

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**LUCÉLIA BORGÓ**

**Caracterização e possível papel da modulação oxidativa da parede celular em alterações  
na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 a pH baixo  
durante a retomada do ciclo celular**

**Piracicaba**

**2010**

**LUCÉLIA BORGIO**

**Caracterização e possível papel da modulação oxidativa da parede celular em alterações na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 a pH baixo durante a retomada do ciclo celular**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello

Piracicaba

2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Borgo, Lucélia

Caracterização e possível papel da modulação oxidativa da parede celular em alterações na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 a pH baixo durante a retomada do ciclo celular / Lucélia Borgo; orientador Victor Alexandre Vitorello. - - Piracicaba, 2010.

85 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Crescimento vegetal 2. Cultura de células vegetais 3. Fumo 4. Mecanismos de controle celular 5. Parede celular vegetal 6. Peroxidase I. Título

CDU 576:582.926.2

*Dedico*

*A toda minha família e aos meus queridos amigos*

*“Há os que se queixam do vento.*

*Os que esperam que ele mude.*

*E os que procuram ajustar as velas”.*

*(William George Ward)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo bem mais valioso, a vida.

Aos meus pais Miguel e Zilma pelo amor incondicional e por sem medir esforços me proporcionarem condições para a conquista dos meus objetivos pessoais e profissionais.

Ao meu irmão Luciano, por ser mais que irmão. Por ser meu ombro amigo em tantos momentos.

Ao Paulo pelo amor, dedicação, compreensão e principalmente por estar sempre ao meu lado, compartilhando sonhos e enfrentando desafios.

A família Lange Takano: Paulo, Walkyria, Marcinha, Vó Fina, Vô Miguel (*in memorian*) e Wagner, por terem sido minha segunda família. Obrigada por todo carinho e apoio.

A amiga Elissena, pela convivência, companheirismo e pelos vários momentos de descontração no laboratório que tornaram mais alegre este período de muito trabalho.

Ao Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello pelos ensinamentos, orientação e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade e estrutura disponível para que este trabalho fosse realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos técnicos e auxiliares do Lab. De Biologia Celular e Molecular Francisco Montrazi, Fábio Duarte e Wagner Piccinini pela ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura - NAP/MEPA - Esalq/USP, ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima por disponibilizar de maneira irrestrita o uso do microscópio óptico, e em especial ao Prof. Dr. Francisco A. O. Tanaka pela colaboração e disposição em ajudar sempre que necessário.

A Bibliotecária Chefe do CENA/USP, Marília Ribeiro Garcia Henyei por toda ajuda prestada e compreensão.

Aos amigos do laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, Carol Hoff, Diego Genuário, Marcelo Vaz e Elaine Crispim pela imensa alegria compartilhada no dia a dia, especialmente à Carol por ter se tornado em tão pouco tempo uma amiga tão especial.

Enfim, aos amigos de longe e de perto, aos antigos e novos, aos presentes e aos fisicamente ausentes, mas não menos importantes, agradeço por toda força e motivação.

## RESUMO

**BORGO, L. Caracterização e possível papel da modulação oxidativa da parede celular em alterações na sensibilidade de células de tabaco cv. BY-2 a pH baixo durante a retomada do ciclo celular.** 2010. 85 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

A acidez do solo é um dos principais fatores limitantes à produção vegetal. Apesar da toxicidade por alumínio ter sido extensamente investigada, pouca atenção tem sido dada ao estresse causado pelo baixo pH em si. Existem diferenças marcantes entre células quanto à sensibilidade ao pH baixo que dependem do seu estado de crescimento e desenvolvimento celular e que devem ser exploradas para se entender o que determina a sensibilidade e tolerância a pH baixo. Em alguns casos, a suscetibilidade a pH baixo está relacionada a desarranjos na parede de células em crescimento, chegando a causar o rompimento da célula, como já foi demonstrado em pêlos radiculares em expansão. Por outro lado, o metabolismo oxidativo e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na parede podem influenciar neste processo por romper ou criar ligações dentro ou entre cadeias de polissacarídeos, modulando assim a extensibilidade da parede celular. Em células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. BY-2, há um aumento acentuado na sensibilidade ao pH baixo no final da fase lag da cultura, que ocorre entre 12 e 24 h de cultivo. Os objetivos deste trabalho foram: a) Investigar se a mudança na sensibilidade a pH baixo ocorre durante a retomada do ciclo celular e determinar, com o uso de inibidores do ciclo celular, o período do ciclo em que isto ocorre; b) verificar se o aumento da sensibilidade a pH baixo está relacionado com a expansão celular ou com alterações no potencial osmótico da célula; c) examinar o efeito da aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou ascorbato sobre a resposta de células sensíveis a pH baixo; d) testar a hipótese de que a sensibilidade a pH baixo pode ser revertida por meio de um choque hipo-osmótico prévio; e) avaliar o possível papel da modulação oxidativa da parede celular na reversão de sensibilidade das células a pH baixo expostas ao choque hipo-osmótico. A retomada do ciclo celular é necessária para que ocorra a alteração de sensibilidade a pH baixo, pois a remoção de auxina (2,4-D) ou a adição de bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> impediu ou atrasou, respectivamente, a alteração na sensibilidade a pH baixo. O uso de inibidores do ciclo celular demonstrou que as células de BY-2 se tornam mais sensíveis a pH baixo durante o final da fase G<sub>1</sub> mas antes do ponto de checagem da transição G<sub>1</sub>/S do ciclo celular. A aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diminuiu a suscetibilidade das células a pH baixo, ao contrário da aplicação de ascorbato. Foi demonstrado que a aplicação prévia de tratamento hipo-osmótico por 60 min reverteu a sensibilidade de células a pH baixo. A aplicação de inibidores de NADPH oxidase da membrana plasmática e de peroxidases revelou a participação destas enzimas na reversão de sensibilidade das células a pH baixo, indicando a possibilidade de geração de ROS e de modulação oxidativa da parede. Embora já tenha sido descrito que ocorre uma explosão oxidativa com choque hipo-osmótico, ainda não havia sido demonstrado a consequência disto. Este trabalho fornece indícios de que uma explosão oxidativa poderia modificar a parede tornando-a mais resistente e a célula menos suscetível a pH baixo.

Palavras-chave: pH baixo. Cultura de células. Ciclo celular. Auxina. Canais de K<sup>+</sup>. Choque hipo-osmótico. Pressão de turgor. Explosão oxidativa. Modulação oxidativa. Parede celular. Espécies reativas de oxigênio. Peroxidases.

## ABSTRACT

BORGO, L. **Characterization and possible role of the oxidative modulation of the cell wall in changes in the sensitivity of tobacco BY-2 cells to low pH during restart of the cell cycle.** 2010. 85 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Soil acidity is a major factor limiting plant growth worldwide. Although aluminum toxicity, which occurs only at low pH, has been extensively studied, little attention has been given to stress caused by low pH. There are marked differences in the sensitivity of cells to low pH which are contingent on the growth and developmental stage of the cells. These differences should be explored to further the understanding of the factors governing sensitivity and tolerance to low pH. In at least some cases, the susceptibility of cells to low pH is related to derangements in the wall of growing cells, which can cause ruptures or bursting of the cells, as has been clearly demonstrated in expanding root hairs. On the other hand, the oxidative metabolism and generation of reactive oxygen species (ROS) can modulate cell wall extensibility by breaking or making bonds within and between cell wall polymers. In tobacco (*Nicotiana tabacum*) cv. BY-2 cells, there is a sharp increase in sensitivity to low pH at the end of the lag phase of the cell culture, which occurs between 12 and 24 h of subculture. The objectives of this study were: a) determine if the changes in sensitivity to low pH occurred during the restart of the cell cycle and, by employing cell cycle inhibitors, at which points of the cycle does this occur; b) examine if the changes in sensitivity to low pH are related to cell expansion or changes in osmotic potential of the cell; c) examine how the application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ascorbate affects the response of cells to low pH; d) test the hypothesis that sensitivity of cells to low pH can be reverted by the previous application of a hypo-osmotic shock; e) evaluate the possible role of oxidative modulation of the cell wall in hypo-osmotic-induced reversal of the sensitivity of cells to low pH. The restart of the cell cycle was shown to be necessary for the change in sensitivity to low pH occur, since the absence of auxin (2,4-D) or the addition of K<sup>+</sup> channel blockers prevented or delayed this change, respectively. The use of cell cycle inhibitors demonstrated that BY-2 cells become sensitive to low pH at the end of G<sub>1</sub> but before the G<sub>1</sub>/S transition restriction point of the cell cycle. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not ascorbate, reduced the effect of low pH on sensitive cells. Sensitive cells submitted to 60 min hypo-osmotic treatment became insensitive to low pH. This reversal of sensitivity depended on the activity of plasma membrane NADPH oxidase and peroxidase, as evidenced by the use of DPI and SHAM, inhibitors of these enzymes, respectively. This suggests that ROS is generated and that oxidative modifications of the cell wall occur. Although hypo-osmotic treatments have been shown to generate an oxidative burst, its purpose or implication has not yet been shown. This study provides evidence that an oxidative burst might modify and strengthen the cell wall, making cells less susceptible to low pH.

Key-words: Low pH. Cell cultures. Cell cycle. Auxin. K<sup>+</sup> channels. Hypo-osmotic shock. Turgor pressure. Oxidative burst. Oxidative modulation. Cell wall. Reactive oxygen species.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	ácido 2,4 diclorofenoxiacético
BY-2	bright yellow – 2
CDK	quinases dependentes de ciclina (cyclin-dependent kinases)
d.p.	desvio padrão
DMSO	dimetil sulfóxido
DPI	difenileno iodônio (diphenylene iodonium)
e.p.	erro padrão da média
G <sub>1</sub>	fase G <sub>1</sub> (gap 1) do ciclo celular
G <sub>2</sub>	fase G <sub>2</sub> (gap 2) do ciclo celular
HU	hidroxiuréia
IM	índice mitótico
M	fase M (mitose) do ciclo celular
MES	ácido-2-morfolinoetanosulfônico
MM	meio mínimo
MS	meio de Murashige e Skoog (1962)
pKa	constante de dissociação
ROS	espécies reativas de oxigênio
S	fase S (síntese) do ciclo celular
SHAM	ácido salicilhidroxâmico (salicylhydroxamic acid)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISAO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1. A cultura de células de tabaco BY-2 como modelo para estudos celulares.....	15
2.2. Efeito do estresse por pH baixo em células vegetais.....	16
2.3. ROS em plantas e suas relações com estresse biótico e abiótico .....	18
2.4. Modificação oxidativa da parede .....	21
2.5. Importância dos tampões nos estudos celulares de estresse por acidez .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4.1. Cultura de células de tabaco BY-2.....	26
4.2. Ensaio para avaliação da sensibilidade das células a pH baixo.....	26
4.3. Avaliação da viabilidade celular .....	27
4.4. Uso de inibidores do ciclo celular .....	27
4.5. Avaliação do índice mitótico.....	28
4.6. Avaliação da influência da auxina na transição do estado não sensível para o estado sensível ao pH baixo .....	28
4.7. Uso de bloqueadores de canais de potássio .....	29
4.8. Avaliação da pressão osmótica de células .....	29
4.9. Pré-tratamento de células sensíveis a pH baixo com soluções de diferentes níveis de nutrientes.....	29
4.10. Pré-tratamento de células sensíveis a pH baixo com soluções hipo-osmóticas .....	30
4.11. Aplicação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e ascorbato .....	31
4.11.1. Em células na fase sensível a pH baixo.....	31
4.11.2. Em células durante o pré-tratamento hipo-osmótico .....	31
4.12. Uso de inibidores de NADPH oxidase e de peroxidases .....	32

4.13. Avaliação do efeito de diferentes tampões a pH baixo em células BY-2 .....	32
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1. Caracterização da sensibilidade a pH baixo de células BY-2 na fase lag da cultura</b> .....	<b>34</b>
<b>5.1.1. Determinação das condições do ensaio para avaliação da sensibilidade das células a pH baixo .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1.2. Alteração da sensibilidade de células BY-2 a pH baixo durante a fase lag.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.3. Auxina é necessária para transição do estado não sensível para o estado sensível a pH baixo .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1.4. A atividade de canais de K<sup>+</sup> também é necessária para transição do estado não sensível para o estado sensível a pH baixo .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.5. O aumento de sensibilidade ao pH baixo ocorre antes da transição G1/S do ciclo celular .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.6. Alterações na osmolaridade intracelular não influenciam na transição do estado não sensível para o estado sensível a pH baixo .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.7. A aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminui a suscetibilidade de células sensíveis a pH baixo .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2. Reversão da sensibilidade a pH baixo induzido por tratamento hipo-osmótico .....</b>	<b>50</b>
<b>5.3. Modulação oxidativa da parede celular induzido por tratamento hipo-osmótico como causa do aumento da tolerância ao pH baixo .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3.1. Aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante o tratamento hipo-osmótico.....</b>	<b>55</b>
<b>5.3.2. Uso de inibidores de NADPH oxidase e de peroxidases.....</b>	<b>59</b>
<b>5.4. Estudo complementar de avaliação de tampão adequado para experimentos a pH baixo.....</b>	<b>62</b>
<b>5.4.1. Avaliação dos tampões a pH 5,7 .....</b>	<b>62</b>
<b>5.4.2. Avaliação dos tampões a pH 4,5 .....</b>	<b>65</b>
<b>5.4.3. Comparação entre MES e Homopipes para avaliar a sensibilidade de células a pH 4,2 .....</b>	<b>67</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A acidez do solo (pH <5,5) é um fator limitante para o desenvolvimento de culturas de interesse econômico. É estimado que aproximadamente 30% dos solos disponíveis para plantio no mundo sejam solos ácidos (KOCHIAN, 2004). A acidez do solo causa danos às plantas reduzindo a profundidade do sistema radicular e aumentando, desta maneira, a suscetibilidade à seca e diminuição do uso de nutrientes pelas plantas (FOY et al., 1978).

A toxicidade pelo alumínio (Al) tem sido objeto de muitas pesquisas e revisões (VITORELLO et al., 2005; KOCHIAN et al., 2004; KOCHIAN, 1995), mas ela só ocorre em condições de pH abaixo de 5,0. Apesar de se saber que o pH baixo em si pode ser diretamente prejudicial às raízes e de que é um fator de grande importância, há poucos trabalhos sobre a toxicidade por H<sup>+</sup> em plantas (KIDD; PROCTOR, 2001; KOYAMA et al., 2001).

É importante investigar os mecanismos envolvidos com o estresse por pH baixo em função de sua ocorrência generalizada, para poder distingui-los dos causados pelo alumínio, e para auxiliar no processo de obtenção de genótipos tolerantes a solos ácidos.

Uma questão fundamental é que as células apresentam sensibilidade diferenciada ao pH baixo. Ou seja, há variações não genótípicas na sensibilidade celular a esta condição. Assim, alguns trabalhos mostram que, semelhante ao que ocorre com o Al (YAMAMOTO et al., 1994; SIVAGURU; HORST, 1998), a sensibilidade ao pH ácido depende da fase de crescimento e/ou desenvolvimento das células (KOYAMA et al., 1995; KOYAMA et al., 2001; VITORELLO; HAUG, 1996). Yan et al. (1992) encontraram indícios morfológicos de que a alta concentração de prótons afeta com maior intensidade a região de alongamento do que a região meristemática de raízes de *Zea mays* e *Vicia faba* e, em suspensões celulares, as células na fase logarítmica são mais sensíveis do que na fase estacionária (VITORELLO; HAUG, 1996).

O pH ácido atua na extensibilidade da parede celular. O abaixamento do pH causa modificações na estrutura da parede celular, através de interações dos prótons com a pectina, gerando um afrouxamento da parede e conseqüentemente um aumento da sua extensibilidade (HESLOP-HARRISON, 1987; HOLDAWAY-CLARKE et al., 2003).

Recentemente, Monshausen et al. (2007) forneceram evidências do envolvimento da parede celular na resposta celular a pH baixo. Estes autores relataram que 100% dos pêlos observados e em crescimento sofreram ruptura quando expostos a pH 4,5, e obtiveram evidências indiretas de que isto ocorreu devido ao afrouxamento da parede celular em função

do pH. A elevação do pH externo levou a interrupção do crescimento celular enquanto o abaixamento do pH resultou na ruptura celular. Respostas semelhantes foram observadas com a manipulação de espécies reativas de oxigênio (ROS, “reactive oxygen species”) na parede celular. A adição de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) resultou na interrupção do crescimento enquanto a remoção de ROS via antioxidantes levou a ruptura celular.

Sabe-se que espécies reativas de oxigênio ( $O^{2\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ) e enzimas do metabolismo oxidativo, como a NADPH oxidase e as peroxidases do tipo III, desempenham papel importante na modulação da extensibilidade da parede celular (LISZKAY et al., 2003; PASSARDI et al., 2004) e no crescimento e desenvolvimento (FOREMAN et al., 2003; SWANSON; GILROY, 2010). Ligações intra e intermoleculares podem ser quebradas ou formadas em cadeias de polissacarídeos ou outras moléculas estruturais da parede pela ação direta de ROS ou em conjunto com a ação de enzimas como as peroxidases do tipo III da parede.

A ruptura celular em função do desbalanceamento entre a pressão de turgor e a resistência da parede celular é conhecida em pêlos radiculares e tubos polínicos (JONES et al., 2006). Apesar de poucos casos descritos, o mesmo também pode ocorrer em outros tipos de células vegetais (PROSEUS; BOYER, 2006), o que nos leva a acreditar que a ruptura celular causada por pH baixo também pode ocorrer em células de crescimento difuso (não polar).

Experimentos com inibidores do ciclo celular mostraram que este aumento de sensibilidade ao pH baixo ocorre antes da fase S e antes do ponto de checagem de G1, correspondendo provavelmente à retomada das células no ciclo celular (a partir de G0) ou uma fase já próxima do final de G1.

Já foi demonstrado que o tratamento hipo-osmótico de células em suspensão gera uma explosão oxidativa (“oxidative burst”) (YAHRAUS et al., 1995; CAZALE et al., 1998; ROUET et al., 2006). As atividades de NADPH oxidase e de peroxidases estão fortemente implicadas nesta explosão oxidativa (CAZALE et al., 1998; ROUET et al., 2006) e a ativação desta resposta parece requerer uma elevação do cálcio citosólico e ativação de quinases de proteínas (TAKAHASHI et al., 1997a; TAKAHASHI et al., 1997b; CAZALE et al., 1998).

Uma hipótese formulada é de que esta explosão oxidativa seria um mecanismo de resposta ao estresse na parede celular.

Atualmente há grande interesse em determinar se plantas, à semelhança do que ocorre em leveduras, possuem um sistema de monitoramento e resposta à integridade da parede celular (LEVIN, 2005; HAMANN et al., 2009). A resposta celular decorrente do choque hipo-

osmótico sugere um mecanismo de resposta frente à parede celular sob estresse. Isto levanta a pergunta se células, ao serem expostas mais gradativamente a pH baixo, poderiam responder com mecanismos de adaptação semelhantes.

Ainda, Vitorello e Haug (1999) descreveram uma redução na capacidade de células de tabaco acumular alumínio que, em retrospectiva, provavelmente foi decorrente do choque hipo-osmótico imposto pelos tratamentos aplicados antes da exposição ao Al. Curiosamente, esta redução foi inibida pela presença do inibidor do tráfego de membranas e da via secretória Brefeldin A (BFA). Postulou-se que algum fator era necessário ser inserido ou removido da membrana plasmática ou parede celular. Em função do que foi discutido até aqui, é provável que a NADPH oxidases, localizadas na membrana plasmática, ou peroxidases do tipo III, que são secretadas na parede celular, podem ter sido estes fatores. Isto abre a possibilidade de se realizar experimentos que fortaleçam uma relação causal entre a modulação oxidativa da parede e a sensibilidade de células a pH baixo.

Por fim, ainda há falta de um tampão mais adequado para estudos celulares a pH baixo, para evitar que flutuações de pH possam interferir na resposta celular e conseqüentemente ter um efeito indesejado nos resultados obtidos. Esta questão não é tão simples, pois, além do tampão ser eficiente a pH baixo, não deve interferir no metabolismo celular (SOARES; DUARTE, 2000), que é justamente o caso dos tampões conhecidos que possuem valores de pKa adequados e que geralmente são ácidos orgânicos do metabolismo celular.

Até o momento, a sensibilidade a pH baixo parece estar relacionada ao crescimento celular (VITORELLO et al., 2005; KOYAMA et al., 2001). De fato, células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. BY-2 na fase log de crescimento são bastante sensíveis a pH baixo enquanto células na fase estacionária são insensíveis. No entanto, trabalhos anteriores do nosso laboratório (SOUZA, 2004; CAPALDI, 2006) indicam que ocorre um aumento na sensibilidade de células de tabaco BY-2 a pH baixo no final da fase lag da cultura. Isto é interessante pois não se espera que estas células estejam expandindo. Este trabalho pretende caracterizar e examinar estas alterações mais detalhadamente, além de testar a hipótese de que um choque hipo-osmótico prévio pode reverter a condição de sensibilidade a pH baixo. Durante o choque hipo-osmótico, ROS gerado por uma explosão oxidativa poderia modular a extensibilidade da parede celular. Embora isto já tenha sido proposto, há poucas evidências descritas que de fato relacionam a explosão oxidativa induzida pelo choque hipo-osmótico com a modulação de propriedades físicas da parede, muito menos que isto poderia afetar a sensibilidade de células a pH baixo. O sistema experimental que descrevemos aqui, onde há

mudanças na suscetibilidade de células ao pH baixo, é um sistema promissor para fornecer evidências desta possível relação.

## 2. REVISAO DA LITERATURA

### 2.1. A cultura de células de tabaco BY-2 como modelo para estudos celulares

A cultura de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. bright yellow-2 (BY-2) vem sendo utilizada há aproximadamente 30 anos nas mais diferentes áreas do conhecimento da biologia vegetal. Mesmo atualmente existindo várias linhagens celulares cultiváveis, ainda não há linhagem vegetal tão estudada e amplamente utilizada como as células de tabaco BY-2 (NAGATA; SAKAMOTO; SHIMIZU, 2004).

Segundo Nagata et al. (1992), a linhagem de tabaco BY-2 teve origem a partir de um calo induzido sobre uma plântula desta variedade, por pesquisadores do “Japan Tobacco and Salt Public Corporation” (atualmente Japan Tobacco Company) (KATO et al., 1972). A partir de 1980 esta linhagem começou a ser usada em pesquisa básica, ainda com restrições por parte da Japan Tobacco Company, e somente em 1999 a sua distribuição foi difundida sem restrições através do meio acadêmico.

Durante estes anos, esta linhagem vem sendo propagada exclusivamente *in vitro*, pois não possui capacidade de regeneração. É uma linhagem neoplásica, sendo talvez a única cultura de células vegetais conhecida que pode ser subcultivada indefinidamente, comparável à linhagem HeLa de células de mamíferos (NAGATA et al., 1992). Entretanto, ainda outras características foram responsáveis pela sua ampla utilização como, por exemplo, altas taxas de crescimento, alto padrão de homogeneidade entre as células e alta susceptibilidade a *Agrobacterium tumefaciens* para transformação genética (GEELEN; INZÉ, 2001; NAGATA; SAKAMOTO; SHIMIZU, 2004). Mas, principalmente a facilidade de sincronização do ciclo celular nesta linhagem contribuiu significativamente para os estudos de biologia molecular do ciclo celular vegetal.

A sincronização celular é um processo pelo qual é possível, por meio de drogas, uniformizar células quanto a sua progressão através do ciclo celular sendo possível sincronizá-las em um determinado ponto do ciclo e, com a retirada do inibidor, voltar à progressão normal do mesmo. A aplicação dos inibidores nos estudos do ciclo celular é bastante ampla, sendo os mais utilizados a afidicolina (inibidor específico da DNA polimerase  $\alpha$ ) e a propizamida (inibidor da formação de microtúbulos) que inibem a progressão do ciclo nas fase S e na mitose, respectivamente (DEWITTE; MURRAY, 2003).

É relatado que em outras culturas de células obtém-se aproximadamente 10% de células sincronizadas em termos de índice mitótico com simples bloqueio na presença de afidicolina. Em BY-2 este número chega a 60-70% na presença de afidicolina e até 95% (em condições ideais de cultivo e crescimento) com bloqueio duplo na presença de afidicolina e propizamida (NAGATA; SAKAMOTO; SHIMIZU, 2004).

Esta linhagem celular também é modelo para estudos envolvendo citoesqueleto (HASEZAWA; KUMAGAI, 2002; HUSSEY et al., 2002; SHIBAOKA et al., 1996), obtenção de protoplastos (NAGATA et al., 1981), transporte e tráfego de membranas (VITORELLO; HAUG, 1999; WEINGARTNER et al., 2003).

Em 2003 com a construção do banco de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) pelo Yokohama Institute of the RIKEN, Japão (<http://mrg.psc.riken.go.jp/strc/>) acelerou-se o entendimento das características da biologia celular vegetal em nível molecular. Determinados genes expressos durante o ciclo celular e a multiplicação celular puderam ser sistematicamente identificados e estudados em detalhe.

## **2.2. Efeito do estresse por pH baixo em células vegetais**

Uma das conseqüências mais evidentes causadas pelo pH baixo em plantas é a redução da profundidade do sistema radicular, aumentando, desta maneira a suscetibilidade à seca e diminuição do uso de nutrientes pelas plantas (FOY et al., 1978). As raízes são expostas constantemente a variações de pH espaciais e temporais no solo, e mudanças na disponibilidade de água podem modificar substancialmente o pH do solo (MISRA; TYLER, 1999).

Koyama et al. (1995) demonstraram que o crescimento de raízes de *Arabidopsis thaliana* teve redução acentuada em pH 4,5. Após o tratamento, mais de 80% das raízes não apresentaram comprimento superior a 2 mm, enquanto que em pH 5,0, mais de 60% apresentaram comprimento igual ou maior que 5 mm.

No caso de pêlos radiculares que sofrem ruptura em suas pontas, Bibikova et al. (1998) especulam que o abaixamento do pH para valores menores que 4,5 poderia enfraquecer a estrutura da parede ou afetar processos de síntese e organização na extremidade do pêlo, a ponto do turgor celular causar a ruptura da célula. No caso dos pêlos em que o

crescimento já tenha parado, é possível que a parede destes sejam insensíveis ao abaixamento de pH.

Mudanças no pH do meio ao redor de raízes de *Arabidopsis* têm mostrado afetar fortemente o pH apoplástico, mas não o pH citoplasmático (GAO et al., 2004). Em raízes de milho, alterações no pH do apoplasto e na superfície da raiz foram menores que as mudanças de pH no meio (FELLE, 1998), indicando que o tamponamento pela parede, o transporte de membrana e a difusão incompleta criam zonas com diferenças de pH externo nos compartimentos ao redor das células das raízes.

A acidez é um fator que também afeta a membrana plasmática. A alta atividade de  $H^+$  do meio externo altera as cargas elétricas e os cátions da membrana plasmática das células, afetando sua estrutura e funcionamento (MARSCHNER, 1991; YAN et al., 1992) e aumentando sua permeabilidade (ZSOLDOS; ERDEI, 1981; YAN et al., 1992; KOYAMA et al., 1995; KOYAMA et al., 2001; YOKOTA; OJIMA, 1995).

Os prótons são muito mais permeáveis à bicamada lipídica do que outros cátions (TEPPER; VOTH, 2005). Além disto, a própria acidez pode aumentar a permeabilidade da membrana ao próton (MIEDEMA et al., 1996; TYERMAN et al., 2001). Assim, o abaixamento do pH extracelular resulta em um aumento considerável do influxo de prótons (BABOURINA et al., 2001). Este influxo é a provável causa da despolarização da membrana e do efluxo de potássio observado nestas condições. O abaixamento do pH citoplasmático, devido à acidez externa, também foi observado em rizóides de *Riccia fluitans* (FELLE, 1988) e em protoplastos de raízes de trigo (LINDBERG; STRID, 1997).

Koyama et al. (2001) apresentaram evidências de que o pH baixo poderia causar injúrias às raízes devido a sua interação com pectina. Em células de crescimento polarizado como tubos polínicos ou pêlos radiculares, a parede celular da extremidade de sua extremidade é composta praticamente por pectina, com poucas microfibrilas celulósicas (HESLOP-HARRISON, 1987). Foi encontrado que o pH baixo reduz a atividade de PME (pectina metiltransferase), uma enzima importante envolvida na síntese de pectina e pode aumentar a atividade de isoformas ácidas, que juntamente com hidrolases de pectina causam degradação dos arranjos de pectina na parede celular (BORDENAVE, 1996).

Paredes celulares em crescimento tem maior extensibilidade a pH baixo, um fenômeno conhecido como crescimento ácido (RAYLE; CLELAND, 1992). Em pH neutro a parede celular para seu crescimento, mas com o abaixamento do pH rapidamente volta a crescer. A extensibilidade induzida por pH baixo não é meramente uma propriedade física dos polissacarídeos da parede celular, pois requer a atividade de proteínas. Uma informação

importante veio com a descoberta que proteínas da parede podem ser readicionadas às paredes celulares desnaturadas, recuperando a capacidade de extensibilidade. Estas proteínas foram denominadas expansinas. O conceito de que as expansinas têm função na regulação da extensibilidade da parede celular é suportado por algumas evidências. Elas induzem o relaxamento e a extensão de paredes celulares isoladas de maneira dependente de pH (MCQUEEN-MASON; DURACHKO; COSGROVE, 1992; MCQUEEN-MASON; COSGROVE, 1995), sendo que até o momento nenhuma outra proteína foi identificada com esta atividade. Foi demonstrado que genes que codificam expansinas são expressos no momento e local onde ocorre expansão celular e a redução da expressão destes genes por métodos antisense resultou em inibição do crescimento (CHO; COSGROVE, 2000).

Lager et. al., 2010 utilizando a técnica de microarranjos de DNA para investigar se mudanças no pH externo afetam a expressão global de genes em raízes de *A. thaliana* encontrou que 881 genes mostraram pelo menos duas vezes mais transcritos 8 h depois do abaixamento do pH do meio de 6,0 para 4,5, identificando o pH como maior efeito da mudança nos padrões da expressão gênica. Vários genes foram ativados no período de 20 min, e a resposta também foi observada em folhas de plântulas.

Os padrões observados em termos de expressão gênica indicam redundâncias e interações entre respostas ao pH, auxina e elicitores. Ainda, estes padrões de expressão foram associados com modificações na parede celular e sinalização por  $\text{Ca}^{2+}$ , o que sugere que a resposta a mudanças de pH envolve  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

A importância dos estudos de mecanismos envolvidos com o estresse por pH baixo se dá somente devido à sua ocorrência generalizada, mas também para auxiliar no processo de obtenção de genótipos tolerantes a solos ácidos.

### **2.3. ROS em plantas e suas relações com estresse biótico e abiótico**

A evolução de processos metabólicos aeróbicos como a respiração e fotossíntese levou de forma inevitável à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou “Reactive Oxygen Species” (ROS) (ALSCHER; DONAHUE; CRAMER, 1997; VRANOVÁ, 2002; APEL; HIRT, 2004).

Estas espécies reativas são formadas por reações redox, durante a redução incompleta do oxigênio ou oxidação da água pela cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias e

cloroplastos, podendo também ser produzidos nos peroxissomos. Ou seja, as maiores fontes de ROS estão associadas a organelas com intensas taxas de fluxo de elétrons.

O termo ROS é usado para designar um grupo de compostos oxidantes que são radicais livres de oxigênio ou que podem ser facilmente convertidos em tal. Por sua vez, radicais livres são caracterizados por possuírem elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, portanto sua alta reatividade se dá pela avidez em captar elétrons de outros compostos a fim de tornar-se mais estável. Sendo assim, uma característica comum entre diferentes tipos de ROS é a capacidade de causar dano oxidativo a proteínas, DNA e lipídios. As principais espécies reativas de oxigênio são: o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ).

Sob condições fisiológicas normais estas moléculas são destoxificadas por sistemas enzimáticos e não enzimáticos, geralmente localizados em compartimentos celulares (GECHEV et al. 2006), pois dependendo de sua natureza algumas espécies reativas de oxigênio podem ser altamente tóxicas.

Fazem parte do mecanismo não enzimático principalmente o ascorbato (vitamina C), glutathione reduzida (GSH),  $\alpha$  – tocoferol (vitamina E) e carotenóides, sendo o ciclo ascorbato-glutathione a principal via antioxidante em plantas (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). Já o mecanismo enzimático inclui superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT).

No passado, as situações que provocavam aumento da produção de ROS em plantas eram caracterizadas como estresse oxidativo, o que implica em um termo negativo indicando um processo prejudicial, quando na verdade em muitos casos o aumento de ROS pode atuar como um componente essencial integrante dos processos de sinalização celular que as plantas dispõem em resposta a diversos estímulos durante o desenvolvimento ou impostos pelo ambiente (FOYER; NOCTOR, 2005).

Em plantas, ROS podem atuar em inúmeras funções, dentre elas no controle do desenvolvimento vegetal, alongamento celular, sinalização, defesa contra patógenos e morte celular programada. Espécies reativas de oxigênio têm emergido como importantes reguladores no desenvolvimento vegetal atuando em processos diversos como a transdução de sinais na resposta hormonal e a modulação da estruturação dos polímeros da parede celular (MULLER et al., 2009; PEDREIRA et al., 2004; POTIKHA et al., SCHOPFER et al., 2001). Como regulador do desenvolvimento, ROS têm sido bastante estudado em células de crescimento polarizado como pêlos radiculares e tubos polínicos.

No que diz respeito ao papel de ROS em processos relacionados ao desenvolvimento vegetal, mais recentemente foi demonstrado que estes compostos ativam uma série de respostas celulares incluindo cascatas de MAP quinases (mitogen activated proteins) e mudanças na atividade transcricional (PITZSCHKE et al., 2009) dando fortes evidências para o envolvimento de ROS numa rede de respostas que regulam o crescimento polarizado.

Quanto a eventos de sinalização celular, três principais modos de ação indicam como ROS poderiam afetar a expressão gênica. Sensores específicos para ROS poderiam ser ativados para induzir cascatas de sinalização que por fim culminariam na expressão gênica. Alternativamente, componentes das vias de sinalização poderiam ser diretamente oxidados por ROS. Finalmente, ROS poderia mudar a expressão gênica por modificação da atividade de fatores de transcrição (APEL; HIRT, 2004).

Espécies reativas de oxigênio também estão envolvidas na resposta a estresses bióticos e abióticos. A explosão oxidativa (oxidative burst) é um fenômeno que resulta da rápida geração de  $O_2^-$ ,  $OH^\bullet$  e  $H_2O_2$  na superfície da membrana celular em resposta a um elicitador ou patógeno.

Durante defesa a patógenos em plantas, ROS são produzidos pelo aumento da atividade de NADPH-oxidases, peroxidases ligadas à parede celular e amina oxidases no apoplasto (GRANT; LOAKE, 2000) e podem ser considerados como a primeira linha de defesa contra este tipo de infecção por causar diretamente a morte do patógeno ou tornar sua infecção mais lenta, devido a sua rápida produção e citotoxicidade (GEETHA; SHETTY, 2002).

Segundo Dangl e Jones (2002), sob estas condições, mais de 15  $\mu M$  de  $H_2O_2$  podem ser produzidos diretamente ou como resultado da dismutação do superóxido. Ao contrário do superóxido,  $H_2O_2$  pode se difundir para dentro das células e ativar respostas de defesa incluindo morte celular programada (PCD – programmed cell death), que potencialmente limita a disseminação da doença ao ponto de infecção.

Durante a condição de estresse provocada pela infecção por patógenos a atividade e os níveis de enzimas do sistema antioxidativo são reprimidos por ácido salicílico (AS) e óxido nítrico (NO), determinando assim mudanças no equilíbrio entre a produção e o consumo de ROS, necessárias para a indução de PCD.

PCD não ocorre somente como resultado de explosão oxidativa causada por patógenos, mas também por exposição a estresses abióticos. Entretanto, o papel de ROS durante estresses abióticos parece ser oposto ao desempenhado durante a infecção por patógenos.

Durante estresses abióticos, enzimas antioxidativas são induzidas para diminuir níveis tóxicos de ROS. As diferenças no papel de ROS entre estresses bióticos e abióticos parecem estar relacionadas com a ação de hormônios e interação entre diferentes vias de sinalização, ou de diferenças nos locais onde ROS são produzidos e/ou acumulados durante os diferentes tipos de estresse. Estas considerações levantam a questão de como as plantas regulam a produção de ROS e os mecanismos antioxidativos quando são expostas simultaneamente a ambos os tipos de estresses. Evidências para estas situações conflitantes vieram de trabalhos onde plantas de tabaco mostraram reduzida PCD depois da exposição a estresse oxidativo (MITTLER et al., 1999). De acordo com estas informações plantas super produtoras de catalase (CAT) tem diminuída resistência a infecção por patógenos, lesões e tratamentos com alta luminosidade (POLIDOROS; MYLONA; SCANDALIOS, 2001; OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999; MULLINEAUX; KARPINSKI, 2002).

Foi sugerido que ROS pode agir em conjunto com compostos que tem a capacidade de se deslocar sistemicamente e tem a capacidade de ativar a produção de ROS em partes mais distantes da planta. Entretanto, ainda é debatido se ROS podem se deslocar a grandes distâncias na planta devido a sua reatividade e rápida destoxificação pelos sistemas antioxidativos na maioria dos casos.

#### **2.4. Modificação oxidativa da parede**

O crescimento por alongamento celular (em contraste ao crescimento por divisão celular) leva a um aumento irreversível no volume celular que ocorre juntamente com o relaxamento da parede celular.

Os processos bioquímicos envolvidos na extensibilidade da parede durante o crescimento são somente parcialmente conhecidos, e vários mecanismos enzimáticos têm sido propostos como a clivagem e remontagem de xiloglucanos ou a quebra de ligações de hidrogênio entre a celulose e xiloglucanos por expansinas (COSGROVE, 2000).

Entretanto, muito menos é conhecido a respeito de como o padrão espacial na estrutura da parede celular contribui para regulação do crescimento polarizado, por exemplo.

Espécies reativas de oxigênio produzidas por NADPH oxidases ligadas à membrana plasmática são indispensáveis para o crescimento polarizado por ativarem canais de  $\text{Ca}^{2+}$  importantes para gerar gradientes polarizados de  $\text{Ca}^{2+}$  que dirigem o crescimento apical

(FOREMAN et al., 2003). NADPH oxidases oxidam o NADPH citosólico, transferindo um elétron através da membrana para gerar radical superóxido na parede celular, que pode ser rapidamente dismutado para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou formar radicais hidroxila na parede, sendo consideradas como principais fontes de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apoplásticos (SAGI; FLUHR, 2006).

O maior avanço para definição do papel de ROS neste processo veio com a clonagem do mutante *rhd2* (root hair defective 2 mutant) de *A. thaliana* (FOREMAN et al, 2003) que não possui capacidade de manter o crescimento polarizado dos pêlos radiculares. Quando vários alelos da mutação *rhd2* foram clonados, foi encontrado que eles situam-se em um gene que codifica AtRBOHC (respiratory burst oxidase homolog C) em *A. thaliana*, subunidade catalítica homóloga da NADPH oxidase de mamíferos que é responsável pela produção de ROS durante a explosão oxidativa em fagócitos.

Cazalé et al., 1998 demonstrou que a resposta oxidativa de células de tabaco a estresse hipo-osmótico e mecânico tem envolvimento de NADPH oxidases. A produção de ROS ativado por um choque hipo-osmótico mostrou ser sensível a DPI, um inibidor desta enzima. Também foi detectado que a explosão oxidativa contribuiu para uma pequena, mas significativa parte do efluxo de Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup> e alcalinização extracelular induzido pelo estresse hipo-osmótico. O envolvimento de ROS na modulação da parede celular, como já descrito, pode ter um papel importante na regulação do volume e turgor celular. Entretanto, o modo como a explosão oxidativa contribui na regulação destes fluxos iônicos é ainda incerto.

Altos níveis de ROS têm sido reportados no ápice de pêlos radiculares (CARDENAS et al, 2008, LOHAR et al, 2007) e tubos polínicos (POTOCKY et al., 2007) em crescimento, indicando que sua produção localizada dá suporte ao crescimento celular polarizado. As taxas de crescimento deste tipo de células são oscilatórias, o que é consistente com oscilações de NAD(P)H observados em tubos polínicos em crescimento (CARDENAS et al., 2006). Além disso, foi demonstrado em rizóides da alga *Fucus serratus* um gradiente de ROS e Ca<sup>2+</sup> que parece ser capaz de dirigir o crescimento polarizado (COELHO et al., 2008).

Assim, a similaridade na dependência de produção de ROS por NADPH oxidases em células de crescimento polarizado em plantas e algas sugere um papel mais abrangente de ROS na regulação do crescimento polarizado do que somente em pêlos radiculares.

Entretanto, mudanças na estrutura interna da parede celular podem também ocorrer devido à ação de peroxidases, através dos ciclos peroxidativo ou hidroxílico. Em plantas superiores, ambos contribuem para a regulação dos níveis endógenos de peróxido de hidrogênio (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004). Como demonstrado por Schopfer

(1994) em plantas de soja, a quantidade de  $H_2O_2$  aumenta fortemente da extremidade do hipocótilo (zona de alongamento) para a base lignificada.

Em plantas, peroxidases são classificadas em duas classes de acordo com o proposto por Welinder (1992). As enzimas da classe I são intracelulares, enquanto as da classe III são secretadas na parede celular.

Durante o ciclo peroxidativo, as enzimas catalisam a redução do peróxido de hidrogênio pela retirada de elétrons de várias moléculas doadoras como compostos fenólicos, precursores de lignina, auxina ou metabólitos secundários (HIRAGA et al., 2001). A diversidade de substratos oxidados por esta via explica o fato destas proteínas estarem envolvidas em uma variedade de processos como catabolismo de auxinas, formação de lignina e suberina, processos de rearranjo da parede e alongamento celular e defesa contra patógenos.

Além do  $H_2O_2$ , o ascorbato tem mostrado controlar processos de alongamento e expansão pela inibição de enzimas envolvidas no enrijecimento da parede celular. Por exemplo, tratamentos com ascorbato estimularam o alongamento de raízes através da inibição de peroxidases assim como reduziu a curvatura de raízes de milho, que está diretamente relacionado ao processo de alongamento (SCHOPFER, 1994).

Radicais  $OH^\cdot$  podem participar dos processos de alongamento e expansão celular. Este radical altamente reativo é capaz de clivar polissacarídeos da parede como pectinas e xiloglucanas, podendo ser produzidos nas proximidades da parede celular a partir do radical superóxido e peróxido de hidrogênio por peroxidases (SCHOPFER et al., 2002; LISZKAY et al., 2003).

Auxina também tem envolvimento neste processo, pois promove a liberação de radicais superóxido e produção de radicais hidroxila quando induz o alongamento celular (SCHOPFER et al., 2002).

Estes fatos sugerem que as peroxidases podem regular o alongamento de diferentes maneiras por atuarem através de dois ciclos e por possuírem várias isoformas. Elas podem ser controladas por ascorbato e podem também induzir o processo de alongamento pela geração de radicais  $OH^\cdot$  no ciclo hidroxílico, ou ainda pela regulação local de  $H_2O_2$  devido a ambos os ciclos (PASSARDI et al., 2005).

## 2.5. Importância dos tampões nos estudos celulares de estresse por acidez

Uma das principais dificuldades encontradas ao se trabalhar com organismos vivos sob condições de baixo pH sem dúvida é a escolha de um tampão que não interfira na resposta biológica (DUARTE ; SOARES, 2000). Um dos tampões mais conhecidos e utilizados é o ácido-2-morfolinoetanosulfônico (MES) (BIBIKOVA et al., 1998; KOYAMA, 2001; SOUZA, 2004., MERSSELI, et al, 2005). Este composto faz parte da classe de tampões conhecidos como “Good Buffers” do tipo zwitteriônico, apresentando um balanço entre cargas negativas e positivas em sua molécula. Entre os tampões do tipo “Good Buffers”, o MES tem sido considerado o mais estável para o tamponamento na faixa de pH entre 5,5 e 6,7, e de fato dentre esta classe de tampões, ele é o que apresenta pKa mais baixo. Embora se saiba que nenhum tampão é totalmente inerte as condições de estudo (FERGUNSON et al., 1980), é necessário buscar tampões com pKa mais apropriados para ensaios onde os tratamentos são feitos com pH mais baixos.

Uma alternativa seria o uso do tampão biftalato de potássio (BIF). Sabe-se que este composto faz parte de uma classe de tampões chamados não- ziteriônico, ou seja, há a predominância de um tipo de carga, neste caso, negativas. Quanto a dissociação química, numa temperatura de 25°C tem-se dois valores de pKa (pKa1 2,89 e pKa2 5,51). Poucos trabalhos relatam o uso do tampão biftalato de potássio em células de plantas sob condições ácidas, conseqüentemente poucas informações dos efeitos fisiológicos deste tampão nos sistemas biológicos são encontrados na literatura.

Ainda, outros tampões potencialmente poderiam ser utilizados com base nos seus valores de pKa: homopipes (homopiperazina-1,4-bis (2-ácido etanosulfônico, pKa 4,32), dimetilglutarato ou DMGA (ácido 3,3 – dimetilglutárico, pKa1 3,73 e pKa2 6,71) e o aminoácido β-alanina (pKa1 3,7 e pKa2 10,10), sendo que o homopipes já vem sendo utilizado em alguns trabalhos (BABOURINA et al., 2006; BABOURINA et al., 2005; KOCHIAN et al., 2003; SAMAC et al., 2003; KINRAIDE; SWEENEY, 2001).

### 3. OBJETIVOS

**3.1. Objetivo geral:** Investigar processos celulares que estejam envolvidos com mudanças na sensibilidade a pH baixo em células BY-2.

**3.2. Objetivos específicos:**

- Caracterizar a alteração de sensibilidade a pH baixo em células BY-2 durante o final da fase lag, buscando:

(A) Examinar a relação entre a retomada do ciclo celular e a alteração de sensibilidade das células a pH baixo;

(B) Delimitar, com o uso de inibidores do ciclo celular, o período do ciclo em que há aumento da sensibilidade das células a pH baixo;

(C) Verificar se o aumento da sensibilidade a pH baixo está relacionado com a expansão celular ou com alterações no potencial osmótico da célula (e indiretamente com o potencial de pressão);

(D) Examinar o efeito da aplicação de ROS ( $H_2O_2$ ) ou de antioxidante (ascorbato) sobre a resposta de células sensíveis a pH baixo;

(E) Testar a hipótese de que a sensibilidade a pH baixo pode ser revertida por meio de um choque hipo-osmótico prévio;

(F) Avaliar o possível papel da modulação oxidativa da parede celular na reversão de sensibilidade das células a pH baixo com choque hipo-osmótico, através do uso de inibidores de NADPH oxidase e peroxidases e a aplicação de ROS ou antioxidantes.

**3.3. Objetivo complementar:**

(A) Avaliar o efeito de diferentes tampões, para possível uso em estudos a baixo pH, sobre o desempenho de células em cultura.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Cultura de células de tabaco BY-2

Para todos os ensaios foi utilizada a cultura de células de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2. A manutenção das mesmas foi feita de acordo com o protocolo descrito por Nagata et al. (1992) e Vitorello e Haug (1996). O meio de cultura é composto pelos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescidos de tiamina-HCl (1 mg/L); mio-inositol (100 mg/L); 2,4-D (0,22 mg/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (180 mg/L), sacarose (3%) e MES (0,5 g/L), com pH final ajustado para 5,7 com KOH 1M antes da esterilização em autoclave a 120°C por 20 min. Para o crescimento, as células foram cultivadas em incubadoras sob agitação orbital de 160 rpm a 28°C, no escuro. A manutenção da cultura foi realizada através de subcultivos semanais onde uma alíquota de 2 mL de cultura na fase estacionária (7 dias de cultivo) foi adicionada a 50 mL de meio de cultura novo, acondicionado em Erlenmeyer de 250 mL.

### 4.2. Ensaios para avaliação da sensibilidade das células a pH baixo

Neste trabalho, a sensibilidade das células a pH baixo foi avaliado por meio de um ensaio de curta duração (aproximadamente 50 min) onde alíquotas de células foram expostas a condições de pH 4,2 e 5,7 (controle).

Alguns ensaios preliminares foram realizados utilizando células com 20 h de subcultivo (já sensíveis a pH baixo) para verificar se diferentes condições de exposição a pHbaixo, resultariam em efeitos mais acentuados na sensibilidade das células. Os tratamentos consistiram em lavagens prévias combinadas com diferentes tempos de exposição ao pH baixo.

Células na fase estacionária (7dias) foram subcultivadas em meio MS por 20 h e em seguida tratadas com solução composta por 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl e 10 mM MES a pH 4,2 e pH 5,7 (controle).

Os tratamentos consistiram em lavagens prévias combinadas com diferentes tempos de incubação: T1) sem lavagem e 30 min de exposição; T2) uma lavagem prévia de 10 min e 30 min de exposição; T3) uma lavagem prévia de 10 min e 40 min de exposição; T4) uma lavagem prévia de 10 min e 60 min de exposição e T5) duas lavagens de 10 min cada e 30

min de exposição nas soluções de tratamento pH 4,2 e 5,7. Em seguida, para determinar o efeito do pH baixo sobre as células, foi avaliada a permeabilidade da membrana plasmática ao corante trypan blue. O tratamento T5 foi escolhido como padrão para todos os experimentos seguintes em virtude dos resultados obtidos no experimento acima descrito.

### **4.3. Avaliação da viabilidade celular**

Trypan blue é um corante de viabilidade celular. Células viáveis com membrana plasmática intactas não são coradas pelo trypan blue. Já células com qualquer tipo de dano que permita a passagem do corante são consideradas inviáveis e podem ser observadas ao microscópio óptico por uma coloração azul escura.

O uso do corante trypan blue foi baseado no trabalho de Vanaková et al. (2001), com as modificações abaixo descritas.

O corante trypan blue (0,4%) foi adicionado às células após a exposição às soluções de tratamento (pH 4,2 e 5,7) na proporção de 1:1 (v/v) por 5 min. Em seguida, as células foram lavadas com a solução controle pH 5,7 (2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl e 10 mM MES) para a retirada do corante e foram fotografadas em microscópio óptico AxioSkop 2 (Zeiss), equipado com câmara digital AxioCamMR3 (Carl Zeiss), para posterior determinação do índice de viabilidade celular.

Para determinação deste índice foi feita a contagem de no mínimo 500 células por tratamento. A contagem das células foi realizada com auxílio do software ImageJ (ABRAMOFF; MAGELHAES; RAM, 2004; RASBAND, 2009).

### **4.4. Uso de inibidores do ciclo celular**

Soluções estoque de olomoucina, roscovitina e afidicolina foram preparadas em DMSO (dimetil sulfóxido) numa concentração de 10 mM. As concentrações finais no meio de cultura foram respectivamente 50, 50 e 15 µM, sendo que a concentração final de DMSO no meio de cultura foi menor que 0,5% (v/v). A solução estoque de mimosina foi preparada em KOH na concentração de 2 mM (CHABOUTÉ et al., 1998; REICHELLED et al., 1998), o pH ajustado para 5,5 com HCl e a concentração final no meio de cultura foi de 2 mM.

A solução estoque de hidroxiuréia (HU) foi preparada em água na concentração de 2M e esterilizada por filtração. A concentração final no meio de cultura foi de 30 mM (PLANCHAIS et al., 2000; NAGATA et al., 1992).

Células na fase estacionária foram subcultivadas utilizando-se 0,8 mL de inóculo em frascos contendo 20 mL de meio de cultura já contendo os inibidores nas concentrações apropriadas. Em seguida as células foram incubadas a 28 °C e 160 rpm de agitação por 12, 20 e 24 horas. Após este período amostras destas células foram coletadas para determinação do índice mitótico (IM) e para o ensaio de sensibilidade a baixo pH.

#### **4.5. Avaliação do índice mitótico**

O índice mitótico das células foi avaliado pela coloração com orceína lactopropiônica (1%), com a qual é possível a observação de células em mitose. A solução estoque de orceína foi preparada a 0,1% (m/v) diretamente em uma solução de ácido lático e ácido propiônico 1:1 (v/v). Em seguida, a solução foi filtrada com membrana de 0,47 µm de diâmetro.

Para coloração, foram adicionadas duas partes de solução de orceína lactopropiônica para uma parte de solução de células. Em seguida as células foram levadas ao banho-maria onde permaneceram por 15 min a 60°C. Após o resfriamento da solução, foram preparadas as lâminas e foi feita a contagem de células em divisão ao microscópio óptico. Foram contadas pelo menos 500 células por tratamento.

#### **4.6. Avaliação da influência da auxina na transição do estado não sensível para o estado sensível ao pH baixo**

Para este experimento células com 7 dias foram subcultivadas utilizando-se 2 mL de inóculo para 50 mL de meio MS na presença e ausência da auxina 2,4-D (0,2 mg/L). As células foram subcultivadas por 12, 16, 20, 24 e 48 horas nos respectivos meios de cultura e, em seguida procedeu-se o ensaio de exposição a pH baixo e avaliação da viabilidade celular.

#### **4.7. Uso de bloqueadores de canais de potássio**

Para avaliar a influencia da atividade de canais de potássio na transição do estado não sensível para sensível a pH baixo, primeiramente foi realizado um experimento com o bloqueador de canais de potássio (de influxo e efluxo), TEA (tetraetilamônio), combinado com BaCl<sub>2</sub> (SANO et al., 2009).

As soluções estoque de TEA (tetraetilamônio) e BaCl<sub>2</sub> foram preparadas em água nas concentrações de 200 e 100 mM, respectivamente e posteriormente filtradas em membrana de 0,47 µM de diâmetro.

Um inóculo de 2 mL de células na fase estacionária (7dias) foi subcultivado em 50 mL de meio MS contendo 20 e 10 mM de TEA e BaCl<sub>2</sub> respectivamente. Alíquotas de células foram retiradas com 12, 20 e 24 horas após o subcultivo e foi realizado o ensaio de exposição a pH baixo.

Da mesma forma foi realizado o experimento usando o bloqueador de canais de efluxo de potássio CsCl<sub>2</sub> (cloreto de céσιο). A solução estoque de CsCl<sub>2</sub> também foi preparada em água numa concentração de 100 mM e filtrado em membrana de 0,47 µM de diâmetro. A concentração final no meio de cultivo foi de 10 mM.

#### **4.8. Avaliação da pressão osmótica de células**

Concentrações crescentes de manitol (0,2 a 0,7M) foram adicionadas a células subcultivadas por 12 e 24 h em meio MS. Após 1 h foi realizada a contagem de células plasmolisadas em cada concentração. Foram avaliadas pelo menos 500 células para cada concentração de manitol.

#### **4.9. Pré-tratamento de células sensíveis a pH baixo com soluções de diferentes níveis de nutrientes**

Para testar a hipótese de que baixa osmolaridade do meio de cultura causa a reversão da sensibilidade ao pH baixo em células BY-2, foram testados três meios com concentração molar crescente: meio mínimo (MM; 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl e 10 mM MES e 5 mM de

sacarose) com 36 mOsm, meio MS sem sacarose e 2,4D com 100 mOsm e meio MS sem 2,4D. A osmolaridade deste meio pode ser considerada muito próxima do meio MS completo (188,52 mOsm), pois a retirada do 2,4D (0,2 mg/L), não interfere na osmolaridade do meio. Este tratamento teve função de controle para o experimento. Células com 24 horas de subcultivo em meio MS foram transferidas para os respectivos meios de cultura com diferentes concentrações molares onde permaneceram por 2 e 4 horas. Em seguida foi realizado o ensaio de exposição ao pH baixo conforme já descrito.

#### **4.10. Pré-tratamento de células sensíveis a pH baixo com soluções hipo-osmóticas**

Para avaliar o efeito da duração do pré-tratamento hipo-osmótico, células com 24 horas de subcultivo em meio MS, foram transferidas para meio mínimo (MM), meio mínimo acrescido de manitol (188 mM) e meio MS completo (controle). A adição de manitol no segundo meio teve como objetivo de deixá-lo com osmolaridade semelhante ao do meio MS completo (188,52 mOsm). Alíquotas foram retiradas após 30, 60 e 120 min de subcultivo nos respectivos meios e seguiu-se o ensaio de exposição a pH baixo como já descrito anteriormente.

De maneira similar ao experimento anterior, foi realizada uma avaliação de possíveis diferenças na resposta ao tratamento hipo-osmótico utilizando outros dois osmólitos na substituição dos sais do meio MS: sorbitol e sacarose.

Células com 24 horas de subcultivo em meio MS foram transferidas para meio mínimo (MM), MM acrescido de manitol, MM acrescido de sorbitol, MM acrescido de sacarose, MS sem sacarose e MS completo (controle). As células foram subcultivadas por 60 min em cada um dos tratamentos e em seguida submetidas ao ensaio de exposição ao pH baixo como já descrito anteriormente.

## 4.11. Aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ascorbato

### 4.11.1. Em células na fase sensível a pH baixo

Foram avaliados os efeitos do peróxido de hidrogênio e ascorbato em células na fase sensível ao pH baixo. Células na fase estacionária (7 dias) foram subcultivadas por 24 horas. O meio de cultura foi retirado e as células foram submetidas ao ensaio de exposição a pH baixo na ausência presença de 5 μM de peróxido de hidrogênio e da mesma forma, 100 μM de ácido ascórbico em tratamentos independentes. Em seguida as células foram coradas com trypan blue e fotografadas para determinação da viabilidade celular.

### 4.11.2. Em células durante o pré-tratamento hipo-osmótico

Neste experimento foi avaliado se a adição de peróxido de hidrogênio teria efeito na sensibilidade de células submetidas ao tratamento hipo-osmótico.

Células com 24 horas de subcultivo em meio MS foram transferidas para meio mínimo (MM) e MM acrescido de manitol na ausência e presença de 5 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O meio MS completo foi usado como controle. Aliquotas de células foram retiradas após 30 e 60 min de subcultivo nos respectivos tratamentos e seguiu-se o ensaio de exposição a pH baixo como já descrito anteriormente.

Em seguida foi avaliado se a adição da mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teria efeito na diminuição de sensibilidade de células expostas a pH 4,2 tratadas com MM acrescido de manitol e por fim se o manitol poderia ter efeito de “scavenger” nos tratamentos onde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado. Neste último caso, o manitol foi substituído por concentração equivalente de sorbitol na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As condições experimentais foram mantidas com exceção dos dois últimos experimentos as células permaneceram por 60 min nos respectivos tratamentos para então serem submetidas ao ensaio de exposição ao pH baixo.

#### **4.12. Uso de inibidores de NADPH oxidase e de peroxidases**

Inibidores de NADPH oxidase e peroxidases foram testados para avaliar o papel destas enzimas nas alterações de sensibilidade a pH baixo. O uso destes inibidores já é bem estabelecido (CROSS; JONES, 1986; FOREMAN et al., 2003) sendo comumente empregados. Entretanto, nem sempre são totalmente específicos com relação aos seus efeitos (BARCELO, 1998). O inibidor de NADPH oxidase utilizado foi o DPI (diphenylene iodonium) e os inibidores de peroxidases, o KCN (cianeto de potássio) e o ácido salicilhidroxâmico (SHAM; salicylhydroxamic acid).

Células na fase estacionária cultivadas por 24 horas foram transferidas para meio mínimo na presença de 50  $\mu$ M de DPI, 100  $\mu$ M de SHAM e 1mM de KCN onde permaneceram por 60 min sob agitação. Em seguida foram expostas a pH 4,2 e 5,7. As células foram então fotografadas e foi calculado o índice de viabilidade celular. Foram incluídos controles com estes inibidores em células que permaneceram no meio MS e também um controle com células em meio MS acrescido de DMSO, utilizado do preparo das soluções estoque. O volume de DMSO transferido para o meio de cultura foi de 1%.

#### **4.13. Avaliação do efeito de diferentes tampões a pH baixo em células BY-2**

Os testes com os tampões têm objetivo de avaliar possíveis efeitos tóxicos para as células. A escolha dos tampões foi feita com base em seus valores de pKa (constante de dissociação do ácido) e com base em relatos na literatura do uso destes compostos em células vegetais (KOCHIAN et al., 2003; SAMAC et al., 2003; KINRAIDE; SWEENEY, 2001; BIBIKOVA et al., 1998; BRACCINI et al., 2000; MADHAVA RAO et al., 2006; FOUAD; RATHINASABAPATHI, 2006; HAMMER et al., 2003).

A tabela abaixo mostra os tampões testados e suas respectivas constantes de dissociação.

Tabela 1 - Tampões testados nos experimentos e seus respectivos valores de pKa

<i>Tampões</i>	<b>Homopipes (25°C)</b>	<b>DMGA (25°C)</b>	<b>β-alanina (30°C)</b>	<b>Biftalato de Potássio ( 25°C)</b>	<b>MES (25°C)</b>
pKa <sub>1</sub>	4,4	3,73	3,70	2,95	6,15
pKa <sub>2</sub>	8,1	6,71	10,10	5,41	----

Foram realizados testes preliminares em pH 5,7 para avaliar o crescimento, flutuação de pH no meio de cultura e viabilidade das células na presença de cada um dos tampões. O tampão MES foi usado como controle em todos os experimentos. Células na fase estacionária foram subcultivadas em meio novo na presença de 10 mM de cada tampão. Esta é a concentração de tampão MES utilizada nos ensaios a pH baixo e que é comumente encontrada na literatura para este tipo de experimento. Assim, padronizou-se esta concentração para os demais tampões. Após o subcultivo, as células permaneceram por sete dias na presença dos tampões e amostras foram coletadas diariamente para avaliação do crescimento, do pH do meio de cultura e da viabilidade celular.

O segundo experimento foi realizado a pH 4,5 seguindo o mesmo procedimento do experimento a pH 5,7, entretanto somente com os tampões homopipes e MES (controle). O tampão homopipes foi escolhido por ser o único dentre os tampões testados a pH 5,7 que proporcionou crescimento da cultura de forma semelhante ao obtido com uso do tampão MES.

Alíquotas de células foram utilizadas para o ensaio de sensibilidade a pH baixo, seguido da avaliação da viabilidade celular.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Caracterização da sensibilidade a pH baixo de células BY-2 na fase lag da cultura**

Em trabalho anterior (SOUZA, 2004), foi encontrado que a suscetibilidade de células BY-2 ao acúmulo de Al em culturas sincronizadas apresentou aumento significativo em dois momentos distintos. Um ocorreu no final da fase lag da cultura, entre 10 e 16 h de subcultivo, e outro durante e imediatamente após a mitose. Nesses estudos, as células que se mostraram suscetíveis ao acúmulo de Al também se mostraram sensíveis a pH baixo.

Assim, na primeira parte deste trabalho buscou-se confirmar, caracterizar e investigar causas para a alteração de sensibilidade a pH baixo no final da fase lag da cultura. Este período foi escolhido por dois motivos principais. Primeiro, porque durante este período as células não encontram-se em expansão e o aumento de sensibilidade a pH baixo ocorre antes que haja taxas expressivas de divisão celular. O fato das células não se encontrarem em expansão é uma exceção ao que geralmente tem sido observado, onde células em expansão são sensíveis a pH baixo. O segundo motivo foi principalmente metodológico, pois o estudo desta fase não exige a sincronização celular, o que é geralmente trabalhoso e caro.

#### **5.1.1. Determinação das condições do ensaio para avaliação da sensibilidade das células a pH baixo**

Neste trabalho, a sensibilidade das células a pH baixo não foi avaliada através da exposição contínua das células a esta condição, mas sim, através de um ensaio de curta duração (aproximadamente 50 min) onde alíquotas de células foram coletadas do meio de cultura ou dos respectivos tratamentos e foram expostas a condições de pH 4,2 e 5,7 (controle). Após a exposição, a sensibilidade foi avaliada pela determinação da viabilidade celular com uso de trypan blue, conforme descrito na metodologia.

Um ensaio preliminar foi realizado utilizando células com 20 h de subcultivo (já sensíveis a pH baixo) em que se buscou avaliar diferentes condições para o ensaio de exposição a pH baixo. Estas condições dizem respeito a lavagens prévias combinadas com diferentes tempos de exposição às soluções de tratamento. O propósito deste ensaio foi encontrar uma condição que resultasse em uma boa diferenciação entre células tratadas a pH

5,7 e 4,2, sem necessariamente resultar em viabilidade celular demasiadamente baixa a pH 4,2.

Como a solução de tratamento utilizada (MM; 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl e 10 mM MES) não possui boa capacidade tamponante na faixa de pH estudado (pH 4,2 a 5,7) as lavagens prévias foram realizadas com a preocupação de minimizar possíveis alterações do pH externo causado pelo metabolismo celular. Entre os tampões “Good” (GOOD et al., 1966), que são conhecidamente compatíveis para estudos com células vivas, o MES é o que possui menor valor de pKa (6,1). Portanto, mesmo não sendo o tampão mais adequado para os experimentos, foi utilizado pela falta de alternativa de tampão compatível para estudos *in vivo*.

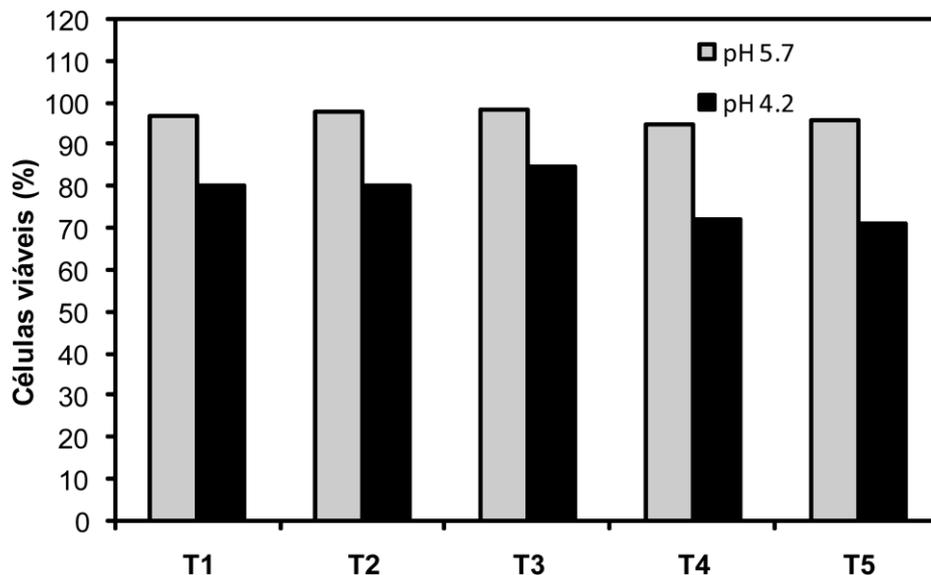


Figura 1 – Efeito de pré-lavagens e diferentes tempos de exposição ao pH baixo na viabilidade de células BY-2 com 20 h de subcultivo. A solução de tratamento foi composta por 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl e 10 mM MES com pH ajustado para 4,2 e 5,7. As diferentes combinações de exposição foram: T1= sem pré-lavagem + 30 min de exposição; T2= pré-lavagem de 10 min + 30 min de exposição; T3= pré-lavagem de 10 min + 40 min de exposição; T4= pré-lavagem de 10 min + 60 min de exposição e T5= duas pré-lavagens de 10 min cada + 30 min de exposição. Após a incubação das células nestas condições, a viabilidade celular foi avaliada usando o corante trypan blue 1:1 (v/v) por 5 min

Os resultados representados na Figura 1 indicaram que a maneira com que as células são expostas ao pH baixo tem influência na resposta em termos de viabilidade celular. Ainda que as diferenças entre os tratamentos não tenham se mostrado muito acentuadas, no

tratamento T5 observou-se uma queda de 25% na viabilidade das células tratadas a pH 4,2 em relação a pH 5,7. Isto já foi suficiente para que esta condição de exposição fosse adotada para todos os ensaios seguintes na avaliação da sensibilidade celular a pH baixo.

Em ensaios posteriores, verificou-se que células com 24 h de subcultivo possuíam sensibilidade mais acentuada a pH baixo do que células com 20 h, demonstrando assim, diferenças ainda maiores em termos de viabilidade celular em relação ao controle a pH 5,7 para as mesmas condições descritas do ensaio de exposição a pH baixo.

### **5.1.2. Alteração da sensibilidade de células BY-2 a pH baixo durante a fase lag**

Sabendo-se que a sensibilidade de células BY-2 a pH baixo sofre alterações no decorrer da fase lag da cultura, buscou-se confirmar e acompanhar esta alteração de sensibilidade no tempo, inclusive porque o momento exato em que isto ocorre pode variar dependendo das condições da cultura, assim como a intensidade da resposta também depende das condições de exposição das células ao pH baixo.

Foram realizados experimentos em que se avaliou a sensibilidade das células ao pH baixo em cinco pontos, entre 8 e 24 h depois do subcultivo de células em meio de cultura novo, a partir de culturas na fase estacionária. Em cada ponto amostrado, a sensibilidade ao pH baixo foi avaliada em ensaios onde as células foram expostas às soluções de tratamento pH 4,2 e 5,7 (controle) conforme as condições adotadas (tratamento T5, Figura 1).

Observou-se um aumento contínuo na sensibilidade das células a partir de 12 h de cultivo, alcançando os níveis mais altos com 24 h (Figura 2A). O aumento na sensibilidade ao pH baixo foi um pouco tardio e menos acentuado do que se esperava a partir dos resultados de Souza (2004), que apresentaram um aumento mais acentuado na suscetibilidade ao acúmulo de Al já com 16 horas após o subcultivo. No entanto, a relação entre a sensibilidade a pH baixo e a suscetibilidade ao acúmulo de Al não é necessariamente estreita, e nas curvas de suscetibilidade ao acúmulo de Al obtidas por Souza (2004), apenas foram realizadas observações de queda na viabilidade celular a pH baixo, sem ser realizada a contagem das células para o cálculo da porcentagem de viabilidade. Entretanto, o motivo mais provável das diferenças em relação ao que se esperava é que durante a execução deste trabalho, as culturas aparentemente apresentaram grau de sincronização um pouco menor do que as utilizadas por Souza (2004). Como já mencionado, estas alterações podem ocorrer devido a variações nas condições de cultivo das células.

É importante considerar que a curva apresentada na Figura 2A provavelmente não é resultante de aumentos gradativos da sensibilidade de células individualmente, mas sim resultante do fato de células atingem um estágio crítico de sensibilidade em momentos distintos (Figura 2B). Assim, o grau de sincronização das células determinará se a curva será mais ou menos acentuada.

A avaliação de parâmetros morfométricos indicou que células com 24 h de subcultivo não aumentaram de tamanho em relação a células com 12 h, mas ao contrário, apresentaram área cerca de 15% menor. Células com 12 h de subcultivo apresentaram área média de 2376  $\mu\text{m}^2$  (e.p. = 52,2) enquanto células com 24 h apresentaram área média de 2014  $\mu\text{m}^2$  (e.p. = 54,5). No entanto, o índice de circularidade aumentou de 0,705 (e.p. = 0,0068) com 12 h para 0,730 (e.p. = 0,0067) com 24 h, indicando as células ficaram mais arredondadas.

Após a caracterização da curva de sensibilidade, os demais experimentos foram realizados em células com 24 horas de subcultivo (período de maior sensibilidade ao pH baixo).

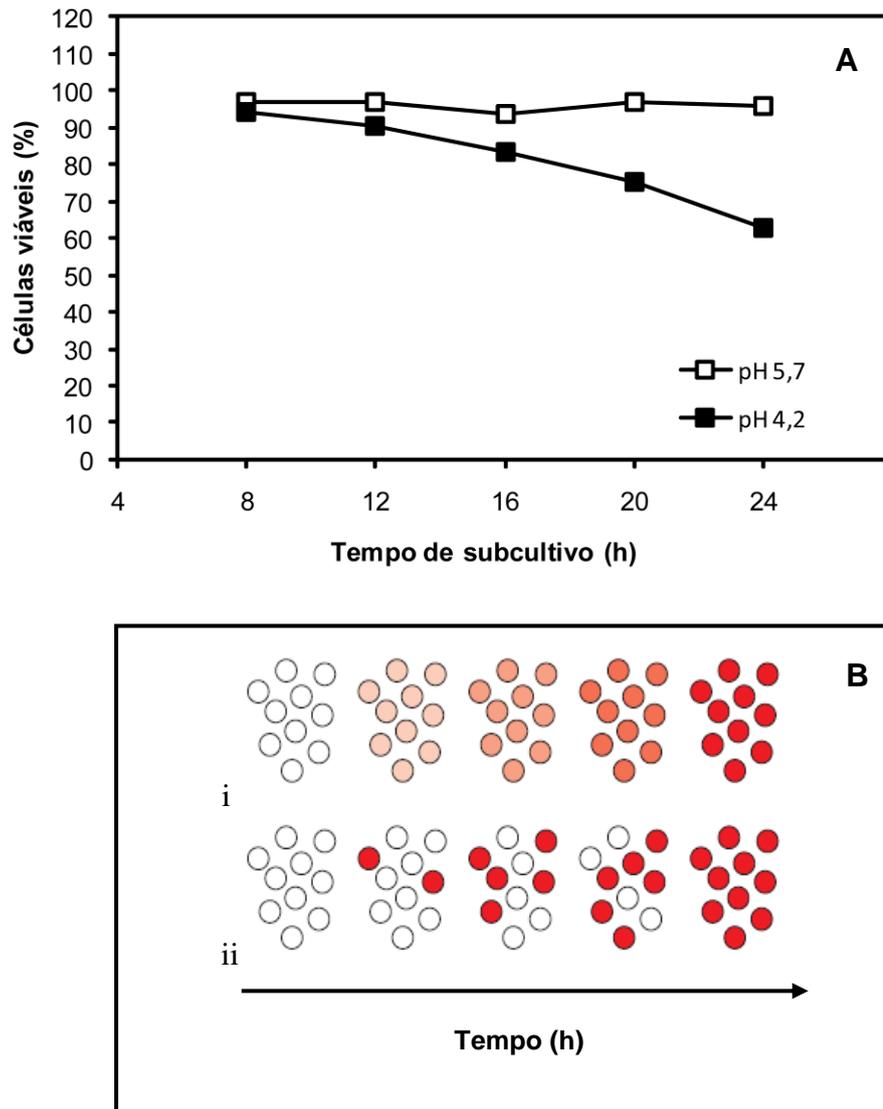


Figura 2 – Alteração da viabilidade de células BY-2 após o ensaio de exposição a pH baixo (A). Alíquotas de células foram amostradas após diferentes tempos de subcultivo e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH 4,2 e 5,7 (controle) que consistiu de duas pré-lavagens de 10 min cada + 30 min de exposição em solução 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl e 10 mM MES. Os dados são médias de 2 a 5 repetições. (B) Ilustração demonstrando que as alterações na viabilidade celular não são gradativas (i), mas sim resultado de uma medida discreta (ii). Portanto, variações neste índice são indicativos da porcentagem de células sensíveis ao ensaio de pH baixo em determinado momento. O aumento gradativo na porcentagem de células sensíveis é função do grau de sincronização da cultura

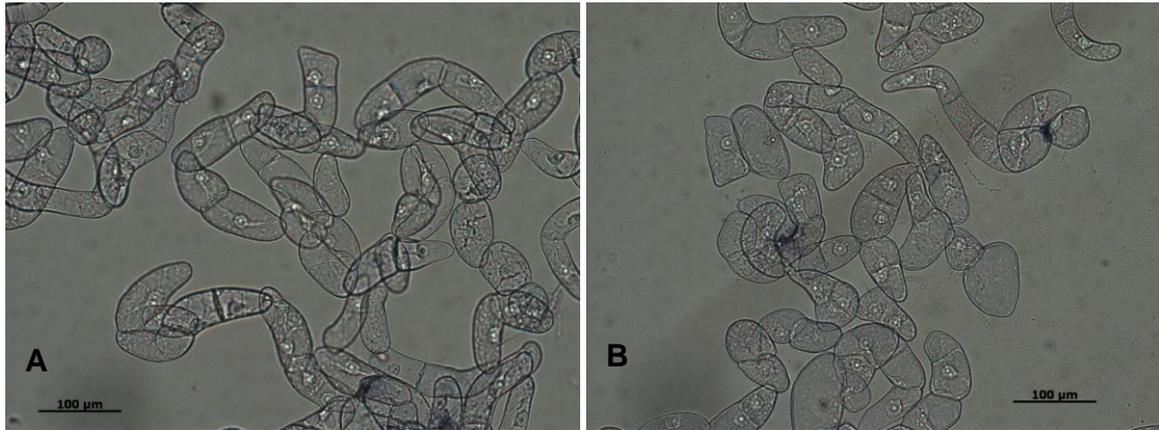


Figura 3 – Fotos ilustrando células BY-2 com 12 h de subcultivo (A) e com 24 h de subcultivo (B).

### 5.1.3. Auxina é necessária para transição do estado não sensível para o estado sensível a pH baixo

Sabe-se que a auxina é requerida pela cultura de células de BY-2 para o crescimento e divisão celular. Na ausência de auxina, as células não se dividem e aumentam em tamanho (WINICUR; ZHANG; STAEHELIN, 1998). Para verificar se a alteração na sensibilidade a pH baixo depende da presença de auxina e/ou se a expansão celular influencia na sensibilidade das células a pH baixo, ensaios foram realizados onde as células foram cultivadas na ausência de 2,4-D.

Como parte da caracterização da transição de sensibilidade a pH baixo entre células com 12 e 24 h, encontrou-se que a presença da auxina 2,4-D é necessária para que tal transição ocorra (Figura 4). A viabilidade de células expostas a pH 4,2, cultivadas na ausência de 2,4-D foi alta em todos os pontos amostrados em comparação às células tratadas a pH 5,7. Ou seja, células cultivadas na ausência de 2,4D se mostraram insensíveis a pH baixo, independente do tempo de cultivo, ao contrário de células cultivadas na presença desta auxina, que sofreram alteração na sensibilidade a pH 4,2. Células expostas a pH 5,7 não sofreram alterações na viabilidade celular em nenhum dos tratamentos.

Conforme mencionado, o 2,4-D é necessário para a progressão normal da cultura pelo ciclo celular, não havendo divisão na sua ausência. Curiosamente, outra exceção foi encontrada na suposta relação entre expansão celular e sensibilidade a pH baixo.

A avaliação de parâmetros morfométricos indicou que células cultivadas na ausência de 2,4D aumentaram de tamanho (Figura 5), mas não se tornaram sensíveis a pH baixo. Células com 24 h de subcultivo na presença de 2,4-D apresentaram área média de  $2014 \mu\text{m}^2$  (e.p. = 54,5) enquanto células na ausência de 2,4-D apresentaram área média de  $3269 \mu\text{m}^2$  (e.p. = 76,7). A expansão nestas células parece ser mais devagar e de forma não homogênea entre as células, diferente do que normalmente ocorre.

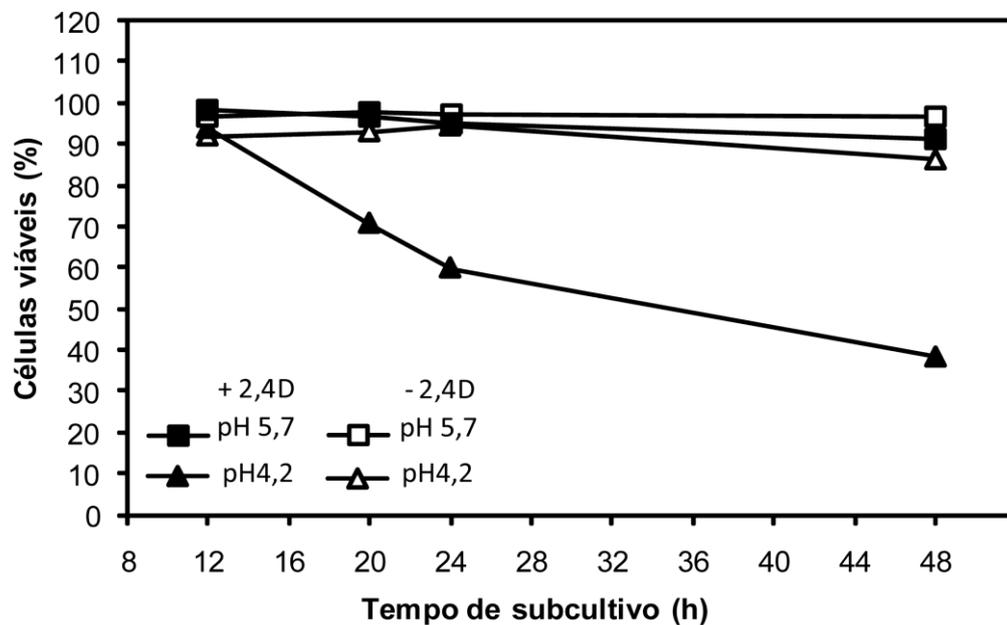


Figura 4 - Efeito de 2,4D na alteração da sensibilidade de células à exposição a pH baixo com o tempo de subcultivo. Células foram subcultivadas em meio de cultura MS com e sem 2,4D. Alíquotas de células foram retiradas após diferentes tempos de subcultivo e submetidas ao ensaio de sensibilidade ao pH baixo. A determinação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito na Figura 2. Médias de 2 experimentos independentes

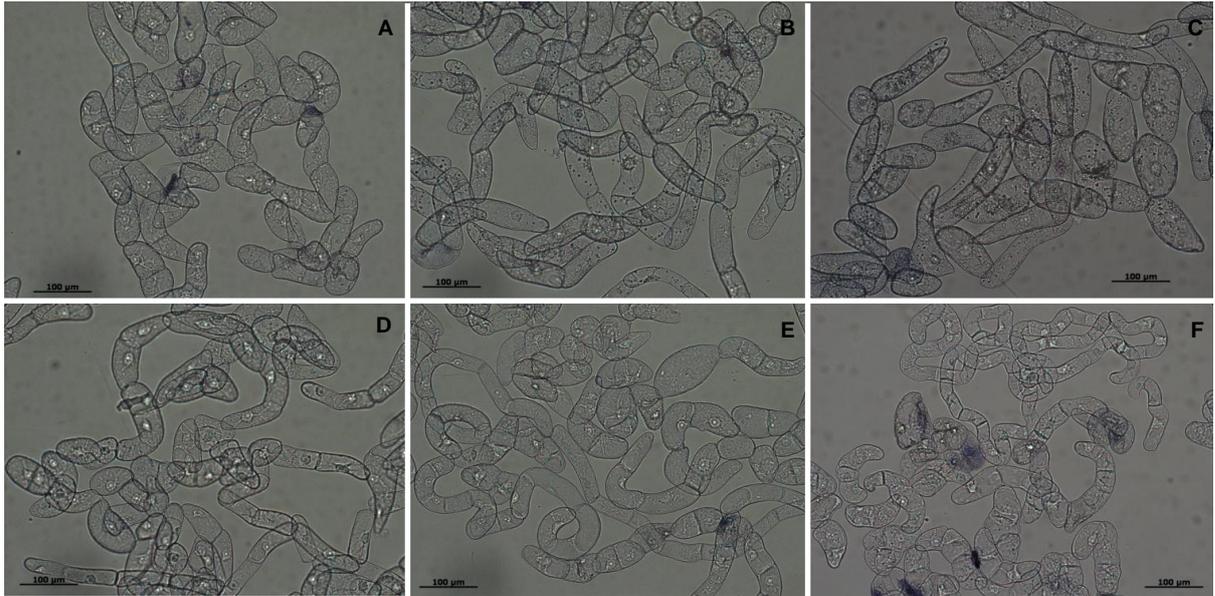


Figura 5 – Células cultivadas na presença e ausência de 2,4D. Fotos A, B e C – células cultivadas por 12, 24 e 48 h respectivamente na ausência de 2,4D. Fotos D, E e F - células cultivadas por 12, 24 e 48 h respectivamente na presença de 2,4D.

#### 5.1.4. A atividade de canais de $K^+$ também é necessária para transição do estado não sensível para o estado sensível a pH baixo

Sano et al. (2007) demonstraram que se um limiar de potássio intracelular não for ultrapassado durante a fase lag da cultura, as células BY-2 atrasam o seu progresso no ciclo celular. Estratégias como o uso de bloqueadores de canais de potássio, cultivo das células em meio com concentração de potássio reduzida e estudo da expressão diferencial de genes que codificam canais retificadores do influxo e efluxo de potássio indicaram que a progressão normal do ciclo celular é dependente da atividade de canais de  $K^+$ .

Com base nos resultados acima citados, e outros mais recentes (SANO et al., 2009) foi realizada uma avaliação do possível papel de canais de potássio na transição de sensibilidade ao pH baixo durante o final da fase lag da cultura. Para isto foram usados dois bloqueadores de canais de  $K^+$  em conjunto, tetraetilamônio (tetraethylammonium, TEA) +  $BaCl_2$  que inibem tanto canais que regulam o influxo quanto o efluxo de  $K^+$  e  $CsCl_2$  bloqueador de canais que regulam o influxo de  $K^+$ .

Células na fase estacionária foram subcultivadas em meio MS acrescido de 20 mM de TEA + 10 mM de  $BaCl_2$  onde permaneceram por até 24 h.

Os resultados demonstram que células tratadas com os bloqueadores de canais de  $K^+$  por 24 h apresentaram menor queda da viabilidade celular quando submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH baixo do que células controle (Figura 6).

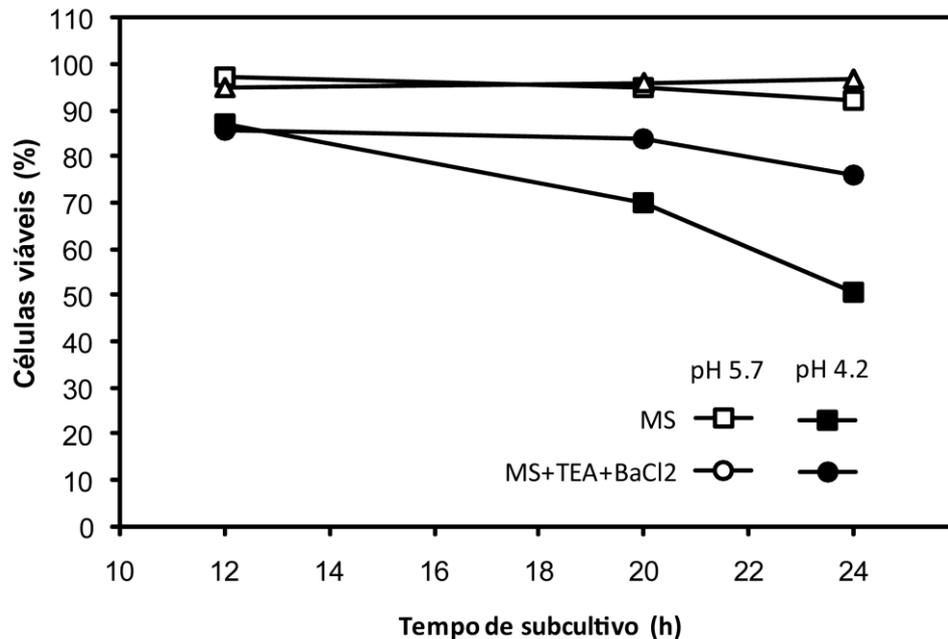


Figura 6 - Efeito da ação dos bloqueadores de canais de potássio TEA e  $BaCl_2$  na alteração da sensibilidade de células à exposição a pH baixo ao longo do tempo de subcultivo. Células na fase estacionária (7dias) foram subcultivadas em meio MS na presença de 20 mM de TEA e 10 mM de  $BaCl_2$ . Alíquotas de células foram retiradas após diferentes tempos de subcultivo e submetidas ao ensaio de sensibilidade ao pH baixo. A determinação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito na Figura 2. Médias de 2 experimentos independentes

No experimento em que  $CsCl_2$  foi empregado, também foi observado uma queda na sensibilidade das células a pH baixo após 24 h (Figura 7), entretanto este efeito foi menor do que no tratamento TEA +  $BaCl_2$  (Figura 6).

Baseado nos trabalhos anteriores de Sano et al. (2007; 2009), estes dados indicam que, de forma semelhante ao progresso no ciclo celular, a atividade de canais de  $K^+$  afeta a transição de sensibilidade a pH baixo que ocorre no final da fase lag em células BY-2. Entretanto, para elucidar o grau de envolvimento de cada tipo de canal é necessário o uso de

outros bloqueadores, como por exemplo, os específicos para a inibição da atividade de canais de efluxo de potássio.

Estes dados complementam os ensaios em que foram empregados bloqueadores do ciclo celular e remoção de 2,4-D.

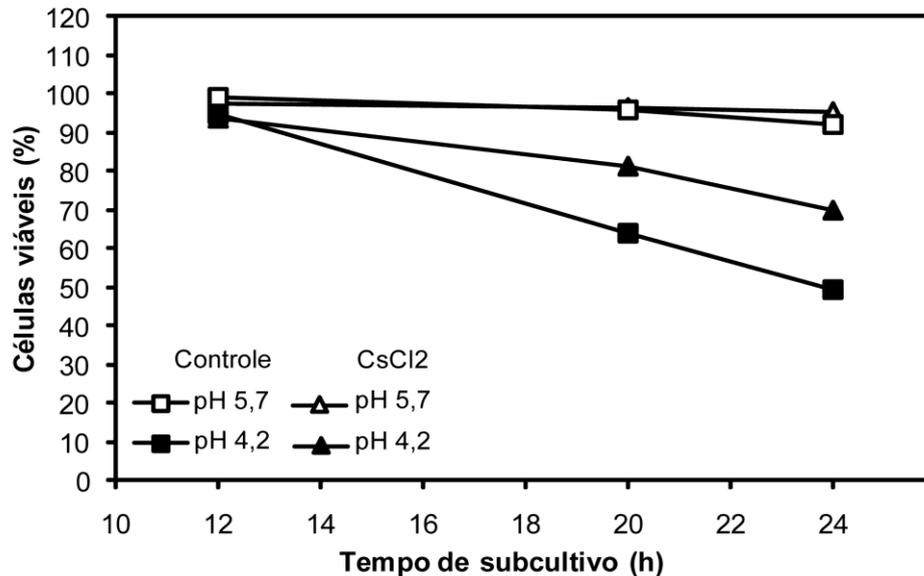


Figura 7 – Efeito da ação do bloqueador de canais de potássio CsCl<sub>2</sub> na alteração da sensibilidade de células à exposição a pH baixo ao longo do tempo de subcultivo. Células na fase estacionária (7dias) foram subcultivadas em meio MS na presença de 10 mM de CsCl<sub>2</sub>. Alíquotas de células foram retiradas após diferentes tempos de subcultivo e submetidas ao ensaio de sensibilidade ao pH baixo. A determinação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito na Figura 2. Resultados de um experimento

### 5.1.5. O aumento de sensibilidade ao pH baixo ocorre antes da transição G1/S do ciclo celular

Utilizando a afidicolina, um inibidor da DNA polimerase que bloqueia a progressão da fase S do ciclo celular, Souza (2004) mostrou que um aumento na suscetibilidade de células BY-2 ao acúmulo de AI ocorre no final da fase lag da cultura e antes das células entrarem na fase S. Estes resultados são um indicativo indireto de que comportamento semelhante ocorre com relação à sensibilidade ao pH baixo. Lorca e Valdez (2001), também observaram

mudanças na expressão diferencial de proteínas em *Lactobacillus acidophilus* tolerantes a baixo pH, indicando que há uma modificação na expressão gênica ao longo do ciclo celular.

Juntamente com a afidicolina, a propizamida (inibidor da formação de microtúbulos que impede a progressão das células nos eventos iniciais da mitose) é um dos inibidores mais utilizados em estudos com células vegetais (DEWITTE; MURRAY, 2003).

A olomoucina e a roscovitina são inibidores específicos de CDKs. No trabalho de Glab et al. (1994) a olomoucina mostrou-se eficiente na inibição da proliferação de células de *Arabidopsis* e petúnia em duas situações: na passagem da fase G1 para S e da fase G2 para M, o que indica que o complexo CDK/ciclina controla estas duas transições no ciclo celular vegetal.

A roscovitina demonstrou inibir a atividade de CDKs (CDK1 e CDK2) em humanos em concentrações 10 a 100 vezes menores do que a olomoucina (DE AZEVEDO et al., 1997; HAVLICEK et al., 1997). Ainda, a reversibilidade e especificidade fazem destas drogas alternativas para estudos de sincronização celular.

Como não se sabe precisamente em que momento do ciclo celular ocorre a mudança de sensibilidade do estado não sensível para o estado sensível a pH baixo, buscou-se usar um conjunto de inibidores que atuam em pontos diferentes do ciclo celular: a afidicolina e a hidroxiureia - HU (DOBREV, 2002) que também bloqueia o ciclo celular na fase S, antes da duplicação total do DNA; e outros três inibidores: roscovitina, olomoucina e mimosina (CHABOUTÉ et al., 1998) que agem no final da fase G1 do ciclo, em pontos e com mecanismos de ação diferentes.

Esta informação é interessante, pois abre uma série de perspectivas para estudos futuros no que diz respeito, por exemplo, a análises de expressão diferencial de genes e proteínas, adaptações bioquímicas e fisiológicas ao estresse por pH baixo, entre outras possibilidades.

Os dados obtidos com HU e afidicolina mostraram aumento da sensibilidade (diminuição da viabilidade celular) ao pH baixo mesmo na presença de ambas as drogas, como mostra a Figura 8. Portanto, o aumento da sensibilidade ocorreu antes do ponto de bloqueio das mesmas. A eficiência das drogas como bloqueadores foi comprovada pela ausência de células em divisão (IM=0).

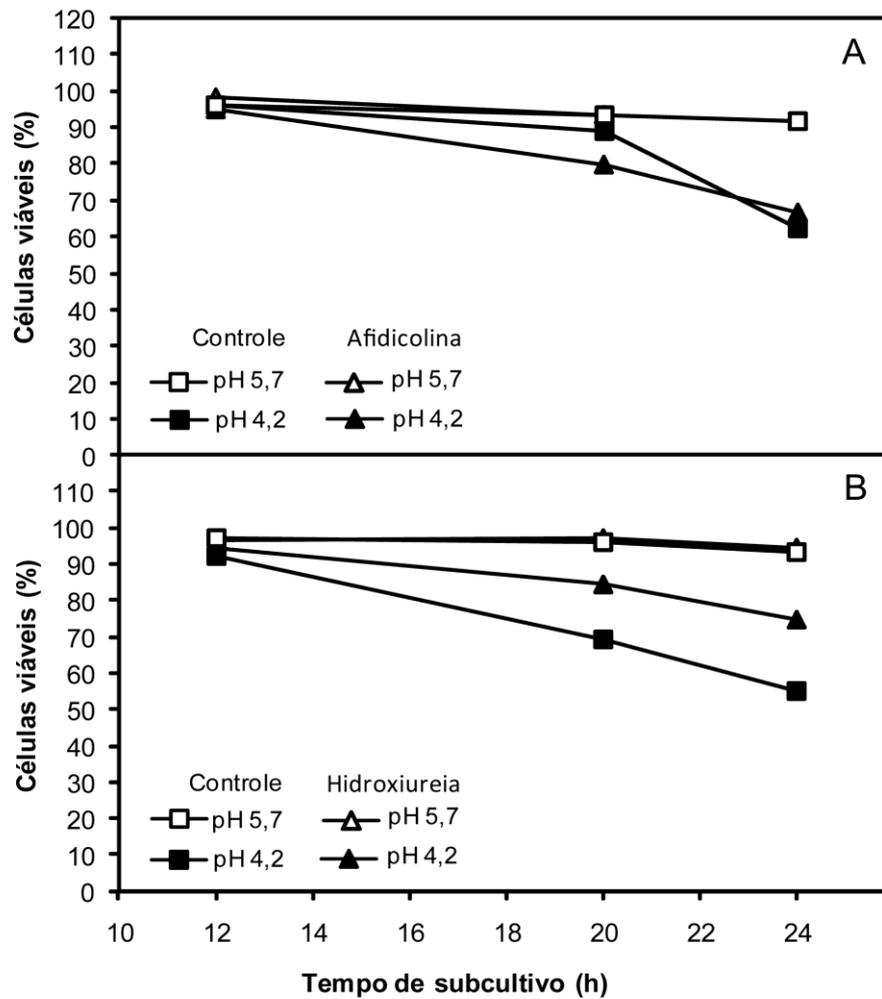


Figura 8 - Efeito dos inibidores do ciclo celular, afidicolina (A) e hidroxiuréia (B), na alteração da sensibilidade de células BY-2 à exposição a pH baixo ao longo do tempo de subcultivo. As células foram subcultivadas na ausência e presença de afidicolina (15  $\mu$ M) e hidroxiuréia (30 mM). Alíquotas foram retiradas após diferentes tempos de subcultivo e submetidas ao ensaio de sensibilidade ao pH baixo e foi determinado a viabilidade celular. Os resultados são referentes a um único experimento

Os resultados com os inibidores roscovitina e mimosina que atuam no final da fase G1 do ciclo também mostraram aumento da sensibilidade (diminuição da viabilidade celular) ao pH baixo mesmo na presença destas drogas (Figura 9A e 9B respectivamente), ou seja, da mesma maneira que ocorreu com a afidicolina e HU o aumento da sensibilidade ocorreu antes do ponto de bloqueio destas drogas, comprovado pela ausência de células em divisão (IM=0). Células tratadas com mimosina (Figura 9B) mesmo a pH 5,7 apresentaram ligeira queda na viabilidade celular ao final das 24 horas de cultivo, indicando que existe a necessidade de um estudo mais detalhado para avaliação de possível toxicidade desta droga.

Em células tratadas com olomoucina (Figura 9C) foi encontrado o mesmo padrão acima mencionado. Entretanto, a presença de células em divisão indica que, por motivos desconhecidos, a droga não foi eficiente no bloqueio do ciclo celular, diminuindo a confiabilidade dos dados obtidos com o uso desta droga.

Com os dados acima apresentados e obtidos até o momento podemos inferir que o aumento de sensibilidade ao pH baixo ocorre antes do ponto de bloqueio de todas as drogas testadas até o momento, ou seja, antes da transição G1/S do ciclo celular.

Entretanto, esta estratégia é de certa maneira limitada para estudos onde se pretende identificar eventos que ocorrem em pontos específicos do ciclo celular, já que dependente da disponibilidade de inibidores que atuem em diferentes pontos do ciclo celular com algum conhecimento prévio do modo de ação e possível toxicidade em células vegetais.

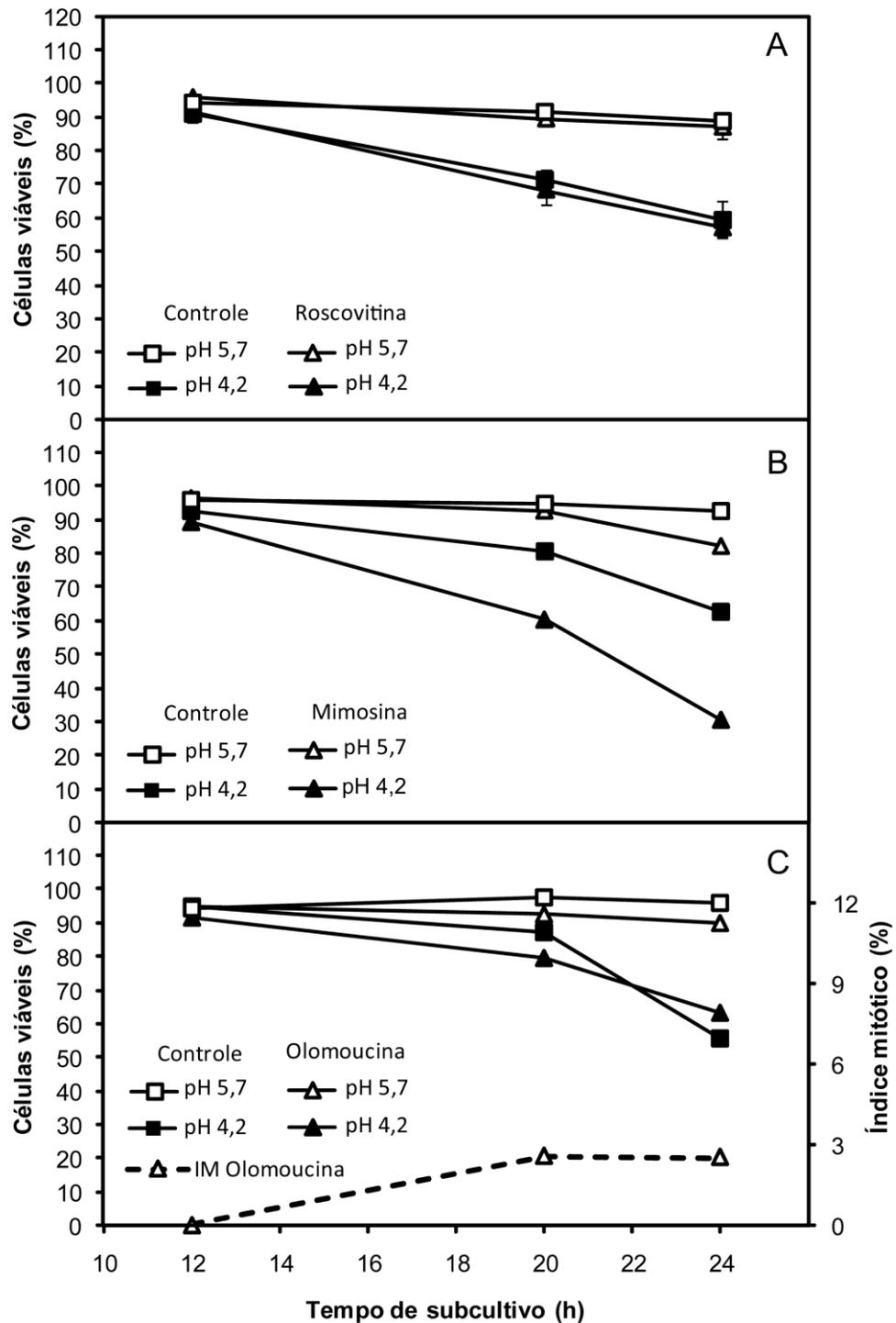


Figura 9 - Efeito dos inibidores do ciclo celular, roscovitina (A), mimosina (B) e olomoucina (C), na alteração da sensibilidade de células BY-2 à exposição a pH baixo ao longo do tempo de subcultivo. As células foram subcultivadas na ausência e na presença de roscovitina (50  $\mu$ M), mimosina (2 mM) e olomoucina (50  $\mu$ M). Alíquotas de células foram retiradas após diferentes tempos de subcultivo e submetidas ao ensaio de sensibilidade ao pH baixo conforme a Figura 2. (A) As barras indicam o erro padrão da média (n = 3); (B) e (C), resultados referentes a um único experimento

### **5.1.6. Alterações na osmolaridade intracelular não influenciam na transição do estado não sensível para o estado sensível a pH baixo**

Conforme mencionado, uma das hipóteses deste trabalho é que a sensibilidade diferencial de células BY-2 ao pH baixo durante a fase lag seja causada por desarranjos na parede celular, o que pode comprometer sua integridade e tornar as células mais suscetíveis ao pH baixo. Portanto, o aumento na pressão de turgor celular pode ser um fator que influencia na sensibilidade de células a pH baixo. Como foi demonstrado que a atividade de canais de  $K^+$  influencia a alteração da sensibilidade das células a pH baixo, procurou-se determinar se a osmolaridade interna das células é alterada durante este período.

Assim, a pressão osmótica (osmolaridade) de células com 12 e 24 horas de subcultivo foi estimada pelo método de plasmólise. Concentrações crescentes de manitol foram adicionadas às células e a porcentagem de células plasmolisadas foi determinada para cada concentração, permitindo a obtenção de uma curva de plasmólise em função da concentração externa de manitol.

Foram encontradas pequenas diferenças na pressão osmótica das células com 12 e 24 h de subcultivo (Figura 10). Quando a pressão osmótica do meio foi aumentada pela adição de manitol, células com 12 horas exigiram maiores concentrações de manitol para chegar ao mesmo grau de plasmólise em comparação a células com 24 h. Isto significa que a pressão osmótica das células e, conseqüentemente a pressão de turgor, sofreu uma pequena redução de 12 para 24 h, o que está de acordo com os dados de Sano et al. (2007).

Assim, constatou-se que alterações na pressão de turgor celular não é um fator que contribui para o aumento de sensibilidade das células a pH baixo entre 12 e 24 h de subcultivo.

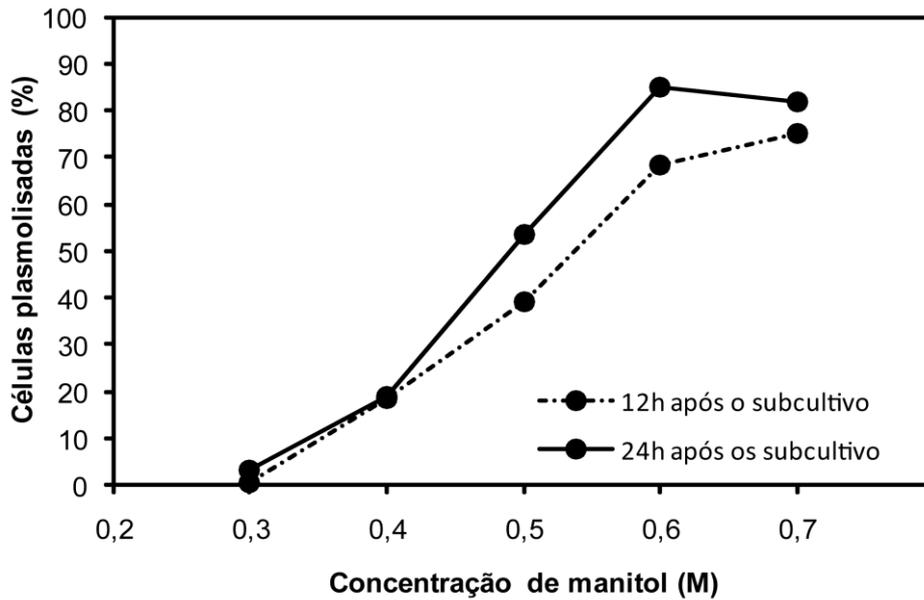


Figura 10 - Diferenças na pressão osmótica em células BY-2 com 12 e 24 h de subcultivo, avaliada pelo método de plasmólise em soluções com diferentes osmolaridades. Alíquotas de células foram coletadas nos respectivos tempos e incubadas a concentrações crescentes de manitol e a porcentagem de células plasmolisadas foi determinada pela contagem de no mínimo 500 células por tratamento. Médias de 2 experimentos independentes

### 5.1.7. A aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminui a suscetibilidade de células sensíveis a pH baixo

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio – ROS (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>•</sup>) têm papel importante na modulação da extensibilidade da parede celular (LISZKAY; KENK; SCHOPFER, 2003; PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004), sendo pela ação direta destas espécies reativas com componentes da parede celular ou pela ação de peroxidases. Monshausen et al. (2007) demonstraram que a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultou em interrupção do crescimento e inibição da ruptura (a pH baixo) dos pêlos radiculares enquanto que a remoção de ROS via antioxidantes levou a ruptura celular.

Em células BY-2 com 24 horas de cultivo (período de maior sensibilidade ao pH baixo), a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no ensaio de sensibilidade a pH baixo resultou em diminuição da sensibilidade celular, comparado com células expostas aos mesmos tratamentos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 11). Por sua vez, a adição de ácido ascórbico como agente antioxidante

praticamente não afetou a viabilidade celular. Não foi observado efeito tóxico do peróxido de hidrogênio, visto que a porcentagem de células viáveis no tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 5,7 foi muito próxima (alta viabilidade) ao tratamento sem peróxido no mesmo valor de pH.

Acredita-se que a viabilidade celular mais elevada no tratamento com peróxido de hidrogênio seja devido a uma mudança na extensibilidade da parede celular resultante da interação do peróxido com a mesma deixando-a mais rígida e, portanto, menos suscetível a ação do pH baixo, conforme já foi relatado em pêlos radiculares (MONSHAUSEN et al., 2007).

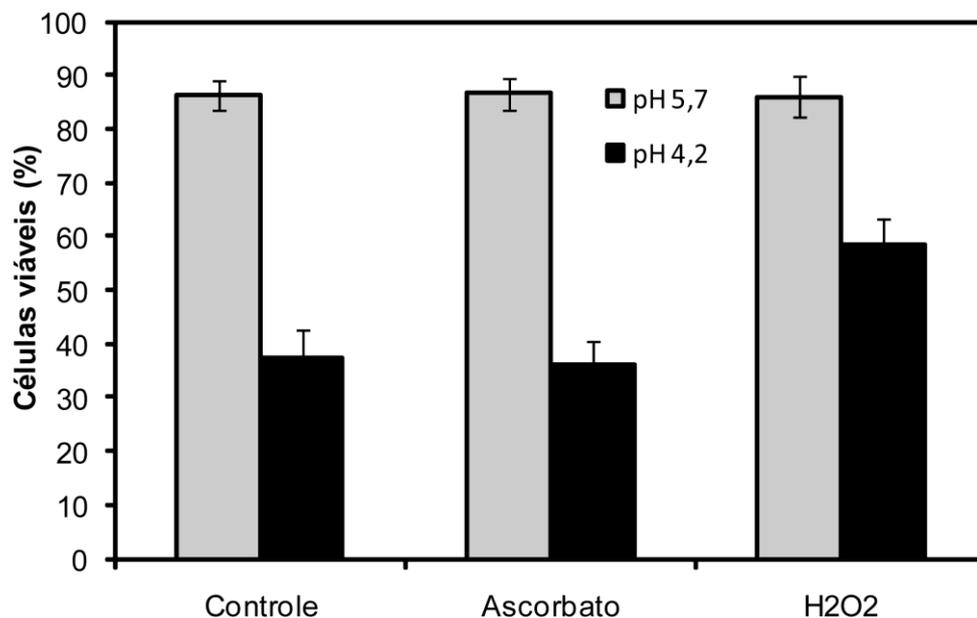


Figura 11 – Efeito do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico na sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo. Uma hora antes do ensaio de sensibilidade a pH baixo, foi adicionado ascorbato (100  $\mu$ M) e peróxido de hidrogênio (5 $\mu$ M) a culturas com 24 h de subcultivo. Controles não receberam adição destes compostos. Alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. As barras indicam o erro padrão da média (n = 3)

## 5.2. Reversão da sensibilidade a pH baixo induzido por tratamento hipo-osmótico

Em células de BY-2 suscetíveis ao acúmulo de Al, foi observado que quando removidas do meio de cultura original e incubadas previamente em um meio mínimo de composição semelhante ao utilizado no presente trabalho por cerca de uma hora, as mesmas

se tornavam menos suscetíveis ao acúmulo de Al e a pH baixo (VITORELLO; HAUG, 1999). Na ocasião, os autores sugeriram que isso ocorreu pela parada de crescimento das células em função de uma sinalização promovida pela deficiência de nutrientes do meio mínimo.

Entretanto, trabalhos mais recentes mostram que ocorre uma explosão oxidativa em células em suspensão quando submetidas a um choque hipo-osmótico (CAZALE et al., 1998; ROUET; MATHIEU; LAURIERE, 2006). Levando em consideração estas informações, os resultados obtidos por Vitorello e Haug (1999) foram reavaliados e surgiu a hipótese de que as respostas observadas tenham sido consequência de um choque hipo-osmótico ao invés da deficiência de nutrientes no meio mínimo, pois as células eram transferidas do meio MS para um meio de osmolaridade reduzida, composto apenas por 5mM sacarose, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> e 10 mM MES (pH 5,7).

Assim, experimentos foram realizados onde células com 24 horas de subcultivo foram incubadas por 2 e 4 h em meio mínimo, meio MS sem sacarose e 2,4D e por fim meio MS sem 2,4D. Este experimento teve como objetivo avaliar a possível influência destes componentes do meio de cultura e as diferenças de osmolaridade causadas pela retirada dos mesmos sobre a sensibilidade das células a pH baixo.

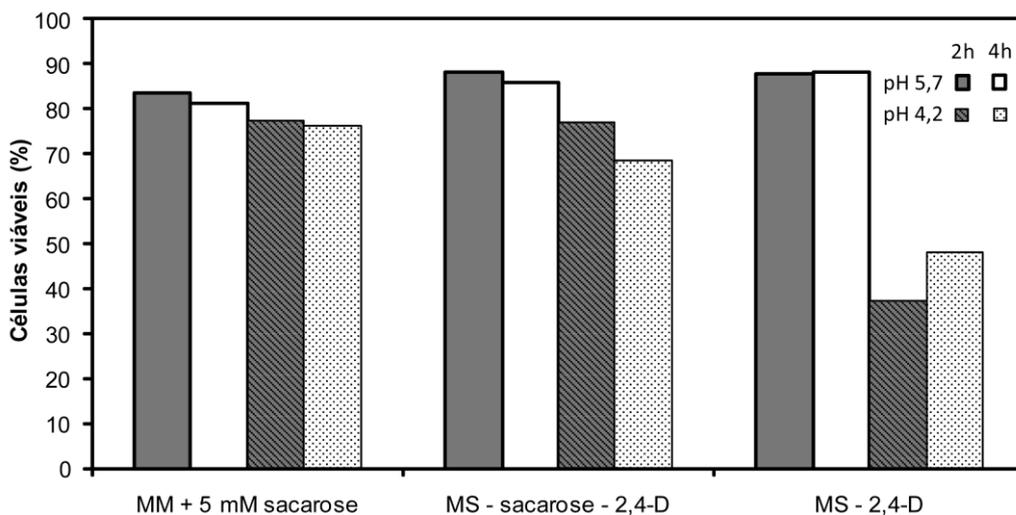


Figura 12 – Efeito de pré-tratamentos onde componentes do meio de cultura foram retirados na sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo. Células com 24 h de subcultivo foram transferidas para os respectivos tratamentos e incubadas por 2 e 4 h em meio de cultura sem 2,4-D (MS – 2,4-D), sem 2,4-D e sacarose (MS – sacarose – 2,4-D) e em meio mínimo (MM pH 5,7), com adição de 5 mM de sacarose (MM + 5 mM sacarose). Em seguida, alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. Resultados de um único experimento

Os meios em que as células foram previamente incubadas (Figura 12) possuem osmolaridade crescente: MM + 5 mM sacarose (36 mOsm), MS - sacarose - 2,4D (100 mOsm), MS -2,4D (188,5 mOsm). O resultado encontrado neste experimento foi um aumento na viabilidade de células cultivadas nos meios de menor concentração molar quando expostas a pH 4,2, enquanto que nos tratamentos a pH 5,7 a viabilidade das células manteve-se alta. Isto indica que a diminuição da sensibilidade ao pH baixo, a principio, é devido a um choque hipo-osmótico e não a deficiência de nutrientes no meio mínimo. Observa-se que o aumento da viabilidade celular é gradual no tempo e acompanha a diminuição da concentração osmolar do meio de cultura.

Em seguida, foi realizada uma caracterização da resposta celular a pH baixo em tratamentos com a substituição dos sais do meio MS do meio de cultura por concentração equivalente de manitol, um osmólito comumente empregado em experimentos com células vegetais para aumentar a osmolaridade do meio externo. Este experimento teve como objetivo confirmar que a diminuição da osmolaridade do meio de cultivo causa a reversão da sensibilidade a pH baixo e não a remoção de nutrientes (minerais e sacarose) ou 2,4-D.

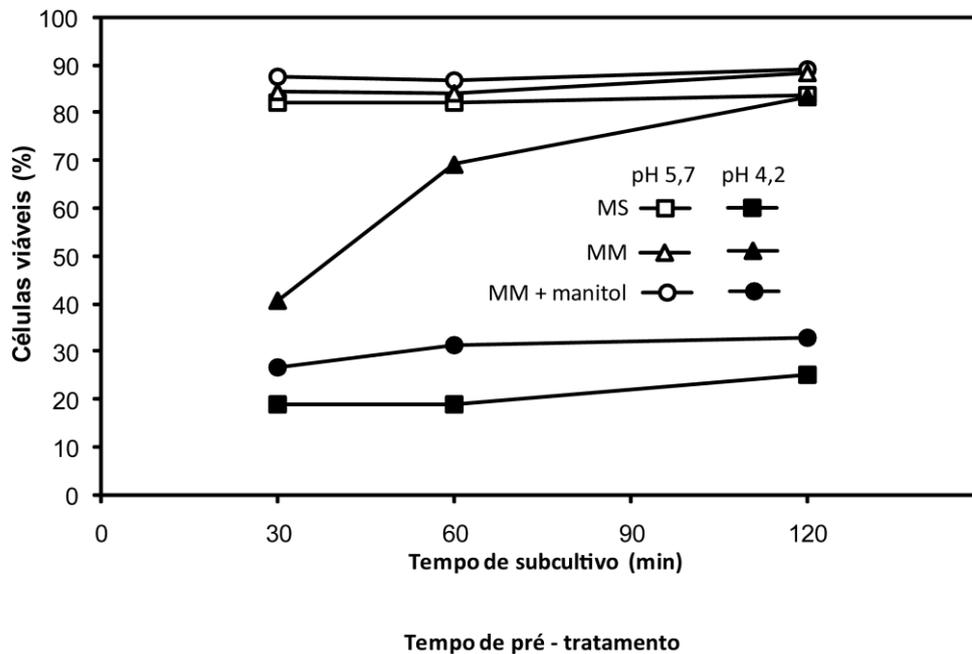


Figura 13 – Efeito de pré-tratamento hiposmótico na sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo. Células com 24 h de subcultivo foram transferidas e incubadas por diferentes tempos em meio mínimo (MM) e em MM + manitol ajustado para uma osmolaridade equivalente ao MS completo. O pH destes pré-tratamentos foi de 5,7. No controle (MS) as células permaneceram no meio de cultura. Em seguida, alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. Resultados de um único experimento

De maneira similar ao que foi observado no experimento representado na Figura 12, houve um considerável aumento na viabilidade das células pré-incubadas em MM e expostas a pH 4,2 em comparação às células cultivadas em MM com manitol (Figura 13). Não foi observado nenhum efeito tóxico do manitol nos tratamentos. Esta resposta foi progressivamente maior com o tempo de pré-incubação das células. Com 60 min de pré-tratamento em MM, células expostas a pH baixo apresentaram aproximadamente 70% de viabilidade.

A diferença de viabilidade celular ao final do tratamento com MM a pH 4,2 comparada ao controle com meio MS (aproximadamente 50% maior) foi considerada suficiente para que a partir daí a maioria dos demais ensaios envolvendo tratamento hiposmótico fosse realizada com 60 min de pré-tratamento no respectivo meio.

Apesar desta resposta se manter com o decorrer do tempo durante o experimento (até 120 min), outro motivo pelo qual foi adotado 60 min como tempo padrão para os demais

experimentos, é que um intervalo de tempo mais longo poderia comprometer a interpretação dos dados em detrimento de outras possíveis respostas desencadeadas pela condição do tratamento hipo-osmótico em questão.

Para avaliar se outros osmólitos teriam efeito sob a resposta ao tratamento hipo-osmótico, foram utilizados além do manitol, sorbitol e sacarose na substituição dos sais do meio MS também em concentração molar equivalente ao meio MS completo (Figura 14). Entretanto há ressalvas quanto ao uso de sacarose para este propósito, por ser utilizada como constituinte do meio de cultivo original, sendo preferencial o uso de manitol e/ou sorbitol.

Novamente, células cultivadas em meio mínimo mostraram menor sensibilidade ao pH baixo comparado aos tratamentos com osmólitos e ao controle em MS completo, confirmando que o tratamento hipo-osmótico é um fator que promove a reversão do estado sensível para não sensível a pH baixo em células BY-2.

Como não foi observada diferença expressiva na sensibilidade ao pH baixo entre os tratamentos com os diferentes osmólitos, foi adotado o manitol para composição do meio mínimo na substituição dos sais do meio MS nos ensaios seguintes.

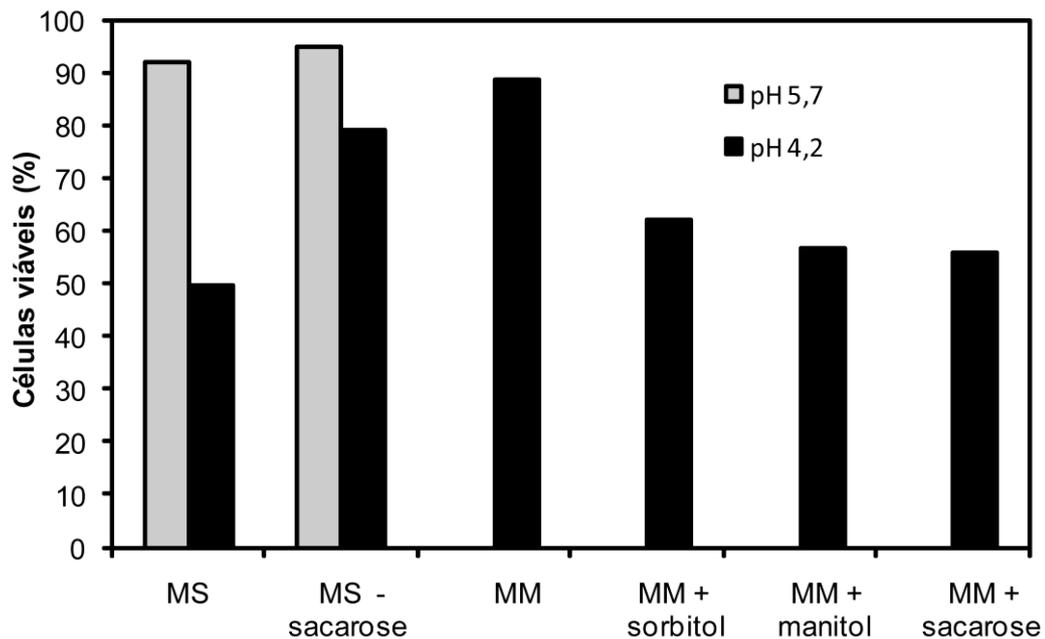


Figura 14 – Avaliação de pré-tratamentos na sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo, onde a osmolaridade do meio completo (MS) foi mantida por substituição por diferentes osmólitos. Células com 24 horas de subcultivo foram transferidas e incubadas por 1 h em meio mínimo (MM pH 5,7) na presença de sorbitol, manitol ou sacarose (152 mM) de maneira a resultar em solução com osmolaridade equivalente ao meio MS completo. No controle (MS) as células permaneceram no meio de cultura. Alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. Resultados de um único experimento

### 5.3. Modulação oxidativa da parede celular induzido por tratamento hipo-osmótico como causa do aumento da tolerância ao pH baixo

#### 5.3.1. Aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante o tratamento hipo-osmótico

O experimento seguinte teve como objetivo avaliar se a adição de peróxido de hidrogênio teria efeito na diminuição de sensibilidade de células com 24h subcultivadas em MM mais manitol a pH 4,2 (Figura 15), ou seja, se a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia atuar no

enrijecimento da parede celular e por conseqüência tornar as células menos susceptíveis à exposição a pH baixo.

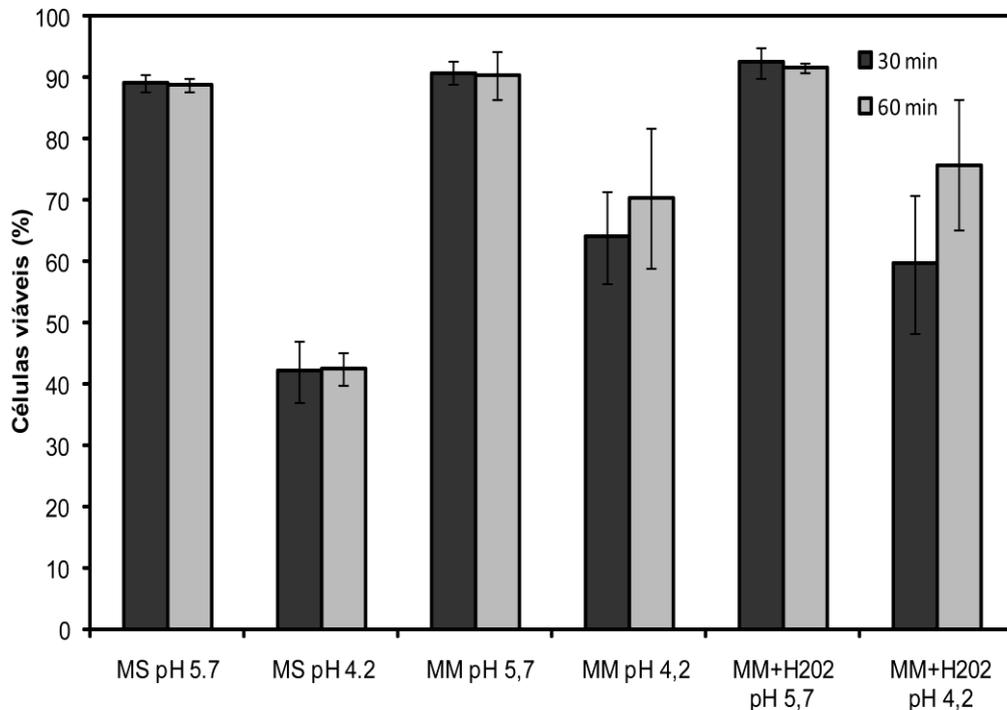


Figura 15 - Efeito da presença de peróxido de hidrogênio ( $5 \mu\text{M}$ ) nos pré-tratamentos hiposmóticos sobre a sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo. Células com 24 horas de subcultivo foram transferidas e incubadas por 30 e 60 min em meio mínimo (MM), com e sem adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O pH destes pré-tratamentos foi de 5,7. No controle (MS) as células permaneceram no meio de cultura. Em seguida, alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. As barras indicam o erro padrão da média ( $n = 3$ )

Não foi observado efeito pronunciado do peróxido de hidrogênio na diminuição de sensibilidade ao pH baixo no tratamento com manitol, nem diferenças entre os tratamentos em MM e MM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também a pH 4,2 (Figura 16).

Duas hipóteses podem ser consideradas. No primeiro caso, desta resposta estar relacionada com a possibilidade do manitol atuar como “scavenger” (SCHOPFER, 2001). No segundo caso, do peróxido de hidrogênio não efeito pronunciado no aumento da viabilidade celular em virtude do próprio tratamento hiposmótico anteriormente ter desencadeado uma resposta já acentuada no aumento da viabilidade, possivelmente via modulação oxidativa.

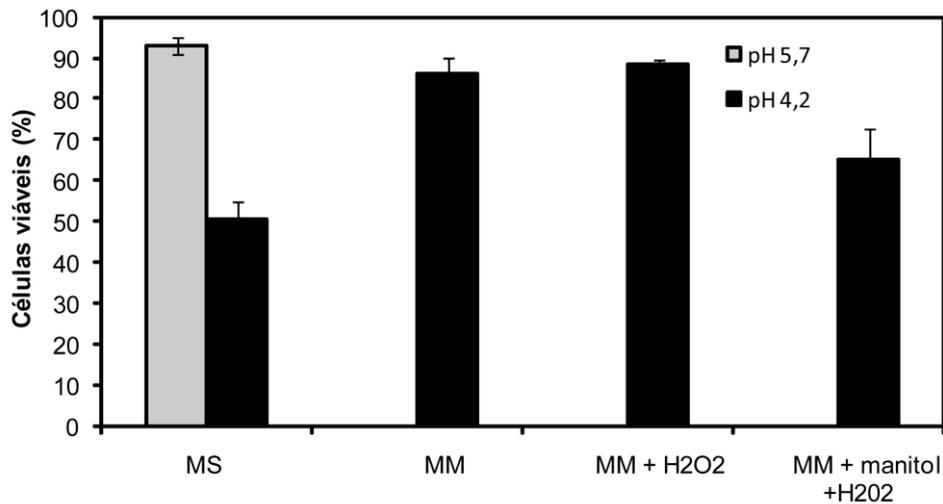


Figura 16 – Efeito da presença de peróxido de hidrogênio (5  $\mu$ M) nos pré-tratamentos com meio mínimo (com e sem manitol), sobre sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo. Células com 24 horas de subcultivo foram transferidas e incubadas por 1 h em meio mínimo (MM) e meio mínimo com manitol (MM + manitol), ambos com e sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A adição de manitol (152 mM) teve a função de deixar a osmolaridade do meio mínimo equivalente ao meio completo (MS). O pH destes pré-tratamentos foi de 5,7. No controle (MS) as células permaneceram no meio de cultura. Alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. As barras indicam o erro padrão da média (n = 3)

Para avaliar, mesmo que de maneira indireta, se o manitol apresentou este tipo de atividade, outro experimento foi realizado, porém substituindo o manitol por sorbitol também na presença de peróxido de hidrogênio (Figura 17).

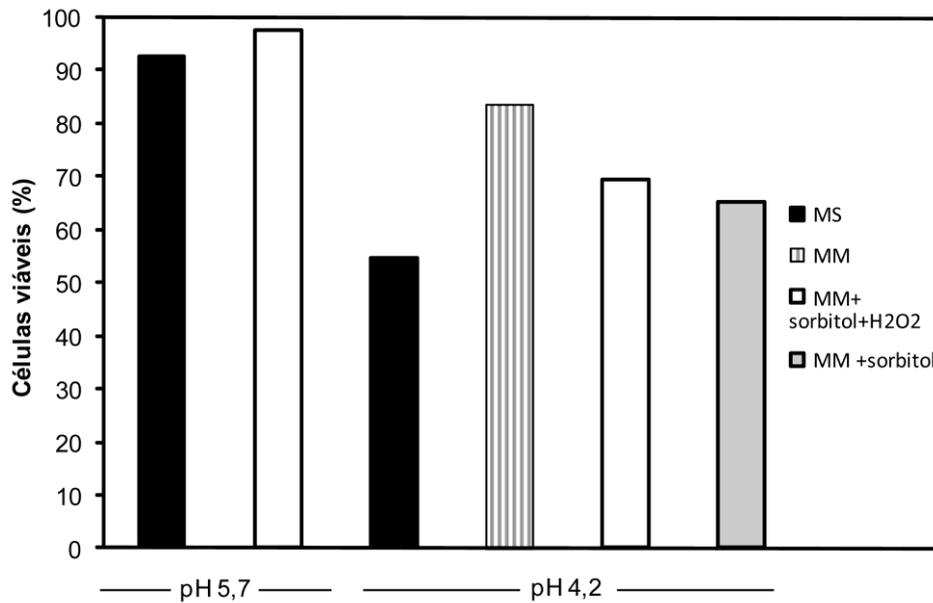


Figura 17 – Efeito da presença de peróxido de hidrogênio ( $5 \mu\text{M}$ ) nos pré-tratamentos com meio mínimo (com e sem sorbitol), sobre a sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo. Células com 24 horas de subcultivo foram transferidas e incubadas por 1 h em meio mínimo (MM) e meio mínimo com sorbitol (MM + sorbitol), ambos com e sem adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A adição de sorbitol (152 mM) teve função de deixar a osmolaridade do meio mínimo equivalente ao meio completo (MS). O pH destes pré-tratamentos foi de 5,7. No controle (MS) as células permaneceram no meio de cultura. Alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. As barras indicam o erro padrão da média ( $n = 3$ )

Houve um aumento na viabilidade de células cultivadas em sorbitol juntamente com peróxido em relação ao mesmo tratamento com manitol. De fato, o manitol pode apresentar efeito de “scavenger” para íons  $\cdot\text{OH}$ , entretanto no trabalho de Schopfer (2001) não demonstrou efeito na inibição da extensibilidade da parede celular pelo menos em concentrações até 100 mM e nos resultados do presente ensaio a diferença entre os tratamentos com manitol e sorbitol mais peróxido não foram expressivos ao ponto de inviabilizar o uso de manitol na substituição dos sais de MS para os ensaios seguintes.

Possivelmente o peróxido de hidrogênio não teve efeito no aumento da viabilidade celular em condições hipo-osmóticas em consequência de o próprio tratamento ter desencadeado esta resposta anteriormente.

### 5.3.2. Uso de inibidores de NADPH oxidase e de peroxidases

Algumas fontes de ROS em plantas são decorrentes do próprio metabolismo celular, incluindo fotossíntese e respiração. Outras são produzidas por vias induzidas durante estresses abióticos. Entretanto, mais fontes de ROS têm sido identificadas em plantas, incluindo a atividade de NADPH oxidases e peroxidases ligadas à parede celular (MITTLER et al., 2002) que participam na produção de ROS durante processos como morte celular programada e defesa a patógenos. As peroxidases podem oxidar vários substratos na presença de  $H_2O_2$  e também produzir ROS. Uma das características mais notáveis destas enzimas é estarem envolvidas tanto em processos de alongamento celular, como em reações que restringem o crescimento. Este aparente paradoxo tem sido extensivamente estudado (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004).

Cazalé et al. (1998) demonstrou que uma explosão oxidativa é induzida por choque hipo-osmótico em células BY-2. Estes autores sugeriram que esta explosão oxidativa poderia promover um enrijecimento da parede celular, mas não apresentaram evidências concretas de que isto de fato ocorria. Entre outros fatores, esta explosão oxidativa é dependente de NADPH oxidase e pode ser bloqueado pela ação de difenileno-iodônio (diphenylene iodonium, DPI), inibidor desta enzima.

Para avaliar a possibilidade da ocorrência de explosão oxidativa em células BY-2 e se ROS gerados nestas circunstâncias poderiam estar modulando a reversão de sensibilidade a pH baixo induzido por choque hipo-osmótico, foram usados o inibidor de NADPH oxidase DPI e dois inibidores de peroxidases, ácido salicilhidroxâmico (salicylhydroxamic acid, SHAM) e cianeto de potássio, KCN.

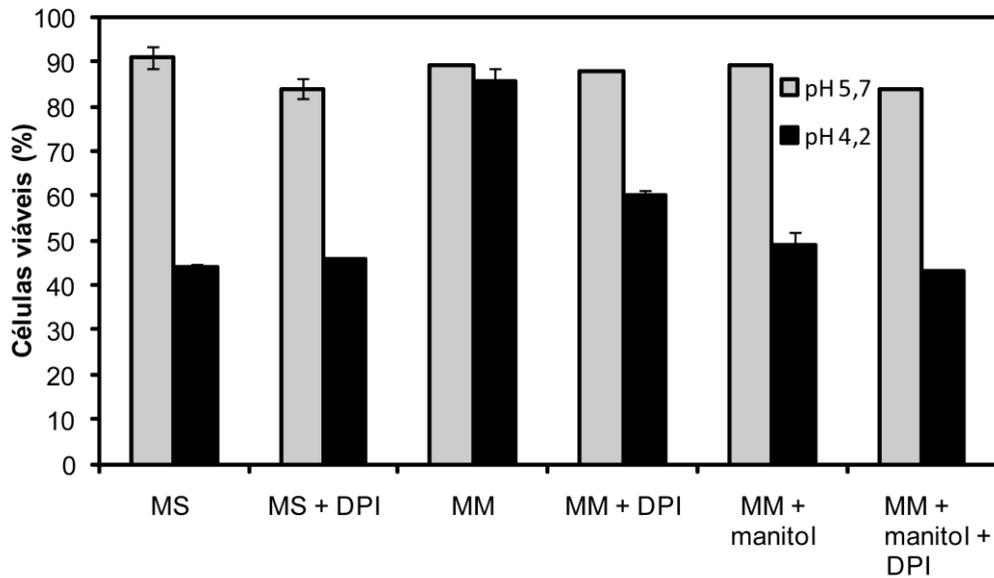


Figura 18 – Efeito do inibidor de NADPH oxidase - DPI nos pré-tratamentos com meio mínimo (com e sem manitol), sobre a sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo. Células com 24 horas de subcultivo foram transferidas e incubadas por 1 h em meio mínimo (MM) e meio mínimo com manitol (MM + manitol), ambos com e sem adição de 50  $\mu$ M de DPI. A adição de manitol (152 mM) teve a função de deixar a osmolaridade do meio mínimo equivalente ao meio completo (MS). O pH destes pré-tratamentos foi de 5,7. No controle (MS) as células permaneceram no meio de cultura. Alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. As barras indicam o erro padrão da média (n = 3)

Células tratadas com DPI em meio mínimo apresentaram diminuição na viabilidade celular comparadas às células que permaneceram apenas em meio mínimo (Figura 18). Isto é um bom indício que a inibição de NADPH oxidases não permitiu a reversão da sensibilidade das células a pH baixo induzidas pelo choque hipo-osmótico e, portanto, que NADPH oxidases estão envolvidas neste processo.

Também foram testados sob as mesmas condições experimentais os inibidores de peroxidases: ácido salicilhidroxâmico - SHAM e cianeto de potássio – KCN.

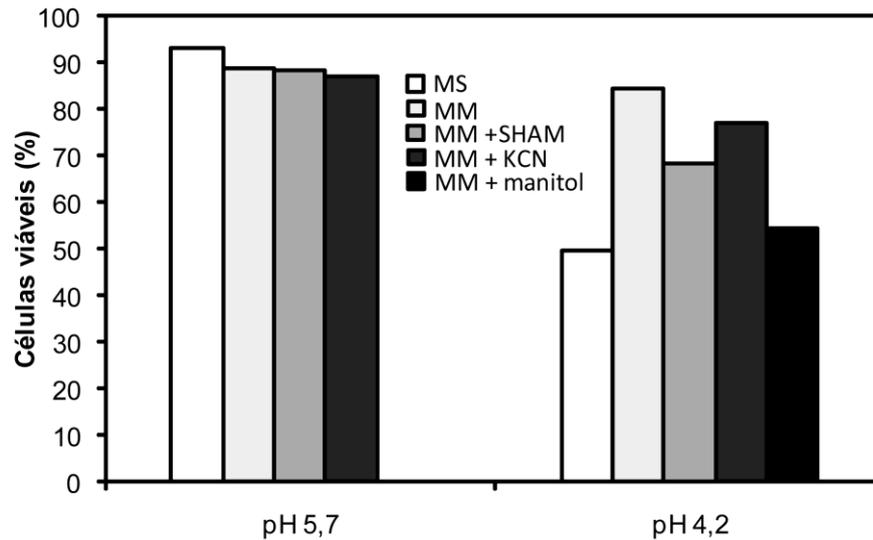


Figura 19 – Efeito de inibidores de peroxidases - SHAM e KCN nos pré-tratamentos com meio mínimo (com e sem manitol), sobre a sensibilidade de células BY-2 no ensaio a pH baixo. Células com 24 horas de subcultivo foram transferidas e incubadas por 1 h em meio mínimo (MM) e MM + manitol, ambos com e sem adição de 100  $\mu$ M de SHAM ou 1 mM de KCN. A adição de manitol (152 mM) teve a função de deixar a osmolaridade do meio mínimo equivalente ao meio completo (MS). O pH destes pré-tratamentos foi de 5,7. No controle (MS) as células permaneceram no meio de cultura. Alíquotas de células foram coletadas e submetidas ao ensaio de sensibilidade a pH (4,2 e 5,7) sendo em seguida determinado o índice de viabilidade celular. As barras indicam o erro padrão da média (n = 3)

Similar aos resultados com DPI, células tratadas com SHAM em meio mínimo apresentaram diminuição na viabilidade celular em comparação ao controle, no entanto menos acentuada do que células tratadas com DPI (Figura 19).

Os dados obtidos com SHAM indicam envolvimento de peroxidases na reversão da sensibilidade das células a pH baixo induzidas pelo choque hipo-osmótico, entretanto estudos mais detalhados como por exemplo análise da atividade de peroxidases podem ser úteis para confirmação destes resultados.

O cianeto de potássio teve efeito inibitório pouco pronunciado, indicado por valores mais altos de viabilidade celular em comparação aos tratamentos com SHAM e DPI. Entretanto deve-se considerar que a especificidade destes inibidores pode ser variável, portanto, mais estudos com este inibidor são necessários.

## **5.4. Estudo complementar de avaliação de tampão adequado para experimentos a pH baixo**

Estudos celulares a pH baixo requerem atenção nem sempre dispensada com relação ao uso tampões edequados para esta condição, na tentativa de minimizar efeitos indesejados causados por flutuações de pH. Esta questão não é tão simples, pois, além do tampão ser eficiente a pH baixo, não deve interferir no metabolismo celular (SOARES; DUARTE, 2000), o que ocorre com os tampões conhecidos que possuem valores de pKa adequados. Geralmente estes tampões são ácidos orgânicos envolvidos no metabolismo celular.

Ainda há falta de um tampão mais adequado para estes tipos de ensaios, e por esta razão, o tampão ácido-2-morfolinoetanosulfônico (MES) tem sido utilizado na maioria dos estudos a pH baixo (BIBIKOVA et al., 1998; KOYAMA, 2001; SOUZA, 2004; MERSSELI, et al., 2005). Este tampão faz parte de uma classe de tampões conhecida como “Good Buffers”. Dentre esta classe, é o que apresenta valor de pKa mais baixo (6,15), sendo portanto adequado para o tamponamento na faixa de pH entre 5,5 e 6,7. Embora se saiba que nenhum tampão é totalmente inerte (FERGUNSON et al., 1980), é necessário buscar e avaliar tampões com pKa mais apropriados para ensaios onde os tratamentos são feitos com pH mais baixos. Assim, buscou-se avaliar os tampões homopipes, dimetilglutarato, biftalato de potássio, e beta-alanina em ensaios a pH baixo.

### **5.4.1. Avaliação dos tampões a pH 5,7**

Para investigar a possível toxicidade dos tampões às células, primeiramente foi realizada uma avaliação do crescimento celular na presença de cada um dos tampões a pH 5,7. Os resultados mostraram que houve crescimento celular apenas na presença do tampão homopipes, que apresentou curva de crescimento semelhante à do controle MES (Figura 20A).

Além disso, células cultivadas com o tampão homopipes apresentaram alta viabilidade, também semelhante ao controle MES (Figura 20B). Embora as células não tenham crescido na presença do tampão biftalato de potássio e DMGA, a viabilidade celular foi alta, semelhante ao controle, mas com queda da viabilidade de células cultivadas em DMGA após o quinto dia de cultivo. Na presença do tampão beta-alanina não houve

crescimento celular, mas a viabilidade das células foi relativamente alta no primeiro dia de subcultivo, caindo progressivamente com o passar do tempo, ou seja, este tampão também apresentou efeito tóxico às células. Ainda não se sabe o motivo pelo qual as células apresentaram alta viabilidade e nenhum crescimento na presença dos tampões biftalato de potássio e DMGA. Estudos mais detalhados seriam necessários para elucidar esta questão.

Outro parâmetro avaliado foi a variação do pH do meio de cultura das células cultivadas com os tampões (Figura 20C), e que é resultante da atividade metabólica das células. Percebe-se que o tampão homopipes tem comportamento semelhante ao controle MES. Observa-se uma acidificação do meio de cultura nos primeiros dois dias na presença do tampão controle (MES) e homopipes. Esta acidificação é característica da cultura em condições normais, e é seguida por um período em que o pH se estabiliza próximo do valor inicial 5,7. O pH do meio com o tampão DMGA apresentou flutuação acentuada, indicando afetar as células de modo bem distinto do tampão MES. Já o pH do meio de cultura com os tampões biftalato de potássio e beta-alanina não apresentou variação de pH acentuada ao longo do tempo. Entretanto, foi observada uma alcalinização do meio de cultura na presença do tampão beta-alanina. Células cultivadas com o tampão biftalato de potássio, que manteve o pH mais próximo de 5,7 não apresentaram crescimento.

Com estes resultados é possível concluir que com exceção do tampão homopipes os demais tampões apresentaram algum grau de toxicidade às células.

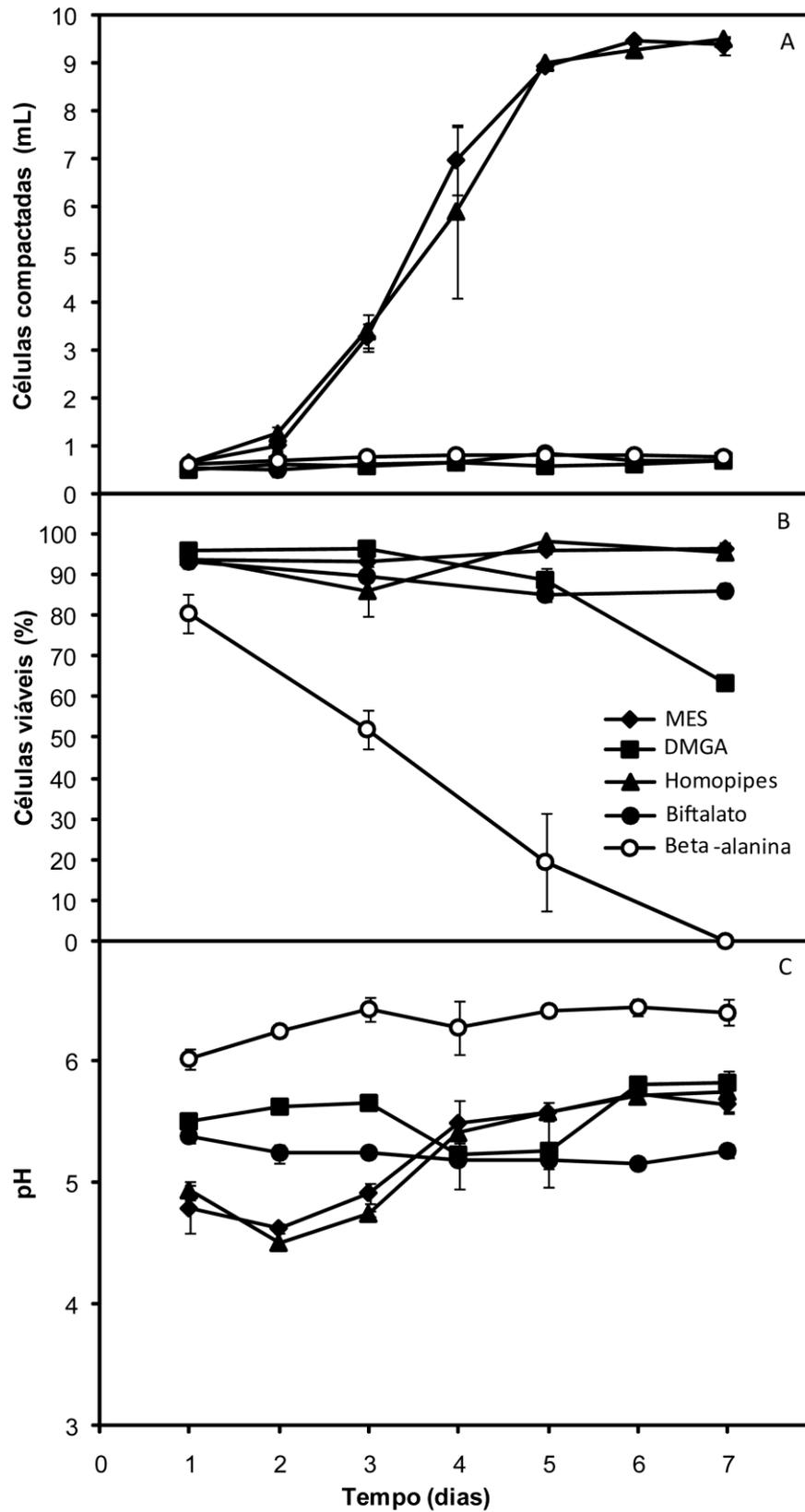


Figura 20 – Curva de crescimento (A), viabilidade celular (B) e variação de pH no meio de cultura (C) de células subcultivadas em meio de cultura MS na presença dos tampões dimetilglutarato, homopipes, biftalato de potássio, beta-alanina e MES (controle) com pH inicial 5,7. As barras indicam o erro padrão da média (n = 3)

#### 5.4.2. Avaliação dos tampões a pH 4,5

Um problema ao avaliar os tampões apenas a pH 5,7 é que neste pH existe um predomínio de formas dissociadas do tampão no meio de cultura, em função dos tampões testados possuírem valores de pKa mais baixos do que o controle MES (pKa homopipes 4,4; pKa DMGA 3,73; pKa biftalato potássio 2,95 e pKa beta-alanina 3,70). Portanto, o experimento a pH 5,7 avaliou a toxicidade quase exclusivamente da forma dissociada dos tampões em estudo. Porém, é necessário avaliar se formas não dissociadas apresentam algum efeito tóxico, já que é esperado maior tendência das mesmas entrarem nas células e causarem alterações indesejadas.

Assim, nos experimentos realizados a pH 4,5 para avaliação do efeito das formas não dissociadas dos tampões, verificou-se um atraso no crescimento das células em relação a pH 5,7 (Figura 21A). O maior atraso ocorreu na cultura cultivada com homopipes a pH 4,5 em relação à cultivada com MES a pH 4,5.

A viabilidade celular nestas mesmas condições permaneceu alta (Figura 21B), bem próxima do observado com o controle (MES pH 5,7).

Quanto à avaliação da flutuação de pH, observou-se uma tendência do pH se manter mais baixo na presença do tampão homopipes (pH inicial 4,5) até o quinto dia de cultivo (Figura 21C). Ainda não se sabe o motivo do atraso no crescimento da cultura em presença do tampão homopipes a pH 4,5, porém existe a possibilidade deste atraso ter ocorrido em função das células terem sido expostas a valores de pH mais baixos já no início do experimento. Entretanto o crescimento das células em todos os tratamentos igualou-se a partir do 5º e 6º dias de cultivo.

Os dados de crescimento, viabilidade celular e flutuação de pH no meio de cultura indicam que até o momento não houve efeito tóxico para as células na presença do tampão homopipes a pH 4,5.

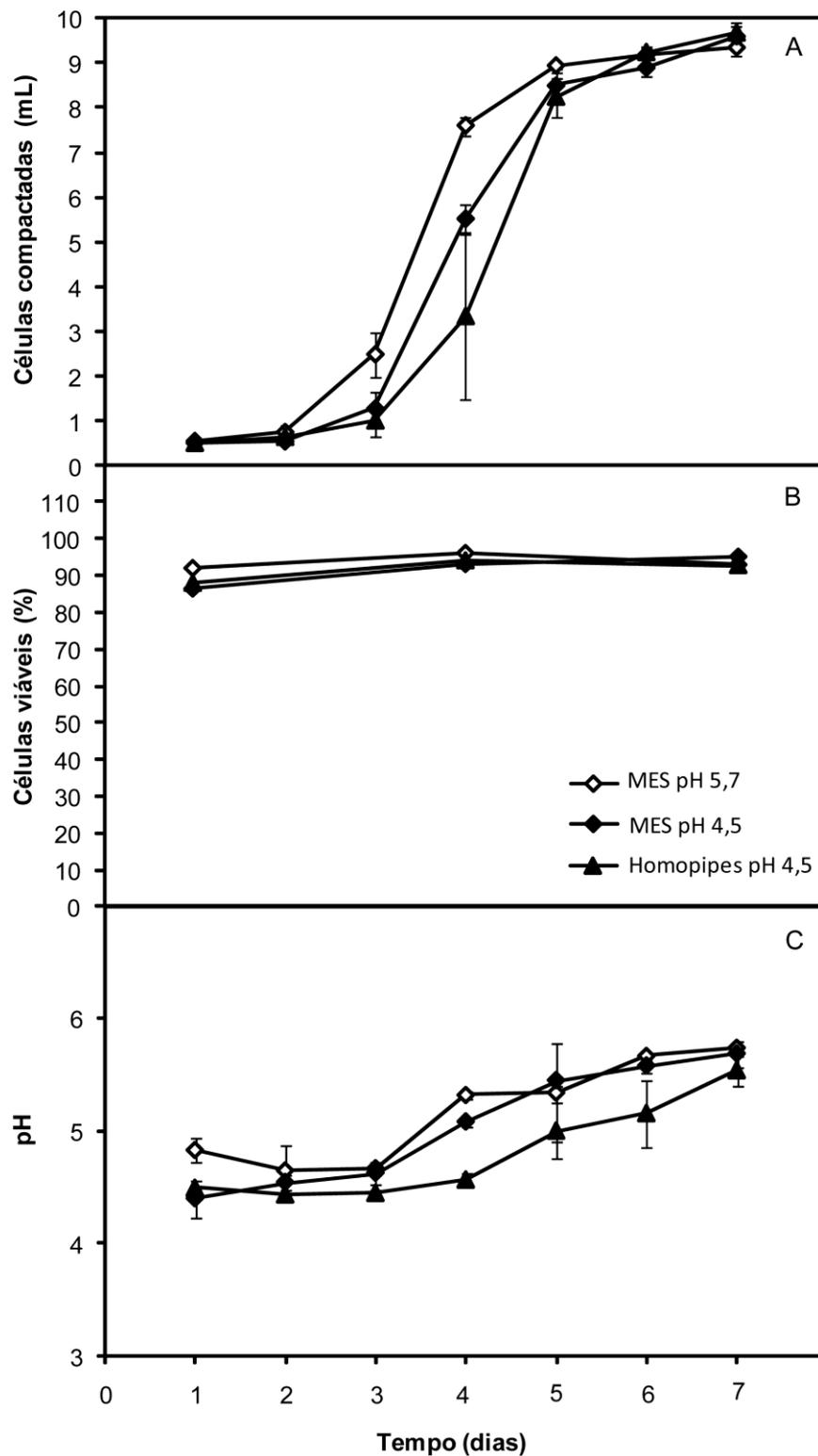


Figura 21 - Curva de crescimento (A), viabilidade celular (B) e variação de pH no meio de cultura (C) de células subcultivadas em meio de cultura MS na presença do tampão homopipes e MES com pH inicial 4,5. O meio MS pH 5,7 foi usado como controle. As barras indicam o erro padrão da média (n = 3)

### 5.4.3. Comparação entre MES e Homopipes para avaliar a sensibilidade de células a pH 4,2

Com base nestes resultados preliminares, a próxima etapa foi avaliar o desempenho do tampão homopipes em experimentos a pH baixo. Estes experimentos indicaram que houve um efeito ligeiramente mais pronunciado da ação do pH (no tratamento a pH 4,2) com homopipes em relação ao tampão MES no último ponto amostrado (Figura 22). Isto já era esperado, visto que o tampão homopipes possui pKa menor que o tampão MES e por isso teria ação tamponante melhor a pH baixo. Entretanto, há necessidade da realização de mais testes para avaliar se este efeito realmente é significativo ou não. Contudo, conclui-se até o momento que o tampão homopipes é uma boa alternativa para uso em experimentos a pH baixo.

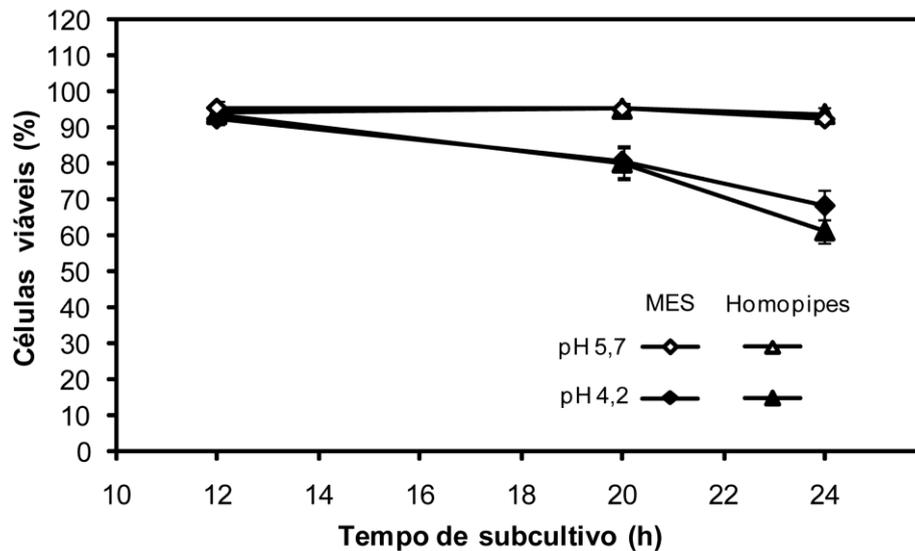


Figura 22 –Viabilidade de células expostas a pH 4,2 e 5,7 na presença dos tampões MES e homopipes após 12, 20 e 24 horas de subcultivo nos respectivos tampões. As barras indicam o erro padrão da média (n = 3)

## 6. DISCUSSÃO

É conhecido que células vegetais apresentam sensibilidade diferenciada ao pH baixo, ou seja, variações não genótípicas tem influência nesta característica. Tudo indica que estas diferenças estão relacionadas com a fase de crescimento e/ou desenvolvimento (KOYAMA et al., 1995; KOYAMA et al., 2001; VITORELLO; HAUG, 1996).

De fato, células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. BY-2 são bastante sensíveis ao pH baixo na fase log de crescimento ao contrário de células na fase estacionária (VITORELLO; HAUG, 1996). Utilizando o inibidor do ciclo celular afidicolina, Souza (2004) comprovou a existência de uma diferença na sensibilidade de células BY-2 ao Al no final da fase lag, detectando um aumento na suscetibilidade ao acúmulo de Al 16 horas após o subcultivo. Os dados obtidos por Souza (2004) dão indícios que o padrão observado para a sensibilidade ao Al seja esperado para pH baixo. Entretanto, para que isto seja confirmado, é importante que a sensibilidade ao pH baixo seja avaliada separadamente do Al.

No presente trabalho foi confirmado que há uma alteração de sensibilidade a pH baixo em células BY-2 no final da fase lag entre 12 h e 24 h de subcultivo, ou seja, células com 12 h ainda são pouco sensíveis enquanto células com 24 h já são consideravelmente sensíveis a pH baixo. Comparado aos resultados obtidos por Souza (2004) que avaliou a susceptibilidade ao Al, esta alteração de sensibilidade ao pH baixo foi um pouco tardia. Entretanto, como já mencionado, a susceptibilidade ao Al e ao pH baixo podem não ser respostas com estreita relação. Além disso, o momento exato em que isto ocorre pode variar dependendo das condições da cultura, assim como a intensidade da resposta também depende das condições de exposição das células ao pH baixo. É provável que o atraso observado tenha sido em decorrência de diferenças no grau de sincronização das culturas utilizadas nos dois trabalhos.

Com estes dados buscou-se examinar dois aspectos gerais com relação à mudança de sensibilidade ao pH baixo. Primeiro, definir em que momento durante o ciclo celular e em quais condições esta mudança ocorre, e segundo, testar a hipótese de que um choque hiposmótico prévio pode reverter a condição de sensibilidade a pH baixo e obter evidências de que a modulação oxidativa da parede celular estaria envolvido neste processo.

*As células de BY-2 se tornam mais sensíveis a pH baixo durante a retomada do ciclo celular e antes do ponto de checagem de G1/S*

As células BY-2 utilizadas nos experimentos foram subcultivadas a partir de culturas na fase estacionária e está bem estabelecido que estas se encontram em G0/G<sub>1</sub> (SANO et al., 2007). A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que a reentrada ou a retomada do ciclo celular é necessária para que ocorra a alteração de sensibilidade a pH baixo. Isto pode ser deduzido pelos experimentos realizados na presença ou ausência de auxina (2,4-D) (Figura 6) e nos experimentos realizados com bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> (Figuras 8 e 9).

Sabe-se que a auxina é necessária para a sinalização para indução da divisão celular, fazendo com que as células entrem novamente no ciclo celular (DAVID et al., 2007). Auxina pode agir direta ou indiretamente na regulação da atividade de quinases dependentes de ciclina (CDKs) (JOHN et al., 1993). O trabalho de Magyar et al., 2005 sugere que a auxina também regula uma das famílias de fatores de transcrição associados ao ciclo celular, E2FB. Em células de BY-2, a superexpressão de E2FB causou aumento da proliferação celular mesmo na ausência de auxina, e na presença a superexpressão promoveu a transição das fases G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M. Estes dados confirmam a importância da auxina no controle do ciclo celular, embora pouco se sabe a respeito do mecanismo molecular pelo qual a auxina exerce esta influência (DEN BOER; MURRAY, 2000; STALS; INZE, 2001).

Neste trabalho, foi confirmado que a auxina é necessária tanto para a retomada do ciclo celular quanto para a mudança do estado não sensível para sensível. Sem a adição de 2,4D as células não se dividiram e não ficaram sensíveis ao pH baixo (Figura 6).

Com relação ao uso de bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>, Sano et al. (2007) demonstraram em células BY-2 que estes inibidores impedem a entrada de potássio na célula e que a progressão pelo ciclo celular é atrasada, constatando que um limiar de potássio é requerido para as células reentrarem no ciclo celular. O emprego dos inibidores de canais de potássio TEA + BaCl<sub>2</sub> (Figura 8) e CsCl<sub>2</sub> (Figura 9) indicou que quando estes canais são bloqueados a alteração na sensibilidade ao pH baixo também é atrasada. Baseado em análises de expressão gênica, o canal de potássio NKT1 foi identificado como mediador do influxo de potássio durante a progressão do ciclo celular de G<sub>1</sub> para S. Os resultados obtidos por Sano et al., 2007 sugerem que a regulação do turgor através do influxo e efluxo pelos canais de potássio é um fator que controla a divisão e a progressão do ciclo celular.

No trabalho de Sano (2007), foi demonstrado que com o uso de bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> a progressão da cultura atrasou no mínimo 2 h e aproximadamente 4 h com o uso

de CsCl<sub>2</sub>. Neste estudo, as mudanças na sensibilidade a pH baixo atrasaram em cerca de 6 h na presença de bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>, no entanto, para uma melhor estimativa seria necessário estender o período de observação para facilitar o cálculo desta diferença.

Quanto à definição do período do ciclo celular em que ocorre a mudança de sensibilidade, os dados obtidos com o uso de inibidores do ciclo celular, mostraram que a alteração de sensibilidade ocorre antes do ponto de chegada da transição G<sub>1</sub>/S do ciclo celular. Por outro lado, considerando que se leva pelo menos 12 h para as células começarem a ficar sensíveis a pH baixo, e que com 24 h de subcultivo, quando a sensibilidade já é acentuada, já se observa células em divisão, pode-se concluir que este evento ocorre no final da fase G<sub>1</sub>.

Como já existe uma porcentagem de células em divisão com 24 h de subcultivo e, por se tratar de uma cultura não sincronizada, sem a utilização de inibidores não seria possível inferir adequadamente o momento do ciclo celular em que ocorre a mudança de sensibilidade.

A afidicolina e a hidroxureia bloqueiam pontos do ciclo celular próximos entre si. A afidicolina bloqueia a progressão da fase S, pela inibição da DNA polimerase  $\alpha$ , e a hidroxureia, um inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, inibe a síntese de DNA por reduzir a quantidade de dNTPs disponíveis para a DNA polimerase na forquilha de replicação (KOÇ et al., 2004).

Os outros três inibidores utilizados (roscovitina, olomoucina e mimosina) inibem o ciclo celular na transição da fase G<sub>1</sub>/S. Drogas que inibem especificamente as ciclinas dependentes de quinases, (cyclin-dependent kinase; CDK) como a roscovitina e a olomoucina representam ferramentas úteis para o estudo de pontos durante o progresso do ciclo celular em plantas onde a ativação de CDKs é requerida.

No trabalho de Glab et. al (1994) a olomoucina mostrou-se eficiente na inibição da proliferação de células de *arabidopsis* e petúnia em duas situações: na passagem da fase G<sub>1</sub> para S e da fase G<sub>2</sub> para M, o que indica que o complexo CDK/ciclina controla estas duas transições no ciclo celular vegetal.

A roscovitina demonstrou inibir a atividade de CDKs (CDK1 e CDK2) em humanos em concentrações 10 a 100 vezes menores do que a olomoucina (DEAZEVEDO et al., 1997; HAVLICEK et al. 1997). Ainda, a reversibilidade e especificidade fazem destas drogas alternativas para estudos de sincronização celular.

Os resultados mais consistentes foram obtidos com a roscovitina. Primeiro pela repetibilidade apresentada nos experimentos e segundo por não serem observadas células em

divisão após o tratamento com este inibidor, o que indica que o mesmo foi eficiente no bloqueio do ciclo celular.

De maneira similar os resultados com afidicolina e hidroxíureia mostram que viabilidade de células tratadas com estes inibidores e expostas a pH baixo caiu ao longo do tempo, ou seja, mesmo impedidas de progredir normalmente pelo ciclo celular, as células continuaram sensíveis ao pH baixo. Também neste caso os inibidores foram considerados eficientes, pois não foram observadas células em divisão (Figura 4).

Entretanto, experimentos com mimosina e olomoucina devem ser reavaliados e repetidos. Células tratadas com olomoucina apresentaram resposta similar aos outros inibidores quando expostas ao pH baixo. Entretanto, foram observadas células em divisão (Figura 5C), indicando que não houve bloqueio total da progressão destas células pelo ciclo celular. Células tratadas com mimosina mesmo a pH 5,7 (controle) apresentaram discreta queda na viabilidade celular, o que pode ser indício de efeito tóxico (Figura 5B).

A melhor definição do momento do ciclo celular em que ocorre a alteração de sensibilidade a pH baixo é relevante, pois abre uma série de perspectivas para estudos futuros no que diz respeito, por exemplo, a análises de expressão diferencial de genes e proteínas, adaptações bioquímicas e fisiológicas ao estresse por pH baixo, entre outras possibilidades. Além disto, é possível relacionar conhecimentos da literatura sobre eventos celulares que estão ocorrendo nesta fase para associações com possíveis mecanismos causais.

Em raízes, as células mais sensíveis a pH baixo são as que se encontram em expansão, ou seja, células da zona de alongamento e pêlos radiculares em crescimento. Células BY-2 na fase log de crescimento são bastante sensíveis a pH baixo (CAPALDI, 2006) e se encontram tanto em processos de divisão como de expansão celular. No presente trabalho, escolheu-se uma fase inicial da cultura que apresentasse aumento de sensibilidade a pH baixo mas poucas ou nenhuma célula em divisão, e também que não apresentasse indícios de expansão celular. De fato, demonstrou-se que de 12 a 24 h de subcultivo, o tamanho (área) das células não aumenta, apresentando na realidade uma pequena queda. Isto pode ter ocorrido possivelmente devido ao fato de algumas células se encontrarem em divisão. Entretanto, os índices morfométricos indicaram que estas células sofreram pequenas alterações em seus formatos, tornando-se mais arredondadas conforme indicado pelo índice de circularidade. Isto mostrou que a área transversal das células diminuiu, mesmo sem alteração no volume celular. Embora análises mais cuidadosas sejam necessárias, este é um resultado interessante, pois demonstra que embora as células não tenham expandido, ocorreram alterações de formato, que pode ser

explicada por uma remodelagem da parede celular, de certo modo, à semelhança do que ocorre em células em expansão.

Outro resultado interessante foi demonstrado no experimento onde as células foram cultivadas na ausência de auxina. As células aumentaram de tamanho, mas não se tornaram sensíveis a pH baixo. No caso de células cultivadas sem auxina, a expansão parece ser diferente do que normalmente ocorre, mais devagar e de forma não homogênea entre as células. É possível que nestas células o modo com que a parede é rearranjada seja diferente.

Uma das hipóteses levantadas é de que o pH baixo causa desarranjos na parede, o que pode permitir a ocorrência de microrupturas. Já foi discutido em itens anteriores que o pH baixo pode causar o rompimento de pêlos radiculares. Este fato é de fácil visualização em pêlos radiculares. Entretanto, talvez não seja em células de crescimento difuso, caso a ruptura seja muito pequena, e visto que não existem relatos deste tipo de observação na literatura. Atualmente, há grande interesse em se estudar como as células vegetais conseguem perceber problemas na integridade na parede celular e responder por meio de rearranjos ou remodelagem na parede.

Recentemente, encontrou-se que o tratamento de raízes de *Arabidopsis* a pH baixo induziu um padrão de expressão de genes muito parecido com o que se espera de um sistema de monitoramento e manutenção da integridade da parede celular (LAGER et al., 2010). O pH baixo alterou principalmente a expressão de genes relacionados a modificações da parede.

Desta maneira, a literatura evidencia que o pH baixo pode gerar estresse na parede e ameaçar a sua integridade de modo a gerar uma resposta através da via de sinalização de integridade da parede.

Um indicativo de que isto esteja ocorrendo em determinada condição ou tratamento é quando a adição de osmólitos (suporte osmótico) evita a ocorrência de determinadas respostas. Assim, foi demonstrado que a adição de osmólitos a células BY-2 reduziu a sensibilidade ao pH baixo, bem como o acúmulo de Al (CAPALDI, 2006).

De maneira contrária, o aumento no potencial hídrico (pressão de turgor) da célula deveria agravar a sensibilidade de células a pH baixo. Assim, averiguamos a hipótese de que o potencial osmótico das células (e conseqüentemente a pressão de turgor) poderia aumentar no intervalo de 12 para 24 h. No entanto, os dados de plasmólise (Figura 10) indicaram que o potencial osmótico das células se alterou muito pouco ou até mesmo diminuiu neste período, não parecendo ser um fator que explique as diferenças de sensibilidade entre células com 12 e 24 h de subcultivo.

Isto significa que as diferenças de sensibilidade a pH baixo são devidas a alterações na parede celular tais como na extensibilidade ou, alternativamente, que as hipóteses aqui propostas estão erradas.

O efeito da aplicação de  $H_2O_2$  sugere que um enrijecimento da parede pode diminuir a sensibilidade a pH baixo, e portanto, que a estrutura da parede é fator importante na determinação da sensibilidade a pH baixo. Por ser substrato para peroxidases, o nível de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na parede é importante. Na função clássica destas enzimas (ciclo peroxidativo), um substrato é oxidado para promover a redução de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . Quando substratos das peroxidases são componentes da parede, isto comumente resulta na formação de ligações entre componentes estruturais, que leva a um enrijecimento da parede mostrado por diversos trabalhos na literatura.

*A sensibilidade a pH baixo pode ser revertida por choque hipo-osmótico prévio: possível envolvimento de modulação oxidativa da parede*

O tratamento prévio de células sensíveis a pH baixo com choque hipo-osmótico induziu menor sensibilidade ao pH baixo. Isto corrige a interpretação de resultados obtidos por Vitorello e Haug (1996) que utilizaram tratamentos semelhantes, e atribuíram os efeitos observados, sobre a capacidade de células acumularem Al e aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  próximo à membrana plasmática, à redução do nível de nutrientes e conseqüente redução do crescimento celular.

A alteração no nível de nutrientes como causa das respostas observadas pode ser descartada já que células tratadas com MM na presença de osmólitos sem variação do potencial osmótico da solução externa, não mostraram alterações na sensibilidade ao pH baixo.

Já foi demonstrado que o tratamento hipo-osmótico de células em suspensão gera uma explosão oxidativa (“oxidative burst”) (YAHRAUS et al., 1995; CAZALE et al., 1998; ROUET et al., 2006). As atividades de NADPH oxidase e de peroxidases estão fortemente implicadas nesta explosão oxidativa (CAZALE et al., 1998; ROUET et al., 2006) e a ativação desta resposta parece requerer uma elevação do cálcio citosólico e ativação de quinases de proteínas (TAKAHASHI et al., 1997a; TAKAHASHI et al., 1997b; CAZALE et al., 1998).

O tempo de pré-tratamento hipo-osmótico necessário para reverter a sensibilidade das células BY-2 a pH baixo (Figura 13) foi consistente com a cinética de explosão oxidativa relatado anteriormente (CAZALE et al., 1998; ROUET et al., 2006).

Infelizmente, não foi possível obter dados consistentes de geração de ROS (dados não apresentados). Tentou-se detectar ROS por meio de duas técnicas bem estabelecidas. A princípio, foi utilizado o XTT (3'-[1-phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis[4-methoxy-6-nitro] benzenesulfonic acid hydrate) como substrato a ser oxidado (MULLER et al., 2009), no entanto, observou-se coloração muito fraca no meio externo e coloração mais intensa associada com as células, indicando penetração do corante nas células. Outra técnica empregada foi a oxidação de epinefrina (ROUET; MATHIEU; LAURIERE, 2006). No entanto, esta reação é dependente de pH, sendo sensível a valores de pH mais elevados. Por outro lado, a geração de ROS apoplástico também é dependente de pH, com valores ótimos em torno de 4,5 a 6,5 (FRAHRY; SCHOPFER, 1998).

Os substratos usados nestas técnicas são, na realidade, diretamente sensíveis apenas a  $O_2^{\bullet -}$  e  $OH^{\bullet}$ . Para ocorrer a reação com  $H_2O_2$  é necessário a presença de peroxidases, que pode ser endógeno ou fornecido. Rouet et al. (2006) examinaram a explosão oxidativa induzida por choque hip-osmótico em células de tabaco e de *A. thaliana* sendo que a detecção de ROS somente foi possível na presença de peroxidase de rabanete (horseradish peroxidase) em *A. thaliana*.

Apesar de ainda não se ter conseguido medir os níveis de ROS apoplásticos, o uso de inibidores de NADPH oxidase (Figura 18) e de peroxidases (Figura 19) demonstrou o envolvimento destas enzimas na reversão da sensibilidade a pH baixo por choque hip-osmótico prévio.

As NADPH oxidases da membrana plasmática desempenham papel importante na geração de superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), cujo papel principal é ser fonte de outras ROS. As peroxidases do tipo III da parede desempenham um papel muito mais complexo, sendo enzimas multifuncionais. Na função clássica destas enzimas (ciclo peroxidativo), um substrato é oxidado para promover a redução de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . Quando os substratos da peroxidase são componentes da parede, isto comumente resulta na formação de ligações entre componentes estruturais, levando a um enrijecimento da parede.

As peroxidases do tipo III parecem desempenhar um papel central na modulação oxidativa da parede. São uma família grande de proteínas, possuindo funções diversas, que constituem uma proporção elevada das enzimas envolvidas com o metabolismo oxidativo da parede e até mesmo da célula como um todo. Em *A. thaliana*, existem 73 genes para peroxidases do tipo III, enquanto existem pelo menos 289 genes envolvidos com o metabolismo oxidativo da célula como um todo (GECHEV et al., 2006).

## 7. CONCLUSÕES

- As células BY-2 se tornam mais sensíveis a pH baixo durante a reentrada ou retomada do ciclo celular, no final da fase G1 e antes do ponto de checagem da transição G1/S do ciclo celular. Fatores que impedem ou atrasam a retomada do ciclo celular apresentam o mesmo efeito sobre a mudança de sensibilidade a pH baixo.

- A mudança de sensibilidade a pH baixo durante a retomada do ciclo celular não está relacionada a um aumento no tamanho celular nem a alterações no potencial osmótico, mas possivelmente está relacionado a mudanças no formato da célula.

- Apesar de ainda não se saber exatamente as causas da mudança de sensibilidade ao pH baixo, foi demonstrado que a aplicação de  $H_2O_2$  reduziu a sensibilidade das células, sugerindo que alterações na parede poderiam estar envolvidos com estes mecanismos.

- A sensibilidade a pH baixo pode ser revertida por choque hipo-osmótico prévio, possivelmente por meio de uma explosão oxidativa que levaria a alterações da parede.

- As evidências indicam que NADPH oxidases e peroxidases do tipo III estão envolvidas na reversão da sensibilidade a pH baixo induzida por choque hipo-osmótico, reforçando a possibilidade da ocorrência de uma explosão oxidativa e modificações da parede.

- A avaliação dos tampões indicou que alguns deles podem afetar as células drasticamente, alterando o balanço de compostos absorvidos e podendo inibir a divisão celular ou mesmo comprometer a viabilidade celular. O melhor tampão para estudos celulares a pH baixo foi o Homopipes, por não apresentar nenhuma aparente interferência indesejável.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M. D.; MAGELHAES, P. J.; RAM, S. J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, Danville, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. H.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 100, p. 224–233, 1997.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373–399, 2004.
- BABOURINA, O. et al. Reactive oxygen species production in wheat roots is not linked with changes in H<sup>+</sup> fluxes during acidic and aluminium stresses. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v.1, n. 2, p. 37-42, 2006.
- BABOURINA, O.; VOLTCHANSKII, K.; NEWMAN, I.; RENGEL, Z. Ca<sup>2+</sup> effects on K<sup>+</sup> fluxes in Arabidopsis seedlings exposed to Al<sup>3+</sup>. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 51, n. 5, p. 733-736, 2005.
- BABOURINA, O.; HAWKINS, B.; LEW, R. R.; NEWMAN, I.; SHABALA, S. K<sup>+</sup> transport by Arabidopsis root hairs at low pH. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 7, p. 635-641, 2001.
- BIBIKOVA, T. N.; JACOB, T.; DAHSE, I.; GILROY, S. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v. 124, p. 2925-2934, 1998.
- BORDENAVE, M. Analysis of pectin methyl esterase. In: LINSKENS, H. F.; JACKSON, J. F. (Ed.). **Modern methods of plant analysis: Plant cell wall analysis** 17. Heidelberg: Springer Verlag, 1996. p. 165-180.
- BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; BRACCINI, A. L. Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução. **Bragantia**, Campinas, v. 59, p. 221-226, 2000.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- CAPALDI, F. R. **Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez**. 2006. 150 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- CARDENAS, L.; MARTINEZ, A.; SANCHEZ, F.; QUINTO, C. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, p. 802–813, 2008.

CARDENAS, L.; MCKENNA, S. T.; KUNKEL, J. G.; HEPLER, P. K. NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 1460–1468, 2006.

CAZALE, A. C.; ROUET-MAYER, M. A.; BARBIER-BRYGOO, H.; MATHIEU, Y.; LAURIERE, C. Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 659-669, 1998.

CHABOUTÉ, M.; COMBETTES, B.; CLÉMENT, B.; GIGOT, C.; PHILIPPS, G. Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 797-806, 1998.

CHO, H.; COSGROVE, D. J. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, n. 17, p. 9783–9788, 2000.

COELHO, S. M.; BROWNLEE, C.; BOTHWELL, J. H. A tip-high, Ca<sup>2+</sup>-interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 1037–1046, 2008.

COSGROVE, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 131–134, 2001.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, London, v. 407, n. 6802, p. 321-326, 2000.

CROSS, A. R.; JONES, O. T. G. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils - specific labeling of a component polypeptide of the oxidase. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 237, n. 1, p. 111-116, 1986.

DAVID, K. M.; COUCH, D.; BRAUN, N.; BROWN, S. GROSCLAUDE, J.; PERROT RECHENMANN, C. The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, n.2, p. 197-206, 2007.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v. 411, p. 826-833, 2001.

DE AZEVEDO, W. F.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; HAVLICEK, L.; STRNAD, M.; KIM, S. H. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues – Crystal structure of human cdk2 complex with roscovitina. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 243, p. 518-526, 1997.

DEN BOER, B.G.; MURRAY, J.A. Control of plant growth and development through manipulation of cell-cycle genes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 138-145, 2000.

DEWITTE, W.; MURRAY, J. A. H. The plant cell cycle. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 235-264, 2003.

DOBREV, P.; MOTYKA, V.; GAUDINOVA, A.; MALBECK, J.; TRAVNICKOVA, A.; KAMINEK, M.; VANKOVA, R. Transient accumulation of *cis*- and *trans*-zeatin type cytokinins and its relation to cytokinin oxidase activity during cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 4, p. 333-337, 2002.

FELLE, H. Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: Interaction of Ca<sup>2+</sup> and pH? **Planta**, Berlin, v. 176, p. 248-255, 1988.

FELLE, H. The apoplastic pH of the *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 49, p. 987-995, 1998.

FERGUSON, W. J.; BRAUNSCHWEIGER, K. I.; BRAUNSCHWEIGER, W. R.; SMITH, J. R.; McCORMICK, J. J.; WASMANN, C. C.; JARVIS, N. P.; BELL, D. H.; GOOD, N. E. Hydrogen ion buffers for biological research. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 104, p. 300-310, 1980.

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H. F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A.; LINSTAD, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J. D. G.; DAVIES, J. M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, London, v. 422, n. 6930, p. 442-446, 2003.

FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 511-566, 1978.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

FRAHRY, G.; SCHOPFER, P. Hydrogen peroxide production by roots and its stimulation by exogenous NADH. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 103, n. 3, p. 395-404, 1998.

GAO, D. J.; KNIGHT, M. R.; TREWAVAS, A. J.; SATTELMACHER, B.; PLIETH, C. Self-reporting arabidopsis expressing pH and [Ca<sup>2+</sup>] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 3, p. 898-908, 2004.

GECHEV, T. S.; VAN BREUSEGEM, F.; STONE, J. M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, p. 1091-1101, 2006.

GEELLEN, D. N. V.; INZE, D. G. A bright future for the bright yellow-2 cell culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 4, p. 1375-1379, 2001.

GEETHA, H. M.; SHETTY, H. S. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment. **Plant Science**, Amsterdam, v. 163, p. 653-660, 2002.

GLAB, N.; LABIDI, B.; QIN, L-X.; TREHIN, C.; BERGOUNIOUX, C.; MEIJER, L. Olomoucine, an inhibitor of the *cdc2/cdk2* kinases activity, blocks plant cell at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 353, p. 207-211, 1994.

GOOD, N. E.; WINGET, G. D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T. N.; IZAWA, S.; SINGH, R. M. M. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, Washington, v. 5, p. 467-477, 1966.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 21–29, 2000.

HAMANN, T. et al. Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. **Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1015-1026, 2009.

HAMMER, M. A.; BALTZ, J. M. Beta-alanine but not taurine can function as an organic osmolyte in preimplantation mouse embryos cultured from fertilized eggs. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 66, p. 153-161, 2003.

HASEZAWA, S.; KUMAGAI, F. Dynamic changes and the role of cytoskeleton during the cell cycle in higher plants cells. **International Reviews on Cytology**, New York, v. 214, p. 161-191, 2002.

HAVLICEK, L.; HANUS, J.; VESELÝ, J.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; SHAW, G.; STRNAD, M. Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and *cdc2* inhibitory activity of olomoucine and related compounds. **Journal of Medical Chemistry**, Washington, v. 40, p. 408-412, 1997.

HESLOP-HARRISON, J. Pollen germination and pollen-tube growth. **International Review of Cytology**, New York, v. 107, p. 1-78, 1987.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, p. 462–468, 2001.

HOLDAWAY-CLARKE, T. L.; WEDDLE, N. M.; KIM, S. R.; ROBI, A.; PARRIS, C.; KUNKEL, J. G.; HEPLER, P. K. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 380, p. 65-72, 2003.

HUMPHREY, T.V.; BONETTA, D.T; GORING, D.R. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. **New Phytologist**, London, v.176, p. 7–21, 2007.

HUSSEY, P. J.; HAWKINS, T. J.; IGARASHI, H.; KALORITI, D.; SMERTENKO, A. The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, p. 915-924, 2002.

JOHN, P. C. L.; ZHANG, K.; DONG, C.; DIEDERICH, L.; WIGHTMAN, F. p34<sup>cdc2</sup> Related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation

in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 20, p. 503–526, 1993.

KATO, K.; MATSUMOTO, T.; KOIWAI, A.; MIZUSAKI, S.; NISHIDA, K.; NOGUCHI, M.; TAMAKI, E. Liquid suspension culture of tobacco cells. In: TERUI, G. (Ed.). **Ferment technology today**. Osaka: Society of Fermentation Technology, 1972. p. 689-695.

KINRAIDE, T. B.; SWEENEY, B. K. Buffered, phosphate-containing media suitable for aluminum toxicity studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, p. 75–83, 2001.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PINEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; VISION, T. J.; SHAFF, J. E.; MONFORTE, A. J.; GUNG, P. L.; HOWELL, S. H. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait: *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p.936-948, 2003.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 237-260, 1995.

KOYAMA, H.; TODA, T.; HARA, T. Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 361-368, 2001.

KOYAMA, H.; TODA, T.; YOKOTA, S.; DAWAIR, Z.; HARA, T. Effects of aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain landsberg in hydroponic culture. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 36, n. 1, p. 201-205, 1995.

LAGER, I.; ANDRÉASSON, O.; DUNBAR, T. L.; ANDREASSON, E.; ESCOBAR, M. A.; RASMUSSEN, A. G. Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 33, p. 1513–1528, 2010.

LEVIN, D.E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 69, n. 2, p. 262-291, 2005.

LIN, H.; FALCHETTO, R.; MOSCA, P. J.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; HAMLIN, L. Mimosine targets serine hydroxymethyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, p. 2548–2556, 1996.

LINDBERG, S.; STRID, H. Aluminum induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentrations in root protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 99, p. 405–414, 1997.

LISZKAY, A.; KENK, B.; SCHOPFER, P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. **Planta**, Berlin, v. 217, n. 4, p. 658-667, 2003.

LOHAR, D. P.; HARIDAS, S.; GANTT, J. S.; VAN DEN BOSCH, K. A. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. **New Phytologist**, London, v. 173, p. 39-49, 2007.

LORCA, G. L.; VALDEZ, G. F. D. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 1, p. 21-25, 2001.

MADHAVA RAO, K. V.; RAGHAVENDRA, A. S.; JANARDHAN REDDY, K. **Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants**. Heidelberg: Springer, 2006. 260 p.

MAGYAR, Z.; DE VEYLDER, L.; ATANASSOVA, A.; BAKO, L.; INZE, D.; BOGRE, L. The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. **Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 2527-2541, 2005.

MATOH, T.; KOBAYASHI, M. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. **Journal of Plant Research**, Sendai, Japan, v. 111, n. 1101, p. 179-190, 1998.

MCQUEEN-MASON, S.; COSGROVE, D. J. Expansin mode of action on cell walls: Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 87-100, 1995.

MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. **Plant Cell**, Baltimore, v. 4, p. 1425-1433, 1992.

MERSSERLI, M. A.; AMARAL-ZETTLER, L. A.; ZETTLER, E.; JUNG, S.-K.; SMITH, P. J. S.; SOGIN, M. L. Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, p. 2569-2579, 2005.

MIEDEMA, H.; ASSMANN, S. M. A membrane-delimited effect of internal pH on the K<sup>+</sup> Outward rectifier of *Vicia faba* guard cells. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 154, p. 227-237, 1996.

MISRA, A.; TYLER, G. Influence of soil moisture on soil solution chemistry and concentrations of minerals in the calcicoles *Phleum phleoides* and *Veronica spicata* grown on a limestone soil. **Annals of Botany**, Oxford, v. 84, p. 401-410, 1999.

MITTLER, R.; HERR, E. H.; ORVAR, B. L.; VAN CAMP, W.; WILLEKENS, H. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 14165-14170, 1999.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004.

MONSHAUSEN, G. B.; BIBIKOVA, T. N.; MESSERLI, M. A.; SHI, C.; GILROY, S. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 104, n. 52, p. 20996-21001, 2007.

MULLER, K.; LINKIES, A.; VREEBURG, R. A. M.; FRY, S. C.; KRIEGER-LISZKAY, A.; LEUBNER-METZGER, G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress (*Lepidium sativum* L.) seed germination and elongation growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, p. 1855-1865, 2009.

MULLINEAUX, P.; KARPINSKI, S. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 43-48, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAGATA, T.; NEMOTO, Y.; HASEZAWA, S. Tobacco BY-2 cell line as the HeLa cell in the cell biology of higher plants. **International Review of Cytology**, New York, v. 132, p. 1-30, 1992.

NAGATA, T.; OKADA, K.; TAKEBE, I.; MATSUI, C. Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 184, p. 161-165, 1981.

NAGATA, T.; SAKAMOTO, K.; SHIMIZU, T. Tobacco by-2 cells: The present and beyond. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 40, n. 2, p. 163-166, 2004.

OROZCO-CARDENAS, M. L.; RYAN, C. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 6553-6557, 1999.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, n. 5, p. 255-265, 2005.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 11, p. 534-540, 2004.

PEDREIRA, J.; SANZ, N.; PENA, M. J.; SANCHEZ, M.; QUEIJEIRO, E.; REVILLA, G.; ZARRA, I. Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, p. 530-534, 2004.

PITZSCHKE, A.; DJAMEI, A.; BITTON, F.; HIRT, H. A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. **Molecular Plant**, Oxford, v. 2, p. 120-137, 2009.

- PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZE, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 476, p. 78-83, 2000.
- POLIDOROS, A. N.; MYLONA, P. V.; SCANDALIOS, J. G. Transgenic tobacco plants expressing the maize Cat2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 10, p. 555–569, 2001.
- POTIKHA, T. S.; COLLINS, C. C.; JOHNSON, D. I.; DELMER, D. P.; LEVINE, A. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 849–858, 1999.
- POTOCKY, M.; JONES, M. A.; BEZVODA, R.; SMIRNOFF, N.; ZARSKY, V. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. **New Phytologist**, London, v. 174, p. 742–751, 2007.
- PROSEUS, T.E.; BOYER, J.S. Calcium pectate chemistry controls growth rate of *Chara corallina*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 15, p. 3989-4002, 2006.
- RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 1271–1274, 1992.
- REICHHELD, J. P.; GIGOT, C.; CHAUBET-GIGOT, N. Multilevel regulation of histone gene expression during the cell cycle in tobacco cells. **Nucleic Acids Research**, London, v. 26, p. 3255–3262, 1998.
- ROUET, M. A.; MATHIEU, Y.; LAURIERE, C. Characterization of active oxygen-producing proteins in response to hypo-osmolarity in tobacco and *Arabidopsis* cell suspensions: identification of a cell wall peroxidase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1323-1332, 2006.
- SAGI, M.; FLUHR, R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 336–340, 2006.
- SAMAC, D. A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 189-207, 2003.
- SANO, T.; BECKER, D.; IVASHIKINA, N.; WEGNER, L. H.; ZIMMERMANN, U.; ROELFSEMA, M. R.; NAGATA, T.; HEDRICH, R. Plant cells must pass a K<sup>+</sup> threshold to re-enter the cell cycle. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 401–413, 2007.
- SANO, T.; KUTSUNA, N.; BECKER, D.; HEDRICH, R.; HASEZAWA, S. Outward-rectifying K<sup>+</sup> channel activities regulate cell elongation and cell division of tobacco BY-2 cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 55-64, 2009.
- SCHOPFER, P.; LISZKAY, A.; BECHTOLD, M.; FRAHRY, G.; WAGNER, A. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. **Planta**, Berlin, v. 214, n. 6, p. 821-828, 2002.

SCHOPFER, P. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 679-688, 2001.

SCHOPFER, P. Histochemical demonstration and localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. **Plant Physiology**, Rockville, v.104, p.1269–1275, 1994.

SHIBAOKA, H.; ASADA, T.; YAMAMOTO, S.; SONOBE, S. The use of model systems prepared from tobacco BY-2 cells for studies of the plant cytoskeleton. **Journal of Microscopy**, London, v. 181, pt. 2, p. 145-152, 1996.

SIVAGURU, M.; HORST, J. W. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 155–163, 1998.

SOARES, V. E.; DUARTE, A. P. R. S. Study of the suitability of 2 – (N-morpholino) ethanesulfonic acid pH buffer for heavy metals accumulation studies using *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Speciation and Bioavailability**, London, v. 12, n. 2, p. 59–66, 2000.

SOUZA, C. A. de. **Alterações celulares relacionadas com a sensibilidade ao alumínio em *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2**. 2004. 123 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

STALS, H.; INZE, D. When plant cells decide to divide. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 8, p. 359-364, 2001.

SWANSON, S.; GILROY, S. ROS in plant development. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 138, n. 4, p. 384-392, 2010.

TEPPER, H. L.; VOTH, G. A. Protons may leak through pure lipid bilayers via a concerted mechanism. **Biophysical Journal**, Bethesda, v. 88, p. 3095–3108, 2005.

TYERMAN, S. D.; BEILBY, M.; WHITTINGTON, J.; JUSWONO, U.; NEWMAN, I.; SHABALA, S. Oscillations in proton transport revealed from simultaneous measurements of net current and net proton fluxes from isolated root protoplasts: MIFE meets patch-clamp. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 7, p. 591-604, 2001.

VANAKOVÁ, R.; KUNCOVÁ, G.; OPATRŇA, J.; SÜSSENBEKOVÁ, H.; GAUDINOVÁ, A.; VANEK, T. Two-dimensional fluorescence spectroscopy – a new tool for the determination of plant cell viability. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, p. 41-47, 2001.

VITORELLO, V. A.; HAUG, A. Capacity for aluminium uptake depends on brefeldin A-sensitive membrane traffic in tobacco (*Nicotiana tabacum* L-cv. BY-2) cells. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 9, p. 733-736, 1999.

VITORELLO, V. A.; HAUG, A. Short-term aluminium uptake by tobacco cells: Growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 97, n. 3, p. 536-544, 1996.

VRANOVÁ, E.; ATICHARTPONGKUL, S.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN CAMP, W. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 99, p. 10870–10875, 2002.

WATANABE, T.; OKADA, K. Interactive effects of Al, Ca and other cations on root elongation of rice cultivars under low pH. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 2, p. 379-385, 2005.

WEINGARTNER, M.; PELAYO, H. R.; BINAROVA, P.; ZWERGER, K.; MELIKANT, B.; DE LA TORRE, C.; HEBERLE-BORS, E.; BOGRE, L. A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. **Journal of Cell Science**, London, v. 116, n. 3, p. 487-498, 2003.

WELINDER, K.G. Plant peroxidases: structure–function relationships. In *Plant Peroxidases* (Penel, C. et al., eds), University of Geneva, Switzerland, p. 1–24, 1992.

WINICUR, Z. M.; ZHANG, G. F.; STAEHELIN, L. A. Auxin deprivation induces synchronous Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 2, p. 501-513, 1998.

YAMAMOTO, Y.; RIKIISHI, S.; CHANG, Y. C.; ONO, K.; KASAI, M.; MATSUMOTO, H. Quantitative estimation of aluminium toxicity in cultured tobacco cells – correlation between aluminium uptake and growth inhibition. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 35, p. 575-583, 1994.

YAHRAUS, T.; CHANDRA, S.; LEGENDRE, L.; LOW, P.S. Evidence for a mechanically induced oxidative burst. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 1259-1266, 1995.

YAN, F.; SCHUBERT, S.; MENGEL, K. Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root-growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 415-421, 1992.

YOKOTA, S.; OJIMA, K. Physiological-response of root-tip of alfalfa to low pH and aluminum stress in water culture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, p. 163-165, 1995.

ZSOLDOS, F.; ERLEI, L. Membrane and ion-transport properties in cereals under acidic and alkaline stress.1.Effects of pH on potassium uptake and growth of rice and wheat. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 53, p. 468-470, 1981.