

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

**LUCÉLIA BORGHO**

**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 memoriam*) 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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

