enzima é expressa em baixa concentração (5×10^{-3} unidades. mg^{-1}) e de forma homogênea nos diferentes tecidos de *A. thaliana*, de forma análoga à expressão em animais (Smith *et al.*, 1988). De fato, já era conhecida, nessa época, a catálise oxidativa promovida por esta enzima frente a alcoóis de cadeia longa e ácidos graxos. No entanto, foi em 1998 que, pela primeira vez, ainda em animais, foi descrito que a molécula *S*-nitrosoglutathione (GSNO) seria também substrato desta enzima (Jensen *et al.*, 1998). Os pesquisadores Jensen e Belka observaram a primeira evidência da presença de uma enzima responsável pela redução da GSNO, por um processo dependente de NAD^+ (Jensen e Belka, 1997). Nesta época a enzima foi denominada de “GSNO terminase” pela sua característica catabólica, mas atualmente é descrita como *S*-nitrosoglutathione redutase (GSNOR). Em seu artigo, Jensen e colaboradores (1998) propuseram que esta promiscuidade enzimática seria conseqüência da similaridade dos substratos em questão e demonstraram que nesta reação o doador de elétron é a coenzima NADH. Ainda, através da determinação dos valores de K_m para as diferentes reações, mostraram que a GSNO é o principal substrato para a enzima GSNOR (Jensen e Belka *et al.*, 1997). Concomitantemente, outro grupo ao estudar o estresse nítrico em doenças cardiovasculares, mostrou que a enzima FALDH apresentava maior atividade como GSNOR e que era evolutivamente conservada de bactérias a humanos (Liu *et al.*, 2001). Dessa forma, foi proposto que a atividade da GSNOR era crucial para a homeostase de nitrosotióis (SNOs) e proteção contra o estresse nítrico.

Todo esse cenário indicava que a enzima descrita por Martínez deveria também apresentar atividade GSNOR. Realmente, em 2002, foi demonstrado pela primeira vez essa atividade em plantas através de ensaios enzimáticos e clonagem do gene vegetal em levedura (Sakamoto *et al.*, 2002). Com o objetivo de estudar as funções dessa

enzima no metabolismo vegetal, o grupo de Martínez desenvolveu linhagens de *A. thaliana* transgênicas transformadas com as construções sense e antisense do gene ADH2 sob o controle do promotor 35S do vírus mosaico da couve-flor, o que garantiu uma expressão constitutiva do gene (Achkor *et al.*, 2003). As linhagens com as construções sense e antisense foram denominadas L1 (gene superexpresso) e L5 (gene silenciado), respectivamente. Desde então, estas plantas vem sendo utilizadas como modelo experimental também com o objetivo de se conhecer mais sobre os efeitos do radical óxido nítrico, já que a GSNO é considerada um reservatório natural de NO capaz de alterar a expressão gênica em situações de estresse (Park *et al.*, 1988; Durner *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

O presente estudo buscou proporcionar um melhor entendimento das alterações na funcionalidade mitocondrial em células vegetais com nível alterado de S-nitrosotióis (SNO) e relacionar com o metabolismo do radical óxido nítrico (NO). Mais especificamente, ele teve como objetivos:

- Estabelecer um protocolo de cultivo para a cultura líquida de células do tipo selvagem de *A. thaliana* e dos transgênicos com alta (L1) e baixa (L5) expressão da enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR).
- Determinar e correlacionar alterações no nível de emissão de NO e o conteúdo de SNO em células em suspensão do tipo selvagem de *A. thaliana* e dos transgênicos L1 e L5.
- Caracterizar a funcionalidade dos complexos e a indução das proteínas alternativas da cadeia transportadora de elétrons de mitocôndrias isoladas de cultura de células de *A. thaliana* selvagem e dos transgênicos L1 e L5.
- Analisar a atividade de degradação de NO por mitocôndrias isoladas dos transgênicos L1 e L5, verificando o envolvimento da cadeia respiratória vegetal, em especial da NADH desidrogenase externa, nesse processo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Sacarose foi obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha), DAF-2 da Allexis (San Diego, EUA), Coomassie Plus da Pierce (Rockford, EUA). Os outros reagentes foram obtidos da Sigma (Saint Louis, EUA).

A solução saturada de NO foi preparada borbulhando-se o gás NO puro (armazenado em cilindro) em um frasco selado com tampa de borracha contendo tampão fosfato (pH 7,2) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ previamente deaerado com argônio. A concentração da solução saturada de NO foi considerada como sendo aproximadamente $1,7 \text{ mmol.L}^{-1}$, que corresponde à saturação máxima deste gás em solução aquosa à 25°C (Henry *et al.* 1997).

3.2 Material vegetal

Sementes de *Arabidopsis thaliana* L. Ecotipo Columbia e das linhagens transgênicas L1 e L5, obtidas por Martínez (Achkor *et al.*, 2003), foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,3 % durante 8 minutos e germinadas *in vitro* utilizando meio sólido (phytagel 0,28%) com de nutrientes Murashige e Skoog (MS – 1962) acrescido de vitaminas de Murashige e Tucker (MT). As plantas foram mantidas em uma câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro e temperatura controlada de 24°C .

Para o estabelecimento da cultura de calos, folhas de 20 a 25 dias de idade foram retiradas das plantas e incubadas em meio sólido de nutrientes MS modificado (nitrato de potássio, 5 mmol.L^{-1} ; nitrato de amônio, 5 mmol.L^{-1}) acrescido de vitaminas de MT, extrato de malte 0,5 g/L e hormônios 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenilacético) $4,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e cinetina $0,025 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. A cultura de calos foi mantida no escuro, a 25°C , por 30 dias para um aumento de massa celular. Os calos foram então transferidos para culturas líquidas com a mesma composição do meio de cultura, exceto phytigel. As culturas líquidas de microcalos foram mantidas no escuro a 25°C com rotação

constante de 150 rpm (Shaker modelo C25KC, New Brunswick Scientific) e um ciclo de crescimento de 7 dias. Semanalmente, para os três genótipos, a cultura dos microcalos foi repicada para uma densidade de 2 g de massa fresca/50 mL. Todo o trabalho de esterilização das sementes e das folhas, o estabelecimento das culturas sólidas e líquidas e a repicagem dos calos e células foram feitos em condições assépticas, em uma câmara de fluxo laminar (Fluxo Laminar Modelo H1FS-12-M, Veco).

As curvas de crescimento foram obtidas através da determinação da massa fresca e da massa seca em função do tempo. A massa fresca foi determinada pela filtragem dos microcalos em filtro de papel sob pressão negativa, com o auxílio de uma bomba de vácuo. A massa seca foi determinada pela secagem dos microcalos em forno a 60°C por 24 horas. O dia do repique foi considerado como tempo zero e as medições foram realizadas até o décimo quinto dia de cultivo. A linha de tendência foi obtida através do ajuste polinomial de ordem 4 ($R^2 > 0,9$).

3.3 Quantificação do conteúdo de S-nitrosotióis totais

O conteúdo total de SNO foi determinado pelo método de Saville (1958), com algumas alterações. Proteínas totais foram extraídas de células em suspensão dos genótipos selvagem, L1 e L5 em tampão de extração (fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,2, EDTA 0,1 mol.L⁻¹ e EGTA 0,1 mol.L⁻¹). Os extratos foram incubados por 10 minutos em solução A (1% sulfanilamida em 0,5 mol.L⁻¹ HCl) e em solução B (solução A acrescida de HgCl₂), obtendo a formação do sal diazônio. A formação do corante azo foi obtida pela reação das soluções de incubação com a solução C (N-(1-naftil) etilenodiamina dihidroclorida 0,02% em 0,5 mol.L⁻¹ HCl) equivolumentricamente por 10 minutos. A absorbância foi lida em seguida a 550 nm em um espectrofotômetro (Simadzu MultiSpect 1501 - Japão). A quantificação do conteúdo de SNO do extrato de proteínas foi determinada pela diferença na absorbância entre a solução B e a solução A (B-A). Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão previamente construída utilizando-se GSNO. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo protéico, determinado pelo método de Bradford (Rusterucci *et al.*, 2007).

3.4 Quantificação da emissão de óxido nítrico

A quantificação da emissão de NO na cultura de microcalos foi realizada pela incubação direta com a sonda DAF-2 para eliminação da interferência de compostos intracelulares que podem reagir com NO (Zhang *et al.*, 2002). Este método foi adaptado por nosso grupo de pesquisa (Seligman *et al.*, 2008) baseado no método descrito por Ye e colaboradores (2004). Em cada análise, 10 mg de microcalo foi incubado por 1 h, a 25°C, no escuro e na presença de DAF-2 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ diluído em tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} (pH 7.2). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 7.500 $\times g$ para a precipitação celular e o sobrenadante diluído 9x em tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} (pH 7.2). A emissão de fluorescência de DAF-2T foi analisada em espectrofluorímetro (Hitachi F-450 – Inglaterra) entre 500 e 550 nm sob excitação de 495 nm. A quantificação da emissão de NO foi calculada através de uma curva padrão obtida utilizando-se uma solução aquosa saturada de NO.

3.5 Quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio

A quantificação do conteúdo de H_2O_2 foi realizada de acordo com Gay e colaboradores (1999), com algumas modificações. As células (50 mg) de células foram maceradas em 250 μL de metanol, com o auxílio de nitrogênio líquido. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 $\times g$ por 5 minutos. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi retirada, à qual foram adicionados 500 μL de FeSO_4 1 mmol.L^{-1} e 100 μL de H_2SO_4 1 mmol.L^{-1} . A mistura foi incubada por 5 minutos no escuro. A seguir, foi adicionado 100 μL de alaranjado de xilenol (xilenol Orange) 1 mmol.L^{-1} e a mistura foi novamente incubada no escuro por 20 minutos. A absorbância foi lida em seguida a 595 nm em um espectrofotômetro (Simadzu MultiSpect 1501 - Japão). Os resultados foram normalizados pela massa fresca inicial das células de cada amostra.

3.6 Preparação da suspensão mitocondrial

As mitocôndrias foram isoladas da cultura líquida de células de *A. thaliana* e dos transgênicos (L1 e L5) adaptando-se método descrito por Martins e Vercesi (1985). As células em cultura líquida foram filtradas utilizando-se filtros de papel sob pressão negativa. Quarenta gramas de células foram lavadas em 50 mL de meio para lavagem de células (sacarose 0,4 mol.L⁻¹ e tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2) e filtradas, para então serem ressuspensas em 500 mL de meio de extração (sacarose, 0,4 mol.L⁻¹; tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹ pH 7,2; BSA, 0,1%; EGTA, 1 mmol.L⁻¹ e cisteína, 3 mmol.L⁻¹)

A suspensão foi homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Potter, Tecnal, PT10/35 velocidade 4) por aproximadamente 15 segundos. O pH do homogeneizado foi ajustado para 7,2 com NaOH e centrifugado a 1.500 *xg* por 10 min. As mitocôndrias foram coletada na fração sobrenadante para uma centrifugação a 19.000 *xg* por 15 min. O sedimento obtido foi ressuspensado em 25 mL em meio de lavagem (sacarose 0,25 mol.L⁻¹; BSA 0,1%; tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹ pH 7,2; EGTA 0,2 mmol.L⁻¹ e cisteína 3 mmol.L⁻¹) e centrifugado a 1.100 *xg* por 10 min. A fração sobrenadante resultante foi centrifugada a 18.000 *xg* por 15 min. O sedimento foi ressuspensado em volume mínimo de meio de lavagem de modo que a concentração da proteína medida pelo método de quantificação de proteínas Coomassie blue fosse em torno de 20-50 mg/mL.

As preparações mitocondriais ainda foram purificadas em gradiente de Percoll, adaptando-se o método descrito por Petrusa e colaboradores (2008). Neste caso, o sedimento obtido da última centrifugação foi ressuspensado em um gradiente de Percoll (13,5:21:45%) (sacarose 0,25 mol.L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹ pH 7,2; EGTA 0,3 mmol.L⁻¹) e centrifugado a 40.000 *xg* por 40 min, em *swing rotor* (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). A banda correspondente à mitocôndria intacta (banda entre os gradientes 21:45) foi coletada com pipeta e diluída 10x em meio de lavagem e centrifugada a 18.000 *xg* por 10 min. O sedimento correspondente às mitocôndrias purificadas foi coletado em volume mínimo de meio de lavagem de modo que a

concentração da proteína determinada pelo método de quantificação de proteínas Coomassie blue fosse em torno de 20-50 mg/mL.

Todas as etapas da preparação da suspensão mitocondrial foram realizadas entre 0 e 4°C .

3.7 Medida do consumo de oxigênio e óxido nítrico pelas suspensões mitocondriais

As concentrações de O_2 e NO no meio de reação foram determinadas simultaneamente com sistema eletroquímico que inclui: eletrodo Clark de NO (ISO-NOP, WPI; Sarasota, FL, USA) calibrado em solução de $CuCl_2$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ com SNAP como doador de NO, nas concentrações $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, $40 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, $80 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, eletrodo Clark de O_2 (ISO-OXY-2, WPI) e câmara de 2 entradas para circulação externa de água (NOCHM-4, WPI). A suspensão mitocondrial foi incubada a 25°C em meio igual ao meio de reação utilizado para medir a atividade respiratória (sacarose $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, tampão fosfato de potássio 10 mmol.L^{-1} pH 7,2 e BSA 0,1%). Outras adições estão especificadas nas legendas das figuras.

3.8 Atividade respiratória

O consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas foi medido utilizando um eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) conectado a uma câmara de reação mantida a 25°C. A curva obtida foi registrada com um aquisitor de dados AD 04 (LabTrade, SP, Brasil) conectado ao software Field Chart Novus, 1.57 version (Novus Electronic Products, SP, Brasil). As mitocôndrias foram incubadas em um meio de reação (sacarose $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} pH 7,2; BSA 0,1%). Outras adições ao meio de reação estão especificadas nas legendas das figuras e tabela.

3.9 Determinação do controle respiratório

Para avaliar a integridade das mitocôndrias isoladas a partir de microcalos dos diferentes genótipos foram determinados os controles respiratórios (CR) após sucessivos pulsos de ADP em mitocôndrias energizadas com malato 10 mmol.L^{-1} e glutamato 10 mmol.L^{-1} . O CR foi obtido pela relação numérica entre a velocidade de consumo de oxigênio da mitocôndria no estado III (velocidade máxima, na presença da ADP, Pi e MgCl_2) sobre a velocidade no estado IV (repouso após fosforilação).

3.10 Determinação da atividade da oxidase alternativa

Para a determinação da atividade da AOX, acceptor final de elétrons alternativo à citocromo *c* oxidase, foi adicionado antimicina-A (Anti-A), um inibidor do complexo III, às suspensões mitocondriais energizadas com malato 10 mmol.L^{-1} + glutamato 10 mmol.L^{-1} e analisado o consumo de oxigênio resistente a este inibidor. Subseqüentemente foi adicionado *n*-propil galato $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (GAL), inibidor da AOX (Millar *et al.*, 1996), a fim de inibir completamente o consumo de oxigênio. A adição de Anti-A foi feita após as mitocôndrias terem consumido 50% do oxigênio no meio.

3.11 Análise de dados

Os resultados apresentados nas figuras são representativos de pelo menos três experimentos independentes. Alguns resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o Student *t*-test com $p < 0,05$ indicando significância.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da cultura líquida de microcalos

4.1.1 Estabelecimento da cultura líquida

Foi caracterizado o crescimento celular da cultura líquida de microcalos do tipo selvagem e dos transgênicos L1 e L5. As culturas líquidas dos três genótipos foram iniciadas em uma densidade de 2 g de massa fresca por 50mL. Conforme observado na Figura 5, as culturas dos três genótipos apresentaram uma variação de massa celular típico em função do tempo (fases de aclimação, exponencial, linear, estacionária e morte)⁵. Na cultura do genótipo selvagem (Figura 5B) a fase de aclimação se estendeu até o segundo dia de cultivo, quando se inicia a fase exponencial de duração de um dia e, subseqüentemente, a fase linear até o sétimo dia de cultivo. Do sétimo ao décimo dia de cultivo estende-se a fase estacionária, seguida então da fase de morte celular. O genótipo L1 (Figura 5A) apresentou um perfil de crescimento similar ao genótipo selvagem, com a fase de aclimação de dois dias de duração, seguida das fases exponencial e linear, que se estende até o sétimo dia. A fase estacionária do genótipo L1 também perdura até o décimo segundo dia de cultivo, quando é iniciada a fase de morte celular.

Já a cultura de células do genótipo L5 (Figura 5C) apresentou um perfil de crescimento diferente dos genótipos selvagem e L1. Neste caso, a fase de aclimação foi mais longa e se estendeu até o terceiro dia de cultivo. As fases exponencial e linear foram mais intensas que nos outros dois genótipos. A fase linear estendeu-se até o décimo dia de cultivo, quando iniciou-se a fase estacionária. A fase de morte celular teve seu início no décimo segundo dia de cultivo para o genótipo L5.

Dessa forma, para os três genótipos, em nossas condições experimentais, o quinto e o sétimo dia de cultivo representam o meio e o final da fase linear, respectivamente; enquanto o décimo dia representa a fase estacionária. A partir desses resultados estabelecemos o repique dos microcalos no sétimo dia de cultivo e, para os

⁵ As fases iniciais de crescimento celular usualmente são designadas fase lag e log, porém neste texto procuramos utilizar os termos correspondentes na língua portuguesa; sendo fase de aclimação e exponencial, respectivamente.

experimentos, o quinto (condição de crescimento ideal) e o décimo dia (condição de estresse nutricional/oxidativo) para os três genótipos.

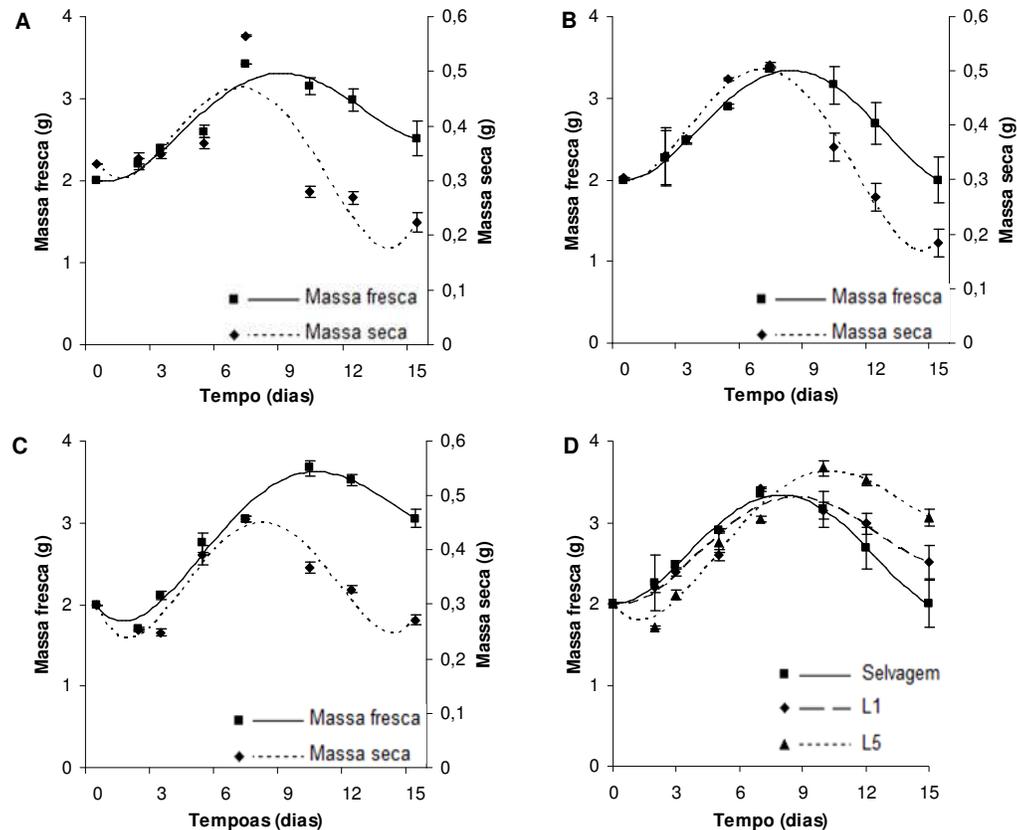


Figura 5. Perfil de crescimento celular em função do tempo cultivo de *A. thaliana* selvagem e dos transgênicos L1 e L5. As culturas foram iniciadas em uma densidade de 2 gramas de massa fresca celular/50 mL de meio de cultura líquido. As curvas foram obtidas através da determinação da massa fresca e da massa seca da cultura líquida dos genótipos L1 (A), selvagem (B) e L5 (C). D, curvas obtidas pela determinação da massa fresca dos três genótipos. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. A linha de tendência foi obtida através do ajuste polinomial de ordem 4 ($R^2 > 0,9$).

4.1.2 Quantificação do conteúdo de S-nitrosotióis totais

O conteúdo de SNO totais em microcalos dos genótipos selvagem, L1 e L5 foi analisado após 5 e 10 dias de cultivo. Os valores foram normalizados pelo conteúdo e proteínas determinado pelo método de Bradford. Na Figura 6 é possível observar que em condições ótimas de crescimento (5 dias), células da linhagem selvagem

apresentaram $22,6 \pm 0,6$ pmol.mg proteína⁻¹ de SNO, valor estatisticamente igual ao observado em células do transgênico L1 ($20,8 \pm 2,3$ pmol.mg proteína⁻¹). No entanto, células do transgênico L5 apresentaram um conteúdo de SNO significativamente maior após 5 dias de cultivo (aumento de 170%), quando comparado ao tipo selvagem e L1.

Em condições de estresse nutricional/oxidativo (após 10 dias de cultivo) é possível observar uma tendência de redução do conteúdo de SNO pelas células dos três genótipos. Em células do tipo selvagem a redução foi de aproximadamente 35%. Em células do transgênico L1 foi observada a menor redução, apenas 11%, e não foi encontrada diferença estatística entre o conteúdo de SNO após 5 e 10 dias de cultivo. Já o transgênico L5 apresentou a maior redução no conteúdo de SNO no décimo dia de cultivo (78%), quando comparado ao quinto dia; apresentando o mais baixo conteúdo de SNO ($8,5 \pm 0,6$ pmol.mg proteína⁻¹) em relação aos três genótipos.

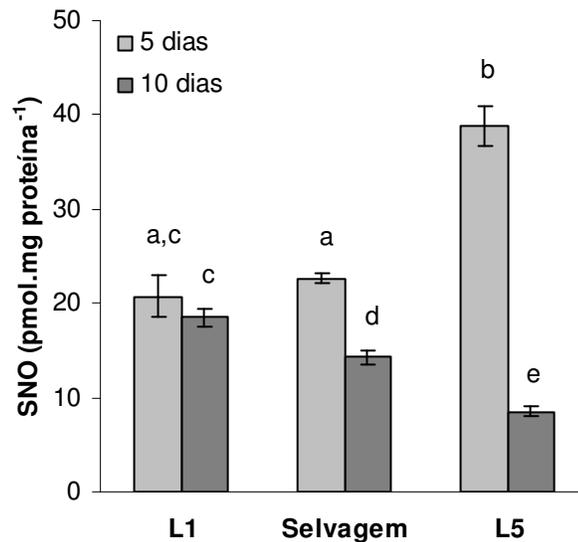


Figura 6. Conteúdo de SNO totais em microcalos dos genótipos selvagem, L1 e L5 em cultura líquida após 5 e 10 dias de cultivo. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão previamente construída utilizando-se GSNO. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo protéico. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student ($p < 0,05$).

4.1.3 Quantificação da emissão de óxido nítrico

A emissão de NO pelos microcalos em suspensões celulares dos genótipos selvagem, L1 e L5 foi determinada após 5 e 10 dias de cultivo. Em nossas condições experimentais, como é possível observar na Figura 7, no quinto dia de cultivo a emissão de NO por microcalos do genótipo selvagem foi de $0,40 \pm 0,02$ pmol.mg de massa fresca⁻¹.h⁻¹. No genótipo L1 a emissão foi de $0,45 \pm 0,05$ pmol.mg de massa fresca⁻¹.h⁻¹, não sendo, entretanto, significativamente diferente em relação à emissão pelo genótipo selvagem. No entanto, no genótipo L5 a emissão de NO foi de $0,54 \pm 0,04$ pmol.mg de massa fresca⁻¹.h⁻¹, valor 25 % superior à emissão no tipo selvagem e estatisticamente superior aos genótipos selvagem e L1.

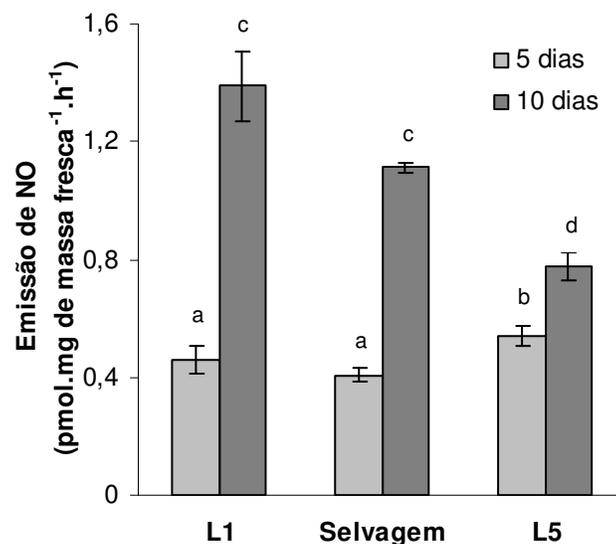


Figura 7. Emissão de NO a partir de microcalos dos diferentes genótipos em cultura líquida após 5 e 10 dias de cultivo. A emissão foi avaliada pela incubação direta de 10 mg de microcalos dos diferentes genótipos com a sonda fluorescente DAF-2 por 1 hora, seguida da análise fluorimétrica (ex. 495 nm; em. 530 nm). Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student ($p < 0,05$).

No décimo dia de cultivo, fase estacionária de crescimento (condição de estresse nutricional/oxidativo), observamos um acréscimo na emissão do radical NO pelos microcalos dos três genótipos em estudo. Esta observação era de fato esperada, já que

evidências experimentais mostram que há acentuada emissão de NO em situações de estresse biótico e abiótico (Zhao *et al.*, 2004; Piterková *et al.*, 2009). Microcalos do tipo selvagem apresentaram incremento de 170%, índice similar ao observado em microcalos do transgênico L1 (aumento de 200%). Em relação ao tipo selvagem e L1 não houve diferença estatística. No entanto, microcalos do transgênico L5 apresentaram um incremento de apenas 43% na emissão de NO. A emissão de $0,77 \pm 0,02$ pmol de NO.mg de massa fresca⁻¹.h⁻¹ foi a menor dentre os três genótipos em condições de estresse, sendo a diferença significativa.

3.1.5 Quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio

Foi avaliado o conteúdo de H₂O₂ de microcalos dos genótipos selvagem, L1 e L5 em condições ideais de cultivo e sob estresse nutricional. Após 5 dias de cultivo, microcalos do genótipo selvagem apresentaram o maior conteúdo de H₂O₂ em comparação aos genótipos L1 e L5 (2,6 e 3,2 vezes, respectivamente). Essa diferença foi estatisticamente significativa. No entanto, microcalos do genótipo L1 apresentaram conteúdo de $0,13 \pm 0,03$ nm.mg de massa fresca⁻¹, e do L5 de $0,10 \pm 0,02$ nm.mg de massa fresca⁻¹, valores estatisticamente iguais (Figura 8).

Sob estresse nutricional, o conteúdo de H₂O₂ em microcalos do tipo selvagem foi de $0,26 \pm 0,03$ nm.mg de massa fresca⁻¹. Neste caso, foi possível observar uma tendência a redução do conteúdo de H₂O₂ nos microcalos em relação ao quinto dia de cultivo, apesar da diferença encontrada não ter sido significativa. No entanto, nos transgênicos L1 e L5 o conteúdo de H₂O₂ aumentou no décimo dia de cultivo, quando comparado ao quinto dia. Para o L1, o aumento foi de 2,1 vezes, enquanto que para o L5 foi de 2,8. Foi significativa a diferença encontrada entre o conteúdo de H₂O₂ dos microcalos dos transgênicos L1 e L5 após 5 e 10 dias de cultivo.

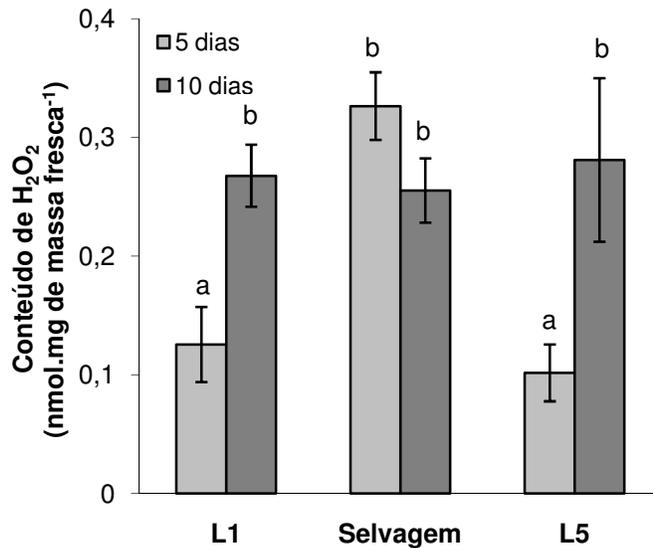


Figura 8. Conteúdo de H₂O₂ de microcalos dos diferentes genótipos em cultura líquida após 5 e 10 dias de cultivo. O conteúdo foi determinado utilizando-se a reação do corante xylenol orange com Fe oxidado pelo H₂O₂. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student ($p < 0,05$).

4.2 Caracterização de mitocôndrias isoladas a partir de microcalos

4.2.1 Análise do controle respiratório

Conforme pode ser observado nas Figuras 9 e 10, o protocolo utilizado para o isolamento e purificação de mitocôndrias resultou na obtenção de mitocôndrias intactas e acopladas ($CR_s > 2$), tanto quando o isolamento foi feito no quinto quanto no décimo dia de cultivo das suspensões celulares, para os três genótipos.

Em mitocôndrias isoladas após 5 dias de cultivo é possível observar um acréscimo no valor do CR após seguidos pulsos de ADP ($CR_1 < CR_2 < CR_3$) nas preparações mitocondriais dos três genótipos (Figura 9A-C). Diversos trabalhos sugerem a inibição de proteínas desacopladoras (UCP) por ATP (Vercesi *et al.*, 1995; Saviani e Martins 1998), o que, em nossas condições experimentais, poderia ser sugerido pelo aumento no valor do controle respiratório. É importante ressaltar que os gráficos foram elaborados a partir da média dos CRs de diferentes preparações

mitocondriais e que, apesar de não haver diferença estatística entre os valores de CR (CR_1 , CR_2 e CR_3), foi possível observar, em todas as preparações, uma evolução positiva no valor do CR das mitocôndrias isoladas de células após 5 dias de cultivo. Dessa forma, nossos dados sugerem que mitocôndrias isoladas a partir de 5 dias de cultivo dos microcalos dos três genótipos apresentam atividade de UCP. A Figura 10 mostra uma preparação mitocondrial representativa para cada genótipo após 5 dias de cultivo celular.

Já após 10 dias cultivo os valores de CRs das preparações mitocondriais dos transgênicos L1 e L5 foram mais baixos, em relação aqueles do quinto dia, indicando obtenção de mitocôndrias menos acopladas (Figura 9B e C, respectivamente). Sugerimos que esta observação seja corroborada pela curva de crescimento, já que no décimo dia de cultivo os microcalos dos três genótipos encontram-se na fase estacionária, uma situação em que há um estresse oxidativo nas culturas devido ao esgotamento de nutrientes. Já preparações mitocondriais do tipo selvagem não apresentaram redução nos valores dos CRs (Figura 9A), sugerindo que o estresse induzido teria sido menos deletério, quando comparado à preparações mitocondriais dos outros dois genótipos. Interessantemente, mitocôndrias isoladas a partir de microcalos do tipo selvagem e do transgênico L1 após 10 dias de cultivo parecem não possuir atividade de UCP, enquanto mitocôndrias isoladas a partir de microcalos do transgênico L5 parecem apresentar atividade desta proteína, já que observa-se incremento nos valores de CR com as adições consecutivas de ADP.

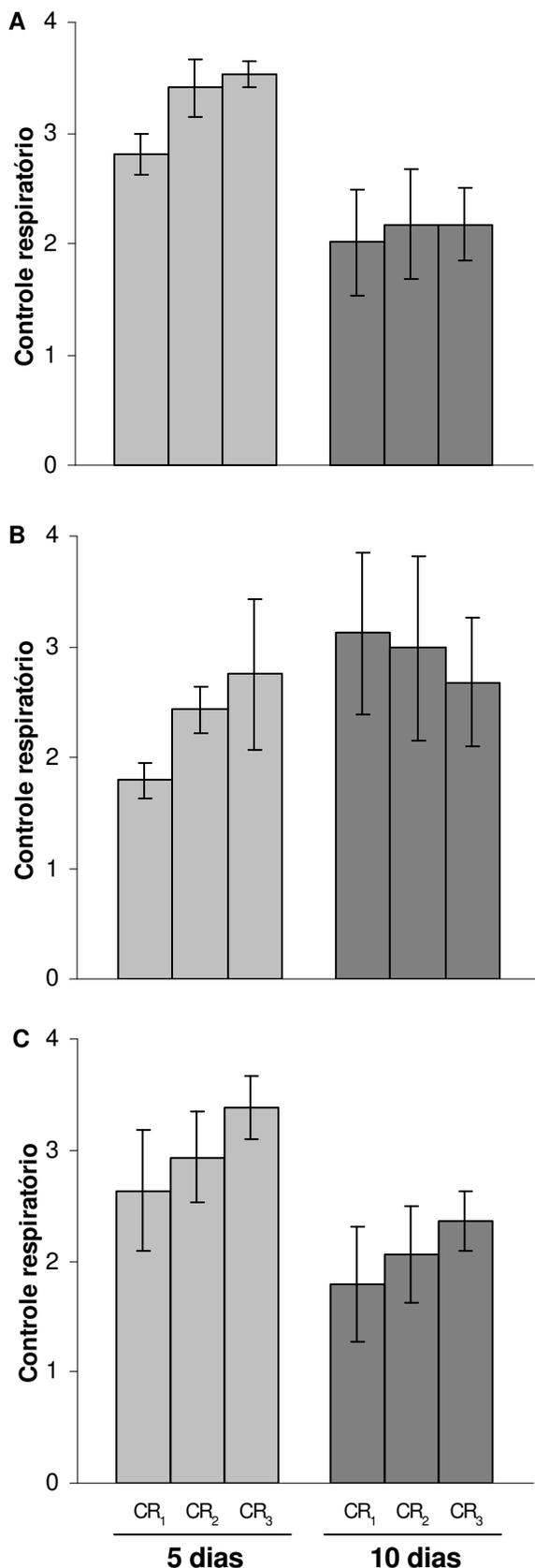


Figura 9. Valores de controle respiratório (CR) de mitocôndrias isoladas a partir de microcalos dos genótipos L1 (A), selvagem (B) e L5 (C) com 5 e 10 dias de cultivo. O CR é dado pela relação numérica entre a velocidade de consumo de oxigênio da mitocôndria no estado III sobre a velocidade no estado IV. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, 0,1% BSA, 10 mmol.L^{-1} tampão fosfato (pH 7,2), MgCl_2 2 mmol.L^{-1} e como substrato respiratório malato 10 mM + glutamato e os CRs (CR₁, CR₂ e CR₃) obtidos após sucessivos pulsos de ADP. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

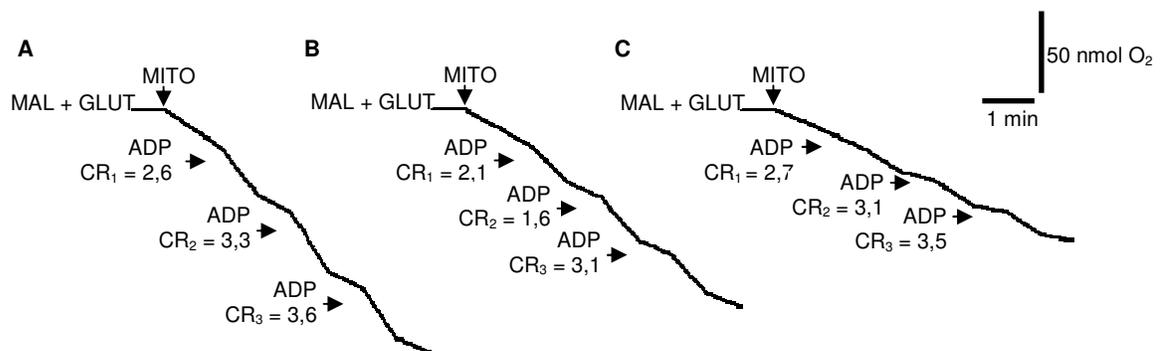


Figura 10. Traçados representativos dos valores de controle respiratório (CR) de mitocôndrias isoladas a partir de microcalos dos genótipos L1 (A), selvagem (B) e L5 (C) após 10 dias de cultivo. O CR é dado pela relação numérica entre a velocidade de consumo de oxigênio da mitocôndria no estado III sobre a velocidade no estado IV. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 0,25 mol.L⁻¹, 0,1% BSA, 10 mmol.L⁻¹ tampão fosfato (pH 7,2), MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹ e como substrato respiratório malato 10 mmol.L⁻¹ + glutamato 10 mmol.L⁻¹. Os CRs (CR₁, CR₂ e CR₃) foram obtidos após sucessivos pulsos de ADP.

4.2.2 Modulação da atividade da oxidase alternativa

Conforme mostra a Figura 11, em mitocôndrias isoladas a partir da cultura líquida de microcalos do genótipo selvagem, é possível observar uma ativação da AOX no décimo dia de cultivo em relação ao quinto dia. Essa ativação representou um acréscimo de 103% na atividade desta proteína.

As mitocôndrias isoladas do transgênico L5 também apresentaram um intenso aumento na atividade AOX do quinto para o décimo dia de cultivo. No quinto dia de cultivo a atividade da AOX foi de aproximadamente metade do valor observado para o tipo selvagem (Figura 11). No décimo dia houve uma ativação de 242%, igualando-se, estatisticamente, ao valor observado no tipo selvagem.

Diferentemente, as mitocôndrias isoladas a partir de microcalos do transgênico L1 não apresentaram ativação da AOX no décimo dia de cultivo, permanecendo com baixa atividade após 5 e 10 dias de cultivo, 82 e 41%, respectivamente, quando comparado ao tipo selvagem (Figura 11). É importante ressaltar que no quinto dia de cultivo o valor referente a atividade da AOX nos genótipos selvagem e L1 são estatisticamente iguais.

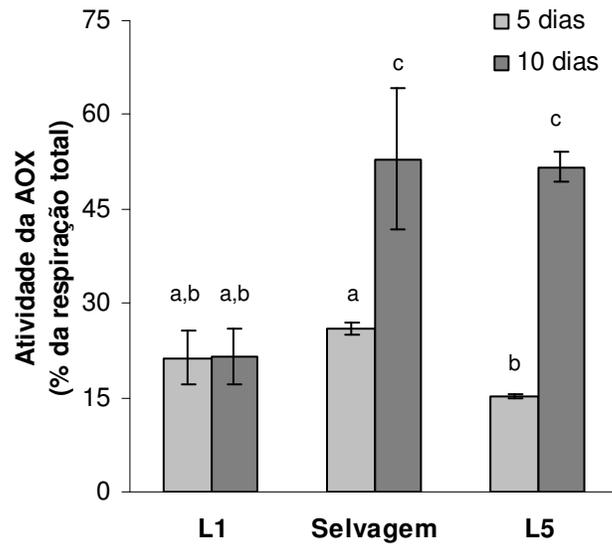


Figura 11. Modulação da atividade da AOX em mitocôndrias isoladas dos genótipos selvagem, L1 e L5. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 0,25 mol.L⁻¹, 0,1% BSA, 10 mmol.L⁻¹, tampão fosfato (pH 7,2), MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹ e como substrato respiratório malato mmol.L⁻¹ + glutamato 10 mmol.L⁻¹. Para a determinação da atividade da AOX foi adicionado antimicina-A e analisado o consumo de oxigênio resistente. Subseqüentemente foi adicionado *n*-propil galato (GAL) e a respiração foi inibida completamente. A adição de Anti-A foi feita após as mitocôndrias terem consumido 50% do oxigênio no meio.

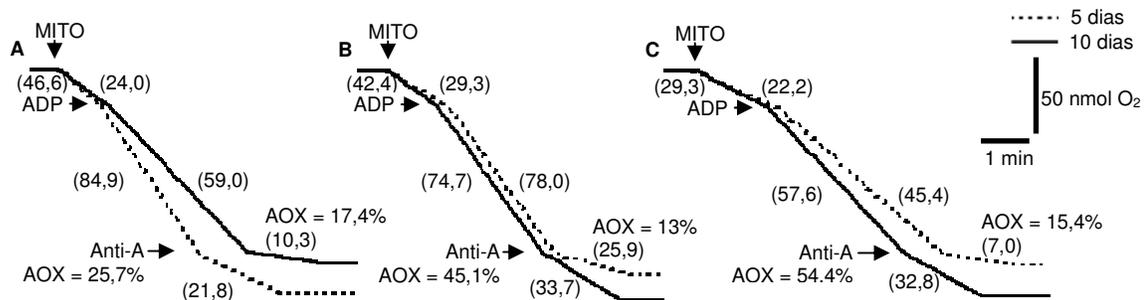


Figura 12. Traçados representativos da atividade da AOX em mitocôndrias isoladas dos genótipos L1 (A), selvagem (B) e L5 (C), após 5 e 10 dias de cultivo celular. Conforme indicado na figura, mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 0,25 mol.L⁻¹, 0,1% BSA, 10 mmol.L⁻¹, tampão fosfato (pH 7,2), MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹ e como substrato respiratório malato 10 mmol.L⁻¹ + glutamato 10 mmol.L⁻¹. Após a suspensão mitocondrial ter consumido 50% do oxigênio do meio de reação foi adicionado Anti-A (10 μmol.L⁻¹) e em seguida *n*-propil galato (GAL, 100 μmol.L⁻¹), conforme indicado. A atividade AOX foi determinada como sendo a respiração resistente à Anti-A e sensível ao GAL.

A Figura 12 apresenta traçado original de experimentos representativos, evidenciando as diferenças entre os 3 genótipos quanto à atividade da AOX nas mitocôndrias isoladas de culturas de 5 e 10 dias. Resultados similares foram obtidos em mitocôndrias energizadas com succinato, embora as diferenças entre os genótipos não tenham sido tão evidentes, provavelmente porque o malato é um ativador da AOX (Rhoads *et al.*, 1998; Umbach *et al.*, 2006).

Os dados apresentados nas Figuras 11 e 12 indicam uma resposta diferenciada em relação a ativação da AOX em situação de estresse nutricional/oxidativo para os transgênicos e tipo selvagem, sugerindo uma importante ação da enzima GSNOR como sinalizadora nesse processo. Além do mais, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa indicam um importante papel da AOX na homeostase do NO (de Oliveira *et al.*, 2008; Wulff *et al.*, 2009), sugerindo que possivelmente processos de degradação deste radical estejam alterados nos transgênicos para GSNOR.

4.2.3 Análise das velocidades de consumo de oxigênio

A Figura 13A mostra que, quando as mitocôndrias foram energizadas com malato, substrato respiratório para o complexo I, houve uma tendência de aumento da velocidade máxima de consumo de oxigênio (estado III) pelas suspensões mitocondriais isoladas a partir do tipo selvagem no décimo dia de cultivo em relação ao quinto. A mesma tendência foi observada para o transgênico L5, embora as diferenças não tenham sido significativas. Já o contrário foi observado nas suspensões mitocondriais do transgênico L1; no qual a capacidade de consumo de oxigênio no estado III diminuiu no décimo dia de cultivo quando comparada ao quinto dia. Esses dados sugerem que o complexo I seja sensível à atividade da GSNOR.

Quando as mitocôndrias foram energizadas com succinato (Figura 13B), substrato respiratório para o complexo II, não foram observadas alterações nas velocidades de consumo de oxigênio pelas suspensões mitocondriais de nenhum dos três genótipos em estudo, quando se compara as velocidades no estado III ou no estado IV entre o quinto e décimo dia de cultivo. Exceção é observada no transgênico L5, no qual a velocidade IV é maior no décimo dia quando comparada ao quinto dia de cultivo. Estes resultados sugerem que o complexo II não seja sensível às alterações no

nível de GSNOR em nossas condições experimentais. Ainda, é possível que esse maior desacoplamento da mitocôndria do transgênico L5 seja devido a maior atividade da AOX (Figura 11) e da UCP (Figura 9) aos 10 dias de cultivo, quando comparado aos outros genótipos.

Quando suspensões mitocondriais foram energizadas com NADH (Figura 13C), no tipo selvagem a velocidade III de consumo de oxigênio no décimo dia de cultivo apresentou uma tendência de acréscimo quando comparada aquela do quinto dia de cultivo. Já o transgênico L1 apresentou redução na velocidade máxima de consumo de oxigênio no décimo dia em relação ao quinto dia de cultivo. O transgênico L5, embora não tenha apresentado diferença entre o quinto e décimo dia de cultivo, apresentou uma velocidade máxima de consumo de oxigênio (estado III) bem maior que aquelas observadas nos genótipos selvagem e L1. Estes dados sugerem que a inibição da enzima GSNOR induz a ativação da NADH desidrogenase externa.

É interessante ressaltar que a velocidade de repouso (estado IV) no transgênico L5 aumenta no décimo dia de cultivo, em comparação ao quinto, quando malato, succinato e NADH são utilizados como substratos respiratórios. Esse aumento sugere um desacoplamento mitocondrial, que pode resultar do incremento na atividade da AOX (Figuras 11 e 12) e da atividade UCP (Figura 9) neste genótipo.

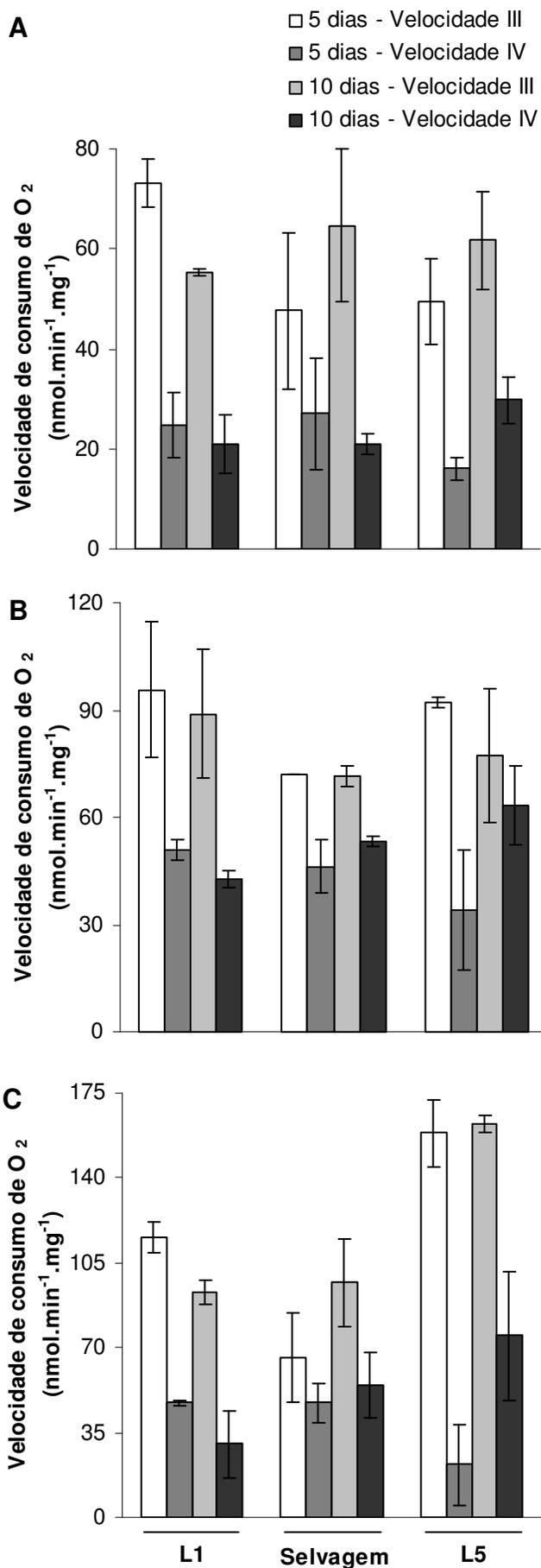


Figura 13. Velocidades de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas dos genótipos L1 (A), selvagem (B) e L5 (C). As suspensões mitocondriais foram energizadas com Malato + Glutamato (A), Succinato + Rotenona (B) e NADH (C). Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 0,25 mol.L⁻¹, 0,1% BSA, 10 mmol.L⁻¹ tampão fosfato (pH 7,2), MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹. A adição de ADP (100 nmol) foi realizada induzindo a fosforilação (estado III) e a posterior respiração de repouso (estado IV).

4.2.4 Análise da degradação do óxido nítrico

A capacidade de degradação de NO pelas mitocôndrias isoladas a partir da cultura de microcalos em suspensão dos transgênicos L1 e L5 após 5 e 10 dias de cultivo foi analisada. Para estes ensaios foram utilizados como substratos respiratórios succinato ou NADH. O NO ($\sim 0,5 \text{ nmol.L}^{-1}$), na forma de solução aquosa saturada, foi adicionado quando as suspensões mitocondriais haviam consumido 50% do oxigênio do meio de reação. Nestes experimentos a concentração de O_2 e de NO foram acompanhadas simultaneamente no meio de reação com eletrodos específicos para estas espécies. Conforme pode ser observado nas figuras 14 e 15, a degradação de NO é muito mais rápida em mitocôndrias energizadas com NADH, em relação àquelas energizadas com succinato, tanto no transgênico L1 (Figura 14) como no L5 (Figura 15), conforme já previamente observado no genótipo selvagem (Wulff *et al.*, 2009). Pode-se ainda observar que, nas mitocôndrias energizadas com NADH, a inibição da respiração é revertida, à medida que a concentração de NO do meio diminui.

A Figura 14 mostra que a inibição causada pela adição de NO na respiração de mitocôndrias isoladas do transgênico L1 foi menor no décimo dia de cultivo (Figura 14A), quando comparado ao quinto dia (Figura 14B), independente do substrato respiratório utilizado (succinato ou NADH). Quando succinato foi utilizado como substrato respiratório a inibição no quinto dia de cultivo foi de 94,9% após a adição de NO, enquanto que no décimo dia a inibição foi de 89,4%. Quando a suspensão mitocondrial foi energizada com NADH a inibição na respiração, após a adição de NO, foi de 97,9 e 93,5% no quinto e décimo dia de cultivo, respectivamente.

Em suspensões mitocondriais do transgênico L5, após 5 dias de cultivo (Figura 15A), quando as mitocôndrias são energizadas com succinato, observamos um lento consumo de NO no meio de reação, acompanhado de uma redução na velocidade de consumo de oxigênio (93,5% de inibição). Já no décimo dia de cultivo (Figura 15B) o consumo do NO no meio de reação é ainda menor que o observado no quinto dia; porém a inibição causada no consumo de oxigênio é menor (77,8% de inibição). Provavelmente, quando energizadas com succinato, o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas do transgênico L5 após 10 dias de cultivo celular seja mantido

pela alta atividade da AOX (Figura 11). Quando NADH é utilizado como substrato respiratório o consumo de NO é bastante rápido, tanto no quinto quanto no décimo dia, bem como a inibição no consumo de oxigênio é menor (95,6% no quinto dia e 85,6% no décimo dia, em relação à inibição observada no transgênico L1, que foi de 97,9 e 93,5%, respectivamente), provavelmente porque no transgênico L5 a NADH desidrogenase é bastante ativa (Figura 13C).

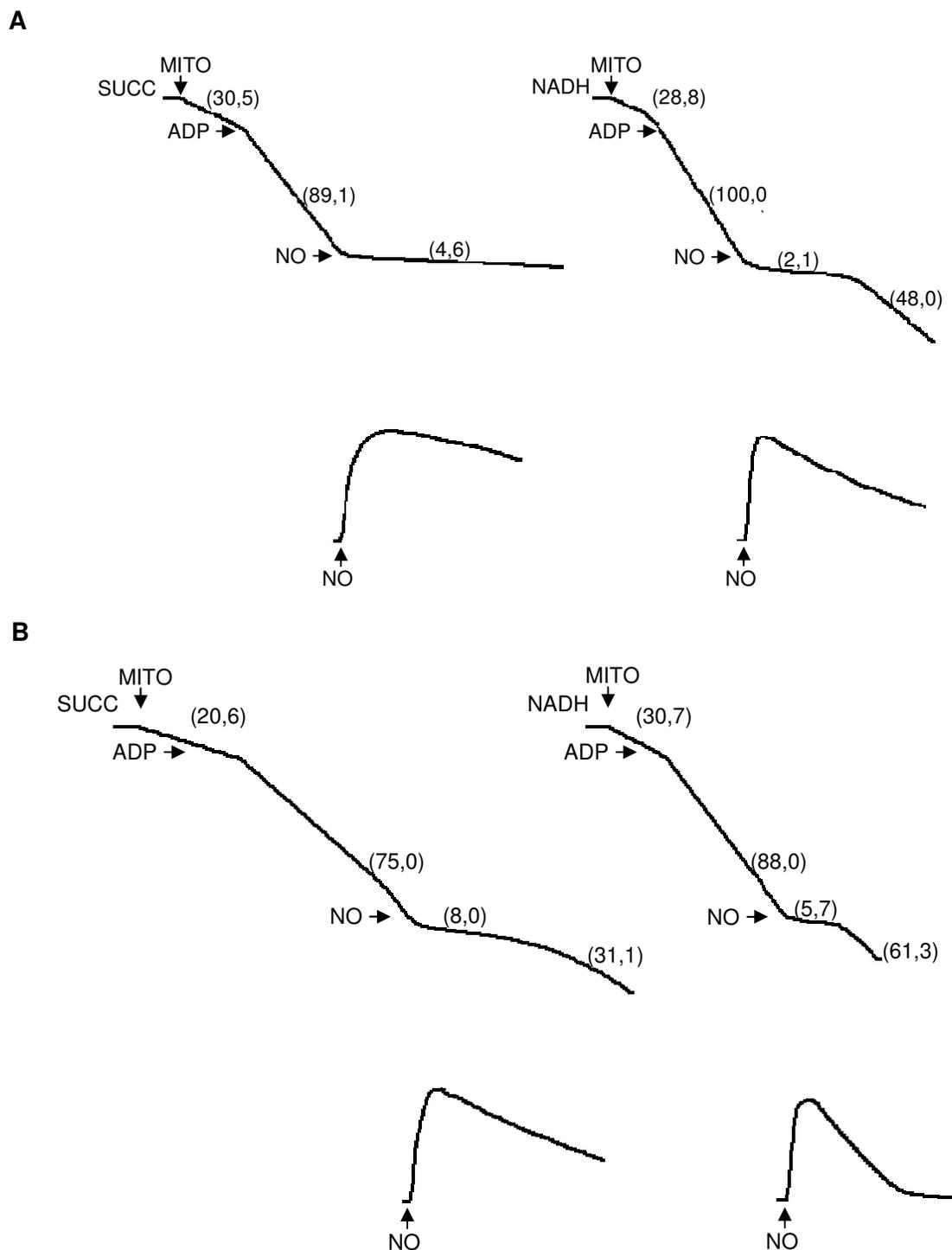


Figura 14. Degradação do NO por mitocôndrias isoladas a partir da cultura líquida de microcalos do transgênico L1 após 5 dias (A) e 10 dias (B) de cultivo. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, 0,1% BSA, 10 mmol.L^{-1} tampão fosfato (pH 7,2), MgCl_2 2 mmol.L^{-1} e como substrato respiratório 10 mmol.L^{-1} succinato ou 1 mmol.L^{-1} NADH, conforme indicado. A concentração de O_2 e de NO no meio de reação foram acompanhadas simultaneamente com eletrodos específicos para estas espécies. A adição de NO foi feita após as mitocôndrias terem consumido 50% do oxigênio no meio.

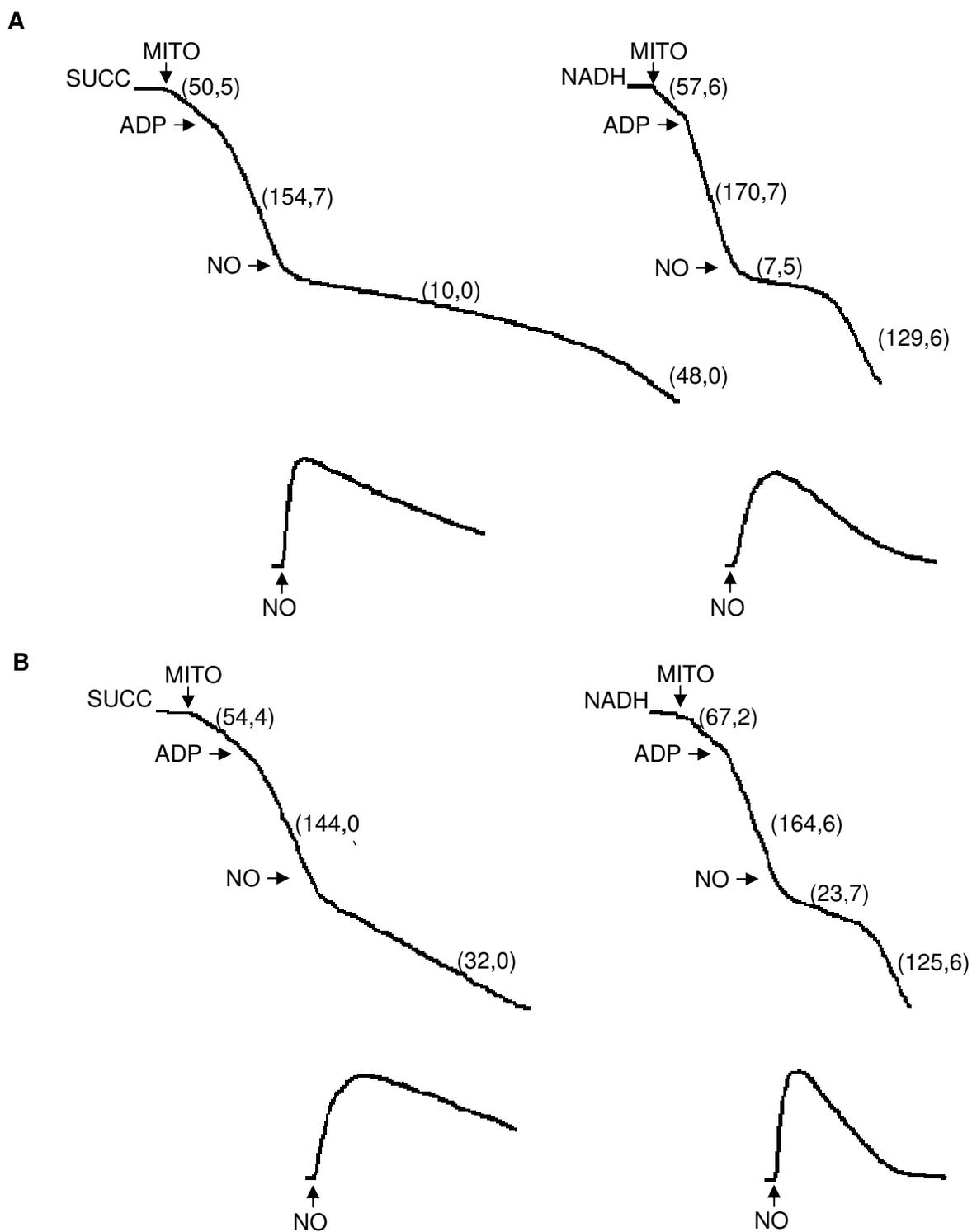


Figura 15. Degradação do NO por mitocôndrias isoladas a partir da cultura líquida de microcalos do transgênico L5 após 5 dias (A) e 10 dias (B) de cultivo. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 0,25 mol.L⁻¹, 0,1% BSA, 10 mmol.L⁻¹ tampão fosfato (pH 7,2), MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹ e como substrato respiratório 10 mmol.L⁻¹ succinato ou 1 mmol.L⁻¹ NADH, conforme indicado. A concentração de O₂ e de NO no meio de reação foram acompanhadas simultaneamente com eletrodos específicos para estas espécies. A adição de NO foi feita após as mitocôndrias terem consumido 50% do oxigênio no meio.

5. DISCUSSÃO

O NO tem sido considerado uma importante molécula sinalizadora em processos fisiológicos e de desenvolvimento, bem como nas respostas de defesa a estresses de origem biótica e abiótica em plantas (Lamattina *et al.*, 2003; Neil *et al.*, 2008; Besson-Bard *et al.*, 2008). Atualmente tem sido proposto que o GSNO apresente uma importante função na atividade regulatória do NO, agindo como um reservatório intracelular natural deste radical e, particularmente, através da S-nitrosação de resíduos de Cys em proteínas. O controle do conteúdo de GSNO e, conseqüentemente, de SNO pela enzima GSNOR é considerado um ponto chave na modulação desta via de sinalização (Liu *et al.*, 2001). Nossos dados apresentam evidências de que a GSNOR possua um importante papel na sinalização mediada pelo NO na mitocôndria vegetal.

Através da análise da curva de crescimento celular de três genótipos de *Arabidopsis thaliana* com diferentes níveis de expressão da enzima GSNOR (Figura 5) foi possível determinar o período de cultivo dos microcalos para realização dos experimentos em uma situação ótima de crescimento (5 dias) e em situação de estresse nutricional/oxidativo (10 dias). O método mais utilizado para a avaliação do crescimento celular é a determinação da massa fresca e da massa seca das células em cultura (Stepan-Sarkissian e Grey, 1990). É essencial a determinação dos dois parâmetros, já que, freqüentemente, é observado diferença entre as tendências ao longo do tempo. Inicialmente, durante a fase de aclimação, as células recuperam a capacidade de divisão. Na fase seguinte, a exponencial, há rápida divisão celular. Nesta fase a composição do meio de cultura pode influenciar na sua duração, comumente de 3-4 gerações celulares (Stepan-Sarkissian e Grey, 1990). Durante a fase linear, as células vegetais sintetizam material da parede celular e amido (açúcar de reserva) a partir de carboidratos disponíveis. Em nossas condições experimentais, passados cinco dias de cultivo após o repique, os microcalos provenientes dos três genótipos encontraram-se no meio da fase linear de crescimento. Consideramos, então, esse dia de cultivo como uma condição ótima ao crescimento celular.

Quando o crescimento da cultura passa para uma progressiva desaceleração até uma fase estacionária, as células metabolizam os carboidratos intracelulares disponíveis. Nesta situação não há mais acúmulo de amido. Justamente, a redução da massa seca corresponde a utilização do amido acumulado pelas células na fase de

crescimento linear. No entanto, a massa fresca das células estabiliza. Neste estágio, as células são maiores e apresentam a tendência de serem menos secadas pelo filtro, o que leva a uma estabilização da massa fresca. A redução na massa seca acompanhada por uma estabilização da massa fresca da cultura celular dos três genótipos é observada no décimo dia após o repique, sugerindo uma situação de estresse nutricional/oxidativo. A manutenção do cultivo nesta condição leva à morte celular, conforme observado nos três genótipos por uma progressiva redução das massas frescas e secas a partir do décimo dia sem repique (Figura 5).

Nossos dados indicam que a enzima GSNOR possui um importante papel na regulação dos níveis intracelulares de SNO em suspensões celulares de *A. thaliana* em condições ideais de cultivo. É possível observar uma tendência a redução do conteúdo de SNO nos microcalos do transgênico com superexpressão do gene *GSNOR* (L1) e um aumento no transgênico com a construção antisense do gene *GSNOR* (L5) na fase linear de crescimento celular (Figura 6). Portanto, o conteúdo de SNO apresenta-se inversamente relacionado a expressão da GSNOR em condições ideais de cultivo. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura (Feechan *et al.*, 2005; Rusterucci *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008). Neste caso, a modulação dos níveis de SNO pela enzima GSNOR seria um efeito da modulação dos níveis de GSNO e, conseqüentemente, da probabilidade de ocorrer reações de transnitrosação com resíduos de cisteínas (Liu *et al.*, 2001).

Em condições ideais de cultivo a emissão de NO no transgênico L5 foi ligeiramente superior a emissão dos genótipos selvagem e L1 (Figura 7). Atualmente, é aceito que a molécula de GSNO, formada a partir da reação entre GSH e NO, seja um reservatório intracelular do radical NO (Mathews e Kerr, 1993). Sua decomposição não enzimática regenera o anti-oxidante GSH e libera NO (Hausladen *et al.*, 1998). Portanto, a maior emissão de NO após 5 dias de cultivo pelo genótipo L5 deve, pelo menos em parte, estar relacionada ao seu maior conteúdo de SNO.

Já em uma situação de estresse nutricional, o conteúdo de SNO intracelular foi diminuído, em relação à condição ideal de crescimento e, ainda, observamos um padrão invertido quanto ao conteúdo de SNO intracelular, já que o transgênico L1 apresentou o maior conteúdo de SNO e o transgênico L5 o menor. A determinação da

emissão de NO pelos microcalos dos diferentes genótipos revelou que o padrão de emissão também se apresentou invertido na situação de estresse. O transgênico L1 teve, em média, a maior emissão de NO na situação de estresse (apesar de ser estatisticamente igual ao tipo selvagem), e o L5 o menor. É possível que, numa situação de estresse, a deficiência na expressão da GSNOR afete a síntese de NO e, conseqüentemente, a formação de SNO.

O nível de emissão de NO pela célula é também dependente de mecanismos de degradação. É sabido que o radical NO pode reagir com o O_2^- formando $ONOO^-$. Em condições fisiológicas, é proposto que o fator limitante para esta reação seja a síntese de O_2^- (Grisham *et al.*, 1999). O ânion superóxido também pode ser dismutado a H_2O_2 através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) ou espontaneamente. Ou seja, podemos considerar que o conteúdo de H_2O_2 seja um reflexo do conteúdo de O_2^- . Observamos que ambas as transgenias para a GSNOR resultaram em uma redução do conteúdo de H_2O_2 em relação ao selvagem após 5 dias de cultivo. Diversos trabalhos têm relatado a importância da manutenção de níveis basais de ROS para a manutenção da homeostase celular e, ainda, suas ações como intermediários da resposta de defesa a agentes abióticos e bióticos (Mazars *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2010). Em estresse nutricional, a produção de ROS parece não ser um fator de adaptação das células em cultura líquida, já que neste caso os níveis de H_2O_2 nos três genótipos são estatisticamente iguais. Aparentemente a enzima GSNOR não interfere na regulação do metabolismo de ROS em uma situação de estresse.

Estes resultados evidenciam a importância da GSNOR para a manutenção da homeostase e sinalização do NO em células vegetais.

Um importante alvo celular do NO são as mitocôndrias. O processo de isolamento e purificação de mitocôndrias dos microcalos após 5 e 10 dias de cultivo resultou em mitocôndrias intactas e acopladas, já que os valores dos controles respiratórios (CRs) encontrados foram superiores a 2. A diferença nos valores obtidos dos CRs neste trabalho e os obtidos por nosso grupo de pesquisa anteriormente com mitocôndrias isoladas a partir de batatas (CR ~ 5,0; de Oliveira *et al.*, 2008) se devem, provavelmente, à atividade de proteínas desacopladoras e AOX nas mitocôndrias de *A. thaliana*.

O acoplamento obtido em mitocôndrias isoladas pela adição sequencial de ADP ao meio de reação sugere a atividade de proteínas desacopladoras (Borecky *et al.*, 2001a). A presença das UCPs na membrana interna mitocondrial é responsável pela redução do potencial de membrana necessário para a síntese de ATP (Vercesi *et al.*, 1995; Borecky *et al.*, 2001b). O estudo dos controles respiratórios sugere que após 5 dias de cultivo esta proteína esteja ativa nas mitocôndrias dos três genótipos, enquanto que no décimo dia de cultivo apenas o transgênico L5 apresenta atividade UCP. É possível que a atividade da UCP seja inibida por NO já que, na situação de estresse houve um grande aumento na emissão de NO no L1 e no selvagem, mas não no L5, em relação aos níveis observados na condição ideal de cultivo. O aumento na emissão de NO em resposta a estresses de origem biótica ou abiótica é bem conhecido (Lamattina *et al.*, 2003; Neil *et al.*, 2008) e a inibição da UCP nestas condições poderia compensar o desacoplamento da respiração mitocondrial induzido pela AOX, como discutido a seguir.

Outro complexo proteico responsável pelo desacoplamento da síntese de ATP e do transporte de elétrons é a AOX (Vanlerberghe e McIntosh, 1997). A AOX é responsável por acelerar a respiração e proteger a mitocôndria da formação de radicais livres. Tal desacoplamento reduz a síntese de ATP por reduzir a força protonmotriz utilizada pela ATPsintase para condensar ADP e Pi, já que o fluxo de elétrons é desviado do complexo III, responsável pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembrana (Lenaz e Genova, 2010). Acredita-se que ROS e o radical NO sejam capazes de induzir a expressão deste acceptor de elétrons, regulando assim a respiração celular (Djajanegara *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2010). Em nossas condições experimentais, não observamos correlação positiva entre o conteúdo de H₂O₂ ou a emissão de NO com a ativação da AOX. Porém, é possível observar uma forte correlação negativa entre o conteúdo de SNO e a atividade da AOX. Interessantemente, em mitocôndrias isoladas a partir do transgênico L5, o nível basal de atividade da AOX é inferior ao observado no tipo selvagem. Porém em estresse nutricional observamos intensa ativação da AOX em preparações mitocôndrias do transgênico L5. Já é bem conhecido que o NO é capaz de estimular a expressão da AOX (Blokhina e Fagerstedt, 2010), entretanto os presentes resultados sugerem que a

atividade desta proteína possa também ser regulada negativamente pelo níveis de SNO.

As velocidades de consumo de oxigênio em mitocôndrias energizadas com diferentes substratos respiratórios também foram analisadas com o objetivo de complementar nossos estudos sobre o efeito da transgenia para a GSNOR na atividade da cadeia respiratória. Ao utilizarmos malato como substrato respiratório, pudemos observar que, ao contrário dos genótipos selvagem e L5, a atividade do complexo I foi inibida nas mitocôndrias isoladas após 10 dias de cultivo do transgênico L1. É conhecido que o NO pode nitrar o complexo I, reduzindo sua atividade (Clementi *et al.*, 1998). Já foi também demonstrado que o complexo I pode ainda ser alvo de nitrosação, apresentando redução na sua atividade (Borutaite e Brow, 2006). Assim, é possível que em condições de estresse nutricional a maior emissão de NO pelas células do transgênico L1 (Figura 7) cause a nitração ou a nitrosação do complexo I em nossas condições experimentais, enquanto que no tipo selvagem e no L5 a menor emissão de NO não seja capaz de reduzir a atividade deste complexo.

Ao contrário do complexo I, o complexo II não teve sua atividade alterada em nenhuma condição de cultivo em nenhum genótipo. De fato, não há relato na literatura sobre alterações na atividade deste complexo enzimático por NO ou GSNO, exceto em recente trabalho de Chouchani e colaboradores (2010), que observaram a nitrosação deste complexo, sob alta concentração de uma molécula doadora de NO. Embora seja bem estabelecido que o NO é capaz de regular o ciclo de Krebs (Sun *et al.*, 2007), é possível que o ponto de regulação por NO ou espécies relacionadas seja a aconitase, enzima responsável pela estereoisomerização do citrato em isocitrato (Navarre *et al.*, 2000).

Já a NADH desidrogenase externa teve sua atividade estimulada pela exposição dos microcalos do tipo selvagem a um estresse nutricional. Em contrapartida, a atividade desta desidrogenase no transgênico L1 foi reduzida após a exposição dos microcalos ao estresse. No transgênico L5 a atividade mostrou-se constitutivamente aumentada, quando comparada aos outros dois genótipos. Acredita-se que NADH desidrogenase externa seja responsável pela geração de grande quantidade de ânion superóxido (Andreyev *et al.*, 2005; de Oliveira *et al.*, 2008). O ânion superóxido é capaz

de reagir não enzimaticamente com o NO, formando peroxinitrito (Radi *et al.*, 2002). Este é considerado um importante mecanismo de degradação do NO por mitocôndrias vegetais (de Oliveira *et al.*, 2008). Portanto, a ativação da NADH desidrogenase externa no transgênico L5 poderia ser responsável pelo reduzido nível de emissão de NO através da sua degradação por espécies reativas de oxigênio produzidas na cadeia respiratória mitocondrial.

A fim de testar esta hipótese sobre a degradação do NO pelas mitocôndrias dos genótipos em estudo, determinamos o consumo de NO em mitocôndrias dos transgênicos L1 e L5 após 5 e 10 dias de cultivo energizadas com succinato e NADH (Figuras 14 e 15). Foi possível observar que em mitocôndrias energizadas com NADH, a inibição da respiração é revertida, à medida que a concentração de NO do meio diminui. Acreditamos que, com a inibição da COX pelo NO, os elétrons não podem fluir pela cadeia respiratória, situação que favorece a geração de ânion superóxido. O O_2^- reage com o NO, reduzindo sua concentração no meio e, conseqüentemente, favorecendo a sua liberação da COX e a restauração do consumo de oxigênio. Estes resultados corroboram os observados por Wulff e colaboradores (2009) que demonstraram que quando a mitocôndria é energizada com NADH observa-se uma menor inibição de sua respiração, o inverso ocorrendo quando a mitocôndria é energizada com succinato onde a degradação é mais lenta resultando numa inibição maior.

De fato, observamos maior capacidade degradativa do NO em mitocôndrias isoladas a partir de microcalos do transgênico L5 após 5 dias de cultivo, como esperávamos no período de caracterização da funcionalidade dos complexos mitocondriais. Essa capacidade foi inferida pela inibição parcial gerada pelo NO em mitocôndrias energizadas com succinato e pela restauração quase que completa da respiração quando as mitocôndrias foram energizadas com NADH; o que não foi observado no transgênico L1.

No entanto, após 10 dias de cultivo, suspensões mitocondriais do transgênico L1 apresentaram maior capacidade de degradação do NO que as suspensões mitocondriais isoladas a partir do transgênico L5. Possivelmente, a alta atividade da AOX no transgênico L5 após 10 dias de cultivo seja responsável pela redução na

velocidade de degradação do NO, já que o transgênico L1 não foi capaz de ativar a AOX após a indução do estresse. O conjunto destes resultados fortalece nossa hipótese de que o conteúdo de SNO após 10 dias de cultivo seja regulado pela síntese de NO.

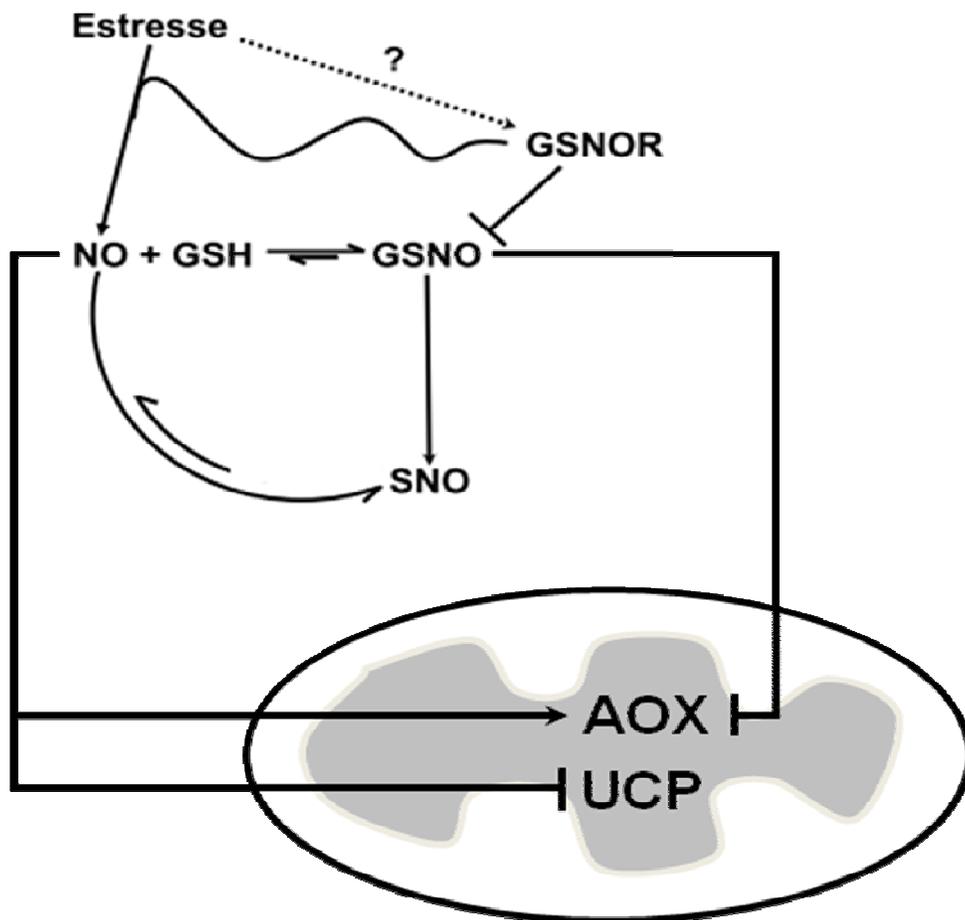


Figura 16. Modelo hipotético para explicar o papel da GSNOR nas alterações na funcionalidade mitocondrial de cultura celular de *A. thaliana* mediada por NO. Nossos dados fortalecem a hipótese de que o conteúdo de SNO seja controlado pela atividade da enzima GSNOR em uma situação ideal de cultivo celular.

Em uma situação de estresse nutricional, nossos dados sugerem que a atividade da GSNOR seja importante na regulação de mecanismos de síntese e/ou de degradação de NO. Nesta situação o conteúdo de SNO parece ser um reflexo do nível de emissão deste radical. O nossos resultados sugerem que o aumento de atividade da AOX seja dependente da depleção do conteúdo de SNO; e a atividade UCP seja inibida pelo NO.

6. CONCLUSÃO

Concluimos, por tanto, que a enzima GSNOR possui um importante papel no controle do estado redox e da atividade da cadeia respiratória mitocondrial em células de *A. thaliana*. A diferente atividade de complexos protéicos da cadeia respiratória, observado no processo de caracterização das mitocôndrias isoladas dos transgênicos com maior (L1) e menor (L5) expressão da enzima GSNOR, bem como os dados referentes a emissão de NO pelas células e os conteúdos de SNO, suportam esta hipótese. Nossos dados acrescentam evidências de que a GSNOR controle o nível de SNO intracelular em condições fisiológicas. Porém sob estresse, o conteúdo de SNO dependeria também dos mecanismos de síntese de NO. Postulamos, ainda, que o aumento de atividade da AOX seja dependente da depleção do conteúdo de SNO; assim como o complexo I e a NADH desidrogenase externa e a UCP são responsáveis às alterações na expressão da GSNOR. Enfim, nossos resultados evidenciam a importância da adequada atividade da GSNOR para o funcionamento da cadeia respiratória.

7. BIBLIOGRAFIA

- Achkor, H., Diaz, M., Fernandez, M.R., Biosca, J.A., Pares, X., and Martinez, M.C. (2003). Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *132*, 2248-2255.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* *357*, 593-615.
- An, G., Watson, B.D., and Chiang, C.C. (1986). Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and *Arabidopsis thaliana* Using a Binary Ti Vector System. *Plant Physiol* *81*, 301-305.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., and Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* *70*, 200-214.
- ArabidopsisHome (2011). Online. [Http://www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/).
- Aracena-Parks, P., Goonasekera, S.A., Gilman, C.P., Dirksen, R.T., Hidalgo, C., and Hamilton, S.L. (2006). Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to disulfides in ryanodine receptor type 1. *J Biol Chem* *281*, 40354-40368.
- Babbs, C.F., Pham, J.A., and Coolbaugh, R.C. (1989). Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol* *90*, 1267-1270.
- Bechtold, N., and Pelletier, G. (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* *82*, 259-266.
- Belenghi, B., Romero-Puertas, M.C., Vercammen, D., Brackenier, A., Inze, D., Delledonne, M., and Van Breusegem, F. (2007). Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* *282*, 1352-1358.
- Beligni, M.V., and Lamattina, L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* *210*, 215-221.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* *59*, 21-39.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G., and Jones, R.L. (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* *57*, 517-526.
- Blokhina, O., and Fagerstedt, K.V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiol Plant* *138*, 447-462.
- Borecky, J., Maia, I.G., and Arruda, P. (2001a). Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. *Biosci Rep* *21*, 201-212.
- Borecky, J., Maia, I.G., Costa, A.D., Jezek, P., Chaimovich, H., de Andrade, P.B., Vercesi, A.E., and Arruda, P. (2001b). Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* *505*, 240-244.
- Borutaite, V., and Brown, G.C. (1996). Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem J* *315 (Pt 1)*, 295-299.
- Borutaite, V., and Brown, G.C. (2006). S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production. *Biochim Biophys Acta* *1757*, 562-566.
- Chance, B., and Williams, G.R. (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* *176*, 250-254.
- Chen, R., Sun, S., Wang, C., Li, Y., Liang, Y., An, F., Li, C., Dong, H., Yang, X., Zhang, J., *et al.* (2009). The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Res* *19*, 1377-1387.
- Chouchani, E.T., Hurd, T.R., Nadochiy, S.M., Brookes, P.S., Fearnley, I.M., Lilley, K.S., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2010). Identification of S-nitrosated mitochondrial proteins by S-nitrosothiol difference in gel electrophoresis (SNO-DIGE): implications for the regulation of mitochondrial function by reversible S-nitrosation. *Biochem J* *430*, 49-59.
- Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S., and Schapira, A.H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial

- respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* **345**, 50-54.
- Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M., and Moncada, S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7631-7636.
- de Oliveira, H.C., Wulff, A., Saviani, E.E., and Salgado, I. (2008). Nitric oxide degradation by potato tuber mitochondria: evidence for the involvement of external NAD(P)H dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 470-476.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., and Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13454-13459.
- Diaz, M., Achkor, H., Titarenko, E., and Martinez, M.C. (2003). The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett* **543**, 136-139.
- Djajanegara, I., Finnegan, P.M., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J., and Day, D.A. (2002). Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Mol Biol* **50**, 735-742.
- Dolferus, R., Osterman, J.C., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1997). Cloning of the Arabidopsis and rice formaldehyde dehydrogenase genes: implications for the origin of plant ADH enzymes. *Genetics* **146**, 1131-1141.
- Durner, J., and Klessig, D.F. (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 369-374.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J.A., and Loake, G.J. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8054-8059.
- Fu, L.J., Shi, K., Gu, M., Zhou, Y.H., Dong, D.K., Liang, W.S., Song, F.M., and Yu, J.Q. (2010). Systemic induction and role of mitochondrial alternative oxidase and nitric oxide in a compatible tomato-Tobacco mosaic virus interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 39-48.
- Gabaldon, C., Gomez Ros, L.V., Pedreno, M.A., and Ros Barcelo, A. (2005). Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol* **165**, 121-130.
- Gao, Y. (2010). The multiple actions of NO. *Pflugers Arch* **459**, 829-839.
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., and Blatt, M.R. (2003). Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11116-11121.
- Gay, C., Collins, J., and Gebicki, J.M. (1999). Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem* **273**, 149-155.
- Giese, M., Bauer-Doranth, U., Langebartels, C., and Sandermann, H., Jr. (1994). Detoxification of Formaldehyde by the Spider Plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by Soybean (*Glycine max* L.) Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol* **104**, 1301-1309.
- Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., Posencheg, M.A., and Ischiropoulos, H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L262-268.
- Gow, A.J., and Ischiropoulos, H. (2001). Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J Cell Physiol* **187**, 277-282.
- Grisham, M.B., Jour'd'Heuil, D., and Wink, D.A. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* **276**, G315-321.
- Guo, F.Q., and Crawford, N.M. (2005). Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436-3450.
- Guo, F.Q., Okamoto, M., and Crawford, N.M. (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**, 100-103.
- Hachiya, T., and Noguchi, K. (2011). Integrative response of plant mitochondrial electron transport chain to nitrogen source. *Plant Cell Rep* **30**, 195-204.

- Hausladen, A., Gow, A.J., and Stamler, J.S. (1998). Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 14100-14105.
- He, Y., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., *et al.* (2004). Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* *305*, 1968-1971.
- Henry, Y.A., Ducastel, B., and Guissani, A. (1997). Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. In YA Henry, B Ducastel, A Guissani, eds, Nitric oxide research from chemistry to biology: EPR spectroscopy of nitrosylated compounds *R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA, pp 15-46.*
- Holzmeister, C., Frohlich, A., Sarioglu, H., Bauer, N., Durner, J., and Lindermayr, C. (2011). Proteomic analysis of defense response of wildtype Arabidopsis thaliana and plants with impaired NO- homeostasis. *Proteomics* *11*, 1664-1683.
- Hu, X., Neill, S.J., Tang, Z., and Cai, W. (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* *137*, 663-670.
- Huang, X., von Rad, U., and Durner, J. (2002). Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in Arabidopsis suspension cells. *Planta* *215*, 914-923.
- Initiative, T.A.G. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* *408*, 796-815.
- Ischiropoulos, H. (2003). Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* *305*, 776-783.
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C.G., and Puntarulo, S. (2006). Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiol* *142*, 1246-1255.
- Jensen, D.E., and Belka, G.K. (1997). Enzymic denitrosation of 1,3-dimethyl-2-cyano-1-nitrosoguanidine in rat liver cytosol and the fate of the immediate product S-nitrosoglutathione. *Biochem Pharmacol* *53*, 1279-1295.
- Jensen, D.E., Belka, G.K., and Du Bois, G.C. (1998). S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J* *331 (Pt 2)*, 659-668.
- Ji, Y., Akerboom, T.P., Sies, H., and Thomas, J.A. (1999). S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione. *Arch Biochem Biophys* *362*, 67-78.
- Jin, C.W., Du, S.T., Zhang, Y.S., Lin, X.Y., and Tang, C.X. (2009). Differential regulatory role of nitric oxide in mediating nitrate reductase activity in roots of tomato (*Solanum lycocarpum*). *Ann Bot* *104*, 9-17.
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B.O., Feelisch, M., and Vierling, E. (2008). Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. *Plant Cell* *20*, 786-802.
- Leiper, J., and Nandi, M. (2011). The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nat Rev Drug Discov* *10*, 277-291.
- Lenaz, G., Baracca, A., Barbero, G., Bergamini, C., Dalmonte, M.E., Del Sole, M., Faccioli, M., Falasca, A., Fato, R., Genova, M.L., *et al.* (2010). Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochim Biophys Acta* *1797*, 633-640.
- Lenaz, G., and Genova, M.L. (2009). Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 1750-1772.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Bahnweg, G., and Durner, J. (2006). Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* *281*, 4285-4291.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., and Durner, J. (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* *137*, 921-930.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., and Stamler, J.S. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* *410*, 490-494.

- Lloyd, A.M., Barnason, A.R., Rogers, S.G., Byrne, M.C., Fraley, R.T., and Horsch, R.B. (1986). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* *234*, 464-466.
- Martinez, M.C., Achkor, H., Persson, B., Fernandez, M.R., Shafqat, J., Farres, J., Jornvall, H., and Pares, X. (1996). *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class p and liver class I alcohol dehydrogenases. *Eur J Biochem* *241*, 849-857.
- Martins, I.S., and Vercesi, A.E. (1985). Some characteristics of Ca²⁺ transport in plant mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* *129*, 943-948.
- Mathews, W.R., and Kerr, S.W. (1993). Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* *267*, 1529-1537.
- Mazars, C., Thuleau, P., Lamotte, O., and Bourque, S. (2010). Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Mol Plant* *3*, 706-718.
- Millar, A.H., and Day, D.A. (1996). Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* *398*, 155-158.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* *191*, 144-148.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M., Magalhaes, J.R., and Salgado, I. (2005). Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett* *579*, 3814-3820.
- Mur, L.A., Carver, T.L., and Prats, E. (2006). NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* *57*, 489-505.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* *15*, 473-479.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., and Wilson, I. (2008). Nitric oxide evolution and perception. *J Exp Bot* *59*, 25-35.
- Olson, B.J., Skavdahl, M., Ramberg, H., Osterman, J.C., and Markwell, J. (2000). Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization and possible targeting to the chloroplast. *Plant Sci* *159*, 205-212.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* *327*, 524-526.
- Park, J.W. (1988). Reaction of S-nitrosoglutathione with sulfhydryl groups in protein. *Biochem Biophys Res Commun* *152*, 916-920.
- Perazzolli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M.C., Zago, E., Zeier, J., Sonoda, M., Lamb, C., and Delledonne, M. (2004). *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* *16*, 2785-2794.
- Petrussa, E., Bertolini, A., Krajinakova, J., Casolo, V., Macri, F., and Vianello, A. (2008). Isolation of mitochondria from embryogenic cultures of *Picea abies* (L.) Karst. and *Abies cephalonica* Loud.: characterization of a K⁺(ATP) channel. *Plant Cell Rep* *27*, 137-146.
- Piterkova, J., Petrivalsky, M., Luhova, L., Mieslerova, B., Sedlarova, M., and Lebeda, A. (2009). Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Mol Plant Pathol* *10*, 501-513.
- Planchet, E., Jagadis Gupta, K., Sonoda, M., and Kaiser, W.M. (2005). Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* *41*, 732-743.
- Radi, R., Cassina, A., and Hodara, R. (2002). Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* *383*, 401-409.
- Rusterucci, C., Espunya, M.C., Diaz, M., Chabannes, M., and Martinez, M.C. (2007). S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol* *143*, 1282-1292.

- Sakamoto, A., Ueda, M., and Morikawa, H. (2002). Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett* 515, 20-24.
- Saviani, E.E., and Martins, I.S. (1998). Fatty acid-mediated uncoupling of potato tuber mitochondria. *Biochem Mol Biol Int* 44, 833-839.
- Saville, B. (1958). A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83, 670-672.
- Seligman, K., Saviani, E.E., Oliveira, H.C., Pinto-Maglio, C.A., and Salgado, I. (2008). Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant Cell Physiol* 49, 1112-1121.
- Smith, M. (1988). Molecular genetic studies on alcohol and aldehyde dehydrogenase: individual variation, gene mapping and analysis of regulation. *Biochem Soc Trans* 16, 227-230.
- Stepan-Sarkissian, G., and Grey, D. (1990). Growth determination and medium analysis. *Methods Mol Biol* 6, 13-27.
- Sun, J., Morgan, M., Shen, R.F., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2007). Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ Res* 101, 1155-1163.
- Torres, M.A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* 138, 414-429.
- Uotila, L., and Koivusalo, M. (1979). Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Arch Biochem Biophys* 196, 33-45.
- Vanlerberghe, G.C., and McIntosh, L. (1997). ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 703-734.
- Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M., and Chaimovich, H. (1995). PUMPing plants. *Nature*, 375.
- Wink, D.A., Hanbauer, I., Grisham, M.B., Laval, F., Nims, R.W., Laval, J., Cook, J., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M., *et al.* (1996). Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul* 34, 159-187.
- Wulff, A., Oliveira, H.C., Saviani, E.E., and Salgado, I. (2009). Nitrite reduction and superoxide-dependent nitric oxide degradation by *Arabidopsis* mitochondria: influence of external NAD(P)H dehydrogenases and alternative oxidase in the control of nitric oxide levels. *Nitric Oxide* 21, 132-139.
- Yamasaki, H., and Sakihama, Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* 468, 89-92.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y., and Sakihama, Y. (2001). Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* 5, 261-270.
- Ye, X., Kim, W.S., Rubakhin, S.S., and Sweedler, J.V. (2004). Measurement of nitric oxide by 4,5-diaminofluorescein without interferences. *Analyst* 129, 1200-1205.
- Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A., and Delledonne, M. (2006). Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol* 141, 379-383.
- Zemojtel, T., Frohlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., Wanker, E.E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P., *et al.* (2006). Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci* 11, 524-525; author reply 526-528.
- Zhang, X., Kim, W.S., Hatcher, N., Potgieter, K., Moroz, L.L., Gillette, R., and Sweedler, J.V. (2002). Interfering with nitric oxide measurements. 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *J Biol Chem* 277, 48472-48478.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., Li, B., and Zhang, L. (2004). Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol* 134, 849-857.

Zhu, Y., Lu, J., Wang, J., Chen, F., Leng, F., and Li, H. (2011). Regulation of thermogenesis in plants: the interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein. *J Integr Plant Biol* 53, 7-13.