

FLUXO MOLECULAR E IÔNICO DAS PROTEÍNAS DE TRANSPORTE EM MEMBRANAS

Carlos Moacir Colodete

Mestre em Ecologia de Ecossistemas/Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia-LMAB/UVV/ES

carloscolodete@gmail.com

RESUMO

Serão discutidos nesta revisão, fluxo molecular e iônico das proteínas de transporte em membranas. As proteínas de transporte englobam três categorias: canais, carreadores (transportadores) e bombas. Além disso, são propostos modelos inéditos das três classes de proteínas transportadoras de membrana (Figura 1) e um motor de rotação da V-ATPase (Figura 3). É relatado uma diversidade de proteínas, que auxiliam na manutenção do gradiente iônico, entre as quais a H⁺-ATPase tem especial destaque. O transporte através de uma membrana biológica é energizado por um sistema de transporte ativo primário, constituídos essencialmente pelas bombas de H⁺, que nas plantas incluem as H⁺-ATPases do tipo P e V acopladas à hidrólise de ATP e uma H⁺-PPase vacuolar. Este transporte de H⁺ gera um gradiente iônico e um potencial eletroquímico. Muitos outros íons e substratos orgânicos podem, então, ser transportados por uma variedade de proteínas de transporte ativo secundário. É corroborado neste trabalho e por outros grupos de pesquisadores, que nas plantas, em diversas condições fisiológicas e de estresse, o PP_i pode assumir o papel do ATP, atuando como doador de energia metabólica da célula, sendo sua principal função é transportar H⁺ para o lúmen, criando uma força elétron-motriz que impulsiona o transporte secundário de íons e compostos orgânicos. Portanto, a H⁺-PPase é funcional na energização dos sistemas de transporte secundários da membrana vacuolar, atuando também no controle da homeostase citoplasmática, em sincronismo com a V-ATPase de tonoplasto e com a H⁺-ATPase de plasmalema.

Palavras-chave: H⁺-ATPases do tipo P, H⁺-ATPases do tipo V, H⁺-PPase

ABSTRACT

In this review, the molecular and ionic flow on transport proteins in membranes is discussed. Transport proteins comprise three categories: channels, carriers and pumps. Furthermore, new models are proposed the three classes of membrane transport proteins (Figure 1) and a motor rotation V-ATPase (Figure 3). It is reported a variety of proteins, which help in maintaining ion gradients, including the H⁺-ATPase has special prominence. The transport across a biological membrane is energized by a primary active transport, consisting essentially of H⁺ pumps, which plants include H⁺-ATPase type P and V coupled to hydrolysis of ATP and an H⁺-PPase vacuolar. This transport generates an H⁺ ion gradient and electrochemical potential. Many other ions and organic substrates can then be transported by a variety of secondary active transport proteins. It is corroborated this work and by other research groups, in plants, under various physiological and stress conditions, PP_i can assume the role of ATP, acting as a donor metabolic energy of the cell, and its main function is to transport H⁺ into the lumen, creating a driving force electron that drives the secondary transport of ions and organic compounds. Therefore, the H⁺-PPase is functional in energizing the vacuolar membrane secondary transport systems, controlling the cytoplasm homeostasis in synchronism with V-ATPase and the tonoplast H⁺-ATPase.

Keywords: H⁺-ATPases type P, H⁺-ATPases type V, H⁺-PPase

1. INTRODUÇÃO

O interior de uma célula vegetal é separado da parede e do ambiente por uma membrana plasmática, cuja espessura é de apenas duas camadas de moléculas de lipídeos. Essa bicamada lipídica separa um ambiente interno relativamente constante do entorno bastante variável. Além de formar uma barreira hidrofóbica à difusão, ela tem a função de facilitar e regular constantemente a passagem de íons e moléculas selecionados para dentro e para fora, à medida que a célula absorve nutrientes, exporta restos e regula sua pressão de turgidez. A membrana plasmática também transmite informações sobre o ambiente físico, com sinais moleculares enviados de outras células e sobre a presença de patógenos invasores. Constantemente os processos de transdução de sinais são mediados por mudanças no fluxo iônico. Além disso, a extensão com o qual uma membrana permite ou restringe o movimento de uma substância é denominada permeabilidade de membrana. A permeabilidade depende das propriedades químicas do soluto em questão e da composição lipídica da membrana, assim como das **proteínas de membrana** que facilitam o transporte de substâncias.

2. REVISÃO

Tanto membranas biológicas quanto artificiais, apresentam permeabilidades semelhantes para moléculas não-polares e moléculas polares pequenas (REA *et al.*, 2000). Por outro lado, as membranas biológicas são muito mais permeáveis a íons, a algumas moléculas polares grandes, como carboidratos (açúcares). A razão para isto é que ao contrário das bicamadas artificiais, as membranas biológicas contêm proteínas de transporte que facilitam a passagem de íons e de moléculas polares específicos (SANDERS & BETHKE, 2000).

O termo geral proteínas de transporte, engloba três categorias principais: **canais**, **carreadoras** (transportadores) e **bombas** (Figura 1).

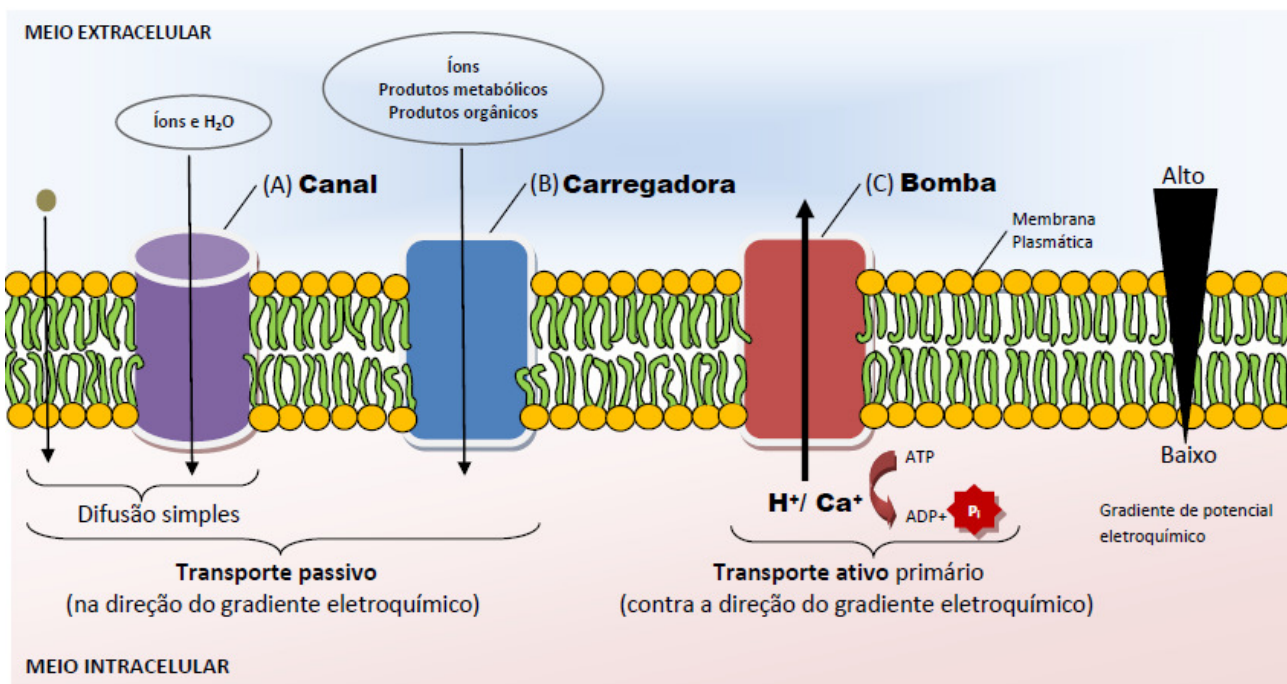


Figura 1. Três classes de proteínas transportadoras de membrana: (A) **canais**, (B) **carreadoras** e (C) **bombas**. Proteínas canais e carreadoras podem mediar o transporte passivo de soluto pela membrana (por difusão simples ou difusão facilitada) a favor do gradiente de soluto e potencial eletroquímico. (A) Proteínas canais agem como poros nas membranas e sua especificidade é determinada primeiramente pelas propriedades biofísicas no canal. (B) Proteínas carreadoras se ligam na molécula a ser transportada em um lado da membrana e depois a liberam do outro lado. (C) O transporte ativo primário é realizado pelas bombas e usam energia diretamente, usualmente da hidrólise do ATP, para bombear os solutos contra o seu gradiente ou potencial eletroquímico. Modificado (TAIZ & ZEIGER, 2010).

2.1. Transportadores primários

Para realizar transporte ativo primário, um carregador precisa acoplar o transporte do soluto contra o gradiente eletroquímico com outro evento que libere energia, de modo que a mudança global na energia livre seja negativa (SANDERS & BETHKE, 2000). Este transporte é diretamente acoplado a uma fonte de energia diferente, como a hidrólise de ATP, uma reação de oxidação-redução, ou a absorção de luz por uma proteína carregadora (REA *et al.*, 2000).

As proteínas de membrana que catalisam o transporte ativo primário são chamadas de bombas (Figura 1C), e na sua maioria transportam íons, como H^+ ou Ca^{2+} . Entretanto, as bombas que pertencem à família de transportadores do tipo cassetes ligadores de ATP, podem transportar grandes moléculas orgânicas. As bombas iônicas (Figura 1C) podem ser ainda caracterizadas como **eletrogênicas** ou **eltroneutras**. Em geral, o transporte eletrogênico refere-se ao transporte de íons envolvendo o movimento líquido de cargas através da membrana. Por outro lado, o transporte eltroneutro, não envolve qualquer movimento líquido de cargas. Além disso, outros mecanismos são necessários para governar a absorção ativa da maioria dos nutrientes minerais, como NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{2-} a absorção de aminoácidos, peptídeos e sacarose e o efluxo de Na^+ , que em altas concentrações é tóxico às células. A outra maneira importante pela qual os solutos podem ser ativamente transportados através das membranas, contra seus gradientes de potenciais eletroquímicos, é acoplando o transporte de um soluto contra o seu gradiente com o transporte de outro soluto a favor do seu gradiente. Esse tipo de co-transporte mediado por carregadores (Figura 1B) é denominado transporte ativo secundário e é governado indiretamente por bombas (Figura 1C) (SANDERS & BETHKE, 2000; REA *et al.*, 2000).

Na membrana plasmática de plantas, fungos e bactérias, assim como nos tonoplastos vegetais e outras endomembranas vegetais e animais, o H^+ é o principal íon bombeado eletrogenicamente através desta membrana (RAMOS *et al.*, 2011).

A H^+ -ATPase da membrana plasmática gera um gradiente de potencial eletroquímico de H^+ através das membranas plasmáticas, enquanto a H^+ -ATPase vacuolar e a H^+ -Pirofosfatase (H^+ -PPase) bombeiam prótons eletrogenicamente para dentro do lume do vacúolo e para a cisterna do complexo de Golgi, respectivamente (SANDERS & BETHKE, 2000; GAXIOLA *et al.*, 2013).

2.2. Transportadores secundários

Os prótons são excluídos do citosol por H^+ -ATPase eletrogênicas que operam na membrana plasmática e na membrana do vacúolo. Consequentemente, um potencial de membrana e um gradiente de pH são criados às custas da hidrólise de ATP. Esse gradiente de potencial eletroquímico de H^+ , representa energia livre armazenada na forma de um gradiente de H^+ , a força motriz de prótons (PMF, *proton motive force*), representa a energia livre armazenada na forma de um gradiente de H^+ .

A força motriz de prótons gerada pelo transporte eletrogênico de H^+ é usada no transporte ativo secundário para governar o transporte de muitas outras substâncias contra seus gradientes de potencial eletroquímico (RAMOS *et al.*, 2011). Além disso o transporte secundário pode envolver ligação de um substrato (açúcar) e de um íon (especialmente H^+) a uma proteína carregadora e uma mudança na conformação desta proteína (GAXIOLA *et al.*, 2013).

Existem três tipos de transportes secundários: **simporte**, **antiporte** e **uniporte**. No simporte (a proteína envolvida é chamada de transportador do tipo simporte), porque as duas substâncias estão se movendo na mesma direção através da membrana. No antiporte (facilitado por uma proteína denominada transportador do tipo antiporte) refere-se ao transporte acoplado, no qual ocorre o movimento de um soluto a favor do gradiente de prótons, e este movimento impulsiona o transporte ativo de outro soluto na direção oposta do gradiente. No uniporte, apenas um soluto é transportado e ocorre a favor do gradiente eletroquímico. Nos dois primeiros exemplos de transporte secundário, o íon ou soluto transportado simultaneamente com os prótons está se movendo contra seu gradiente de potencial eletroquímico, de modo que se trata de transporte ativo. A energia que governa esse transporte é proporcionada pela força-motriz de prótons, em vez de diretamente pela hidrólise de ATP. Já o terceiro denominado uniporte é mediado pelos canais e certos transportadores a favor do gradiente de potencial elétrico (SANDERS & BETHKE, 2000; RAMOS *et al.*, 2011).

Além das proteínas que transportam íons e outros solutos, existem sistemas ou canais seletivos que mediam o transporte de água, são os canais de água ou aquaporinas (MAUREL, 1997). Uma vez que a água difunde-se mais rapidamente através desses canais que pela dupla camada lipídica, as aquaporinas facilitam o movimento de água para dentro e fora das células vegetais (TYERMAN *et al.*, 1999). A expressão e atividade das aquaporinas parecem ser possivelmente reguladas por fosforilação protéica, em resposta à disponibilidade de água (TYERMAN *et al.*, 2002). Elas também são reguladas por pH, concentração de cálcio, heteromerização e espécies reativas de oxigênio (LUU & MAUREL, 2005).

Os principais sistemas de transporte de prótons que operam nas células vegetais são as H⁺-ATPases do tipo P (localizada na membrana plasmática), H⁺-ATPases do tipo V (localizadas no tonoplasto) ambos responsáveis pela catálise da hidrólise de ATP e as H⁺-PPases (localizadas também no tonoplasto) funcionando como bomba de prótons acoplada a hidrólise de PP_i (SANDERS & BETHKE, 2000; GAXIOLA *et al.*, 2013).

2.3. H⁺-ATPases do tipo P

A H⁺-ATPase presente na membrana plasmática (H⁺-ATPases do tipo P) desempenham a função de transportar íons e moléculas por meio de transporte ativo, através de gradiente de pH e potencial elétrico. Esta enzima utiliza ATP como substrato para bombear prótons através da membrana plasmática para o apoplasto (MORSOMME & BOUTRY, 2000).

Em plantas também participam de outras funções importantes para o crescimento, tais como: tolerância ao estresse salino, regulação do pH intracelular e expansão celular e são reguladas pela concentração de substrato (ATP), pH, temperatura e outros fatores (SZE *et al.*, 1999). Além disso, moléculas de H⁺-ATPases podem ser reversivelmente ativadas ou desativadas por sinais específicos, como luz, hormônios, ataque de patógenos e similares. Este tipo de regulação é mediado por um domínio especializado, auto-inibitório, da região C-terminal da cadeia polipeptídica, o qual age como uma válvula regulando a atividade da bomba de prótons (CRONIN *et al.*, 2002; OKOROKOVA-FAÇANHA *et al.*, 2002). As ATPases de membrana plasmática são inibidas por ortovanadato (H₂VO₄⁻) que compete com o fosfato (SZE *et al.*, 1999) e por complexos de fluoreto de alumínio (FAÇANHA & DE MEIS, 1995).

As ATPases do tipo P podem ser encontradas em todos os tipos de células vegetais, em diferentes quantidades de acordo com o tecido. Em geral, os tecidos especializados em intenso transporte ativo e acúmulo de solutos são os mais abundantes nesta bomba. O floema, um tecido especializado para transporte de longa distância de uma grande parte de componentes orgânicos, contém grande concentração de H⁺-ATPases do tipo P (PALMGREN, 2001). ZHAO *et al.*, (2000) verificaram que a H⁺-ATPase do tipo P é importante para o carregamento de sacarose e outros fotoassimilados no floema. Praticamente todos os hormônios de plantas interagem com a bomba de prótons de membrana plasmática (BRUMMEL & HALL, 1987).

PENG *et al.*, (2003) verificaram que no amadurecimento de frutos de maçã (*Pyrus malus*), o ácido abscísico ativou fortemente a H⁺-ATPase do tipo P. Foi visto para frutos de mamoeiro (*Carica papaya*), que o pico de etileno parece sinalizar para uma diminuição na atividade da enzima (AZEVEDO *et al.*, 2008).

As bombas de prótons têm sido relatadas por estarem envolvidas em diversos processos no amadurecimento de frutos. HEYES *et al.*, (1997) verificaram que a bomba de prótons de membrana plasmática tinha sua atividade diminuída durante o início do amadurecimento e com posterior aumento na fase final, até a senescência, em pepino (*Cucumis sativus* L.), sugerindo que esta bomba de prótons contribui para o amolecimento destes frutos através da diminuição do pH apoplástico. DOMINGOS & RUBER, (1998) também relatam variações no pH do apoplasto para frutos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) durante o processo de amadurecimento, eles sugerem que a diminuição no pH do apoplasto seja responsável pela degradação de polímeros e ativação de hidrólises alterando a textura do fruto. Afetando o transporte de açúcares e ácidos durante o amadurecimento de uva (*Vitis vinifera* L.), a homeostase do pH e o transporte de solutos em células vegetais (ROBINSON & DAVIES, 2000; ZANDONADI *et al.*, 2007). MILNER *et al.*, (1995) verificaram um aumento na atividade das bombas de prótons de tonoplasto no início da maturidade de tomate. Este aumento foi seguido por uma redução na atividade destas enzimas. Já para frutos não climatéricos como uva (*Vitis vinifera* L.), morango (*Fragaria vesca* L.) e maçã (*Pyrus malus*), a atividade das bombas de prótons parece aumentar com o processo de amadurecimento destes frutos (TERRIER *et al.*, 2001). As H⁺-ATPases do tipo P são constituídas por uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 100 kDa podendo formar dímeros em conformação homodimérica ativa. A proteína tem 10 domínios

transmembranares e uma alça hidrofílica contendo a região de ligação do ATP (Figura 2) que atravessam a membrana, fazendo com que ela dê voltas através da membrana (SZE *et al.*, 1999; AMBESI *et al.*, 2000). Os domínios C (carboxílico) e N (amino) – terminais estão voltados para face do citoplasma. A função específica da região amino terminal ainda é desconhecida, mas a região C-terminal tem uma função regulatória, constituindo um domínio auto-inibitório (PALMGREN *et al.*, 2001). Modelos de topologia da H⁺-ATPase mostraram a presença de 8 a 12 domínios na transmembrana (MORSOMME & BOUTRY, 2000). Baseado na análise de hidropatia e dados experimentais localizando os domínios amino e carboxi terminais na face citoplasmática da membrana, um modelo com 10 segmentos transmembranais (M1-M10) é mais aceito para esta enzima (Figura 2).

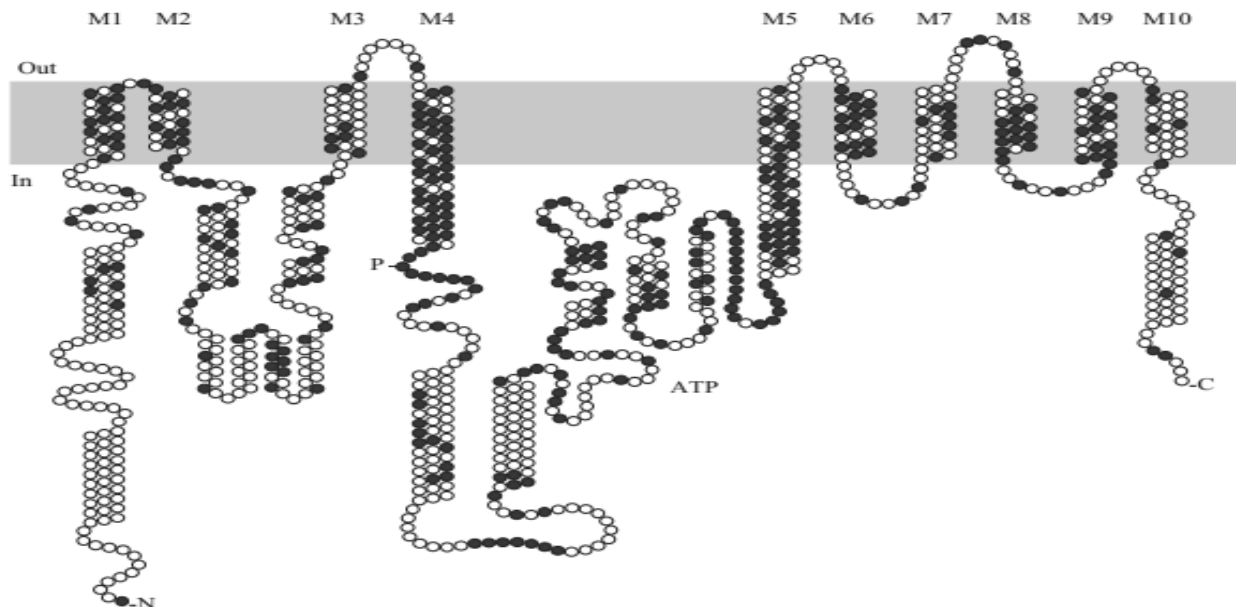


Figura 2. Modelo de H⁺-ATPase de membrana plasmática de fungo. M1-M10, segmentos transmembranais; P, sítio de fosforilação; ATP, sítio de ligação do ATP; resíduos em negrito são comuns em vários gêneros e espécies de fungos. Fonte (AMBESI *et al.*, 2000).

2.4. H⁺-ATPases do tipo V

O vacúolo é a maior organela da maioria das células vegetais, podendo compreender até 90% do espaço intracelular, contendo a maior fração de solutos celulares (TAIZ & ZEIGER, 2010). Entretanto uma vez que as plantas aumentam de tamanho, principalmente pela absorção de água pelos grandes vacúolos centrais, a pressão osmótica do vacúolo precisa ser mantida suficientemente alta para que a água do citoplasma penetre nele. O tonoplasto regula o trânsito de íons produtos metabólicos entre o citosol e o vacúolo, da mesma forma que a membrana plasmática regula a absorção pela célula.

A H⁺-ATPase vacuolar também chamada de H⁺-ATPase do tipo V (V-ATPase) é responsável por transportar solutos para o interior do vacúolo (MAESHIMA *et al.*, 1994; 2000). Nos compartimentos intracelulares, regula o pH de muitas organelas, incluindo lisossomas, endossomas e complexos de Golgi (GAXIOLA *et al.*, 2013).

As H⁺-ATPases vacuolares são bombas eletrogênicas, e sua grande função é bombear prótons para dentro do vacúolo, gerando uma força-motriz de prótons através do tonoplasto. O bombeamento eletrogênico de prótons explica o fato de o vacúolo ser tipicamente 20 a 30 mV mais positivo que o citoplasma, embora ele ainda seja negativo em relação ao meio externo. Para manter a neutralidade elétrica global, ânions como Cl⁻ e malato²⁻ são transportados do citoplasma para dentro do vacúolo via canais na membrana (BARKLA & PANTOJA, 1996). Sem o movimento simultâneo de ânions junto com os prótons bombeados, o acúmulo de cargas através do tonoplasto tornaria energeticamente impossível o bombeamento adicional de prótons. A manutenção da neutralidade elétrica geral pelo transporte de ânions possibilita à H⁺-ATPase do tipo V gerar um grande gradiente de concentração (pH) de prótons através do tonoplasto. Esse gradiente explica o fato de

o pH vacuolar ser tipicamente cerca de 5,5 (Figura 3), ao passo que o pH citoplasmático é de 7,5 (Figura 3). Enquanto o componente elétrico da força-motriz de prótons governa a absorção de ânions pelo vacúolo, o gradiente de potencial eletroquímico para H^+ é diferenciado para governar a absorção de cátions e açúcares pelo vacúolo por sistemas de transporte secundário (RAMOS *et al.*, 2011).

A H^+ -ATPase do tipo V difere estrutural e funcionalmente da H^+ -ATPase do tipo P (KLUGE *et al.*, 2003). As H^+ -ATPase do tipo V são estimuladas por ânions (por exemplo, cloreto) e insensíveis ao vanadato, inibidas pelo antibiótico bafilomicina A, que previne a formação de um componente de potencial químico (ΔpH) vacuolar, assim como por altas concentrações de nitrato, sendo que nenhum deles inibe as H^+ -ATPase do tipo P (KLUGE *et al.*, 2003).

A H^+ -ATPase do tipo V é uma proteína ubiquamente distribuída em todas as células de eucariontes e consistindo em dois domínios: um catalítico e citoplasmático (complexo periférico) (V_1), com 640 kDa e outro integral de membrana formando um canal (V_0) com 240 kDa. Juntos, esses domínios formam um complexo com aproximadamente 900 kDa (WAGNER *et al.*, 2004; JEFFERIES *et al.*, 2008) (Figura 3). O domínio V_1 é composto por oito subunidades (A-H), sendo o responsável pela hidrólise de ATP (Figura 3). O domínio V_0 é composto por seis unidades (a, c, c', c'', d, e) sendo estas responsáveis pela translocação do H^+ através da membrana (Figura 3) (JEFFERIES *et al.*, 2008). A H^+ -ATPase opera por um mecanismo rotatório, no qual a hidrólise de ATP no domínio V_1 e V_0 , o que permite a extrusão do H^+ pelo domínio (V_0) (HIRATA *et al.*, 2003; JEFFERIES *et al.*, 2008).

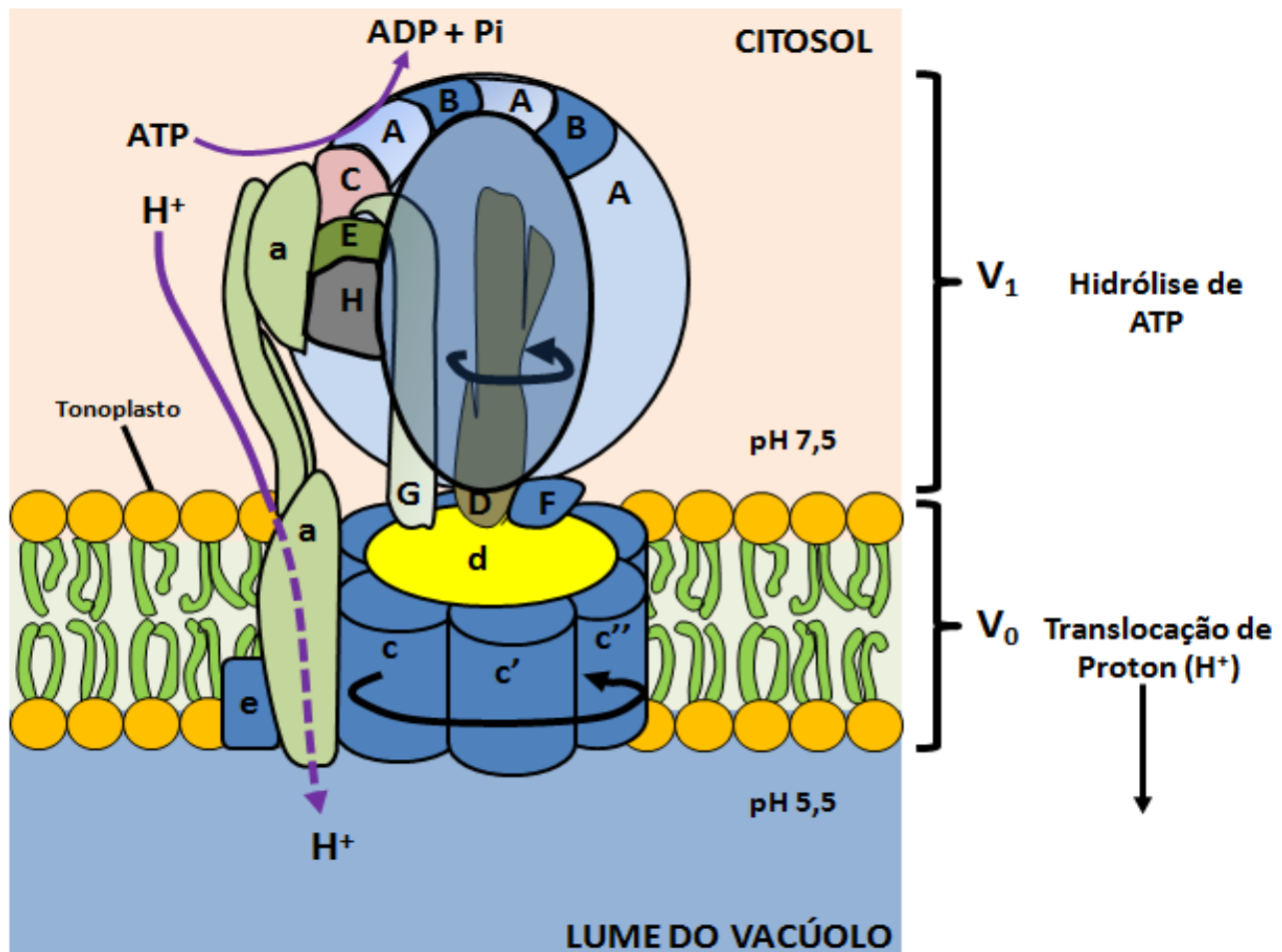


Figura 3. Estrutura proposta para o motor de rotação da V-ATPase. Várias subunidades de polipeptídeos unem-se para formar esta enzima complexa. O domínio citoplasmático V_1 é facilmente dissociado da membrana e contém os sítios de ligação de nucleotídeos e catalítico. Os componentes de V_1 são designados por letras maiúsculas. O complexo de membrana intrínseco que promove o transporte de H^+ é designado V_0 , e suas subunidades recebem letras minúsculas. Propõe-se que as reações de ATPase catalisadas por cada uma das subunidades A, agindo em sequência, governem a rotação do eixo D e das seis subunidades c em relação à subunidade a governe o transporte de H^+ através da membrana. Modificado (JEFFERIES *et al.*, 2008).

2.5. H⁺-Pirofosfatase (V-H⁺-PPase/ H⁺-PPase)

Em plantas a enzima está localizada na membrana do tonoplasto (V-H⁺-PPase) funcionando como bomba de prótons acoplada a hidrólise de pirofosfato inorgânico (PP_i) e na acidificação do vacúolo. Pesquisas recentes sugerem que esta H⁺-PPase pode também residir em outras membranas celulares e que ela contribui para a regulação do transporte de auxinas, crescimento e desenvolvimento vegetal (LI *et al.*, 2005). Segundo GAXIOLA *et al.*, (2007), foi descrito que o nível de V-PPase em plantas é estimulado em resposta aos estresses energéticos, incluindo o frio, anoxia e hipoxia os quais induzem um aumento na transcrição da pirofosfatase (PPase). O conteúdo de PP_i permaneceu estável sob o estresse, ao contrário do ATP, o qual obteve grande variação, durante as mudanças no estado respiratório.

A H⁺-PPase, que é composta por um único polipeptídeo, contendo 16 ou 17 domínios transmembranares (GAXIOLA *et al.*, 2007) (Figura 4) de 73 kDa e possui aproximadamente 770 resíduos de aminoácidos MAESHIMA *et al.*, (2000).

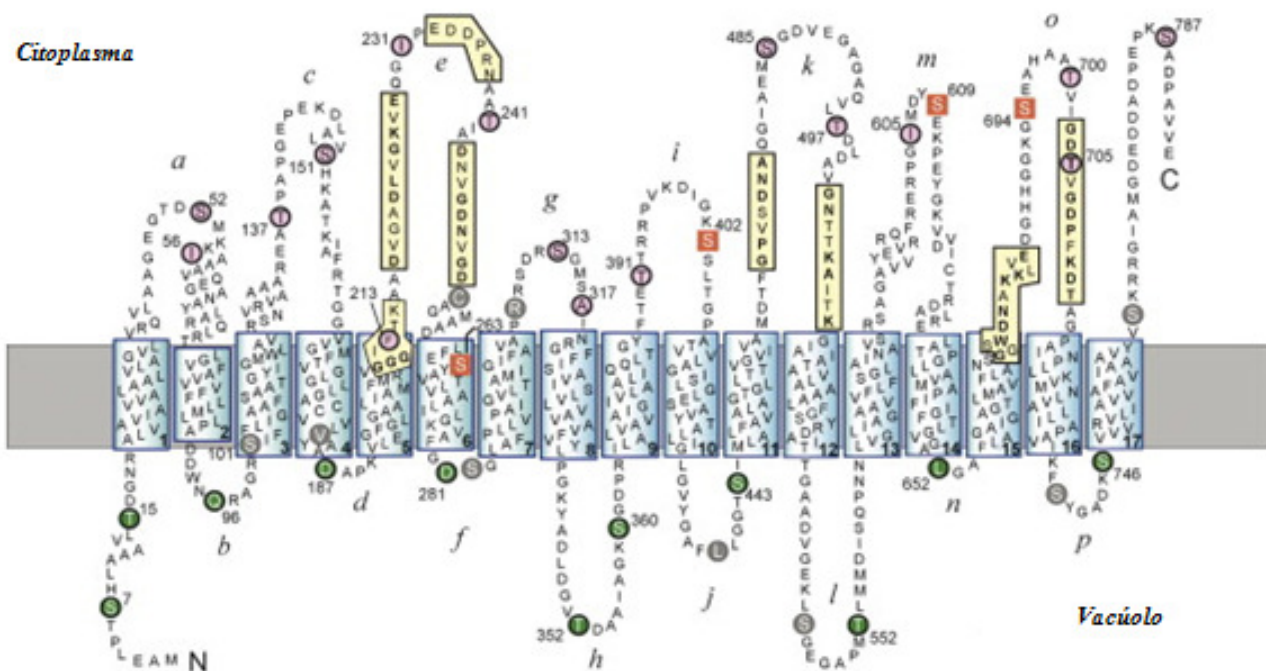


Figura 4. Modelo estrutural da H⁺-PPase de tonoplasto. Modificado (GAXIOLA *et al.*, 2007).

A H⁺-PPase é uma enzima de estrutura única que trabalha paralelamente com a ATPase do tipo V na criação de um gradiente de prótons através do tonoplasto. Elas podem ser divididas em três classes: PPase solúveis, PPase associada a membrana e H⁺-PPase e possuir dois tipos filogeneticamente distintos: o tipo I, que depende do K⁺ citosólico para a sua atividade e é sensível moderadamente a inibição por Ca²⁺, e a tipo II, que é insensível a K⁺ e extremamente sensível a Ca²⁺ (GAXIOLA, 2007). Foi relatado que a H⁺-PPase vacuolar é inibida reversivelmente pelo Ca²⁺ devido a formação do complexo CaPP_i, que é um forte inibidor competitivo como as PPase solúveis (BAYKOV *et al.*, 1999).

A energia livre liberada pela hidrólise de PP_i é menor que a oriunda da hidrólise de ATP. No entanto, a H⁺-PPase transporta somente um H⁺ por molécula de PP_i hidrolisada enquanto a ATPase do tipo V parece transportar dois íons H⁺ por ATP hidrolizado. RAMOS *et al.*, (2005), verificaram estímulos na atividade específica de V-H⁺-PPase de raízes de milho (*Zea mays* L.) micorrizadas, especialmente por *Glomus clarum*. Esses resultados apontam inclusive para o uso da atividade dessa enzimas como marcadores bioquímicos de processos de colonização micorrízica. Segundo GAXIOLA *et al.*, (2007) indicaram altos níveis de proteína com atividade da H⁺-PPase do tipo I em estudos sobre o desenvolvimento de frutos de pêra (*Pyrus communis* L.), tanto em frutos jovens como naqueles em estágio de divisão celular.

A concentração de PP_i citosólico encontra-se em torno de 200 μM, o suficiente para promover a máxima atividade das V-H⁺-PPase (MAESHIMA *et al.*, 1996). De forma geral, os níveis de PP_i celulares são regulados por diversas reações do metabolismo de ácidos nucleicos, aminoácidos, polissacarídeos e lipídeos (GRAZINOLI-GARRIDO & SOLA-PENNA, 2004).

Em tecidos em desenvolvimento, RNAs, proteínas e celulose são ativamente sintetizados para a construção de células, e como resultado, uma grande quantidade de PP_i é produzido como um co-produto destes processos metabólicos. Assim, a H⁺-PPase recolhe o PP_i no citosol e o usa como fonte de energia para o transporte de prótons em vacúolos em expansão (MAESHIMA, 2000).

3. CONCLUSÕES

As membranas biológicas contêm proteínas de transporte que facilitam a passagem de íons e de outras moléculas polares específicos. O termo geral proteínas de transporte engloba três categorias principais de proteínas: canais, carregadoras e bombas. Estas proteínas exibem especificidade para solutos por elas transportados. Embora uma determinada proteína de transporte seja em geral altamente específica para os tipos de substâncias que transporta, sua especificidade comumente não é absoluta.

O transporte ativo primário é realizado pelas bombas e usam energia diretamente, usualmente da hidrólise do ATP, para bombear os solutos contra o seu gradiente ou potencial eletroquímico. Os principais tipos de bombas de prótons são H⁺-ATPase de membrana plasmática e vacuolar, e a H⁺-PPase vacuolar. Além disso, bombas iônicas podem ser ainda caracterizadas como eletrogênicas ou eletrônêtras. Por outro lado, no transporte ativo secundário, o transporte contra a corrente de um soluto é governado pelo transporte a favor da corrente de um outro soluto. Nesse sentido, dois exemplos de transporte ativo secundário acoplados a um gradiente de prótons primário são relatados: um transportador simporte e um antiporte. Em ambos os casos, o substrato considerado está se movendo contra seu gradiente de potencial eletroquímico.

Portanto, a H⁺-PPase é funcional na energização dos sistemas de transporte secundários da membrana vacuolar, atuando também no controle da homeostase citoplasmática, em sincronismo com a H⁺-ATPases do tipo P e V.

4. AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB), pelo apoio à pesquisa e por disponibilizar a estrutura para o desenvolvimento dos trabalhos. À Universidade Vila Velha (UVV), pela bolsa do Mestrado de Carlos Moacir Colodete.

5. REFERÊNCIAS

AMBESI, A.; MIRANDA, M.; PETROV, V.V.; SLAYMAN, C.W. Biogenesis and Function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. **The Journal of Experimental Biology**, 203:155–160, 2000.

AZEVEDO, I. G.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, M.G.; PEREIRA, T.; CORREIA, S.F.; VARGAS, H.; FAÇANHA, A. R. P-type H⁺-ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, 48:242-247, 2008.

BARKLA, B.J. & PANTOJA, O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. **Plant Physiol Plant Mol Biol** 47(1):159-184, 1996.

BAYKOV, A.A.; COOPERMAN, B.S.; GOLDMAN, A.; LAHTI, R. Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, 23:127-150, 1999.

BRUMMEL, D.A. & HALL, J.L. Rapid cellular response to auxin and the regulation of growth. **Plant Cell Environment**, 10:523-543, 1987.

- CRONIN, S.R.; RAJINI, R.; HAMPTON, R.Y. Cod 1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. **Journal of Cell Biology**, 157: 1017-1028, 2002.
- DOMINGOS, P.F.A.; HUBER, D.J. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. **Physiology Plantarum**, 105(3):506-512, 1998.
- FAÇANHA, A.R. & DE MEIS, L. Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. **Plant Physiology**, 108:241, 1995.
- GAXIOLA, R.A.; PALMGREN, M.G.; SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. **Febs Letters**, 581:2204-2214, 2007.
- GAXIOLA, R.A.; PAEZ-VALENCIA, J.; SANCHEZ-LARES, J.; MARSH, E.; DORNELES, L.T.; SANTOS, M.P.; SANCHEZ, D.; WINTER, A.; MURPHY, S.; COX, J.; TRZASKA, M.; METLER, J.; KOZIC, A.; FAÇANHA, A.R.; SCHACHTMAN, D.; SANCHEZ, C.A. Enhanced Proton Translocating pyrophosphatase activity improves nitrogen. **Eff. Rom. Lett**, 161, 1557-1569, 2013.
- GRAZINOLI-GARRIDO, R. & SOLA-PENNA, M. Inactivation of yeast inorganic pyrophosphatase by organic solvents. **An Acad Bras Cienc**, 76(4):699-705, 2004.
- HEYES, J.A.; SEALEY, D.F.; DE VRE, L.A. Plasma membrane ATPase activity during pepino (*Solanum muricatum*) ripening. **Physiol. Plant**, 101:570-576, 1997.
- HIRATA, T.; NAKAMURA, N.; OMOTE, H.; WADA, Y.; FUTAI, M. Regulation and reversibility of vacuolar H⁺-ATPase. **J Biol Chem**, 275:386-389, 2000.
- JEFFERIES, K.C.; CIPRIANO, D.J.; FORGAC, M. Function structure and regulation of the vacuolar H⁺-ATPases. **Arch Biochem Biophys**, 476:33-42, 2008.
- KLUGE, R.A.; JOMORI, L.L.; JACOMINO, A.P.; VITTI, M.C.D.; PADULA, M. Intermittent warming in Tahiti lime treated with an ethylene inhibitor. **Postharvest Biology and Technology**, 29:195-203, 2003.
- LI, B.; PATTENDEN, S.G.; LEE, D.; GUTIERREZ, J.; CHEN, J.; SEIDEL, C.; GERTON, J.; WORKMAN, J.L. Preferential occupancy of histone variant *H2AZ* at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. **Proc Natl Acad Sci**, 102:18385-18390, 2005.
- LUU, D.T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant Cell Environ**, 28:85-96, 2005.
- MAESHIMA, M.; MIMURA, T.; SATO, T. Distribution of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and a membrane integral protein in a variety of green plants. **Plant Cell Physiol**, 35:323-328, 1994.
- MACRI, E.C.; CARRIJO, A.O.; SOUZA, A.F.; PEREIRA, W.; LOPES, C.A. *Ipomoea batatas*. **Journal of Biological**, 4: 20-25, 1995.
- MAESHIMA, M. Oligomeric structure of H⁺ translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. **Biochem. Biophys**, 168:1157, 1996.
- MAESHIMA, M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase *Biochimica et Biophysica*. **Membranes**, 1465:37-51, 2000.
- MAUREL, C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Physiology*. **Plant Molecular Biology**, 48:399-429, 1997.

- MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. **Biochim Biophys Acta**, 1465:1–16, 2000.
- OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L.; APPELGRAN, H.; TABISH, M.; OKOROKOV, L.; EKWALL, K. The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase *Cta4p* is required for control of cell shape and microtubule dynamics. **Journal of Cell Biology**, 157:1029-1039, 2002.
- PALMGREN, M.G. Plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 52:817–845, 2001.
- PENG, Y.B.; LU, Y.F.; ZHANG, D.P. Abscisic acid activates ATPase in developing apple fruit especially in fruit phloem cells. **Plant Cell and Environment**, 8:1329-1342, 2003.
- RAMOS, A.C.; FAÇANHA, A.; PALMA, L.M.; OKOROKOV, L.A.; CRUZ, Z.M.A.; SILVA, A.G.; SIQUEIRA, A.F.; BERTOLAZI, A.A.; CANTON, G.C.; MELO, J.; SANTOS, W.O.; SCHIMITBERGER, V.M.B.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L. An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. **Braz J Plant Physiol**, 23(1):79-89, 2011.
- RAMOS, A.C.; MARTINS, M.A.; FAÇANHA, R.A. Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microcromossomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 29:207-213, 2005.
- REA, P.A. & POOLE, R.J. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 44:157-180, 2000.
- ROBINSON, S.; DAVIES, C. Molecular biology of grape berry ripening. **Aust J Grape Wine Res**, 6:175-188, 2000.
- SANDERS, D.; BETHKE, P. Membrane transport. In: Biochemistry & molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, 110-158, 2000.
- SZE, H.; WARD, J.M.; LAI, S. Vacuolar-H₁-atpases from plants. **J. Bioenerg Biomembr**, 24:371–38, 1999.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** 4^a ed. – Porto Alegre: Artmed. 117-143, 2010.
- TERRIER, N.; FRANÇOIS-XAVIER, S.; AGEORGES, A.; ROMIEU, C. Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. **Plant**, 213:20-28, 2001.
- TYERMAN, S.D.; BONHERT, H.J.; MAUREL, C.; STEUDLE, E.; SMITH, J.A.C. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. **J Exp Biol**, 50:1055–1071, 1999.
- TYERMAN, S.D.; NIEMIETZ, C.M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant Cell Environ**, 25:173–194, 2002.
- WAGNER, C.A.; FINBERG, K.E.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.; GEIBEL, J.P. Renal vacuolar H⁺-ATPase. **Physiol**, 84:1263-1314, 2004.
- ZANDONADI, D.; CANELLAS, L.; FAÇANHA, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. **Trends Plant Sci**, 225: 1583-1595, 2007.
- ZHAO, Z.Y.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; MILLER, M.; WANG, N.; PANG, H.; RUDERT, M.; SCHROEDER, S.; HONDRED, D.; SELTZER, J.; PIERCE, D. Agrobacterium mediated sorghum transformation. **Plant Mol. Biol**, 44:789-798, 2000.