

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALFREDO WULFF



**MECANISMOS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO RADICAL
ÓXIDO NÍTRICO PELA MITOCÔNDRIA DE *Arabidopsis thaliana***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ALFREDO WULFF
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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


Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

W956m	<p>Wulff, Alfredo</p> <p>Mecanismos de síntese e degradação do radical óxido nítrico pela mitocôndria de <i>Arabidopsis thaliana</i> / Alfredo Wulff. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadora: Ione Salgado. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Plantas – Mitocôndria. 2. Nitritos. 3. Óxido nítrico. 4. Reação de oxidação-redução. I. Salgado, Ione. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	--

Título em inglês: Mechanisms of synthesis and degradation of the radical nitric oxide by mitochondria of *Arabidopsis thaliana*.

Palavras-chave em inglês: Plant mitochondria; Nitric oxide; Nitrites; Oxidation-reduction reaction.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Ione Salgado, Celene Fernandes Bernardes, Fernanda Ramos Gadelha.

Data da defesa: 14/03/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 14 de Março de 2008

Banca Examinadora

Professores Titulares

Profa. Dra. Ione Salgado (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Celene Fernandes Bernardes


Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha


Assinatura

Profa. Dra. Márcia Regina Braga

Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, que me apoiaram em minhas escolhas e ajudaram a seguir meu caminho. A minha namorada que sempre está ao meu lado.

E claro, quero agradecer aos que diretamente me ajudaram a concluir meu projeto: a minha orientadora Prof. Dra. Ione Salgado, pela paciência e ensinamentos, as técnicas do laboratório Elzira e Jusceley e aos companheiros de laboratório Halley, Kelly e Pablo pela ajuda e companheirismo. A Andréia da secretaria da pós graduação sempre disposta a ajudar e esclarecer dúvidas.

Gostaria também de agradecer aos membros que participaram de minha banca e pré banca: Prof. Dra Celene Fernandes Bernardes, Prof. Dra. Fernanda Ramos Gadelha e ao Prof. Dr. Carlos Bonafé.

E finalmente agradecer a Unicamp, Capes e Fapesp.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xi
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Propriedades físico-químicas e alvos moleculares do NO	2
1.2 - Alvos do NO na mitocôndria	4
1.3 - Síntese de NO a partir de L-arginina.....	6
1.4 - Papel da nitrato redutase na síntese de NO	8
1.5 - Síntese de NO a partir de nitrito	10
1.6 - Degradação de NO	13
1.7 - Degradação de NO pela mitocôndria	14
1.8 - Degradação de NO pela mitocôndria vegetal	15
1.9 – <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2 – OBJETIVOS.....	17
3 - MATERIAL e MÉTODOS	18
3.1 - Material vegetal.....	18
3.2 - Preparação da suspensão mitocondrial	18
3.3 - Atividade respiratória.....	21

3.4 - Potencial elétrico de membrana ($\Psi\Delta$).....	22
3.5 - Transporte de Ca^{2+}	22
3.6 - Medida de NO e O_2	22
3.7 - Preparo de NO e de doadores de NO	23
3.8 - Análise de dados.....	24
 4 – RESULTADOS.....	 24
4.1 - Isolamento de mitocôndrias de <i>A. thaliana</i> a partir de células em suspensão.....	24
4.2 - Controle respiratório e expressão da AOX em mitocôndrias isoladas de <i>A.</i> <i>thaliana</i>	24
4.3 - Potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de <i>A. thaliana</i>	28
4.4 - Efeito do nitrito na respiração mitocondrial	34
4.5 - Síntese de NO a partir de nitrito	41
4.6 – Efeito de NO na respiração	50
4.7 - Degradação do NO por Mitocôndrias isoladas de <i>A. thaliana</i>	50
4.8 – Consumo de oxigênio por mitocôndrias de <i>A. thaliana</i> na presença de L- arginina.....	55
 5 – DISCUSSÃO.....	 57
 6 – CONCLUSÕES.....	 64
 7 – REFERÊNCIAS.....	 65

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos de síntese e de degradação do radical óxido nítrico (NO) pela mitocôndria vegetal, com ênfase à influência das NAD(P)H desidrogenases e da oxidase alternativa (AOX) nestes processos. Os experimentos foram realizados com mitocôndrias isoladas de células em cultura da planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Inicialmente estabeleceu-se um protocolo para o isolamento e purificação de mitocôndrias, cuja integridade funcional foi determinada pelo controle respiratório, potencial elétrico de membrana e transporte eletroforético de cálcio. Os processos de síntese e de degradação de NO foram analisados monitorando-se o consumo de oxigênio e as concentrações de NO no meio de reação, com eletrodos específicos. Os resultados mostraram que o nitrito inibiu a respiração das mitocôndrias de *A. thaliana* em competição com o oxigênio do meio. Esta inibição foi revertida por cPTIO, um sequestrador de NO. Quando a AOX foi inibida por *n*-propilgalato, o efeito inibitório do nitrito na respiração mitocondrial foi aumentado, enquanto que, na presença de myxothiazol, que previne a redução da citocromo *c* oxidase (COX), o nitrito não teve efeito na respiração. Os efeitos observados do nitrito no consumo de oxigênio sugeriram que NO foi sintetizado pelas mitocôndrias de *A. thaliana* através de uma atividade redutora de nitrito. Entretanto, a síntese de NO a partir de nitrito foi principalmente detectada em anaerobiose. Em altas concentrações de nitrito (1-5 mM), a produção de NO se mostrou praticamente insensível aos inibidores da cadeia respiratória, enquanto que, em concentrações menores de nitrito (100 -200 μ M) a COX, mas não a AOX, contribuiu para a síntese de NO. A exposição das mitocôndrias ao NO ou ao nitrito causou uma inibição transiente e menor no consumo de oxigênio quando NAD(P)H foi utilizado como substrato respiratório, em relação ao succinato. Estas inibições foram potencializadas por superóxido dismutase, sugerindo um mecanismo de degradação de NO dependente de NAD(P)H

e de oxigênio pelas mitocôndrias de *A. thaliana*. O conjunto dos resultados mostra que o NO pode ser produzido pela mitocôndria de *A. thaliana* através de uma atividade redutora de nitrito e que as NAD(P)H desidrogenases e a AOX, além da COX, podem interferir nesta produção. Em aerobiose, a quantidade de NO produzido pode ser controlada pelas atividades de degradação das NAD(P)H desidrogenases e pela COX. A AOX contribui de maneira oposta, ajudando a manter a concentração de NO. Em anaerobiose a atividade redutora de nitrito é favorecida sendo o NO produzido nestas condições pela COX e também devido ao estado mais reduzido da cadeia respiratória. Ainda, em anaerobiose, os mecanismos de degradação de NO, dependentes de oxigênio, estão inibidos. Em conclusão, os resultados deste trabalho mostram a importância das proteínas alternativas da cadeia respiratória da mitocôndria para a homeostase do NO na planta.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the mechanisms of synthesis and degradation of NO by plant mitochondria, with emphasis on the influence of the NAD(P)H dehydrogenases and the alternative oxidase (AOX) in these processes. The experiments were carried out with mitochondria isolated from cells in culture of the model plant *Arabidopsis thaliana*. Initially, a protocol for the isolation and purification of mitochondria was established, and their functional integrity was determined by respiratory control, electric membrane potential and electrophoretic calcium transport. The processes of synthesis and degradation of NO were analyzed by monitoring oxygen consumption and NO concentration in the reaction medium with specific electrodes. The results showed that nitrite inhibited respiration of *A. thaliana* mitochondria, in competition with oxygen in the medium. This inhibition was reversed by cPTIO, an NO scavenger. When AOX was inhibited by *n*-propylgalate, the inhibitory effect of nitrite in mitochondrial respiration was increased, whereas in the presence of myxothiazol, which prevents the reduction of cytochrome *c* oxidase (COX), nitrite had no effect on respiration. The observed effects of nitrite in the oxygen consumption suggested that NO was synthesized by *A. thaliana* mitochondria through a nitrite reductase activity. Meanwhile, the synthesis of NO from nitrite was mainly detected under anaerobiosis. At high concentrations of nitrite (1-5 mM), the production of NO was virtually insensitive to inhibitors of the respiratory chain, while at lower concentrations of nitrite (100-200 μ M) COX, but not AOX, contributed for the synthesis of NO. The exposure of mitochondria to NO or nitrite caused a transient and lower inhibition in oxygen consumption when NAD(P)H was used as respiratory substrate, compared to succinate. These inhibitions were enhanced by superoxide dismutase, suggesting an NAD(P)H- and oxygen-dependent mechanism for NO degradation by mitochondria of *A. thaliana*. The overall results

show that NO can be produced by *A. thaliana* mitochondria through a nitrite reductase activity and that NAD(P)H dehydrogenases and AOX, in addition to COX, can interfere in this production. In aerobiosis the amount of NO produced can be controlled by the degradation activities of NAD(P)H dehydrogenases and COX. The AOX has an opposite effect, keeping the concentration of NO. In anaerobiosis the nitrite reductase activity is favored and NO is produced in these circumstances by COX, and also due to the more reduced state of the respiratory chain. Additionally, in anaerobiosis, the oxygen-dependent mechanisms of NO degradation are inhibited. In conclusion, the results of this study show the importance of the alternative proteins of the mitochondrial respiratory chain for NO homeostasis in the plant.

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-A - Antimicina-A

AOX - Oxidase alternativa

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

CR - Controle respiratório

COX - Citocromo c oxidase

cPTIO - 2-(4-carboxyfeenil)-4,4,5,5-tetrametilamidazol-1-oxil-3-oxido

DEA-NONOato - 2-oxido 2-(N,N-detilamino)-diazenolato

EGTA - Ácido tetracético etilenoglicol

FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

GSNO - *S*-nitrosoglutationa

NAD(P)H desidrogenases - Nicotinamida adenina dinucleotídeo(P)

NO - Óxido nítrico

NO₂ - Nitrito

NO₃ - Nitrato

NOS - Óxido nítrico sintase

NR - Nitrato redutase

KCN - Cianeto de potássio

SOD - Superóxido dismutase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ESQUEMA 1 - Alvos do radical óxido nítrico na mitocôndria.

ESQUEMA 2 - Síntese de NO a partir de L-arginina pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS).

ESQUEMA 3 - Metabolismo do nitrogênio nas plantas, destacando a atividade redutora de nitrato (NO_3^-) da nitrato redutase (NR) e também a atividade redutora de nitrito (NO_2^-) da NR que resulta na síntese de óxido nítrico (NO).

ESQUEMA 4 - Principais vias sugeridas para a produção de óxido nítrico (NO) nas plantas.

ESQUEMA 5 - Vias de degradação de NO já identificadas nas plantas.

ESQUEMA 6 - Cadeia respiratória da mitocôndria vegetal, destacando as vias alternativas.

ESQUEMA 7 - Imagens da planta *Arabidopsis thaliana*.

ESQUEMA 8 - Diagrama da técnica de isolamento de mitocôndrias de células de *Arabidopsis thaliana* cultivadas *in vitro*.

TABELA 1 - Meio de cultura utilizado para irrigar as plantas de *Arabidopsis thaliana*.

TABELA 2 - Meio de cultura utilizado para indução de calos e manutenção da cultura sólida e líquida (sem ágar) de células de *Arabidopsis thaliana*.

TABELA 3 - Controle respiratório (CR), determinado pela relação entre a velocidade de consumo de oxigênio entre os estados respiratórios 3 (fosforilação) e 4 (repouso), de mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana* quando energizadas com Malato 10 mM e Glutamato 10 mM.

TABELA 4 - Controles respiratórios (CR), de mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* com maior expressão de AOX.

TABELA 5 - Efeito da L-arginina e nitrito no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

FIGURA 1 - Consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* energizadas com diferentes substratos respiratórios.

FIGURA 2 - Efeito de inibidor do complexo III (Anti-A) e inibidor da AOX (Galato) no consumo de O₂ por mitocôndrias de *Arabidopsis thaliana*.

FIGURA 3 - Potencial elétrico de Membrana ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias energizadas de *Arabidopsis thaliana*.

FIGURA 4 - Transporte de Ca²⁺ por mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana*.

FIGURA 5 - Efeito de nitrito (NO₂⁻) sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana*.

FIGURA 6 - Inibição do consumo de oxigênio pela adição de nitrito em diferentes concentrações de O₂.

FIGURA 7 - Efeito de nitrito (NO₂⁻) sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana* com a AOX (presença de galato) ou COX (presença de Anti-A) inibida.

FIGURA 8 - Análise do efeito inibitório de nitrito (NO₂⁻) sobre a atividade da COX e da AOX de mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

FIGURA 9 - Detecção de NO com sensor eletroquímico. Efeito da concentração de oxigênio.

FIGURA 10 - Síntese de NO por mitocôndrias de *A. thaliana*.

FIGURA 11 - Síntese de NO por mitocôndrias de *A. thaliana* em função da concentração de nitrito.

FIGURA 12 - Efeito de SOD na detecção de NO produzido por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* a partir de nitrito 5mM.

FIGURA 13 - Produção de NO dependente de mitocôndria e efeito de inibidores da cadeia de transporte de elétrons.

FIGURA 14 - Síntese de NO por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*, em concentrações reduzidas de nitrito.

FIGURA 15 - Análise do efeito do NO sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana*.

FIGURA 16 - Análise da degradação NO liberado por GSNO sobre mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

FIGURA 17 - Degradação de NO, liberado por DEA-NONOato (DEA), por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

1 - INTRODUÇÃO

O radical óxido nítrico (NO) é um radical livre que está associado a diversos processos fisiológicos celulares e também a condições patológicas (Mayer and Hemmes 1997). Estudos em sistemas animais demonstraram que o NO atua em uma grande variedade de processos, desde o relaxamento de células endoteliais (Palmer *et al.* 1987, Ignarro *et al.* 1987) até o controle da pressão sanguínea, agregação de plaquetas, neurotransmissão e resposta imune (Mayer and Hemmes 1997). Dessa forma, a produção descontrolada de NO resulta em várias patofisiologias; seu excesso é associado a doenças neurodegenerativas e sua deficiência à diabetes, hipertensão, entre outras doenças cardiorespiratórias (Naseem 2005).

O NO tem também se destacado como um importante sinalizador para os vegetais. Várias evidências têm demonstrado o envolvimento deste radical no metabolismo vegetal e em processos de desenvolvimento como germinação de sementes, crescimento da raiz, expansão foliar, movimento estomatal e florescimento (Lamattina *et al.* 2003, He *et al.* 2004, Del Rio *et al.* 2004, Magalhães *et al.* 2005, Salgado *et al.* 2006). O NO atua também mediando respostas de defesa das plantas a sinais bióticos e abióticos (Neill *et al.* 2003, Del Rio *et al.* 2004, Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek 2007). Assim, a produção de NO é aumentada durante várias interações planta-patógeno (Salgado *et al.* 2004, Delledonne 2005). Várias substâncias de origem microbiana que provocam respostas de defesa na planta são também capazes de induzir a produção de NO em tecidos ou células de origem vegetal (Foissner *et al.* 2000, Modolo *et al.* 2002, Lamotte *et al.* 2004, Yamamoto *et al.* 2004, Zeidler *et al.* 2004, Yamamoto-Katou *et al.* 2006). O NO, juntamente com espécies reativas de oxigênio, está envolvido na morte celular localizada que ocorre no tecido hospedeiro (resposta hipersensitiva, RH) durante interações incompatíveis entre planta e patógenos (Delledonne *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2003, Tada *et al.* 2004, Murgia *et al.* 2004). O NO induz aumento na expressão de genes de vias biossintéticas que levam ao acúmulo de metabólitos com atividade

antimicrobiana (Delledonne *et al.* 1998, Durner *et al.* 1998, Modolo *et al.* 2002) e também é capaz de provocar acúmulo de ácido salicílico, uma molécula que tem um papel central na resistência sistêmica adquirida dos vegetais (Durner *et al.* 1998).

Apesar das crescentes evidências que vêm demonstrando o envolvimento do NO em diferentes aspectos do metabolismo, fisiologia e defesa das plantas, os mecanismos responsáveis pela síntese deste radical nos vegetais não estão ainda completamente esclarecidos. Os resultados obtidos nesta área têm sido bastante controversos, e muito debate tem sido originado na literatura sobre este tema. Ainda muito pouco se conhece sobre os mecanismos de degradação de NO pelos vegetais e este é um aspecto importante já que a efetividade deste radical em atuar como sinalizador ou agente citotóxico depende de sua concentração intracelular, que certamente deve resultar do equilíbrio entre sua velocidade de síntese e de degradação.

1.1 - Propriedades físico-químicas e alvos moleculares do NO

As propriedades físico-químicas, assim como os inúmeros alvos de suas reações sugerem a importância do NO como uma molécula sinalizadora, biologicamente ativas e reguladoras do metabolismo. O NO é um radical livre gasoso, sem carga e com uma meia-vida relativamente longa, quando comparado a outros radicais (Stamler *et al.* 1992). Sendo uma das menores moléculas diatômicas e altamente difusível, é capaz de migrar facilmente não apenas através de compartimentos hidrofóbicos, como as membranas, mas também através de compartimentos hidrofílicos da célula, como o citosol (Stamler *et al.* 1992). Em condições fisiológicas ele pode ser convertido em outras formas redox. Assim, o NO pode ser rapidamente oxidado pela remoção de um elétron originando o cátion nitrosônio (NO^+), ou reduzido pela adição de um elétron, formando o ânion nitroxil (NO^-), que são importantes intermediários na bioquímica do NO (Hughes 1999). Estas propriedades deste radical o

tornam uma molécula sinalizadora versátil capaz de interagir de várias maneiras com diferentes alvos celulares.

O NO é capaz de interagir com metais de transição, como Fe, Cu ou Zn, formando complexos metal-nitrosil, reatividade que explica seu efeito regulatório em fatores de transcrição e na atividade de algumas enzimas (Cooper 1999, Torres and Wilson 1999). A reação do NO com o Fe hêmico ou com o Fe de proteínas Fe-S corresponde a um dos mecanismos importantes de atuação do NO na mitocôndria. Já foi demonstrado em tabaco que a aconitase, uma enzima Fe-S que cataliza a isomerização de citrato em isocitrato tem sua atividade modificada por NO (Navarre *et al.* 2000).

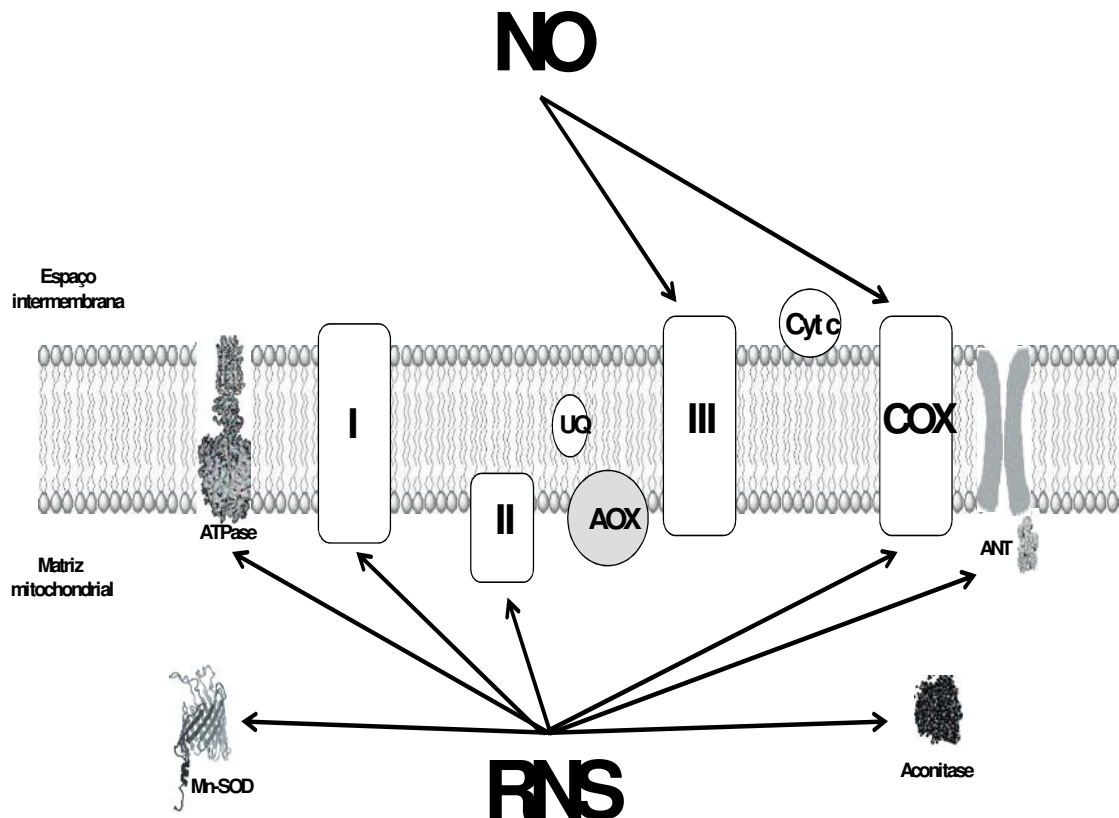
O NO^+ e o NO podem nitrosilar grupos tióis de cisteínas de proteínas (R-S-NO) (Gaston 1999). Na célula a nitrosilação reversível de grupamentos sulfidrilas de proteínas pode resultar na alteração da atividade biológica destas moléculas, constituindo este um importante mecanismo de transdução de sinal. Através de análise proteômica, vários polipeptídeos suscetíveis à S-nitrosilação foram identificados em células em cultura de *Arabidopsis*, incluindo proteínas relacionadas ao balanço redox da célula, proteínas regulatórias, proteínas do citoesqueleto e outras proteínas do metabolismo (Lindermayr *et al.* 2005). O NO pode também reagir com tióis de baixo peso molecular como a glutatona e a cisteína livre, formando os nitrosotióis, nitroglutatona (GS-Fe-NO) e nitrosocisteína (Cys-Fe-NO), respectivamente (Vanin *et al.* 1996). Embora a nitrosocisteína seja mais instável que a nitrosoglutatona, estas moléculas são muito mais estáveis que o NO e podem atuar como carreadoras de NO no organismo (Mülsch *et al.* 1993).

Na presença do ânion superóxido (O_2^-) ocorre a rápida formação de peroxinitrito (ONOO^-) (ver Radi *et al.* 2002), que pode levar à formação de NO_2 (dióxido de nitrogênio) e do potente oxidante, o radical hidroxila (OH^\cdot). Outras reações propiciadas pelo peroxinitrito são a nitração de tirosinas (Tyr-NO_2) e a oxidação de resíduos tióis a ácidos sulfênicos e

sulfônicos (Huie and Padmaja 1993, Reitere *et al.* 2000). Aumento na nitratação de proteínas já foi observado em folhas de tabaco *antisense* para nitrito redutase (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.* 2002) em células de tabaco em suspensão tratadas com elicitor fúngico (Saito *et al.* 2006) e em folhas de oliva sob estresse salino (Valderrama *et al.* 2007). Na presença de oxigênio, o NO pode ser oxidado a NO₂ e este reagir com NO originando dióxido de trinitrogênio (N₂O₃) e então nitrito/nitrato (NO₂⁻/NO₃⁻) (ver Lamattina *et al.* 2003).

1.2 - Alvos do NO na mitocôndria

Alguns dos importantes efeitos fisiológicos e também patológicos do NO resultam de sua ação na mitocôndria (ESQUEMA 1). Em concentrações nanomolares o NO se liga à citocromo *c* oxidase (complexo IV ou COX) inibindo reversivelmente a atividade desta enzima terminal da cadeia respiratória por competir com o O₂ para se ligar ao grupamento heme do citocromo (Brown and Cooper 1994, Cleeter *et al.* 1994). Em vegetais já foi também demonstrado que o NO compete com o oxigênio para se ligar à COX provocando inibição do consumo de oxigênio (Millar and Day 1996, Caro and Puntarulo 1999, Yamasaki *et al.* 2001, Cooper 2002). Esta interação entre o NO e o O₂ através da COX é considerada importante para regular a produção de energia pela mitocôndria e estender a oxigenação do tecido já que, enquanto o NO está ligado à COX o oxigênio não é consumido e pode assim ser levado a maiores distâncias (Hagen *et al.* 2003). Como a inibição reversível do NO na COX ocorre em concentrações nanomolares deste radical, este é considerado um importante mecanismo de controle fisiológico da respiração. Ainda, o NO participa da sinalização da própria biogênese mitocondrial quando células são expostas por longos períodos a baixas concentrações (nM) deste radical (Brown 2003, Nisoli *et al.* 2003).



ESQUEMA 1. Alvos do radical óxido nítrico na mitocôndria. O NO e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) resultantes de sua oxidação, como o peroxinitrito, podem inibir diversos componentes da cadeia respiratória, complexos I, II, III e IV (COX), a ATPase, enzimas da matriz (como a Mn-SOD e a aconitase) e o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT).

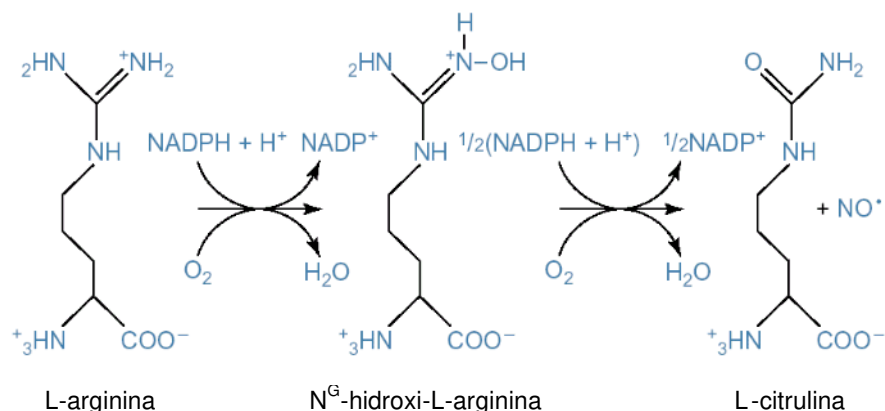
A inibição da atividade mitocondrial favorece a transição de permeabilidade e a liberação de citocromo *c*, desencadeando o processo apoptótico.

O NO é capaz também de inibir o complexo III, aumentando a geração de ânion superóxido, podendo originar peroxinitrito (Poderoso *et al.* 1999). Ainda, quando as células são expostas por períodos prolongados ao NO, outros componentes da cadeia respiratória podem ser inibidos pelas espécies reativas de nitrogênio (RNS) geradas (Clementi *et al.* 1998). O peroxinitrito pode inibir o complexo II, a aconitase, a superóxido dismutase Mn - dependente e outras proteínas (Cassina and Radi 1996, Brown 1999). O peroxinitrito pode também alterar a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial através de uma ação

direta no poro de transição de permeabilidade (PTP), causando a peroxidação lipídica e a formação de pontes tióis cruzadas (Gadella *et al.* 1997). As RNS podem também oxidar diretamente os grupamentos –SH do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), um componente importante do PTP (Viveira *et al.* 2001). A inibição irreversível de proteínas mitocondriais importantes afeta a bioenergética mitocondrial favorecendo a transição de permeabilidade, a liberação de citocromo *c*, desencadeando o processo apoptótico. Em células de *Citrus* foi demonstrado que a inibição da respiração causada por NO afetou o potencial elétrico de membrana mitocondrial, alterando a permeabilidade da membrana e levando à morte celular programada destas células (Saviani *et al.* 2002). Em animais, vários trabalhos já demonstraram o envolvimento do NO na regulação da apoptose mediada pela mitocôndria (Brow and Borutaite 2001, Chung *et al.* 2001, Boyd and Cadenas 2002, Blaise *et al.* 2005).

1.3 - Síntese de NO a partir de L-arginina

Em animais, está bem estabelecido que uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) constitui o principal sistema para a produção de NO. As NOSs catalisam a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina (ESQUEMA 2), numa reação dependente de O₂, NADPH, heme, tetrahidrobiopterina, calmodulina, FAD e FMN (Stuehr 1997). As principais isoformas das NOSs, neuronal, endotelial e de macrófagos, são citosólicas ou ligadas à membrana plasmática, mas alguns grupos têm demonstrado a existência de uma NOS mitocondrial (mtNOS), que seria um processamento alternativo (*splicing*) da NOS neuronal (Haynes *et al.* 2003).



ESQUEMA 2: Síntese de NO a partir de L-arginina pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). NAD(P)H e O₂ são utilizados como co-substratos numa reação que tem o N^G-hidroxi-L-arginina com intermediário (Stuehr, 1999).

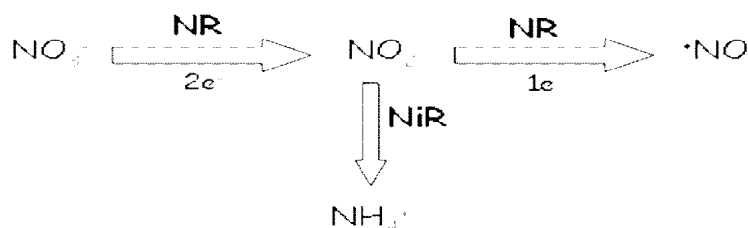
A L-arginina foi primeiramente sugerida como o principal substrato para a síntese de NO em plantas. Entretanto, embora atividade NOS, medida pela conversão de L-arginina em L-citrulina, tenha sido detectada em várias espécies vegetais (Delledonne *et al.* 1998, Durner *et al.* 1998, Barroso *et al.* 1999, Ribeiro *et al.* 1999, Modolo *et al.* 2002) nenhum gene ou proteína com sequência similar à NOS de origem animal foi encontrado quando o genoma de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) foi sequenciado em 2000. Para explicar a capacidade de síntese de NO pelas plantas a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, diferentes grupos propuseram que os vegetais poderiam apresentar uma enzima NOS diferente daquela descrita para mamíferos.

Em 2003, Guo e colaboradores identificaram em *A. thaliana* um gene que apresentava homologia ao da proteína proposta ser responsável pela produção de NO no tecido nervoso do caramujo *Helix pomatia* (Huang *et al.* 1997). Esse gene foi inicialmente denominado *AtNOS1*, pois codificaria uma proteína (AtNOS1) com atividade conversora de L-arginina em L-citrulina. O mesmo grupo também sugeriu que a AtNOS1 estaria localizada na mitocôndria (Guo and Crawford 2005). Entretanto, em 2006 Zmotjel e colaboradores não foram capazes de detectar atividade NOS na proteína recombinante codificada pelo gene *ATNOS1*. O grupo

de Crawford, que originalmente descreveu a ATNOS1, concordou com esta afirmação e também relatou que os experimentos de atividade NOS não puderam ser repetidos em seu laboratório (Crawford *et al.* 2006). Como o mutante *Atnos1* apresenta uma produção basal de NO diminuída em relação ao tipo selvagem (Guo *et al.* 2003), o grupo de Crawford propôs renomear este gene de *NOA1* (NO-associado).

1.4 - Papel da nitrato redutase na síntese de NO

Além da enzima tipo-NOS, outros mecanismos enzimáticos para produção de NO nas plantas têm sido propostos (ver Crawford 2006), destacando-se a atividade redutora de nitrito (NO_2^-) da nitrato redutase (NR), uma enzima essencial para a assimilação de nitrogênio pelas plantas. Conforme mostra o ESQUEMA 3, a NR catalisa a redução de NO_3^- a NO_2^- , dependente de NAD(P)H, o qual é posteriormente reduzido a amônio pela nitrito redutase (NiR). Contudo, já foi demonstrado que a NR pode também produzir NO e N_2O a partir de NO_2^- , resultando na emissão de NO (Yamasaki and Sakihama 2000, Rockel *et al.* 2002).



ESQUEMA 3. Metabolismo do nitrogênio nas plantas, destacando a atividade redutora de nitrato (NO_3^-) da nitrato redutase (NR) e também a atividade redutora de nitrito (NO_2^-) da NR que resulta na síntese de óxido nítrico (NO). A nitrito redutase (NiR) cataliza a redução de nitrito a amônio (NH_4^+) que é utilizado para a síntese de compostos nitrogenados como os aminoácidos.

Resultados com plantas de *A. thaliana* deficientes para NR sugerem que a síntese de NO induzida por ABA e o fechamento estomático dependem de ssa enzima (Desikan *et al.* 2002, Garcia-Mata and Lamattina 2003). Entretanto, outros trabalhos mostram a independência da produção de NO em relação à NR (Garces *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2003). Conciliando estas divergências, resultados recentes de nosso grupo mostraram que plantas de *A. thaliana* deficientes nos dois genes estruturais da NR (*nia1 nia2*) apresentam a mesma capacidade que plantas selvagens de produzir NO a partir de nitrito exógeno (Modolo *et al.* 2005). Esta observação levou à sugestão de que o passo limitante para a síntese de NO nas plantas *nia1 nia2* se deve ao baixo nível endógeno de nitrito, uma vez que estas plantas são deficientes na NR e cultivadas em meio livre de nitrato. Realmente, o nível endógeno de nitrito pareceu ser muito baixo, senão inexistente, e não pôde ser detectado nas plantas *nia1 nia2* (Modolo *et al.* 2006). Estes resultados sugeriram que o principal papel da nitrato redutase NR na geração de NO nas plantas estaria relacionado à produção de nitrito, o substrato necessário para esta atividade. Vários trabalhos têm indicado que a produção de NO pelas plantas está relacionada ao conteúdo endógeno de nitrito. Em folhas de plantas de tabaco *antisense* para NiR, e assim, apresentando atividade NiR muito baixa, a concentração de nitrito é 10 vezes maior e a emissão de NO é 100 vezes maior em relação ao tipo selvagem (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.* 2002). Em *Nicotiana pumbaginifolia*, a expressão de uma NR de tabaco com mutação no sítio regulatório de fosforilação, que resulta numa NR constantemente ativa, provocou a formação de níveis mais elevados de nitrito e aumento na emissão de NO (Lea *et al.* 2004). Ainda, Planchet e colaboradores (2005) demonstraram que plantas ou culturas de células em suspensão de tabaco livres de NR, quando supridas por curtos períodos com nitrato nunca emitiam NO. Entretanto, quando supridas com nitrito, estas células eram capazes de emitir NO com a mesma velocidade que células expressando a NR (Planchet *et al.* 2005).

1.5 - Síntese de NO a partir de nitrito

A observação de que plantas mutantes deficientes na enzima NR apresentavam a mesma capacidade que plantas selvagens para a síntese de NO a partir do nitrito (Modolo *et al.* 2005, Planchet *et al.* 2005) levou à procura do mecanismo responsável por tal atividade, uma vez que, este não poderia ser atribuído à NR. Através da detecção da produção de NO por espectrometria de ressonância paramagnética (EPR) Koslov e colaboradores (1999) mostraram que mitocôndrias de origem animal eram capazes de reduzir o nitrito a NO. A atividade redutora de nitrito de mitocôndrias energizadas com substratos respiratórios foi inibida por myxothiazol, o que levou os autores a propor que o nitrito estaria sendo reduzido por elétrons liberados do segmento bc₁ do complexo III (Kozlov *et al.* 1999). A produção de NO por uma atividade mitocondrial redutora de nitrito foi posteriormente observada na alga *Chlorella sorokiniana* (Tischner *et al.* 2004), em células em suspensão de tabaco (Planchet *et al.* 2005), em extratos foliares de *A. thaliana* (Modolo *et al.* 2005) e em mitocôndrias isoladas de raízes de várias espécies vegetais (Gupta *et al.* 2005). Recentemente, Stoimenova e colaboradores (2007), detectando a produção de NO por quimioluminescência, e mostraram que em condições anaeróbicas mitocôndrias isoladas de raízes de cevada ou arroz foram capazes de reduzir o nitrito à NO através da oxidação de NAD(P)H externo. Esta atividade pôde ser acoplada à síntese de ATP numa velocidade que representaria cerca de 3 -5% da velocidade de produção aeróbica de ATP pela mitocôndria, velocidade esta que estaria na mesma ordem de magnitude da produção glicolítica de ATP durante períodos de anóxia.

Estas observações vêm sugerindo que a redução mitocondrial de nitrito pode representar uma via alternativa para a produção de NO independente de L-arginina. Em vegetais a NR parece ter um papel fundamental neste processo, já que sua atividade redutora produz nitrito, o substrato para a produção de NO.

Em animais, além da atividade redutora mitocondrial (Walters *et al.* 1967, Reutov and Sorokina 1998, Kozlov *et al.* 1999, Nohl *et al.* 2000), já foi demonstrado que o nitrito pode

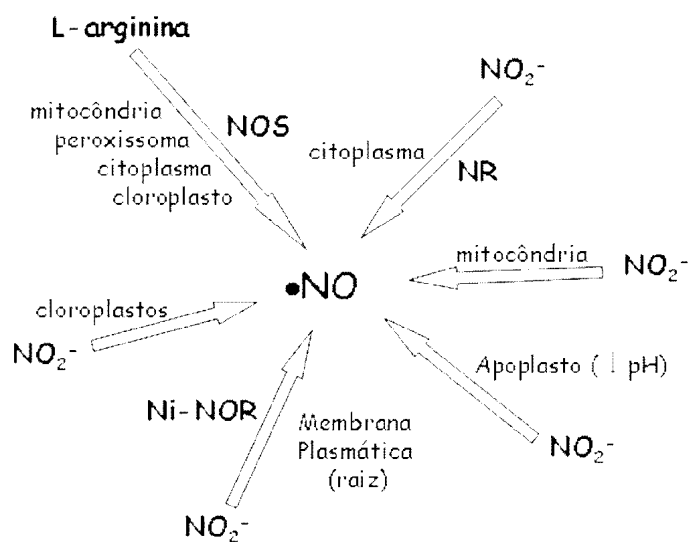
ser reduzido a NO por vários diferentes mecanismos, como pela redução ácida não enzimática (Zweier *et al.* 1999, Hunter *et al.* 2004), pela redução enzimática via xantina oxidoreductase (Millar *et al.* 1998, Alikulov *et al.* 1980, Li *et al.* 2004, Webb *et al.* 2004) ou, ainda, pela hemoglobina deoxigenada (Cosby *et al.* 2003, Hunter *et al.* 2004). Como estas reações são favorecidas em baixo pH e em baixa tensão de oxigênio, têm-se sugerido que a produção de NO através destes mecanismos pode ter uma função importante na vasodilatação durante a hipóxia e no exercício extenuante (Gladwin *et al.* 2005, Gladwin *et al.* 2006, Fago and Jensen 2007). A síntese de NO a partir de nitrito é favorecida não apenas pela redução do pH e da tensão de O₂, mas também como resultante da alta concentração de nitrito (Kleinbongard *et al.* 2003).

Em vegetais a síntese de NO por uma atividade nitrito-NO redutase (Ni-NOR) exclusiva de raiz já foi descrita, cuja atividade estaria coordenada à uma NR ligada à membrana plasmática que reduz nitrato a nitrito (Stohr *et al.* 2001). O envolvimento da Ni-NOR em vários processos fisiológicos da raiz, incluindo desenvolvimento, resposta à anóxia e simbiose foi sugerido (Sthor and Stremlau 2006), entretanto, a identidade genética desta Ni-NOR não é ainda conhecida. A redução não enzimática do nitrito nas condições ácidas do apoplasto foi demonstrada em camadas de aleurona de cevada (Bethke *et al.* 2004).

A redução mitocondrial de nitrito a NO foi detectada a partir de extratos foliares de *A. thaliana* (Modolo *et al.* 2005). Esta atividade foi, entretanto, observada por Gupta e colaboradores apenas em mitocôndrias isoladas de raízes, mas não de folhas (Gupta *et al.* 2005). Recentemente, a capacidade de cloroplastos sintetizarem NO a partir de nitrito foi observada, porém o mecanismo responsável por esta síntese não foi esclarecido (Jasid *et al.* 2006). A emissão de NO pela planta já foi detectada em várias espécies e também já foi demonstrado que a emissão de NO pode ser alterada em resposta a diferentes estímulos (ver Neill *et al.* 2007). Em alguns casos, como na resposta ao ataque de patógenos, parece existir uma boa correlação entre a emissão de NO e a resposta biológica. Entretanto, conforme

discutido por Planchet e Kaiser (2006), as estimativas entre o conteúdo intracelular de NO e sua taxa de evolução nem sempre parecem ser proporcionais. Por exemplo, durante a anóxia o NO é gerado a uma taxa muito maior do que aquela requerida para sua atuação como sinalizador celular.

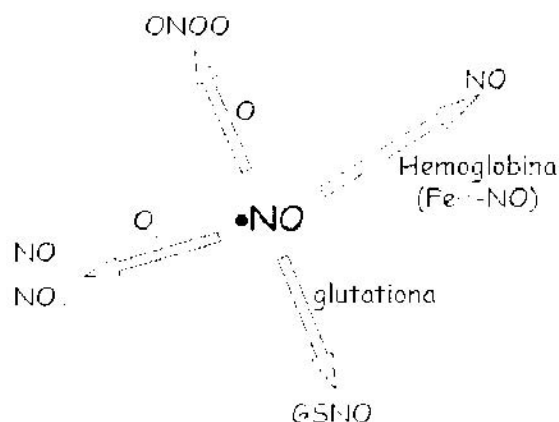
Estes resultados mostram que embora seja inquestionável que o NO é sintetizado e atua como um importante sinalizador para os vegetais muito ainda precisa ser investigado. A maioria dos trabalhos já publicados tem abordado a produção de NO a partir de atividades NOS e NR. Entretanto, trabalhos mais recentes mostram que o NO pode ser produzido a partir da redução de nitrito por diferentes mecanismos (ESQUEMA 4). Particularmente, um melhor conhecimento sobre o mecanismo de redução de nitrito pela mitocôndria parece relevante.



ESQUEMA 4. Principais vias sugeridas para a produção de óxido nítrico (NO) nas plantas. NO pode ser produzido a partir de L-arginina através de uma atividade óxido nítrico sintase (NOS). NO pode também ser produzido a partir do nitrito (NO_2^-) pela nitrato redutase (NR), por uma nitrito-NO redutase (Ni-NOR), pela redução de pH no apoplasto e por vias ainda não completamente elucidadas nos cloroplastos e mitocôndrias (adaptado de Neill *et al.* 2007).

1.6 - Degradação de NO

Para que o NO atue como sinalizador biológico efetivo, além das atividades de síntese, mecanismos eficientes para a sua remoção ou degradação devem estar operantes. A degradação de NO pode ocorrer espontaneamente em meio aeróbico através de auto -oxidação, resultando na formação de NO_2^- (Kharitonov *et al.* 1994). Entretanto, esta reação não é rápida o suficiente para explicar a meia vida extremamente curta do NO em sistemas biológicos, o que sugere a existência de mecanismos adicionais para sua degradação (Coffey *et al.* 2001). Um importante mecanismo de degradação de NO resulta de sua reação não -enzimática com o ânion superóxido (O_2^-) formando peroxinitrito (ONOO^-) (ver Radi *et al.* 2002). Já foi demonstrado que a produção basal de NO em folhas é normalmente sub estimada por causa da rápida reação do NO com ânion superóxido (Vanin *et al.* 2004). O NO também reage rapidamente com glutatona que pode ser metabolizada pela enzima GSNO redutase (Diaz *et al.* 2003). Adicionalmente, alguns mecanismos enzimáticos de conversão de NO em nitrito já foram identificados em animais, como aqueles mediados por lipoxigenases, prostaglandina H sintase e peroxidases (Coffey *et al.* 2001). Ainda, conversão de NO em nitrato, dependente de grupo heme e semelhante à atividade NO dioxigenase de *Escherichia coli*, também foi observada em células de mamíferos e plantas (ver Gardner 2005). Já foi também demonstrado que, na presença de oxigênio, a hemoglobina vegetal é capaz de reagir com NO originando nitrato, contribuindo desta forma para a redução do nível de NO na planta (Perazzolli *et al.* 2004). As principais vias de degradação de NO já estudadas nas plantas são apresentadas no ESQUEMA 5.



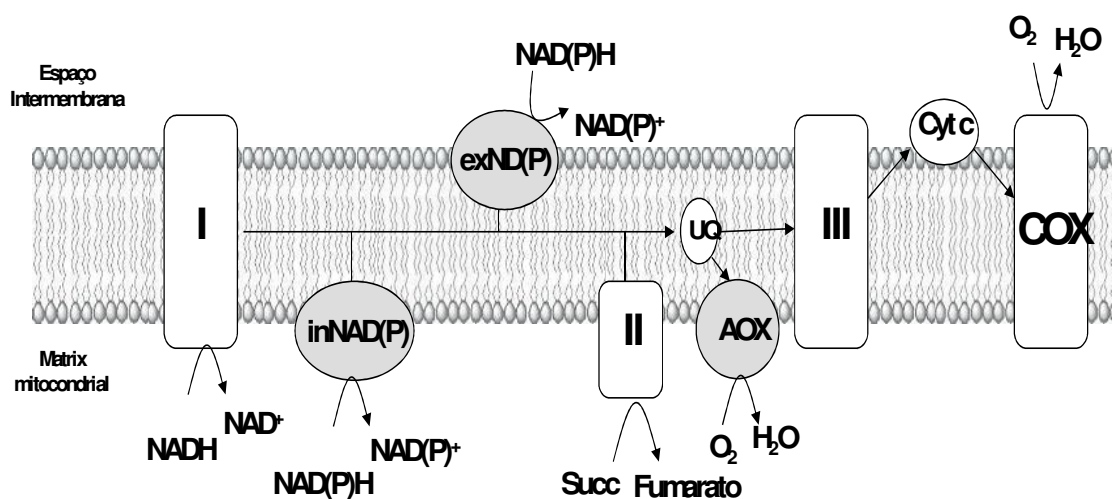
ESQUEMA 5. Vias de degradação de NO já identificadas nas plantas. O NO pode ser metabolizado através de sua reação com hemoglobinas, reagir com glutathione formando a *S*-nitrosoglutationa (GSNO), com o ânion superóxido (O_2^-) formando o peroxinitrito ($ONOO^-$) ou diretamente com oxigênio produzindo nitrato e nitrito (adaptado de Neill *et al.* 2007).

1.7 - Degradação de NO pela mitocôndria

A mitocôndria tem sido identificada como um importante compartimento celular na degradação do NO, o que seria de se esperar, considerando os potenciais efeitos deletérios que o NO pode causar na célula, desencadeados principalmente pela inibição da respiração. Assim, em condições de anóxia, já foi demonstrado que mitocôndrias isoladas de rato são capazes de oxidar NO em nitrito, numa reação catalisada pela COX (Borutaite and Brown 1996). Já na presença de oxigênio, a degradação de NO, através de sua reação com O_2^- formando peroxinitrito, é importante para reativar a COX, quando inibida por NO, permitindo a recuperação da respiração (Poderoso *et al.* 1996). O vazamento de elétrons pelo complexo I (ver Lenaz *et al.* 2006) e o ciclo da ubiquinona e o citocromo b do complexo III (Chen *et al.* 2006, Poderoso *et al.* 1999) correspondem aos principais sítios de geração de O_2^- da cadeia respiratória de mamíferos. O mecanismo molecular que leva à produção de O_2^- nestes sítios da cadeia respiratória não está ainda completamente elucidado (Chen *et al.* 2006, Lenaz *et al.* 2006).

1.8 - Degradação de NO pela mitocôndria vegetal

A cadeia respiratória principal da mitocôndria vegetal é bastante similar àquelas de outras mitocôndrias de eucariotos e os complexos I e III também contribuem para a produção de O_2^- pela mitocôndria vegetal (ver Moller 2001). Entretanto, além dos complexos respiratórios padrão (I a IV), a membrana interna da mitocôndria vegetal é capaz de expressar vias alternativas para o transporte de elétrons, conforme ilustrado no ESQUEMA 6. Estas vias incluem, a oxidase alternativa (AOX), que é capaz de receber elétrons diretamente da ubiquinona (desviando assim o transporte de elétrons dos complexos III e IV), e pelo menos quatro desidrogenases alternativas que desviam o transporte de elétrons do complexo I, reduzindo diretamente a ubiquinona (Millenaar and Lambers 2003, Rasmusson *et al.* 2004).



ESQUEMA 6. Cadeia respiratória da mitocôndria vegetal, destacando as vias alternativas: NAD(P)H desidrogenases externas e internas e oxidase alternativa (AOX).

Duas destas desidrogenases estão voltadas para a face externa da membrana interna permitindo a oxidação direta do NAD(P)H citosólico (Rasmusson *et al.* 2004). Estas enzimas alternativas da cadeia de transporte de elétrons dos vegetais não são eletrogênicas (não são bombas de prótons) e não contribuem assim para a conservação de energia através da fosforilação oxidativa. O nível de expressão destas enzimas varia em função do tecido,

estágio de desenvolvimento e em resposta a diferentes tipos de estresse, o que sugere que estas enzimas tenham importantes funções para os vegetais (Rasmusson *et al.* 2004).

Estudos recentes vêm demonstrando que o metabolismo do NO pode ser influenciado pelas proteínas alternativas da cadeia respiratória da mitocôndria vegetal. Em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata foi observado que a oxidação de NAD(P)H pelas desidrogenases externas leva a um aumento na geração de O_2^- , que reage não-enzimaticamente com NO; esta reação compete com a ligação do NO na COX, favorecendo a recuperação do consumo de oxigênio (Oliveira *et al.* 2008). Também já foi demonstrado que a AOX, diferentemente da COX, não é inibida por NO (Millar and Day 1996). Estas observações vêm indicando que a mitocôndria vegetal parece possuir mecanismos singulares para prevenir os efeitos deletérios do NO na atividade respiratória da planta. As evidências experimentais destas atividades têm sido, entretanto, raras.

1.9 – *Arabidopsis thaliana*

A *Arabidopsis thaliana*, é uma planta herbácea da família das *Brassicaceae*. É um dos organismos modelo para o estudo de diversas áreas da botânica, tendo um papel semelhante e comparado ao da drosófila, para pesquisa em animais. Foi a primeira planta cujo genoma foi completamente sequenciado no ano de 2000. O genoma da *Arabidopsis* consiste de cinco cromossomas. Com 125 milhões de pares de bases, o seu genoma é relativamente pequeno, se comparado com o das outras espécies vegetais, o que facilita o seu estudo. Entretanto, ainda que a maioria de seus 26 000 genes continuem sem função conhecida, muitas pesquisas tem contribuído para determinar o papel de cada um na fisiologia desta espécie. O ciclo rápido de crescimento e as inúmeras informações disponíveis sobre esta espécie tornam-na um material modelo para os mais variados estudos na área vegetal.



ESQUEMA 7. Imagem de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2 - OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi estudar os mecanismos de síntese e degradação de NO pela mitocôndria vegetal, utilizando como sistema experimental a planta modelo *A. thaliana*. Muitos aspectos do metabolismo de NO na planta são ainda desconhecidos e no presente trabalho ênfase foi dada à análise da síntese de NO a partir de nitrato pela mitocôndria e ao papel das enzimas alternativas da cadeia respiratória vegetal no metabolismo do NO. Os estudos iniciais se concentraram em estabelecer o cultivo de células *in vitro* e desenvolver uma metodologia para o preparo de mitocôndrias funcionais, que puderam então ser utilizadas para os estudos e a caracterização da síntese e da degradação de NO pela mitocôndria isolada de *A. thaliana*.

3 - MATERIAL e MÉTODOS

3.1 - Material vegetal: Sementes de *A. thaliana* L. Ecotype Columbia-O foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,3 % durante 10 minutos e plantadas em vasos com vermiculita/perlita (1:1). As plantas germinadas foram irrigadas com meio de nutrientes de Murashige & Skoog (1962) à metade da concentração (TABELA 1). Folhas de 20 a 30 dias de idade, foram retiradas da planta e esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,3 % durante 5 minutos, lavadas com água destilada (também esterilizada) e colocadas em meio sólido de nutrientes de Murashige & Skoog (1962) e vitaminas de Murashige & Tucker (1969) contendo também, inositol 555 mM, sacarose 87 mM, malte 0,5 g/L, ágar 0,8 %, e hormônios 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenilacético) 4,5 M e cinetina 0,025 M, (TABELA 2) para a indução de calos. A cultura de calos foi mantida no escuro, a 26 °C, por 30 dias para um aumento de massa celular. Os calos foram então transferidos para culturas líquidas com a mesma composição, exceto ágar (TABELA 2). As culturas líquidas foram mantidas no escuro a 26°C com rotação constante de 150 rpm (Shaker, New Brunswick Scientific, C25KC) e um ciclo de crescimento de 7 dias. 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 (Veco, H1FS-12-M, SP, Brasil).

3.2 - Preparação da suspensão mitocondrial: Mitocôndrias foram isoladas da cultura líquida de células de *A. thaliana*. Vinte gramas de células da cultura líquida foram lavadas com 50 mL de meio para lavar células gelado (4°C) contendo sacarose 0,4 M e tampão HEPES (N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-acido etanosulfônico) pH 7,2 10 mM e filtradas, para então serem suspensas em meio de extração gelado, contendo sacarose 0,4 M, tampão HEPES (pH 7,2) 10 mM, BSA (Albumina de Soro Bovino) 0,1 % EGTA (etileno glicol 2 aminoetiléter- N,N,N',N'-acido tetraacético) 1 mM e cisteína 3 mM.

TABELA 1. Meio de cultura utilizado para irrigar as plantas de *Arabidopsis thaliana*.

MACRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO	
NH ₄ NO ₃	0,825 g/L	10,30 mM
KNO ₃	0,95 g/L	9,40 mM
KH ₂ PO ₄	0,75 g/L	5,625 mM
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,22 g/L	1,50 mM
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,185 g/L	0,75 mM
MICRONUTRIENTES		
H ₃ BO ₃	3,60 mg/L	50,00 M
MnSO ₄ . 1H ₂ O	8,45 mg/L	50,00 M
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,30 mg/L	15,00 M
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	16,80 mg/L	50,00 M
FeSO ₄ . 7H ₂ O	13,80 mg/L	50,00 M
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0125 mg/L	0,05 M
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0125 mg/L	0,05 M
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,125 mg/L	0,50 M
KI	0,415 mg/L	3,00 M
VITAMINAS		
Ac. Nicotínico	2,5 mg/L	20,00 M
Tiamina	5 mg/L	15,00 M
Piridoxina	5 mg/L	24,30 M
OUTROS		
Inositol	0,1 g/L	555 mM

Murashige T, Skoog F (1962) e adaptações

TABELA 2. Meio de cultura utilizado para indução de calos e manutenção da cultura sólida e líquida (sem ágar) de células de *Arabidopsis thaliana*.

MACRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO	
NH ₄ NO ₃	1,65 g/L	20,60 mM
KNO ₃	1,90 g/L	18,80 mM
KH ₂ PO ₄	0,15 g/L	11,25 mM
K ₂ HPO ₄	0,02 g/L	57,40 M
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,44 g/L	3,00 mM
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,37 g/L	1,50 mM
MICRONUTRIENTES		
H ₃ BO ₃	6,20 mg/L	100,00 M
MnSO ₄ . 1H ₂ O	16,90 mg/L	100,00 M
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,60 mg/L	30,00 M
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	36,60 mg/L	100,00 M
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,60 mg/L	100,00 M
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025 mg/L	0,10 M
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025 mg/L	0,10 M
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25 mg/L	1,00 M
KI	0,830 mg/L	6,00 M
VITAMINAS		
Ac. Nicotínico	5 mg/L	40,00 M
Tiamina	10 mg/L	30,00 M
Piridoxina	10 mg/L	48,60 M
Glicina	2 mg/L	0,266 M
OUTROS		
Inositol	100 mg/L	555 mM
Sacarose	30 g/L	87 mM
2,4-D	1,092 mg/L	4,5 M
Cinetina	5,38 mg/L	0,025 M
Malte	0,50 g/L	
Ágar	8 g/L	0,8 %

Murashige T, Skoog F (1962) e adaptações

A suspensão foi homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Potter, Tecnal, PT10/35 velocidade 4) aproximadamente por 15 segundos e depois o homogeneizado foi passado no Polytron por 7 segundos (Kinematica, PCU11 velocidade 5). O pH do homogeneizado foi ajustado para 7,2 com HCl e centrifugado a $1.550 \times g$ por 10 minutos. A mitocôndria foi coletada na fração sobrenadante para uma centrifugação a $9.400 \times g$ por 15 min. O sedimento obtido foi ressuspensionado em 25 mL em meio de lavagem contendo sacarose 0,25 M, BSA 0,1 %, tampão HEPES (pH 7,2) 10 mM, EGTA 0,2 mM e cisteína 3 mM e centrifugado a $1.100 \times g$ por 10 min. A fração sobrenadante resultante foi centrifugada a $17.300 \times g$ por 15 min. O sedimento foi ressuspensionado em volume mínimo de meio de lavagem de modo que a concentração da proteína fosse de 20 -50 mg/mL.

Algumas preparações mitocondriais foram purificadas em gradiente de Percoll, adaptando-se o método descrito por Moreau & Romani (1982). Neste caso, o sedimento obtido da última centrifugação diferencial foi ressuspensionado em solução de Percoll 21% contendo sacarose 0,25 M, tampão HEPES (pH 7,2) 10 mM e EGTA 0,3 mM e centrifugado a $39.000 \times g$ por 30 min, em rotor SW 41 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). A banda correspondente à mitocôndria foi coletada com pipeta e diluída 10 vezes em meio de lavagem e centrifugada a $19.000 \times g$ por 15 min. O sedimento correspondente às mitocôndrias purificadas foi coletado em volume mínimo de meio de lavagem de modo que a concentração da proteína fosse de 20-50 mg/mL.

Todas as manipulações foram mantidas entre 0 e 4°C e a concentração de proteínas da suspensão mitocondrial foi determinada pelo método Coomassie blue, utilizando BSA (Bradford 1976).

3.3 - 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 básico de reação contendo sacarose 0,25 M, tampão fosfato (pH 7,2) 10 mM e BSA 0,1 %. Outras adições ao meio de reação estão especificadas nas legendas das tabelas e figuras .

3.4 - Potencial elétrico de membrana ($\Psi\Delta$): Alterações do potencial de membrana foram monitoradas adicionando safranina e analisadas opticamente (Akerman and Wilkström 1976). As alterações na absorbância de 511-533 nm foram registradas utilizando espectrofotômetro com arranjo de diodo UV-visível (MultiSpec-1500, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão). A suspensão mitocondrial foi incubada a 25 °C em meio de reação contendo sacarose 0,25 M, tampão fosfato (pH 7,2) 10 mM, BSA 0,1 % e safranina 20 μ M. Outras adições estão especificadas na legenda da figura.

3.5 - Transporte de Ca^{2+} : O transporte de cálcio por mitocôndrias isoladas de cultura de células de *A. thaliana* foi determinado utilizando-se o corante arzenazo III (Scarpa *et al.* 1978). A variação da concentração de cálcio no meio foi monitorada utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu com arranjo de diodo, modelo MultiSpec-1500 (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão), nos comprimentos de onda de 675 e 685 nm. O meio de reação foi composto por sacarose 0,25 M, tampão fosfato de potássio (pH 7,2) 10 mM, BSA 0,1 %, arzenazo III (40 μ M), proteína mitocondrial e substrato respiratório. Outras adições estão especificadas na legenda da figura.

3.6 - Medida de NO e O_2 : Concentrações de NO e O_2 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 0,1M utilizando solução aquosa de SNAP (S-nitroso-N-acetil-L-penicilamina) como doador de NO, nas concentrações 10 μ M, 20

M, 40 M, 80 M, eletrodo Clark de O₂ (ISO-OXY-2, WPI) câmara de 4 entradas para circulação externa de água (NOCHM-4, WPI) e analisador de radicais livres Apollo 4000 (WPI). A suspensão mitocondrial foi incubada a 25 °C em mesmo meio de reação utilizado para medir atividade respiratória: contendo sacarose 0,25 M, tampão fosfato de potássio (pH 7,2) 10 mM e BSA 0,1 %. Outras adições estão especificadas nas legendas das figuras.

3.7 - Preparo de NO e de doadores de NO: S-nitrosoglutathione (GSNO) foi sintetizado misturando-se quantidades equimolares (100 mM) de glutathione reduzida e nitrato de sódio (NaNO₂), ambos dissolvidos em água; o pH foi ajustado para 2,0 com a adição de HCl e a solução incubada por 15 minutos, ao abrigo de luz, para desenvolver a cor vermelha característica do GSNO; o pH da solução foi então neutralizado com a adição de NaOH e a concentração de GSNO determinada espectrofotometricamente, a 542 nm (Matheus and Kerr 1993). Outro doador de NO, o DEA-NONOato (2-óxido 2-(N,N-detilamino)-diazénolato) foi preparado em tampão fosfato (pH 7,2) 0,1 M na concentração de 2 mM. Neste preparo, o composto foi dissolvido em tampão gelado e previamente deaerado com argônio; após a dissolução o frasco foi vedado com tampa de borracha e mantido à temperatura ambiente por 30 min para produzir uma solução saturada de NO, devido à rápida meia-vida do composto. O NONOato se dissocia espontaneamente em função do pH, apresentando uma meia-vida de 2 e 16 minutos a 37 °C e 22-25 °C, pH 7,4, respectivamente, liberando 1,5 moles de NO por mol do composto original (Maragos *et al.* 1991, Keefer *et al.* 1996). Solução saturada de NO foi preparada borbulhando-se o gás puro (armazenado em cilindro) em um frasco selado com tampa de borracha, contendo tampão fosfato (pH 7,2) 0,1 M, previamente deaerado com argônio. A concentração da solução saturada de NO foi considerada como sendo ~1,7 mM, que corresponde à saturação máxima do gás em solução aquosa, à 25 °C (Henry *et al.* 1997).

3.8 – Análise de dados: Os resultados apresentados nas figuras são representativos de pelo menos três experimentos com preparações mitocondriais diferentes. 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 - Isolamento de mitocôndrias de *A. thaliana* a partir de células em suspensão.

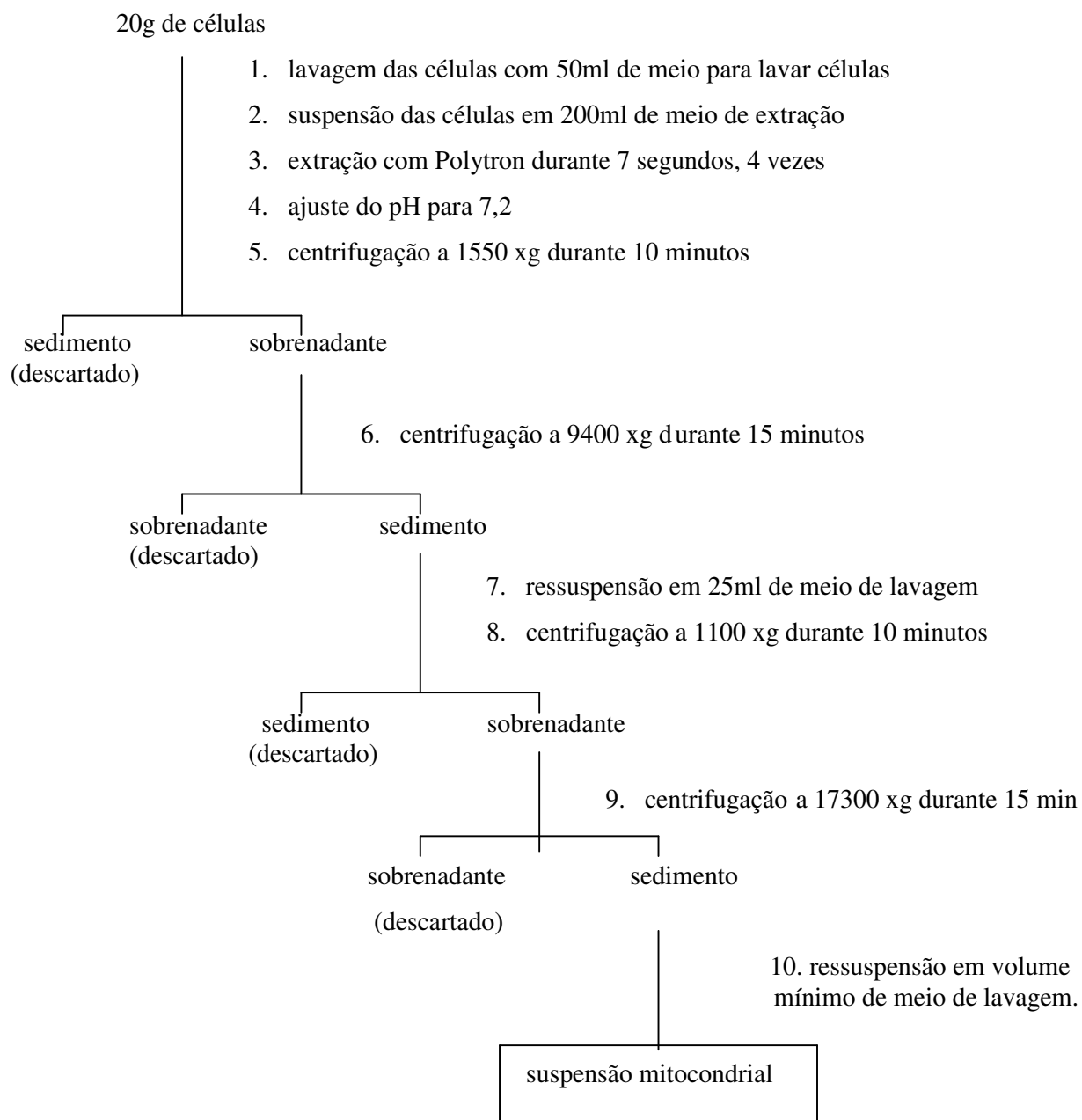
O isolamento das mitocôndrias a partir de células em suspensão de *A. thaliana* foi realizado segundo Martins and Vercesi (1985), porém algumas adaptações foram necessárias a fim de otimizar o processo e o adaptarmos às nossas condições. Desta forma vários isolamentos foram testados, alterando-se a quantidade de células, a forma como elas foram rompidas, o volume de meio de extração, como também o tempo e as rotações das centrifugações, até obtermos o protocolo final para o isolamento de mitocôndrias de *A. thaliana* descrito no ESQUEMA 8.

Utilizando-se então deste protocolo de isolamento estabelecido, as características funcionais das mitocôndrias de *A. thaliana* foram determinadas analisando-se o controle respiratório, expressão da AOX, potencial de membrana e transporte de cálcio.

4.2 - Controle respiratório e expressão da AOX em mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

Os controles respiratórios (CR) foram determinados a partir da relação do consumo de oxigênio das mitocôndrias energizadas no estado 3 (durante a síntese de ATP) sobre o estado 4 (estado de repouso após a síntese de ATP), utilizando malato mais glutamato, succinato, NADH ou NADPH como substratos respiratórios e obteve-se valores de 3,55; 2,38; 2,18 e 1,96, respectivamente, para cada substrato respiratório (FIGURA 1), indicando que o processo de isolamento mitocondrial resultou em uma ótima purificação com mitocôndrias

ESQUEMA 8: Diagrama da técnica de isolamento de mito c ndrias de células de *Arabidopsis thaliana* cultivadas *in vitro*.



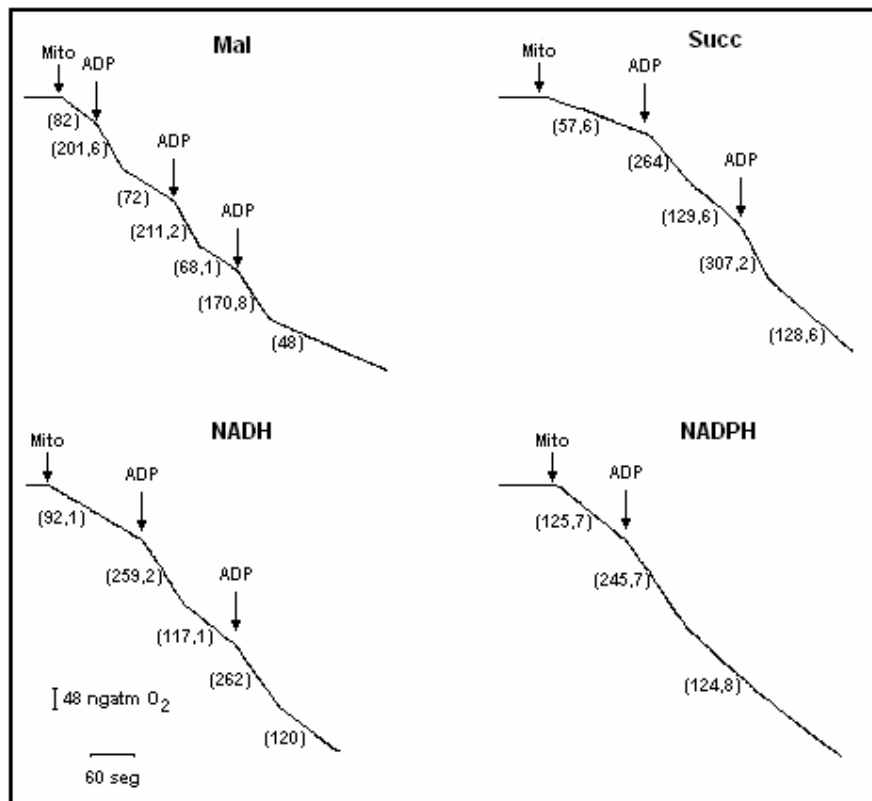


FIGURA 1. Consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* energizadas com diferentes substratos respiratórios. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM MgCl₂, 10 μM rotenona (exceto quando usado malato mais glutamato como substrato respiratório) e diferentes substratos respiratórios: 10 mM malato mais 10 mM glutamato (MAL), 5 mM succinato (SUCC), 1 mM NADH (NADH), 1 mM NADPH mais 0,5 mM Ca²⁺ (NADPH), como indicado na figura. Adições sequenciais de ADP (100 nmol) foram feitas induzindo a fosforilação (Estado 3) e a posterior respiração de repouso (Estado 4). Os números em parênteses são referentes ao consumo de oxigênio em ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹.

altamente intactas. A capacidade de oxidação de NAD(P)H externo mostra que estas mitocôndrias expressam as enzimas NAD(P)H desidrogenases externas, características de algumas mitocôndrias vegetais e também de fungos (Rasmusson *et al.* 2007). A FIGURA 1 também mostra que, quando Mal (malato e glutamato) foi usado como substrato, os controles respiratórios aumentam ($CR3 > CR2 > CR1$), quando quantidades sequenciais de ADP (em meio de reação contendo Pi e Mg^{2+}) são adicionadas à suspensão mitocondrial. Este aumento nos valores dos controles respiratórios também mostrado na TABELA 3 sugere que as mitocôndrias de *A. thaliana* isoladas de culturas de células em suspensão expressam a proteína desacopladora (Vercesi *et al.* 1995), inibida pela formação de ATP, que é um inibidor desta proteína (Saviani *et al.* 1998). Este acoplamento não foi igualmente perceptível quando outros substratos respiratórios foram usados (FIGURA 1). Quando succinato e NADH foram usados como substrato houve um aumento do CR, porém resultado da ativação da succinato desidrogenase por ATP, representada pelo aumento do estado 3 e não do estado 4 da respiração mitocondrial.

As mitocôndrias vegetais, assim como as de alguns fungos, são capazes também de expressar um aceptor final de elétrons, diferente da citocromo *c* oxidase, denominada oxidase alternativa (AOX) (Affourtit *et al.* 2000). A análise da expressão da AOX foi determinada pelo consumo de oxigênio resistente à adição de um inibidor do complexo III, a antimicina -A (Anti-A), adição esta feita após as mitocôndrias terem consumido 50% do oxigênio no meio. Verificou-se então que mitocôndrias de *A. thaliana* expressam AOX e subsequentemente foi adicionado *n*-propil galato (GAL), inibidor da AOX (Millar *et al.* 1996) restando um consumo mínimo residual atribuído a impurezas do processo de isolamento. Nestes primeiros experimentos a média do consumo de oxigênio pela AOX não ultrapassava 10% do consumo total das mitocôndrias (FIGURA 2, curva A), o que não alterava de modo significativo os valores obtidos dos CR com os diferentes substratos. Entretanto, com o tempo de cultura foram selecionadas suspensões celulares que possuíam a mesma velocidade média de

consumo oxigênio, porém uma mais elevada expressão da AOX que variava de 25% a 40% do consumo total de oxigênio (FIGURA 2, curva B). Para confirmar que o consumo de oxigênio verificado após a adição de Anti-A era devido à expressão da AOX, e não a possíveis oxidases contaminantes, as suspensões mitocondriais foram purificadas através de um gradiente de percoll (Moreau and Romani 1982). Os resultados obtidos com percoll não aumentaram substancialmente os CR demonstrando que a preparação mitocondrial, mesmo sem esta posterior purificação, é composta de mitocôndrias acopladas. Controles realizados com a prévia adição de *n*-propil galato resultaram em um aumento expressivo dos CR, como esperado (TABELA 4).

4.3 - Potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

O potencial elétrico de membrana foi monitorado acompanhando-se a diferença de absorbância da safranina (20 μM) nos comprimentos de onda de 511 e 533 nm (Akerman and Wikstrom 1976). Como pode ser observado na FIGURA 3, a adição de substrato respiratório gera um potencial de membrana que é desfeito com a adição de inibidor da cadeia de transporte de elétrons, e pode ser posteriormente restabelecido com a adição de outro substrato doador de elétrons para um complexo posterior ao inibido. Em (A) mitocôndrias energizadas com malato mais glutamato, doador de elétrons para o complexo I, gera um $\Delta\Psi$ que é desfeito quando adicionado rotenona, inibidor do mesmo complexo. Porém, o $\Delta\Psi$ é restabelecido com a adição de succinato, doador de elétrons para o complexo II e, subsequentemente, totalmente colapsado pelo desacoplador FCCP. Em (B) o potencial gerado com malato mais glutamato é desfeito por Anti-A, inibidor do complexo III, e restabelecido por TMPD, doador artificial de elétrons para o complexo IV. Em (C) e (D) pode-se observar que as mitocôndrias são capazes de gerar um $\Delta\Psi$ quando incubadas com NADH ou NADPH, respectivamente, corroborando as análises do consumo de oxigênio (FIGURA 1) indicando

TABELA 3. Controle respiratório (CR), determinado pela relação entre a velocidade de consumo de oxigênio entre os estados respiratórios 3 (fosforilação) e 4 (repouso), de mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana* quando energizadas com Malato 10 mM e Glutamato 10 mM (Mal). A partir de mitocôndrias incubadas conforme descrito na Fig. 1 foram obtidos os CR1, CR2 e CR3 pela adições sequenciais de 100 nmol de ADP. (Média de 3 experimentos com preparações distintas e média em (%) do incremento do valor do CR para CR 2 e CR 3).

	Mal
CR 1	2,8
CR 2	17,8 %
CR 3	29,4 %

TABELA 4. Controles respiratórios (CR), de mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* com maior expressão de AOX: efeito da purificação com percoll e do inibidor *n*-propil galato. As suspensões mitocondriais foram energizadas com malato e glutamato (Malato). Os CR das mitocôndrias purificadas em gradiente de percoll foram realizados na ausência ou presença de 100 µM de *n*-propil galato adicionado antes da suspensão mitocondrial (+Galato). (Média de 3 experimentos com preparações distintas e média em (%) do incremento do valor do CR para CR 2 e CR 3).

	Malato	Malato Percoll	Malato Percoll + Galato
CR 1	2,1	2,2	3,2
CR 2	15,7 %	17,7 %	15,7 %
CR 3	10,4%	27,1 %	12,0 %

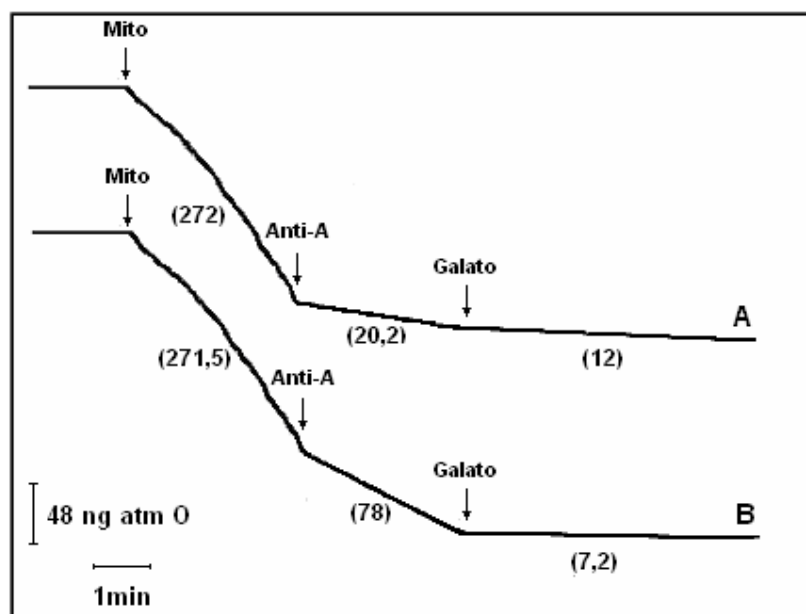


FIGURA 2. Efeito de inibidor do complexo III (Anti-A) e inibidor da AOX (Galato) no consumo de O_2 por mitocôndrias de *Arabidopsis thaliana*. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) de suspensões celulares recém estabelecidas (A) ou mantidas em cultivo por pelo menos seis meses (B) foram incubadas em meio de reação descrito na Fig. 1 e energizadas com 5 mM succinato. Após determinação do consumo basal de O_2 , antimicina-A (Anti-A, 10 μ M) e *n*-propil-galato (Galato, 100 μ M) foram adicionados ao meio onde indicados. Os números em parênteses são referentes ao consumo de oxigênio em $ng\ atm\ O.min^{-1}.mg^{-1}$.

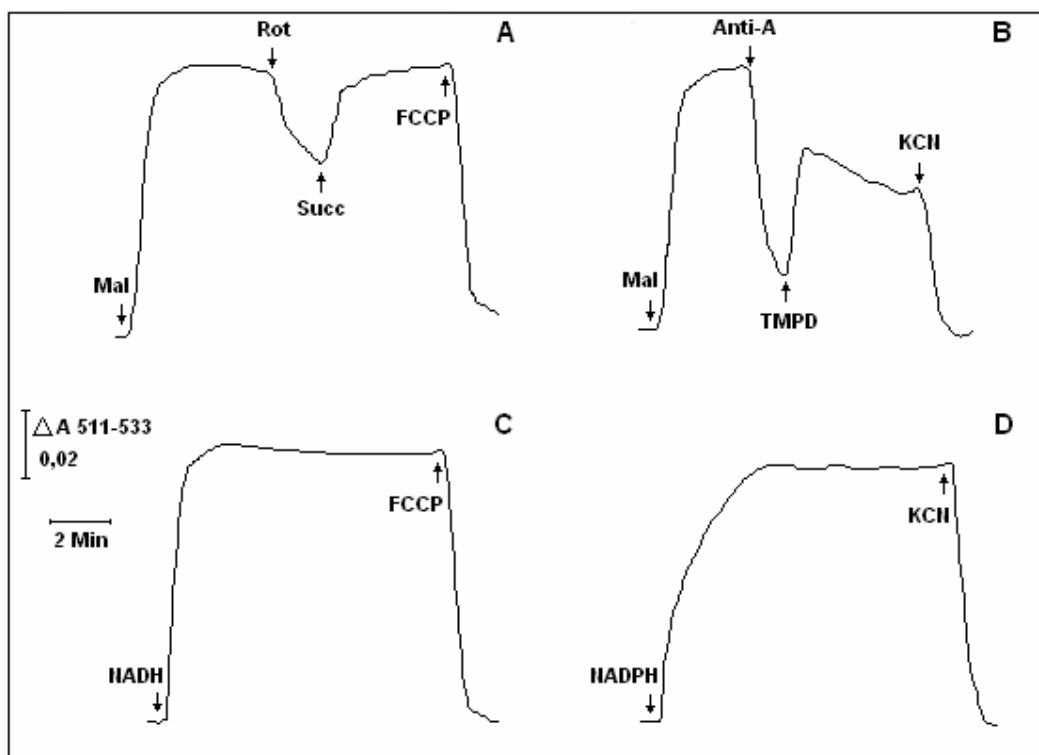


FIGURA 3. Potencial elétrico de Membrana ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias energizadas de *Arabidopsis thaliana*. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação descrito na Fig. 1, acrescido de 20 μ M safranina, e energizadas com 10 mM malato mais 10 mM glutamato (MAL), 5 mM succinato (SUCC), 1 mM NADH (NADH), 1 mM NADPH mais 0,5 mM Ca^{2+} (NADPH) ou 0,2 mM/2 mM TMPD/ascorbato (TMPD), conforme indicado. Rotenona (ROT, 10 μ M), Antimicina-A (Anti-A, 10 μ M), Cianeto (KCN, 1 mM), carbonil cianeto trifluoro-metoxi fenilhidrazona (FCCP, 2 μ M), ADP (200 nmol) foram adicionados onde indicado.

que estas preparações expressam as NAD(P)H desidrogenases externas. Em (B) e (D) o $\Delta\Psi$ é permanentemente desfeito por cianeto de potássio (KCN), inibidor do complexo IV.

Os sistemas de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias vegetais apresentam uma menor afinidade por Ca^{2+} , em relação aos de mitocôndrias animais, um requerimento absoluto por fosfato e, em alguns casos, uma menor ou nenhuma sensibilidade ao vermelho de rutênio (Martins *et al.* 1993, Deryabina *et al.* 2004). Os sistemas mitocondriais de transporte de Ca^{2+} podem ser importantes no controle da concentração de Ca^{2+} mitocondrial, regulando a atividade de enzimas mitocondriais sensíveis ao Ca^{2+} (Gunter and Gunter 2001). Em vegetais, o sistema de transporte de Ca^{2+} pode também participar da redistribuição de fosfato intracelular (Silva *et al.* 1992) e da regulação da concentração de Ca^{2+} citossólico em certas condições fisiológicas (Rizzuto *et al.* 2000). O transporte de cálcio por mitocôndrias isoladas de cultura de células de *A. thaliana* foi determinado utilizando-se o corante arzenazo III (Scarpa *et al.* 1978). A FIGURA 4 mostra que a energização das mitocôndrias com malato mais glutamato (A) ou succinato (B) resulta numa diminuição do Ca^{2+} livre do meio, decorrente da captação eletroforética. Alguns minutos depois, a concentração de Ca^{2+} livre no meio ficou constante. Isso ocorre devido ao equilíbrio entre as vias de entrada e saída de Ca^{2+} das mitocôndrias (Nicholls 1978, Nicholls and Akerman 1982). Entretanto a captação de cálcio através das mitocôndrias de *A. thaliana* é bastante reduzida, quando comparada à de outras espécies como o milho que, quando incubadas nas mesmas condições experimentais são capazes de captar todo o cálcio adicionado ao meio e manter uma concentração de cálcio livre próxima de 2 μM (Martins and Vercesi 1985). Em (B), três experimentos distintos são sobrepostos e verifica-se o resultado da adição, aos 10 minutos, do desacoplador FCCP ou do inibidor da via de captação eletroforética de cálcio, vermelho de rutênio (VR) (Reed and Bygrave 1974) sobre a captação padrão de cálcio pelas mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

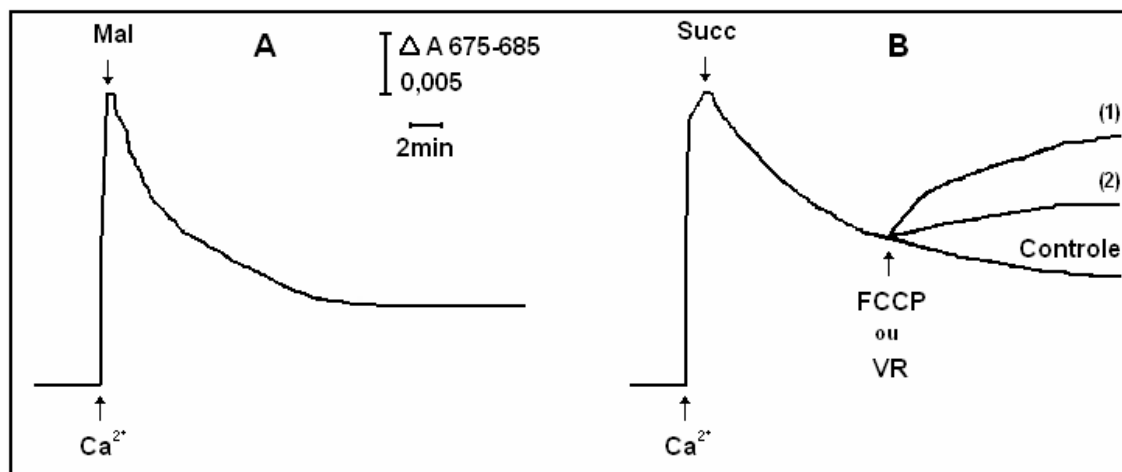


FIGURA 4. Transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana*. Mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), e corante arzenazo III ($40 \mu M$). Foi adicionado Ca^{2+} ($100 \mu M$) e os substratos respiratórios foram adicionados onde indicado em (A) 10 mM malato mais 10 mM glutamato (Mal) e (B) 5 mM succinato (Succ) onde três curvas representam experimentos distintos em (1) FCCP $2 \mu M$, (2) vermelho de rutênio VR $1 \mu M$ foram adicionados 10 minutos após a adição Ca^{2+} e Controle representa a ausência da adição de ambos.

Nota-se que a aplicação do desacoplador FCCP, que resulta na diminuição do $\Delta\Psi$, interfere no efluxo de Ca^{2+} que ocorre de forma mais rápida do que aquele provocado por VR. Esta diferença é decorrente do fato de que, com o colapso do $\Delta\Psi$ o Ca^{2+} é liberado pela via de saída e também pela via de captação, enquanto que, na presença de VR, o Ca^{2+} só é liberado pela via de saída, já que a via de captação está inibida.

4.4 - Efeito do nitrito na respiração mitocondrial

A análise do efeito de nitrito foi realizada verificando-se a interferência da adição do ânion na atividade respiratória estabelecida pela mitocôndria isolada de *A. thaliana* respirando no estado respiratório 3. Nestes experimentos o succinato foi utilizado como substrato respiratório e o nitrito foi adicionado ao meio de reação quando restava ainda 70% de oxigênio. Conforme pode ser observado na FIGURA 5, a adição de nitrito (5 mM) causou uma inibição parcial do consumo de oxigênio que foi revertida parcialmente com 30 μM (traçado D) e completamente com 100 μM (traçado C) de cPTIO. Esta substância possui afinidade e liga-se exclusivamente ao NO (Amano and Noda 1995), indicando que o NO estaria sendo produzido através da redução do nitrito pela mitocôndria, uma vez que a inibição causada após a adição de nitrito foi revertida por cPTIO. Controles realizados adicionando-se apenas cPTIO 100 μM (FIGURA 5, traçado A) demonstraram um pequeno aumento na velocidade de consumo de oxigênio, não estimulada em maiores concentrações de cPTIO (não mostrado), indicando que as mitocôndrias podem conter uma pequena concentração de NO endógeno. Ainda na FIGURA 5, o gráfico inserido à direita mostra a curva de inibição do nitrito em função de sua concentração; os experimentos foram conduzidos da mesma forma que os anteriores e nota-se que, a inibição é mais efetiva em concentrações menores que 1 mM e, a partir da concentração de 2 mM de nitrito, a inibição é pouco incrementada mostrando saturação do efeito inibitório do nitrito na respiração.

Os resultados da FIGURA 5 sugeriram que a inibição da respiração causada por nitrito

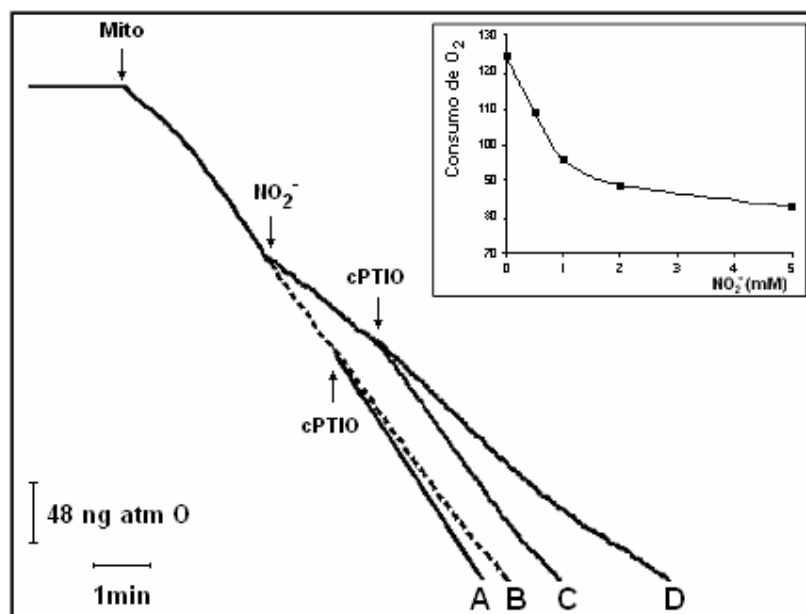


FIGURA 5. Efeito de nitrito (NO_2^-) sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana*. Suspensão mitocondrial (0,5 mg/mL) foi adicionada ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 100 nmol, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM MgCl_2 e 5 mM succinato como substrato respiratório. (A) controle + cPTIO 100 μM ; (B) controle; (C) nitrito 5 mM + CPTIO 100 μM ; (D) nitrito 5 mM + CPTIO 30 μM . Inset mostra a curva de inibição de nitrito no consumo de O_2 ($\text{ng atom O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) com concentrações variando de 0,5 mM a 5 mM.

seria devido à síntese de NO, já que é bem conhecido o efeito inibitório do NO na respiração ao ligar-se à COX (Millar and Day, 1996) e a reversibilidade desta inibição quando o NO do meio é removido, no caso, pelo cPTIO. Para ter mais suporte de que a inibição da respiração causada por nitrito seria devido à síntese de NO, analisou-se o efeito inibitório de nitrito, quando adicionado em diferentes tensões de O₂. Os resultados demonstraram uma inibição crescente para baixas concentrações de oxigênio (FIGURA 6) sugerindo que o NO formado a partir da redução do nitrito estaria competindo com o oxigênio para se ligar à COX (Brown and Cooper 1994, Cleeter *et al.* 1994).

Já foi demonstrado que a AOX, diferentemente da COX não é inibida por NO (Millar and Day 1996). Analisou-se então o efeito da adição de nitrito no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* quando a COX ou AOX estavam inibidas. Como pode ser observado na FIGURA 7, a adição de nitrito (5 mM) à suspensão mitocondrial energizada com succinato reduziu o consumo de O₂ em 44,7% quando a AOX estava inibida (na presença de *n*-propil galato), enquanto que, não se observou efeito inibitório do nitrito na respiração quando as mitocôndrias foram energizadas na presença de Antimicina -A, inibidor do complexo III (COX inibida).

Na FIGURA 8 comparou-se, adicionalmente, o efeito inibitório do nitrito em função do substrato respiratório. Quando as mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* foram energizadas com succinato, a adição de nitrito alterou a velocidade de consumo de O₂ de 272 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹ para 223 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹, indicando que o nitrito (5 mM) provocou uma inibição de 18 % na respiração. Por outro lado, nas mitocôndrias energizadas com NADH a adição de nitrito alterou a velocidade de respiração de 280 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹ para 258 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹, indicando um efeito inibitório do nitrito de apenas 8 %. A menor inibição provocada por nitrito quando a mitocôndria foi energizada com NADH, em relação ao succinato, foi mais evidente quando os experimentos foram realizados na presença de *n*-propilgalato (AOX inibida). Neste caso, a respiração basal de 182 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹ e 191

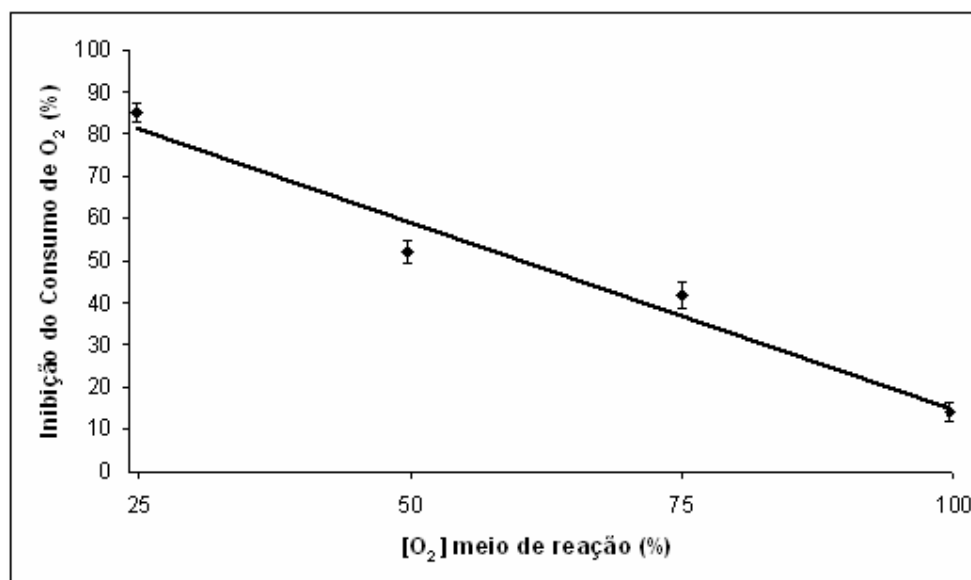


FIGURA 6. Inibição do consumo de oxigênio pela adição de nitrito em diferentes concentrações de O₂. Nitrito (5 mM) foi adicionado ao meio de reação contendo a suspensão mitocôndrial (0,5mg/mL) e 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2) em diferentes concentrações de oxigênio, 100%, 75%, 50%, 25%, em experimentos distintos (média de 3 experimentos para cada concentração de O₂ e desvio padrão. $p < 0.05$).

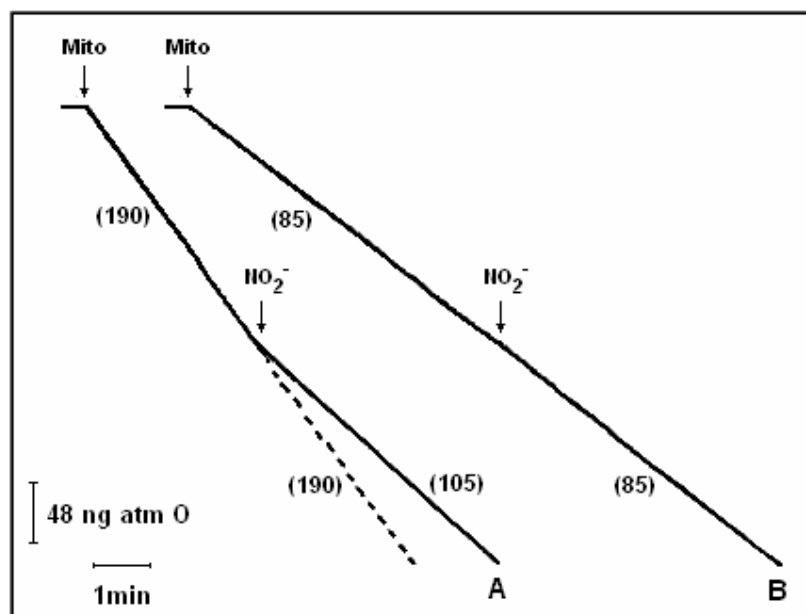


FIGURA 7. Efeito de nitrito (NO_2^-) sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana* com a AOX (presença de galato) ou COX (presença de Anti -A) inibida. Suspensão mitocondrial (0,5 mg/mL) foi adicionada ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM MgCl_2 , 5 mM succinato como substrato respiratório e *n*-propil-galato 2 μM (A) ou antimicina-A 10 μM (B). O nitrito (5 mM) foi adicionado quando a mitocôndria havia consumido 50% do oxigênio do meio de reação. A linha tracejada representa o controle com *n*-propil-galato 2 μM mas a adição de nitrito. Os números em parênteses são referentes ao consumo de oxigênio em $\text{ng atm O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

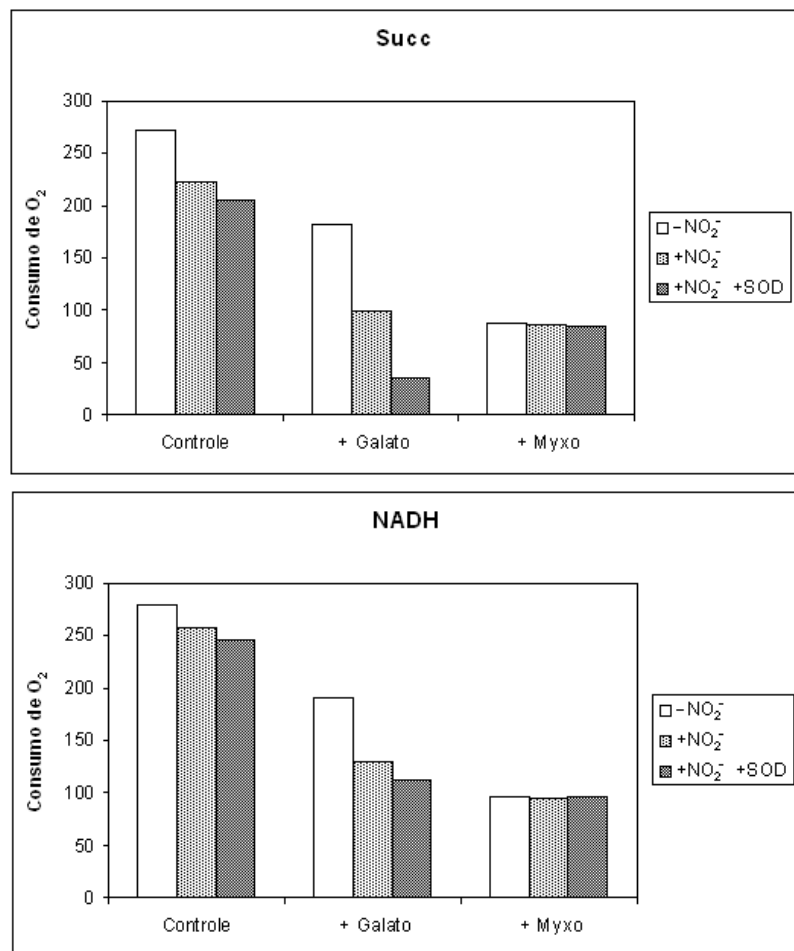


FIGURA 8. Análise do efeito inibitório de nitrito (NO_2^-) sobre a atividade da COX e da AOX de mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 1 μmol ADP, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM MgCl_2 e 5 mM de Succinato (Succ) ou 1 mM de NADH como substrato respiratório (controle). Para analisar o efeito do nitrito na COX foi adicionado ao meio de reação *n*-propilgalato 2 μM (+ Galato) para inibir a AOX, e para análise da AOX foi adicionado myxotiazol 2 μM (+ Myxo) para inibir a COX. O nitrito (5 mM) foi adicionado quando a mitocôndria havia consumido 50% do oxigênio. Os experimentos foram também realizados na presença de 200 U/mL de SOD (+ SOD), conforme indicado. O consumo de oxigênio é expresso $\text{ng atom O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹ de mitocôndrias energizadas com succinato ou NADH, respectivamente, foi reduzida para 99 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹ e 130 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹, respectivamente, na presença de nitrito. Este ânion inibiu assim 45,6 % e 32,0 % do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas com succinato ou NADH, respectivamente, quando apenas a COX estava ativa. Diferentemente, quando a COX estava inibida, experimentos realizados na presença de Myxotiazol (inibidor do complexo III), a adição de nitrito não alterou o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas com succinato ou com NADH.

Os resultados das FIGURAS 7 e 8 mostraram que o nitrito inibiu o consumo de oxigênio quando apenas a COX estava atuando como receptor final de elétrons (presença de galato), mas não teve efeito algum quando apenas a AOX estava ativa (na presença de Anti -A ou Myxotiazol), corroborando os resultados descritos nas FIGURAS 5 e 6 de que o efeito inibitório provocado pelo nitrito na respiração das mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*, nas condições experimentais utilizadas, seriam decorrentes da inibição da COX, através do NO formado a partir da redução do nitrito. Ainda, estes resultados foram observados quando se utilizou NADH ou succinato como substrato respiratório. Entretanto o efeito inibitório do nitrito foi menor nas mitocôndrias energizadas com NADH (FIGURA 8), sugerindo que, na presença deste substrato a degradação do NO formado seria favorecida. Resultados anteriores de nosso grupo demonstraram a operação de um mecanismo de degradação de NO dependente de NAD(P)H em mitocôndrias isoladas de tubérculos batata (Oliveira *et al.* 2008), o que poderia explicar os resultados aqui observados com as mitocôndrias de *A. thaliana*.

A FIGURA 8 mostra ainda que a inibição do consumo de oxigênio causada pela adição de nitrito foi aumentada na presença de superóxido dismutase (SOD), que evita a degradação de NO por prevenir sua reação com o ânion superóxido, principalmente nos experimentos realizados com succinato. Estes resultados corroboram a sugestão de que a maior inibição do consumo de oxigênio provocada pelo nitrito deve resultar de uma menor

velocidade de degradação do NO do meio, quando as mitocôndrias são energizadas com succinato.

4.5 - Síntese de NO a partir de nitrito.

Com o objetivo de se analisar mais diretamente a capacidade de redução de nitrito a NO pelas mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*, utilizou-se um sistema detector capaz de acompanhar simultaneamente as variações da concentração de O₂ e de NO do meio de reação. Inicialmente foram realizados testes de calibração do sistema detector de NO alterando-se a concentração de oxigênio do meio de reação (100% e 0%). Para obter a condição de anaerobiose foi adicionado ao meio 1mg de suspensão mitocondrial de *A. thaliana*, 0,5 mM de ADP e 5 mM de succinato, para que, através da respiração fosforilativa a suspensão mitocondrial consumisse rapidamente o oxigênio livre do meio de reação. Como doador de NO foi adicionado GSNO e como captador de NO, cPTIO. A FIGURA 9 mostra que a adição de GSNO ao meio de reação gera um sinal no eletrodo de NO, indicando a liberação de NO por GSNO. A posterior adição de cPTIO reverte o sinal do eletrodo confirmando que este é devido ao NO liberado no meio de reação (gráfico superior). Para uma mesma adição de GSNO (100 µM), a calibração em aerobiose e anaerobiose mostrou que na presença de oxigênio existe uma degradação espontânea do NO, o que é esperado (gráfico inferior).

Os experimentos apresentados na FIGURA 10 mostram que a adição de nitrito (5 mM) após as mitocôndrias de *A. thaliana* energizadas com succinato terem consumido 50% do oxigênio do meio de reação (gráfico superior), causa uma ligeira inibição do consumo de oxigênio. Entretanto, a produção de NO só começa a ser detectada quando o oxigênio do meio está se esgotando. Quando o nitrito é adicionado após a mitocôndria haver consumido todo o oxigênio (gráfico inferior), uma produção significativa de NO é prontamente observada. Estes resultados mostraram que a redução mitocondrial de nitrito é favorecida em anaerobiose. Em

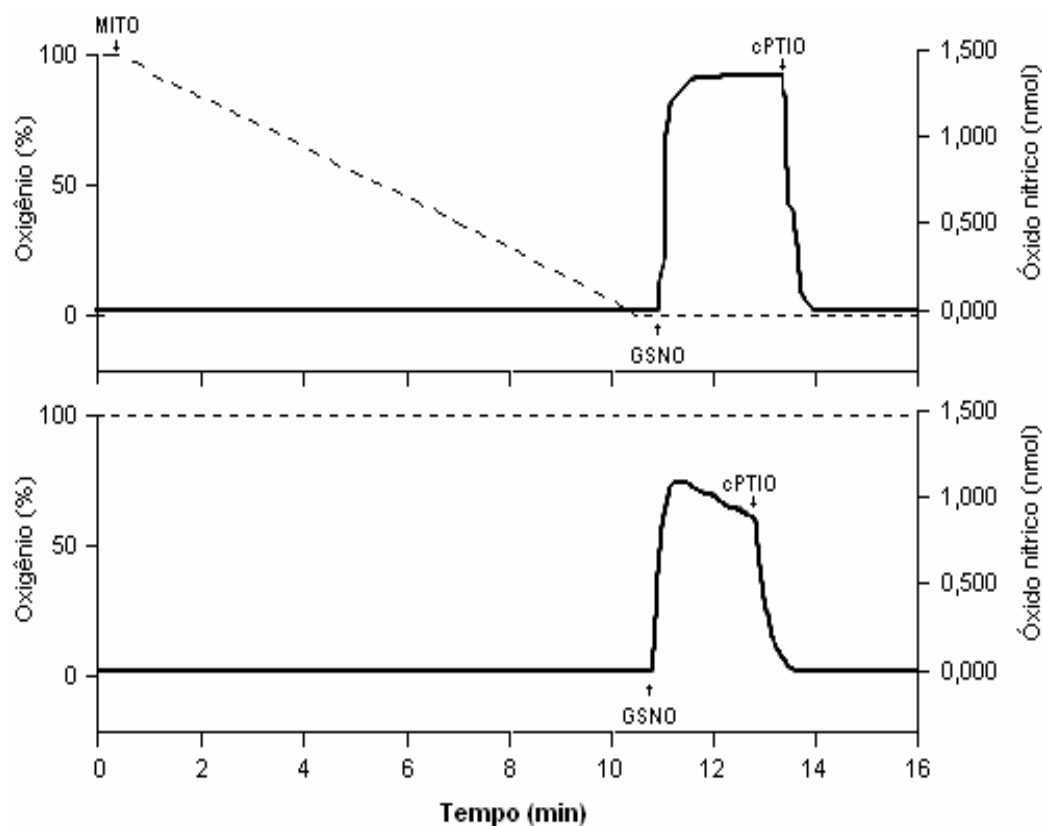


FIGURA 9: Detecção de NO com sensor eletroquímico. Efeito da concentração de oxigênio. Meio de reação contendo 250 mM sacarose, 0,1% BSA e 10 mM fosfato de potássio (pH 7,2). NO liberado por 100 μ M GSNO em anaerobiose após o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias adicionadas onde indicado (gráfico superior) e em aerobiose (gráfico inferior). cPTIO (100 μ M) foi adicionado após a estabilização do sinal. Quando adicionada suspensão mitocondrial (0,5mg/mL), o meio de reação também continha 0,5 mM ADP e 5 mM de Succinato. A linha tracejada (----) representa o monitoramento por eletrodo específico da porcentagem de oxigênio do meio e a linha contínua (—) representa o monitoramento por eletrodo específico da concentração de NO, no mesmo experimento.

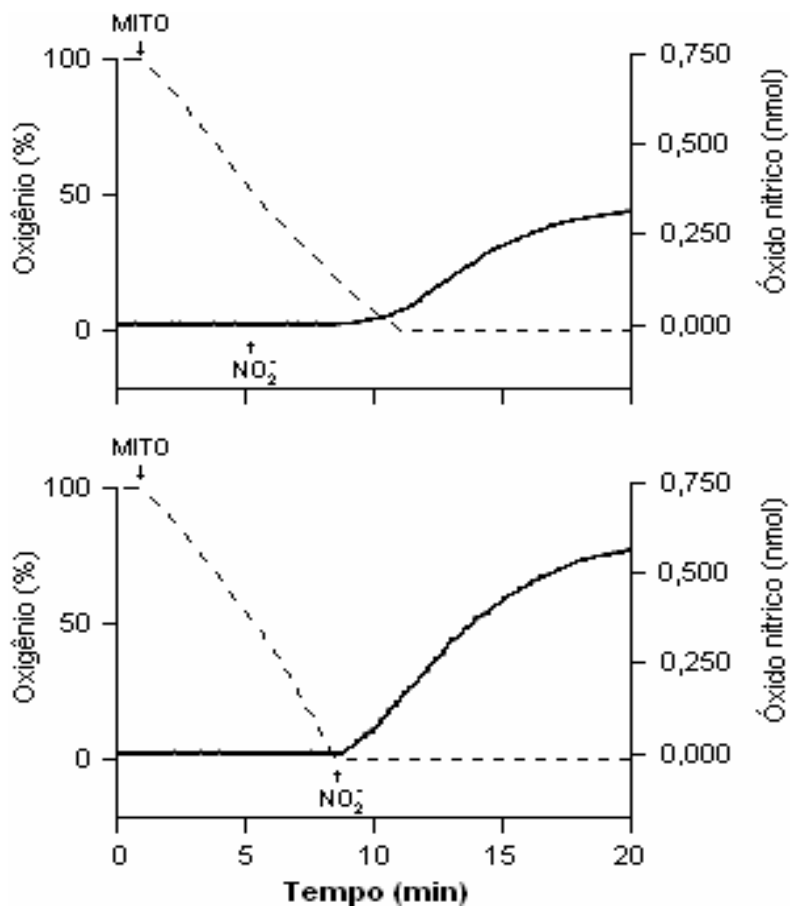


FIGURA 10. Síntese de NO por mitocôndrias de *A. thaliana*. Nitrito (5 mM) foi utilizado como substrato para a síntese do radical, adicionado em concentrações de 0% (gráfico inferior) e 50% (gráfico superior) de oxigênio. Suspensão mitocondrial 0,5 mg/mL adicionada em meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 10 mM tampão fosfato (pH 7.2) e 5 mM succinato como substrato respiratório. A linha tracejada (---) representa o monitoramento da concentração de oxigênio do meio e a linha contínua (—) representa o monitoramento da concentração de NO, no mesmo experimento.

aerobiose, embora os efeitos inibitórios do nitrito na respiração sugiram a síntese de NO, esta produção seria muito pequena, aquém do limite de detecção do eletrodo de NO.

A produção anaeróbica de NO pelas mitocôndrias de *A. thaliana* foi analisada em função da concentração de nitrito (FIGURA 11). Quando nitrito foi adicionado após as mitocôndrias terem consumido todo o oxigênio do meio de reação, a velocidade de produção de NO aumentou de $0,024 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para $0,042 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, com o aumento da concentração de nitrito de 0,25 mM para 5 mM mostrando que a velocidade de produção de NO aumenta em função da concentração de nitrito. Após 10 minutos de exposição a 0,25 mM ou 5 mM nitrito, produção total de NO pelas suspensões mitocondriais foi de 0,10 nmol ou 0,41 nmol, respectivamente.

Quando se comparou a redução anaeróbica do nitrito de mitocôndrias energizadas com malato mais glutamato, NADH, NADPH ou succinato, não se observou diferenças significativas na produção de NO, em função do substrato utilizado (resultados não mostrados).

A redução anaeróbica de nitrito foi favorecida quando as mitocôndrias foram energizadas na presença de SOD. A produção total de NO pelas suspensões mitocondriais, após 10 minutos de exposição ao nitrito aumentou de 0,458 nmol para 0,590 nmol na presença de 100U SOD e para 0,695 nmol na presença de 500U SOD (FIGURA 12, gráfico superior). A FIGURA 12 ainda mostra que, mesmo quando o nitrito foi adicionado antes da suspensão mitocondrial (em aerobiose), síntese detectável de NO só foi observada após a mitocôndria ter consumido todo o oxigênio do meio de reação (gráfico inferior), confirmando os resultados apresentados na FIGURA 10, que foram, entretanto, realizados na ausência de SOD. Estes resultados indicam que na presença de SOD, maiores quantidades de NO podem ser detectadas, provavelmente porque sua degradação nesta condição é diminuída.

Para demonstrar que a produção de NO a partir de nitrito é uma atividade mitocondrial, o oxigênio do meio de reação foi removido com argônio, após o que se

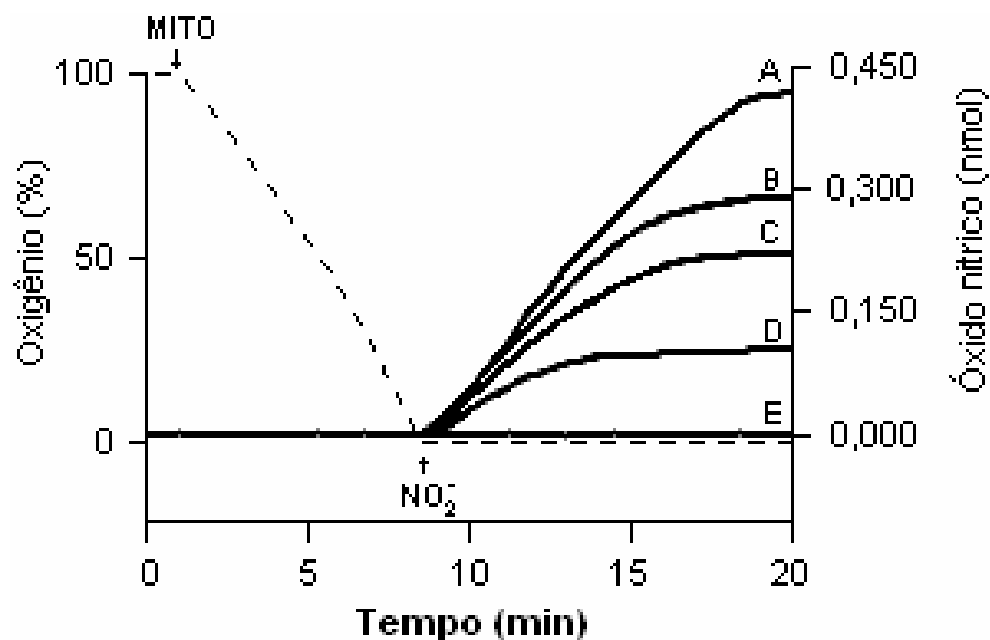


FIGURA 11. Síntese de NO por mitocôndrias de *A. thaliana* em função da concentração de nitrito. O ânion nitrito foi utilizado como substrato para a síntese do radical, adicionado em concentrações de 5 mM (A); 2 mM (B); 0,5 mM (C); 0,25 mM (D) e controle sem adição de nitrito (E). Suspensão mitocondrial 0,5 mg/mL adicionada em meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2) e 5 mM succinato como substrato respiratório. Concentrações de oxigênio (----) e NO (—) monitoradas simultaneamente, com eletrodos específicos.

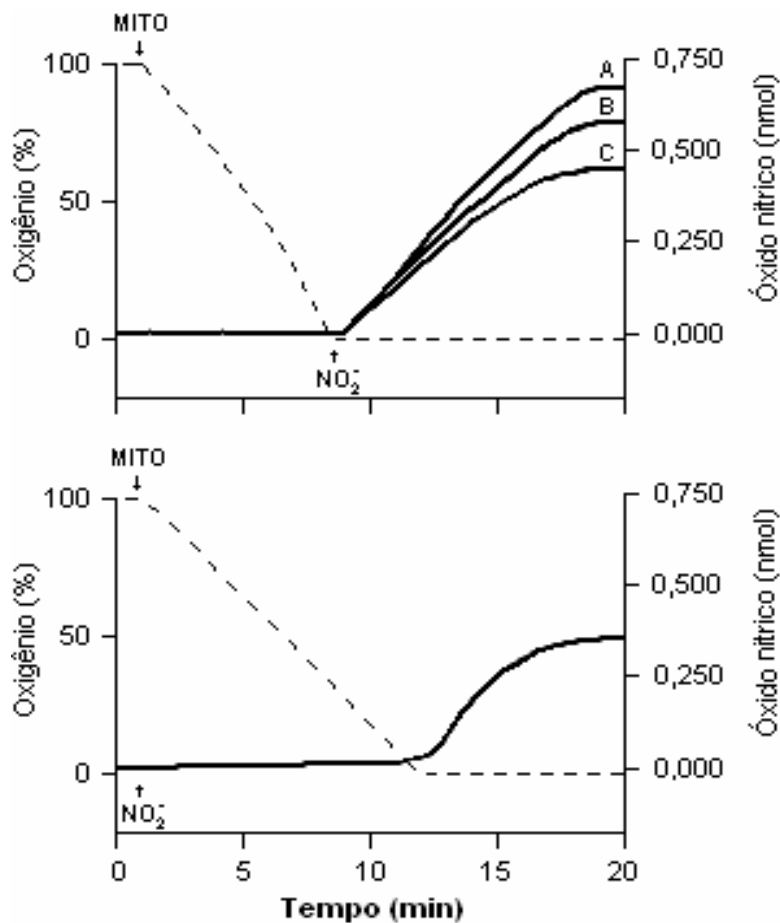


FIGURA 12. Efeito de SOD na detecção de NO produzido por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* a partir de nitrito 5 mM. No gráfico superior 500 Unidades (A) e 100 Unidades (B) de superóxido dismutase (SOD) foram adicionadas a 1 mL de meio de reação desde o início do experimento e (C) representa controle sem adição de SOD. No gráfico inferior o experimento foi realizado na presença de 100 Unidades de SOD e o nitrito foi adicionado ainda em aerobiose. A suspensão mitocondrial (0,5mg/mL) foi incubada em meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2) e 5 mM succinato como substrato respiratório. Concentrações de oxigênio (----) e NO (—) monitoradas simultaneamente, com eletrodos específicos.

adicionou nitrito (5 mM). Neste caso não se observou alteração de sinal do eletrodo de NO (FIGURA 13, gráfico superior). A atividade redutora de nitrito da mitocôndria tem sido atribuída ao vazamento de elétrons do segmento bc1 do complexo III (Koslov et al. 1999) e mais recentemente à COX, que usaria elétrons vindo da cadeia respiratória para reduzir o nitrito (Castello *et al.* 2006). O myxothiazol, por prevenir o vazamento de elétrons no complexo III e, também, impedir a transferência de elétrons para a COX, tem sido utilizado para comprovar estes mecanismos de síntese, embora a utilização deste inibidor não possa distinguir entre a atividade redutora do segmento bc1 e da COX. Quando as mitocôndrias de *A. thaliana* foram expostas ao myxothiazol, durante a síntese anaeróbica de NO, este causou apenas uma ligeira inibição da produção do radical pela mitocôndria e a adição subsequente de *n*-propil galato (inibidor da AOX) não afetou a produção de NO (FIGURA 13, gráfico inferior). O traçado inferior da FIGURA 13 mostra ainda que o NO produzido foi totalmente seqüestrado pela adição de 100 μ M de cPTIO. A observada redução mitocondrial de nitrito - independente da atividade da cadeia respiratória poderia resultar da alta concentração do nitrito (5 mM). Sabe-se que, mesmo em pH fisiológico a redução de nitrito é favorecida quando em altas concentrações (Kleinkleibongard *et al.* 2003). Assim, os efeitos dos inibidores da respiração na síntese de NO foram analisados utilizando-se concentrações mínimas detectáveis pelo eletrodo de NO. Quando o nitrito foi utilizado na concentração de 200 μ M, a velocidade de produção de NO foi reduzida de 5,4 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para 4,4 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ quando myxothiazol estava presente no meio de reação, e a produção final após 10 minutos foi reduzida em 35,3% de 0,051 nmoles para 0,033 nmoles (FIGURA 14, gráfico superior). Quando myxothiazol foi adicionado durante a síntese de NO houve uma inibição acentuada, entretanto a síntese continuou e não foi afetada pela subsequente adição de *n*-propil galato (FIGURA 14, gráfico inferior). Estes resultados mostraram que, com menores concentrações de nitrito é possível detectar melhor a atividade redutora de nitrito sensível ao myxothiazol, mas ainda se observa síntese independente do transporte de elétrons.

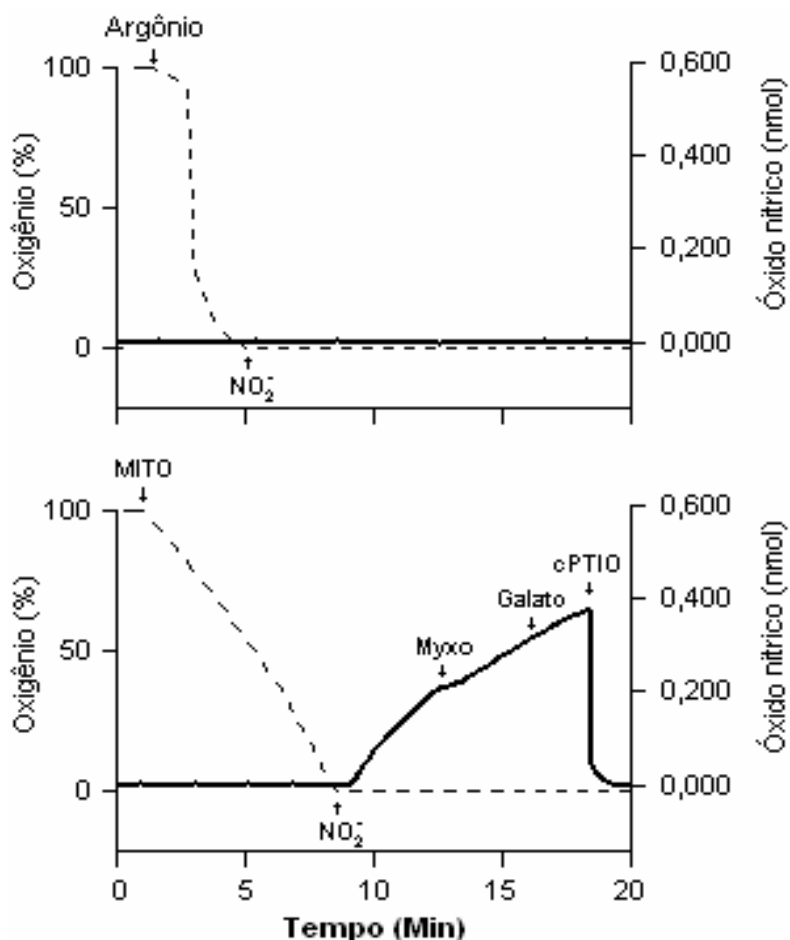


FIGURA 13. Produção de NO dependente de mitocôndria e efeito de inibidores da cadeia de transporte de elétrons. O oxigênio do meio foi retirado borbulhando argônio e nitrito 5 mM foi adicionado (gráfico superior). No gráfico inferior, após a mitocôndria consumir o oxigênio do meio foi adicionado nitrito 5 mM e durante a produção de NO foi adicionado myxotiazol 2 μ M, n-propilgalato 2 μ M e ao final cPTIO 100 μ M. Meio de reação pH 7,2 contendo 250 mM sacarose, 0,1% BSA e 10 mM fosfato de potássio. Quando adicionada suspensão mitocondrial (0,5 mg/mL), o meio de reação também continha 0,5 mM ADP e 5 mM de succinato. Concentrações de oxigênio (----) e NO (—) monitoradas simultaneamente, com eletrodos específicos.

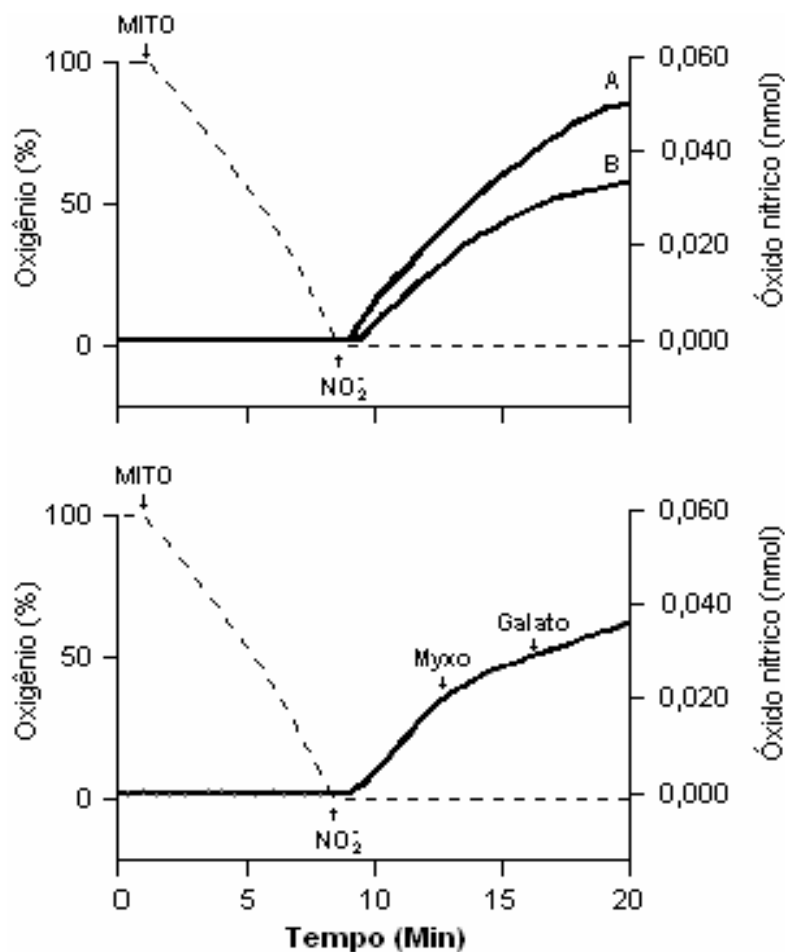


FIGURA 14: Síntese de NO por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*, em concentrações reduzidas de nitrito. Mitocôndrias (1 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 1 μmol ADP, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM $MgCl_2$ e energizadas com 5 mM succinato como substrato respiratório. No gráfico superior quando a mitocôndria havia consumido todo oxigênio do meio de reação foi adicionado (A) nitrito 200 μM; (B) myxotiazol 2 μM e nitrito 200 μM. No gráfico inferior após a mitocôndria haver consumido todo o oxigênio do meio foi adicionado nitrito 200 μM, e depois de alguns minutos, conforme indicado, foram adicionados os inibidores myxotiazol 2 μM e n-propilgalato 2 μM. Concentrações de oxigênio (----) e NO (—) monitoradas simultaneamente, com eletrodos específicos.

Em condições de hipóxia, os transportadores de elétrons da cadeia respiratória tendem a permanecer mais reduzidos, já que não podem entregar seus elétrons ao oxigênio, o que favoreceria a redução do nitrito a NO. Os resultados ainda mostram que a AOX não apresenta esta atividade.

4.6 – Efeito de NO na respiração.

O efeito do NO no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias de *A. thaliana* foi analisado. Nestes experimentos foram utilizados malato mais glutamato, succinato, NADH ou NADPH como substratos respiratórios e o NO foi adicionado quando restavam 50% de oxigênio no meio de reação. Na FIGURA 15 podemos notar que para todos os substratos a adição de $\sim 1,7 \text{ M}$ de NO causou uma inibição da cadeia de transporte de elétrons com uma visível diminuição da velocidade de consumo de oxigênio, revertida por completo em menos de 5 minutos. A reversão da respiração por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* utilizando NADH, malato mais glutamato e NADPH foram muito semelhantes e rápidas 2,07 ; 2,32 e 1,96 minutos respectivamente, o que não ocorre com succinato, onde observa-se um maior tempo 5,86 minutos para reverter a inibição do consumo de O_2 causada por NO.

4.7 - Degradação do NO por Mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

A degradação de NO por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* foi analisada para cada substrato respiratório adicionando-se o liberador de NO, nitrosoglutationa (GSNO), quando a mitocôndria havia consumido 50% do oxigênio do meio. Nestes experimentos a concentração de O_2 e de NO no meio de reação foram acompanhadas simultaneamente com eletrodos específicos para estas espécies. Conforme pode ser observado na FIGURA 16, a degradação de NO é muito mais rápida na mitocôndria energizada com NADH ($0,820 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$), em relação àquela energizada por succinato ($0,393 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). Nas mitocôndrias energizadas com NADPH ou malato mais glutamato a velocidade de degradação foi

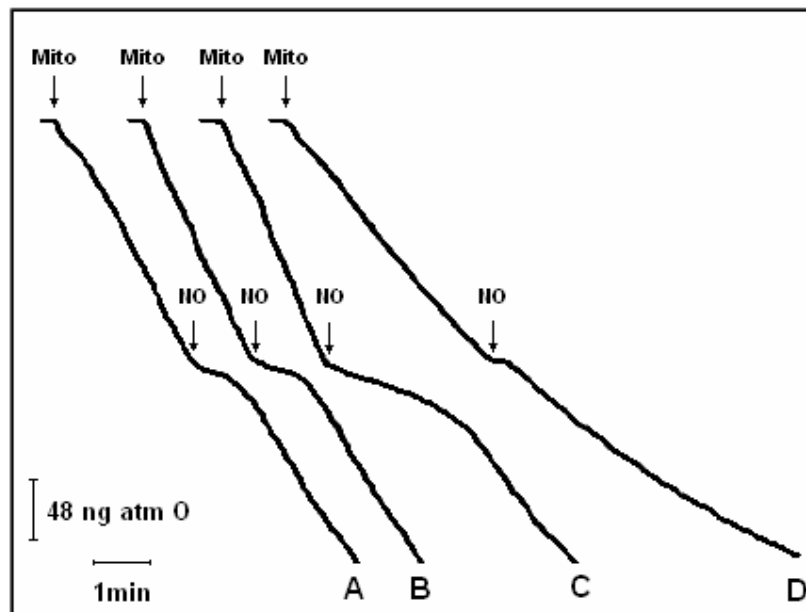


FIGURA 15. Análise do efeito do NO sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de *Arabidopsis thaliana*. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 1 μ mol ADP, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM $MgCl_2$ e energizadas com 1 mM NADH (A), 10 mM malato mais 10 mM glutamato (B), 5 mM succinato (C), ou 1 mM NADPH mais 0,5 mM Ca^{2+} (D), como substratos respiratórios. Quando a mitocôndria havia consumido 50% do oxigênio do meio de reação, adicionou-se 1,7 μ M de NO, conforme indicado.

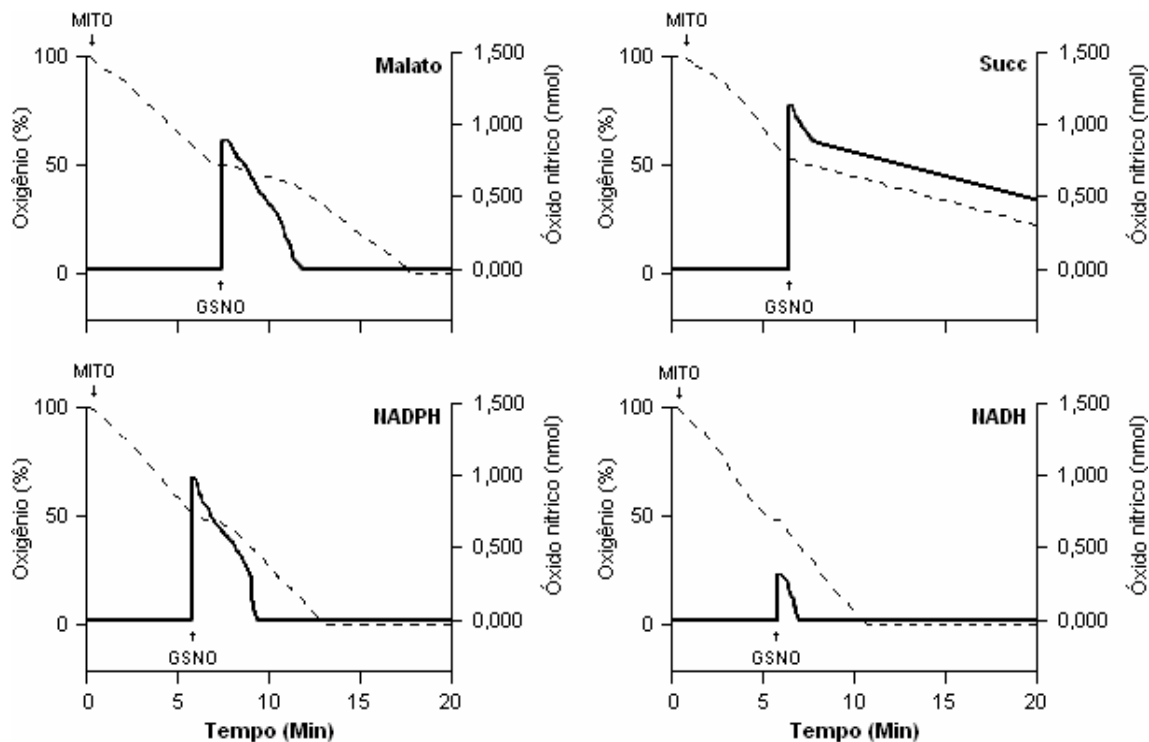


FIGURA 16. Análise da degradação NO liberado por GSNO sobre mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 1 μ mol ADP, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM $MgCl_2$ e energizadas com 5 mM succinato (Succ), 10 mM malato mais 10 mM glutamato (Malato), 1 mM NADH (NADH) ou 1 mM NADPH mais 0,5 mM Ca^{2+} (NADPH), como substratos respiratórios. Quando a mitocôndria havia consumido 50% do oxigênio do meio de reação, adicionou-se 100 μ M de GSNO. Concentrações de oxigênio (----) e NO (—) monitoradas simultaneamente, com eletrodos específicos.

intermediária, ($0,685 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ e $0,606 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$), respectivamente. A diferença na velocidade de degradação de NO em função do substrato foi também refletida no pico de NO acusado pelo eletrodo ao se adicionar GSNO. Assim, a adição de GSNO gerou picos de NO equivalentes a 0,35; 0,92; 0,82; e 1,16 μM nas mitocôndrias energizadas com NADH, NADPH, malato mais glutamato e succinato respectivamente. Pode-se ainda observar que, para cada substrato, a inibição da respiração é revertida, à medida que a concentração de NO do meio é diminuída. Estes resultados confirmaram aqueles da FIGURA 15 mostrando que, quando a mitocôndria está energizada com NADH observa-se uma menor inibição de sua respiração, o inverso ocorrendo quando a mitocôndria está energizada com succinato onde a degradação é mais lenta resultando numa inibição maior.

A influência da COX e da AOX na degradação do NO também foi avaliada. Quando as mitocôndrias de *A. thaliana* foram energizadas na presença de *n*-propilgalato (AOX inibida) e expostas ao NO, através do doador DEA-NONOato, após consumirem 50% do oxigênio do meio, observou-se uma inibição transiente do consumo de oxigênio que foi restabelecido com a degradação do NO (FIGURA 17). Duas quantidades de DEA-NONOato (5 μL e 2 μL) foram adicionadas ao meio gerando concentrações de 0,57 μM (gráfico superior) e 0,18 μM (gráfico do meio) de NO, podendo-se observar que a inibição da respiração é mais duradoura na maior concentração de NO. Quando apenas a AOX estava funcional, a adição de 2 μL DEA-NONOato gerou uma concentração de 0,44 μM de NO que não causou nenhum efeito inibitório no consumo de oxigênio e também não foi degradado (gráfico inferior). Estes resultados evidenciaram o efeito inibitório do NO na COX e a insensibilidade da AOX ao NO. Ainda, com a inibição da COX pelo NO os elétrons não podem fluir pela cadeia respiratória, situação que favorece a geração de ânion superóxido, que reage com NO, reduzindo sua concentração no meio e, conseqüentemente, favorecendo a sua liberação da COX e a restauração do consumo de oxigênio.

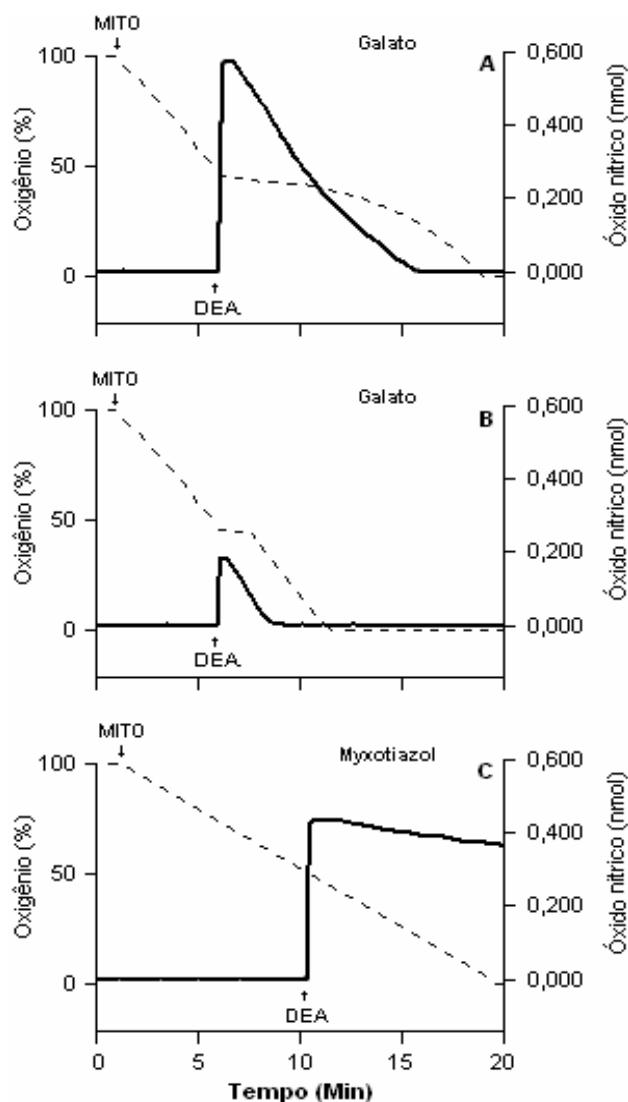


FIGURA 17. Degradação de NO, liberado por DEA-NONOato (DEA), por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*: efeito da inibição na COX e AOX. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 1 μ mol ADP, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM $MgCl_2$ e energizadas com 5 mM succinato. Em (A) e (B) a AOX foi inibida por *n*-propilgalato 2 μ M (Galato) e foi adicionado 5 μ L e 2 μ L de DEA, respectivamente. Em (C) a COX foi inibida por Myxotiazol 2 μ M (Myxo) e foi adicionado 2 μ L de DEA. As adições do doador DEA foram feitas quando a mitocôndria havia consumido 50% do oxigênio do meio. Concentrações de oxigênio (----) e NO (—) monitoradas simultaneamente, com eletrodos específicos.

4.8 - Respiração de mitocôndrias de *A. thaliana* na presença de L-arginina

A ocorrência de uma NOS mitocondrial tem sido sugerida a partir de resultados observados em várias preparações mitocondriais de diferentes órgãos e espécies de origem animal, utilizando-se diferentes metodologias (Haynes *et al.* 2003). Entretanto, outros grupos têm questionado esta atividade NOS da mitocôndria (Tay *et al.* 2004, Lacza *et al.* 2004). Para verificar uma possível atividade NOS nas mitocôndrias de *A. thaliana*, estas foram expostas ao substrato da NOS, a L-arginina. Conforme mostrado na TABELA 5, a adição de L-arginina após a suspensão mitocondrial ter consumido 50% do oxigênio do meio, quando energizada com succinato, não alterou a respiração.

Por outro lado, quando nitrito foi adicionado nas mesmas condições experimentais, o consumo de oxigênio foi reduzido de 283 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹ para 225 ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹ (TABELA 5A). Utilizando um outro protocolo, comparou-se o consumo de oxigênio das mitocôndrias de *A. thaliana* em uma situação controle (sem a adição de substrato para NOS e na presença de SOD e *n*-propilgalato) com aquela na presença de L-arginina ou L-arginina e o cofator da NOS, NADPH. As adições de SOD e *n*-propilgalato ao meio de incubação foram realizadas para prevenir a degradação do NO e evidenciar melhor a inibição da respiração, já que a AOX é insensível ao NO. Entretanto, novamente, nenhum efeito inibitório na respiração foi observado (TABELA 5B), o que seria indicativo da produção de NO. Assim, nenhuma atividade NOS, estimada pelo consumo de oxigênio, foi detectada nas mitocôndrias de *A. thaliana*.

TABELA 5. Efeito da L-arginina e nitrito no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*. Mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,25 M sacarose, 0,1% BSA, 1 μ mol ADP, 10 mM tampão fosfato (pH 7,2), 2 mM MgCl_2 e energizadas com 5 mM succinato Em (A) L-arginina (Arg, 5 mM) ou nitrito (5 mM) foram adicionados após as mitocôndrias terem consumido 50% do oxigênio do meio. Em (B) o meio de incubação continha também *n*-propilgalato 2 μ M e SOD 200 Unidades (controle) e L-arginina (5 mM) apenas ou com NADH (1 mM) foram acrescentados ao meio antes da suspensão mitocondrial. O consumo de oxigênio está expresso ng atom O.min⁻¹.mg⁻¹.

A	Controle	+ Arg	+ NO ₂ ⁻
Succinato	283	283	225

B	Controle	+ Arg	+ Arg NADPH
Succ SOD Galato	187	185	212

5 - DISCUSSÃO

Na última década, um número crescente de evidências vem demonstrando que o NO é um importante sinalizador para os vegetais, atuando nos mais variados processos de desenvolvimento e também nas respostas de defesa das plantas a estresses de origem biótica ou abiótica. Embora muito tenha se avançado nesta área, os desafios maiores se referem a uma melhor elucidação dos mecanismos de síntese de NO, bem como, a identificação de mecanismos de degradação deste radical nos vegetais. A combinação destas duas atividades é que certamente determina em cada célula o papel sinalizador do NO, bem como a especificidade da resposta desejada.

Resultados recentes vêm sugerindo que a mitocôndria parece ter uma contribuição importante para a homeostase do NO nos vegetais, além de ser um alvo importante, vem se destacando como uma organela produtora deste radical. O presente trabalho procurou contribuir para uma melhor elucidação sobre o papel da mitocôndria vegetal na homeostase do NO. Estas organelas expressam proteínas respiratórias alternativas não encontradas em mitocôndrias de origem animal, que apresentam características únicas relacionadas ao NO. A oxidase alternativa (AOX), diferentemente da citocromo *c* oxidase (COX), não é inibida por NO (Millar and Day 1996) e as NAD(P)H desidrogenases de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata aceleram a degradação de NO (Oliveira et al. 2008). Assim, ênfase foi dada também neste estudo à influência das NAD(P)H desidrogenases e da AOX no metabolismo do NO pela mitocôndria vegetal, utilizando *A. thaliana* como modelo experimental.

Numa primeira etapa do trabalho foi importante desenvolver uma metodologia para a purificação de mitocôndrias funcionalmente intactas. Para tanto, estabeleceu-se um protocolo para o crescimento de células em cultura, inicialmente na forma sólida e posteriormente na forma líquida. A partir de células em suspensão foi possível adaptar metodologia

desenvolvida originalmente para o isolamento de mitocôndrias de plântulas de milho (Martins and Vercesi 1985) para o isolamento de mitocôndrias de *A. thaliana* (ESQUEMA 8). A integridade funcional destas preparações foi demonstrada pela análise da fosforilação oxidativa (FIGURA 1, TABELA 3) e do potencial elétrico de membrana estabelecido (FIGURA 3) com diferentes substratos respiratórios e, ainda, pela capacidade de captação de Ca^{2+} do meio (FIGURA 4) que, sendo um processo eletroforético, depende do potencial elétrico de membrana (Nicholls and Akerman 1982).

O nível de expressão das NAD(P)H desidrogenases e da oxidase alternativa (AOX) são bastante variáveis entre as diferentes espécies e, dentro da espécie, pode variar em função do tecido (Millenaar and Lambers 2003, Rasmusson *et al.* 2004). Assim, foi importante determinar a atividade das NAD(P)H desidrogenases (FIGURA 1, TABELA 3) e ainda verificar que, com o tempo de cultivo foram selecionadas células com grande expressão da oxidase alternativa (FIGURA 2) na cadeia respiratória das mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*.

Utilizando-se estas preparações mitocondriais foi possível observar que o nitrito apresentou um efeito inibitório na respiração de mitocôndrias de *A. thaliana* (FIGURA 5) e a análise deste efeito mostrou que a inibição aumenta com a diminuição da concentração de oxigênio do meio (FIGURA 6), é potencializada quando apenas a COX está ativa e não ocorre quando apenas a AOX está funcional (FIGURAS 7 e 8). Estas características indicam que o NO seria o responsável pela inibição causada pelo nitrito na respiração de mitocôndrias de *A. thaliana*, já que é bem conhecido que o NO compete com o oxigênio para se ligar e inibir a COX (Brown and Cooper 1994, Cleeter *et al.* 1994) e que a AOX não é inibida por NO (Millar and Day 1996). Ainda, a inibição da respiração causada por nitrito foi revertida com a adição de um seqüestrador de NO (cPTIO). Estes resultados indicaram que NO foi sintetizado pela mitocôndria de *A. thaliana* através de uma atividade redutora de nítri to.

A atividade redutora de nitrito foi primeiramente observada em mitocôndrias de origem animal (Kozlov *et al.* 1999), onde o NO produzido foi detectado por espectrometria de ressonância paramagnética (EPR). Trabalho de nosso grupo pôde também detectar atividade mitocondrial redutora de nitrito em extratos foliares de *A. thaliana* incubados em condições aeróbicas, utilizando a técnica de EPR (Modolo *et al.* 2005). A produção de NO a partir de nitrito foi também determinada em algas, tabaco e em outras espécies vegetais medindo-se a emissão de NO na fase gasosa por quimioluminescência (Tischner *et al.* 2004, Planchet *et al.* 2005, Gupta *et al.* 2005). Estes autores também obtiveram evidências de que a mitocôndria seria a responsável por esta atividade redutora de nitrito, entretanto, neste caso, esta atividade somente foi observada na ausência de oxigênio. No presente trabalho, que utilizou eletrodo específico de NO, a atividade redutora de nitrito pela mitocôndria de *A. thaliana* foi também principalmente detectada em anaerobiose (FIGURA 10). Esta produção de NO foi dependente da concentração de nitrito (FIGURA 11) e da mitocôndria (FIGURA 13).

A atividade redutora de nitrito, observada em condições de anaerobiose, em mitocôndrias de origem animal (Kozlov *et al.* 1999) ou vegetal (Planchet *et al.* 2005, Stoimenova *et al.* 2007) tem sido atribuída à cadeia respiratória, especificamente ao complexo III (Koslov *et al.* 1999) ou à COX (Castello *et al.* 2006). Mas sabe-se também que o nitrito pode ser reduzido quimicamente na presença de um agente redutor ou por proteínas contendo grupamentos heme como a hemoglobina, mesmo em pH fisiológico (Kleinbongard *et al.* 2003; Jensen 2007). Nossos resultados mostram que a mitocôndria isolada de *A. thaliana* apresenta uma atividade redutora de nitrito que é parcialmente independente do transporte de elétrons da cadeia respiratória e favorecida em concentrações mais elevadas de nitrito (FIGURAS 13 e 14).

A produção de NO a partir de nitrito, que é observada nestas condições, deve ser favorecida pelo aumento transiente do estado de redução dos complexos da cadeia respiratória, resultante do decréscimo da concentração de oxigênio. Estes resultados sugerem

que os efeitos deletérios da anaerobiose, além da falta de oxigênio e conseqüente fornecimento de energia, estariam também relacionados ao favorecimento da produção de NO que pode atingir concentrações tóxicas para a célula. Esta situação pode, por exemplo, ocorrer em raízes crescendo em solos muito compactados e pouco aerados. Entretanto, em condições de melhor suprimento de oxigênio a atividade mitocondrial redutora de nitrito poderia contribuir para a produção de NO com função sinalizadora, estimulando o crescimento de raízes, uma atividade já demonstrada em milho (Gouvêa *et al.* 1997) e pepino (Pagnussat *et al.* 2002). Em mamíferos, a atividade redutora de nitrito tem sido considerada um importante mecanismo para a síntese de NO em condições de hipóxia. O NO assim produzido seria importante para regular o fluxo sanguíneo local e proteger o tecido contra os insultos isquêmicos. Realmente, a produção de NO a partir de nitrito já foi observada em tecido cardíaco enfartado (Zweier *et al.* 1995).

Recentemente foi demonstrado que, além do complexo III, as NADP(H) desidrogenases externas de mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, contribuem para a degradação de NO (Oliveira *et al.* 2008). Os ensaios realizados com mitocôndrias isoladas de *A. thaliana* demonstraram o mesmo comportamento, indicando um mecanismo de degradação de NO comum às mitocôndrias vegetais. Quando as mitocôndrias de *A. thaliana* foram expostas ao NO, a inibição provocada no consumo de oxigênio foi transiente e menor quando NADH e NADPH foram utilizados como substratos respiratórios, em relação aos outros substratos (FIGURA 15). Estes resultados indicaram que a degradação do NO estaria ocorrendo de forma mais rápida nas mitocôndrias energizadas com NAD(P)H. Realmente, quando a concentração de NO e O₂ foram simultaneamente acompanhadas, o NO gerado através da adição do doador GSNO foi degradado mais rapidamente e, conseqüentemente, provocou uma menor inibição no consumo de oxigênio, quando as mitocôndrias foram energizadas com NAD(P)H, em relação aos outros substratos respiratórios (FIGURA 16). Ainda, as análises dos efeitos do nitrito na respiração das mitocôndrias de *A. thaliana*

mostraram um efeito inibitório menor quando as mitocôndrias foram energizadas com NADH comparando-se com succinato (FIGURA 8). Conforme proposto por Oliveira e colaboradores (2008), a oxidação de NAD(P)H pelas desidrogenases externas gera ânion superóxido (O_2^-) que reage não enzimaticamente com NO formando peroxinitrito; esta reação consome NO, diminuindo seu efeito inibitório na COX, restaurando o consumo de oxigênio. Adicional evidência de que este mecanismo de degradação de NO estaria presente nas mitocôndrias de *A. thaliana* foi a observação de que, na presença de superóxido dismutase (SOD) a inibição provocada pelo nitrito no consumo de oxigênio foi potencializada (FIGURA 8). Neste caso, a remoção de O_2^- do meio pela SOD, preveniria, conseqüentemente, uma maior remoção de NO do meio, causando um efeito inibitório maior na COX e, assim, no consumo de oxigênio. O conjunto dos resultados, demonstrados anteriormente em mitocôndrias de batata (Oliveira et al. 2008) e observados no presente trabalho com mitocôndrias de *A. thaliana*, sugere que a aceleração da degradação de NO pelas NAD(P)H desidrogenases deva ser um mecanismo comum para prevenir os efeitos deletérios do NO na atividade respiratória da mitocôndria vegetal. Muitos estudos anteriores abordaram a potencial função das desidrogenases alternativas, por serem não-fosforilativas, em reduzir a produção de radicais livres. Entretanto, as evidências experimentais para esta atividade têm sido elusivas, e o papel destas enzimas, que tem sua expressão alterada em resposta a várias condições ambientais e a diversos tipos de estresses, tem sido uma questão não resolvida (Rasmusson *et al.* 2004). As observações de que estas enzimas contribuem para a degradação do NO pa recém revelar um papel previamente desconhecido destas enzimas no metabolismo do NO pelos vegetais.

A possibilidade de analisar os efeitos do NO na funcionalidade de mitocôndrias de *A. thaliana* com alta expressão da AOX permitiu analisar, adicionalmente, o papel das duas oxidases terminais da cadeia respiratória dos vegetais no metabolismo deste radical. Conforme mostrado na FIGURA 17, quando apenas a AOX está funcional, o NO não inibe a respiração, resultado também observado em resposta ao nitrito (FIGURA 7), confirmando a

conhecida insensibilidade da AOX ao NO (Millar and Day 1996). A possibilidade de acompanhar não apenas os efeitos do NO na respiração, mas também a concentração de NO do meio de reação permitiu demonstrar que, quando apenas a AOX estava ativa o NO adicionado ao meio praticamente não foi degradado (mitocôndrias energizadas com succinato), uma situação bastante oposta daquela em que apenas a COX estava funcional, onde se observou uma degradação proporcional à concentração de NO do meio (FIGURA 17) que deve ter resultado de sua reação com o ânion superóxido, cuja produção é favorecida quando a COX está inibida. Assim, a COX e a AOX atuam de maneira oposta no metabolismo do NO, pois enquanto a COX ao ser inibida por NO facilita sua degradação, a AOX é insensível ao NO e incapaz de degradá-lo.

O conjunto dos resultados aqui obtidos mostra que uma atividade mitocondrial redutora de nitrito foi caracterizada em mitocôndrias isoladas de *A. thaliana*. Em aerobiose, mesmo sob concentrações elevadas de nitrito, a quantidade de NO produzido por esta via é muito pequena e, portanto, não pôde ser detectada com eletrodo específico, sendo no entanto evidenciada através dos efeitos inibitórios provocados pelo nitrito na respiração mitocondrial, e corroborados pelos efeitos provocados com a adição direta do gás ou através de moléculas doadoras, como GSNO ou DEA-NONOato. Foi ainda demonstrado que a produção de NO na presença de oxigênio é também limitada devido à atividade de degradação das NAD(P)H desidrogenases, que é favorecida com a inibição da COX. Atuando de uma maneira diferente, a AOX permite aumentar a meia-vida do NO, sem que o suprimento de oxigênio seja interrompido, já que esta enzima não é inibida por NO. Pode-se assim propor que a atuação coordenada das NAD(P)H desidrogenases, da AOX e da COX controlam a homeostase do NO na célula e também a oxigenação do tecido. Por outro lado, quando o oxigênio do meio se esgota, o maior estado de redução da cadeia respiratória favorece a atividade mitocondrial redutora de nitrito, permitindo que o NO possa atingir concentrações mais elevadas e, provavelmente, tóxicas para a célula. A elevação na concentração de NO nestas condições

também é favorecida porque os mecanismos para sua degradação, dependentes de oxigênio , não estão operantes. Estas características da atividade mitocondrial redutora de nitrito aqui evidenciadas podem conciliar resultados divergentes da literatura, pois sugerem que esta é uma atividade que só ocorre em anaerobiose, quando se mede a emissão de NO por quimioluminescência (Planchet *et al.* 2005), enquanto que, quando se utiliza a técnica de EPR, esta atividade é detectada mesmo em aerobiose (Modolo *et al.* 2005). No caso do EPR, o NO produzido é sequestrado pelo captador de spin, que pode assim captar grandes quantidades de NO sem que este atinja concentrações elevadas no meio. Quando a técnica de quimioluminescência é utilizada para quantificar a emissão de NO (Planchet *et al.* 2005) bem como, quando eletrodo específico de NO é utilizado para esta finalidade (resultados do presente trabalho), quantidades substanciais de NO só podem ser detectadas na ausência de oxigênio. Entretanto, os efeitos inibitórios do nitrito no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias de *A. thaliana* sugerem fortemente que a atividade redutora de nitrito pode ocorrer na presença de oxigênio.

Finalmente, embora a produção de NO a partir de arginina tenha sido proposta ocorrer em mitocôndrias isoladas de origem animal (Haynes *et al.* 2003) e também sugerida ser uma atividade da mitocôndria vegetal (Guo and Crawford 2005), nenhum efeito da arginina na respiração mitocondrial foi observado, mesmo nas condições experimentais que têm sido utilizadas para detectar esta atividade em mitocôndrias de origem animal.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho evidenciam a importância da mitocôndria para a homeostase do NO na planta; este radical pode ser produzido por esta organela através de uma atividade redutora de nitrito. Na presença de oxigênio o nível de NO produzido resulta de uma ação coordenada entre as NAD(P)H desidrogenases e a COX, que aceleram a degradação do radical e, por outro lado a AOX que, não sendo inibida por NO, não favorece sua degradação. A combinação destas atividades resultaria numa produção controlada de NO, o que deve ser importante para sua atuação como sinalizador. Já em anaerobiose, a atividade redutora de nitrito é favorecida e o NO pode ser produzido nestas condições não apenas ao nível do complexo III ou pela COX, mas também pelo maior estado de redução da cadeia respiratória. Ainda, a produção de NO nestas condições é também favorecida pela inibição dos mecanismos de degradação, dependentes de oxigênio, podendo desta maneira atingir níveis tóxicos para o organismo.

7 - REFERÊNCIAS

- Amano F and Noda T (1995). Improved detection of nitric oxide radical (NO) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO, and Griess reagent. *FEBS Lett.* 368: 425-428
- Akerman KEO and Wikström MKF (1976). Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68: 191-197
- Alikulov ZA; L'vov; NP; Kretovich VL (1980). Nitrate and nitrite reductase activity of milk xanthine oxidase. *Biokhimiia* 45 (9): 1714-1718
- Arasimowicz M and Floryszak-Wieczorek J (2007). Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* 172: 876-887
- Barroso JB; Corpas FJ; Carreras A; Sandalio LM; Valderrama R; Palma J; Lupiáñez JÁ; del Río LA (1999). Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 274: 36729-36733
- Bethke PC; Badger MR; Jones RL (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16:332-341
- Borutaite V and Brown GC (1996). Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversibly inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem. J.* 315: 295-299
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brown GC and Borutaite V (2002). Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1440-1450
- Brown GC; Borutaite V (1999). Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp.* 66:17-25

- Brown GC and Cooper CE (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356:295-298
- Caro A and Puntarulo S (1999). Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radic. Res. Suppl.* S205-12
- Cassina A and Radi R (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 328(2):309-16
- Castello P; David P; McClure T; Crook Z and Poyton R (2006). Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab.* 3:277-287
- Chandok MR; Ytterberg AJ; van Wijk KJ and Klessig DF (2003). The pathogen induced nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell.* 113:469-482
- Chen Y; Chen C; Yeh A; Liu X; Zweier JL (2006). Direct and indirect roles of cytochrome *b* in the mediation of superoxide generation and NO catabolism by mitochondrial succinate-cytochrome *c* reductase. *J Biol Chem* 291: 13159-13168
- Coffey MJ; Natarajan R; Chumley PH; Coles B; Thimmalapura PR; Nowell M; Kuhn H; Lewis MJ; Freeman BA; O'Donnell VB (2001). Catalytic consumption of nitric oxide by 12/15- lipxygenase: Inhibition of monocyte soluble guanylate cyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8006-8011
- Cooper CE (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 290 -309
- Cosby K; *et al.* (2003). Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat. Med.* 9:1498-1505
- Cleeter MW; *et al.* (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 GC; Feelisch M; 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(13):7631-6
- Crawford NM (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. J. Exp. Bot. 57:471-478
- Crawford NM (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. J Exp Bot 57:471-478
- Neill SJ; Desikan R; Hancock JT (2003). Nitric oxide signalling in plants. New Phytologist 159:11-35
- del Rio LA; Corpas FJ; Barroso JB (2004). Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. Phytochemistry 65:783-792
- Delledonne M (2005). NO news is good news for plants. Curr Opin Plant Biol 8:390 -396
- Delledonne M; Zeier J; Marocco A; Lamb C (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. Proc Natl Acad Sci USA 98:13454-13459
- Delledonne M; Xia Y; Dixon RA; Lamb C (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature 394:585-588
- Desikan R; Griffiths R; Hancock J; Neill S (2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 99:16314-16318
- Durner J; Wendehenne D; Klessig DF (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proc Natl Acad Sci USA 95:10328-10333
- Foissner I; Wendehenne D; Langebartels C; Durner J (2000). In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. Plant J 23:817-824
- Gadelha FR; Thomson L; Fagian MM; Costa AD; Radi R; Vercesi AE (1997). Ca^{2+} independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is

- mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. Arch Biochem Biophys. 345(2):243-50
- Garces H; Durzan D; Pedroso MC (2001). Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Botany* 87:567-574
- Garcia-Mata C; Lamattina L (2003). Absciscic acid, nitric oxide and stomatal closure - is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci* 8:20-26
- Gardner PR (2005). Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *J Inorg Biochem* 99: 247 -266
- Gaston B (1999). Nitric oxide and thiol groups. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 323-333
- Gladwin MT; Schechter AN; Kim-Shapiro DB; Patel RP; Hogg N; Shiva S; Cannon RO; Kelm M; Wink DA; Espey GE *et al.* (2005). The emerging biology of the nitrite anion. *Nat. Chem. Biol.* 1(6): 308-314
- Gladwin MT; Raat NJH; Shiva S; Dezfulian C; Hogg N; Kim-Shapiro DB and Patel RP (2006). Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection and vasodilatation. *Am. J. Physiol.* 291: H2026-H2035
- Gouvêa CM; Souza CP; Magalhães ACN e Salgado I. (1997). NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* 21:183-187
- Guo FQ; Crawford NM (2005). *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 17:3436-3450
- Guo FQ; Okamoto M; Crawford NM (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302:100-103
- Gupta KJ; Stoimenova M; Kaiser WM (2005). In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *J Exp Bot* 56:2601-2609
- Hagen T; *et al* (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: Effect on HIF1 alpha. *Science* 302:1975-1978

- Haynes V; Elfering SL; Squires RJ; Traaseth N; Sohen J; Ettl A and Giulivi C (2003). Mitochondrial nitric oxide synthase: Role in pathophysiology. *IUBMB Life* 55:599 -603
- He Y; Tang RH; Hao Y; Stevens RD; Cook CW; Ahn SM; Jing L; Yang Z; Chen L; Guo F; Fiorani F; Jackson RB; Crawford NM; Pei ZM (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305:1968-1971
- Henry YA; Ducastel B; 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
- Hughes MN (1999). Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta* 1411:263-272
- Hunter CJ; *et al* (2004). Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NOdependent selective pulmonary vasodilator. *Nat. Med.* 10:1122-1127
- Huie RE; Padmaja S (1993). The reaction of NO with O_2^- . *Free Radical Res. Com.* 18:195-199
- Ignarro LJ; Buga GM; Wood KS; Byrns RE; Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265-9269
- Keefer LK; Nims RW; Davies KM *et al.* (1996). “NONOates” (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: Convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* 268:281-293
- Kharitonov VG; Sundquist AR; Sharma VS (1994). Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solutions. *J Biol Chem* 269:5881-5883
- Kleinbongard P; Dejam A; Lauer T; Rassaf T; Schindler A; Picker O; Scheeren T; Gödecke A; Schrader J; Schulz R *et al.* (2003). Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* 35:790-796

- Kozlov AV; Staniek K; Nohl H (1999). Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 454:127-130
- Lamattina L; Garcia-Mata C; Graziano M; Pagnussat G (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 54:109 -136
- Lamotte O; Gould K; Lecourieux D; Sequeira-Legrand A; Lebrun-Garcia A; Durner J; Pugin A; Wendehenne D (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* 135:516-529
- Lea US; Ten Hoopen F; Provan F; Kaiser WM; Meyer C; Lillo C (2004). Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta* 219:59-65
- Lenaz G; Fato R; Genova ML; Bergamini C; Bianchi C; Biondi A (2006). Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta* 1757:1406 -1420
- Li H; *et al.* (2004). Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J. Biol. Chem.* 279:16939 -16946
- Lindermayer C; Saalbach G and Durner J (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137:921-930
- Maragos CM; Morley D; Wink DA; *et al.* (1991). Complexes of ·NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J. Med. Chem.* 34:3242-3247
- Martins IS; Carnieri EGS and Vercesi AE (1993). Mechanisms of Ca²⁺ and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. *Current Topics in Plant Physiol* 1:211 - 217
- Martins IS; Vercesi AE (1985). Some characteristics of Ca²⁺ transport in plant mitochondria. *Biochem Biophys Res Comm* 129:943-948
- Mathews WR and Kerr SW (1993). Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *Journa. Pharmacol. Exp. Ther.* , 267, 1529-1537

- Mayer B; and Hemmens B (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* 22: 477-481
- Millar AH and Day DA (1996). Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Letter* 398:155 -163
- Millenaar FF and Lambers H (2003). The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function. *Plant Biology* 5:2-15
- Modolo LV; Augusto O; Almeida IMG; Pinto-Maglio CAF; Oliveira HC; Seligman K; Salgado I (2006). Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* 171: 34-40
- Modolo LV; Augusto O; Almeida IM; Magalhaes JR; 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
- Modolo LV; Cunha FQ; Braga MR; Salgado I (2002). Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol.* 130:1288 -1297
- Moller IM (2001). Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:561-591
- Morot-Gaudry-Talarmain Y; Rockel P; Moureaux T; Quillere I; Leydecker MT; Kaiser WM; Morot-Gaudry JF (2004). Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* 215:708 -715
- Moreau F; Romani R (1982). Preparation of avocado mitochondria using self-generated percoll density gradient and changes in buoyant density during ripening. *Plant Physiol* 70: 1380-1384

- Murashige T; Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15:473-479
- Murgia I; Tarantino D; Vannini C; Bracale M; Carravieri S; Soave C (2004). *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide -induced cell death. *Plant J* 38:940-953
- Mülsch A; Mordvintcev PI; Vanin AF and Busse R (1993). Formation and release of dinitrosyl iron complexes by endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1303-1308
- Naseem KM (2005). The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 26:33-65
- Navarre D; Wendenhenne D; Durner J; Noad R and Klessig DF (2000). Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol.* 122: 573 -582
- Neill S; Bright J; Desikan R; Hancock J; Harrison J; Wilson I (2007). Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany.* 59(1):25-35
- Neill SJ; Desikan R; Hancock JT (2003). Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* 159:11-35
- Nicholls D and Akerman K (1982). Mitochondrial calcium transport. Biochim Biophys Acta. 683:57-88
- Nicholls DG (1978). The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. Biochem J. 176(2): 463-74
- Nisoli E; Carruba NO (2006). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci* 119: 2855-2862
- Nohl H; *et al.* (2000). Mitochondria recycle nitrite back to the bio regulator nitric monoxide. *Acta Biochim. Pol.* 47:913–921

- Oliveira HC; Wulff A; Saviani EE and Salgado I (2008). Nitric oxide degradation by potato tuber mitochondria: evidence for the involvement of external NAD(P)H dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* (in press)
- Pagnussat G; Simontachi M; Puntarulo S and Lamattina L (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129:954-956
- Perazzolli M; Dominici P; Romero-Puertas MC; Zago E; Zeier Z; Sonoda M; Lamb C and Delledonne M (2004). *Arabidopsis* non-symbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* 16:2785-2794
- Planchet E; Gupta KJ; Sonoda M; Kaiser WM (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
- Poderoso JJ; Carreras MC; Lisdero C; Riobó N; Schöpfer F; Boveris A (1996). Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328:85-92
- Poderoso JJ; Lisdero C; Schöpfer F; Riobó N; Carreras MC; Cadenas E; Boveris A (1999). The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem* 274:37709-37716
- Radi R; Cassina A; Hodara R; Quijano C and Castro L (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 33:1451-1464
- Rasmusson AG; Soole KL and Elthon TE (2004). Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol* 55: 23-39
- Reiter CD; Teng RJ and Beckman JS (2000). Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 275:32460-32466
- Rasmusson AG; Soole KL; Elthon TE (2004). Alternative NAD(P)H Dehydrogenases of Plant Mitochondria. *Annual Review Plant Biol.* 55:23-39

- Reed KC; Bygrave FL (1975). A kinetic study of mitochondrial calcium transport. *Eur J Biochem* 55:497-504
- Reutov VP; Sorokina EG (1998). NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry (Mosc.)* 63 (7): 874-884
- Ribeiro EA; Cunha FQ; Tamashiro MSC; and Martins IS (1999). Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* 445: 283-286
- Rockel P; Strube F; Rockel A; Wildt J; Kaiser WM (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* 53:103-110
- Salgado I; Saviani EE; Modolo LV; Braga MR (2004). Nitric oxide signaling in plant defence responses to pathogen attack. In: Hemantaranjan A (ed) *Advances in plant physiology*, vol 7. Scientific Publishers, Jodhpur, India, pp 117-137
- Saviani EE; Silva Jr A; Martins IS (1998). Role of F₁F₀-ATP synthase and uncoupling protein in mitochondrial respiratory uncoupling of ripened avocado fruits. *Plant Physiol Biochem* 36(8):575-582
- Stamler JS; Singel DJ; Loscalzo J (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox -activated forms. *Science* 258:1898-1902
- Stohr C and Stremlau S (2006). Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J. Exp. Bot.* 57:463-47
- Palmer RM; Ferrige AG; Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526
- Planchet E; Jagadis Gupta K; Sonoda M; Kaiser WM (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; Hodara R; Quijano C; Castro L (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 33:1451-1464

- Salgado I; Modolo LV; Magalhães JR; Tamashiro WMSC; Saviani EE (2006). Production of nitric oxide in plants by nitric oxide synthase enzymes. In: Singh RP, Jaiwal PK (eds) Biotechnological approaches to improve nitrogen use efficiency in plants. Studium Press, Houston, pp 87-102
- Saviani EE; Orsi CH; Oliveira JF; Pinto-Maglio CA; Salgado I (2002). Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Lett* 510:136-140
- Scarpa A and Azzone G (1970). The mechanism of ion translocation in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 12:328-335
- Stohr C; Strube F; Marx G; Ullrich WR; Rockel P (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212:835-841
- Stuehr DJ (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339-359
- Tada Y; Mori T; Shinogi T; Yao N; Takahashi S; Bet suyaku S; Sakamoto M; Park P; Nakayashiki H; Tosa Y; Mayama S (2004). Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol Plant Microbe Interact* 17:245-253
- Tischner R; Planchet E; Kaiser WM (2004). Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett* 576:151-155
- Valderrama; Corpas FJ; Carreras A; Fernández-Ocaña A; Chaki M; Luque F; Gómez-Rodríguez MV; Colmenero-Varea P; Del Río LA; Barroso JB. (2007). Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* (3):453-61
- Vanin AF; Stukan RA and Manukhina EB (1996). Physical properties of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in relation with their vasodilator activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1295:5-12

Vercesi AE; Martins IS; Silva MAP; Leite HMF; Cuccovia IM; Chaimovich H (1995).
PUMPing plants. *Nature* 375:24

Viveira HL; Belzacq AS; Haouzi D; Bernasola F; Cehen I; Jacotot E; Ferri KF; El Hamel;
Bartle LM; Melino G; Brenner C; Goldmacher V. and Kroemer G. (2001). The adenine
nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal.
Oncogene. 20: 4305-4316

Walters CL; Casselden RJ; Taylor AM (1967). Nitrite metabolism by skeletal muscle
mitochondria in relation to haem pigments. *Biochim. Biophys. Acta* 143:310–318

Webb A; *et al* (2004). Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against
myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:13683-13688

Yamamoto-Katou A; Katou S; Yoshioka H; Doke N; and Kawakita K (2006). Nitrate
reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana
benthiana*. *Plant Cell Physiology*. 47:726-735

Yamamoto A; Katou S; Yoshioka H; Doke N; Kawakita K (2004). Involvement of nitric
oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension
culture. *J Gen Plant Pathol* 70:85-92

Yamasaki H; Shimoji H; Ohshiro Y and Sakihama Y (2001). Inhibitory effects of nitric oxide
on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric oxide* 5(3):261-270

Yamasaki H; 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

Zemojtel T; Frohlich A; Palmieri MC; Kolanczyk M; Mikula I; Wyrwicz LS; Mundlos S;
Vingron M; Martasek P; Durner J (2006). Plant nitric oxide synthase: a never-ending
story? *Trends in Plant Science* 00:000-000

- Zhang C; Czymbek KJ; Shapiro AD (2003). Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the Arabidopsis hypersensitive response. Mol Plant Microbe Interact 16:962-972
- Zeidler D; Zahring U; Gerber I; Dubery I; Hartung T; Bors W; Hutzler P; Durner J (2004). Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc Natl Acad Sci USA 101:15811-15816
- Zweier JL; *et al.* (1995). Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. Nat. Med. 1 (8):804-809