Ilton Yoshio Narita

Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro.

Analysis of nitric oxide produced during the induction of the adventitious organogenesis in basal leaves of pineapple.

São Paulo

2010

Ilton Yoshio Narita

Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro.

Analysis of nitric oxide produced during the induction of the adventitious organogenesis in basal leaves of pineapple.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientadora: Profª Drª Helenice Mercier

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Narita, Ilton Yoshio

Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro.

Número de páginas: 91

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Organogênese vegetal 2. *Ananas comosus* 3. Óxido Nítrico 4. Peróxido de hidrogênio

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Profª Drª Helenice Mercier

Orientadora

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos pelo apoio

irrestrito em todos os momentos

de minha vida.

Epígrafe

"Life is too short to be interested in everything,

but it is good to be interested in as many things

as are necessary to fill our days."

Bertrand Russell

(The conquest of happiness, p. 160, 1930)

Agradecimentos

À Profª Drª Helenice Mercier, pela oportunidade e por ter acreditado na realização deste trabalho, e também pela orientação, incentivo e amizade durante esses anos de convívio, bem como pelo seu exemplo de dedicação à pesquisa e às pessoas.

Ao Profº Drº Gilberto Barbante Kerbauy, pela amizade e apoio, exemplo de dedicação, humildade, competência profissional e pelo seu entusiasmo pela pesquisa.

Ao Luciano, ex-aluno e atual professor, pela sua amizade e exemplo de dedicação à pesquisa, pela sua ajuda incondicional, criatividade e entusiasmo.

À Aline Bertinatto, Aline Tiemi, Auri, Camila, Cássia, Cíntia, Lia, Lucas, Malka, Paula Natália, pelo apoio, amizade, convívio diário e espírito de colaboração, respeito mútuo, e por tornarem agradável o ambiente de trabalho.

Aos demais integrantes do Laboratório de Fisiologia Vegetal/IBUSP: Adriana Grandis, Adriana Yepes, Aline Cavalari, Augusto, Amanda, Bruna, Flavia, Giovanna, Ivan, Leila, Laura, Luis, Maraba, Mari, Patrícia Pinho, Paulo "Perdigão", Priscila, Sandra, Thalita, Tunico. Agradeço pela amizade e pelo agradável convívio diário.

À Alessandra, pela sua amizade, alegria e pelas muitas conversas descontraídas que tivemos.

Ao Paulo, Alejandra, Nielda e Katherine, pela amizade, entusiasmo e pela disposição em sempre ajudar.

Às técnicas Ana Maria, Eglee, Ingrid, Paula, pela amizade, apoio e disposição em ajudar.

A todas as pessoas do Laboratório de Anatomia Vegetal/IBUSP, em especial a Paula e a Gisele pelo apoio técnico e logístico.

Aos docentes do Laboratório de Anatomia Vegetal/IBUSP, em especial a Profª Drª Nanuza, a Profª Drª Gladys, o Profº Drº Gregório e a Profª Drª Verônica, pela disponibilização dos equipamentos e acesso ao Laboratório aos finais de semana.

Aos secretários do Departamento de Botânica (Carlos, Cesário e Norberto) e da Seção de Pós-Graduação (Érika, Helder e Vera) pelo atendimento e pelo auxílio nas questões burocráticas.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado.

São Paulo

2010

Í N D I C E

I. INTRODUÇÃO 1

I.1. O Óxido Nítrico 1

I.2. A Química do Óxido Nítrico 4

I.3. A Biossíntese do Óxido Nítrico 6

I.4. Papel do Óxido Nítrico 9

I.5. Metodologia de Pesquisa do NO 11

I.5.1. Substâncias Doadoras ou Seqüestradoras de NO 11

I.5.2. Técnicas de Quantificação 12

I.5.3. Bioimagens 14

I.6. O Desenvolvimento Vegetal 16

I.7. Meristemas - Regulação Gênica e Hormonal do MAC 17

I.7.1. A Organogênese Adventícia Induzida *in vitro* 19

I.8. O Abacaxizeiro (*Ananas comosus*) 20

I.8.1. Organogênese Adventícia em Abacaxizeiro 21

II. OBJETIVOS 22

II.1. Estratégias Experimentais 22

III. MATERIAL E MÉTODOS 23

III.1. Material Vegetal 23

III.1.1. Obtenção Inicial das Plantas Fornecedoras de Explantes Foliares e Obtenção dos Explantes Foliares 23

III.2. Quantificação do Óxido Nítrico por Quimiluminescência 26

III.3. Sequestro de Óxido Nítrico 28

III.4. Localização *in situ* da Produção do Óxido Nítrico 32

III.4.1. Técnica e Equipamentos 32

III.4.2. Padronização 32

III.4.3. Delineamento experimental 33

III.5. Dosagem de peróxido de Hidrogênio 35

III.6. Investigação sobre as Vias de Produção de NO 38

IV. RESULTADOS 39

IV.1. Adaptações para Quantificação do Óxido Nítrico em Fluxo Contínuo de Ar Atmosférico para Culturas *in vitro* 39

IV.2. Controle da Eficiência da Adsorção do NO pelo Carvão Ativado 42

IV.3. Inclusão do Sistema de Quantificação de Óxido Nítrico em Rede Elétrica com Fornecimento Ininterrupto de Energia 44

IV.4. Quantificação por Fluxo Contínuo (QFC) com Ar Atmosférico 46

IV.5. Dosagem de Óxido Nítrico em Meio de Cultura SIM Contendo Inibidores da Redutase do Nitrato e da Enzima NOS 52

IV.6. Sequestro do NO e a Formação de Eixos Caulinares 57

IV.7. Bioimagens 58

IV.8. Dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e Integração com os Resultados de Dosagem de Óxido Nítrico (NO) 64

V. DISCUSSÃO 68

VI. CONCLUSÕES 78

VII. RESUMO 79

VIII. ABSTRACT 81

IX. APÊNDICES

Apêndice A 83

Apêndice B 86

Apêndice C 87

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP: 4-aminoantipirina

CO: centro organizador

cGMP: GMP cíclico

cPTIO: 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (carboxi-pTIO)

DAF-2DA: 4,5 diaminofluoresceína diacetato

DAR-4M AM: diaminorodamina-4M AM

DCHBS: ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfônico

H_2O_2: peróxido de hidrogênio

MAC: meristema apical caulinar

MF: massa fresca

NO: óxido nitric

NOS: do inglês "Nitric Oxide Synthase"

NPS: nitroprussiato de sódio

PEG: polietileno glicol

PTIO: 2-fenil-4,4,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido

SIM: do inglês "Shoot Induction Medium"

SNAP: S-nitroso-N-acetil-penicilamina

I - INTRODUÇÃO

I.1. O Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) foi descoberto pelo químico inglês Joseph Priestly em 1772. Inicialmente identificado como gás nitroso, naquela época nenhuma função foi atribuída a esse radical, exceto a de ser um constituinte da poluição atmosférica, encontrado na fumaça liberada pelas indústrias e cigarros.

Entretanto, a percepção sobre a importância do composto mudou radicalmente em 1992, quando o óxido nítrico foi considerado a molécula do ano pela revista *Science*. Posteriormente, o NO foi considerado a droga da década, quando a sua função sinalizadora foi atribuída a uma série de eventos fisiológicos, dentre eles: vasodilatação, atuando como um fator de relaxamento endotelial; inibição da agregação de plaquetas; distribuição da perfusão renal; broncodilatação; controle do movimento peristáltico; neurotransmissão; armazenamento de memórias e lembranças; citotoxicidade do sistema imune e potência masculina (Konstadt, 1995).

Posteriormente em 1998, o prêmio Nobel de Fisiologia foi concedido aos pesquisadores Ferid Murad, Robert Furchott e Louis Ignarro pela descoberta da função sinalizadora do óxido nítrico para o sistema cardiovascular. Assim, o papel que o óxido nítrico desempenha foi descoberto inicialmente para organismos animais (mamíferos) e desde então tem sido constatado cada vez mais que esse radical é um sinalizador universal, atuando em muitas vias fisiológicas.

O estudo da função do óxido nítrico em plantas teve início no final da década de 70 (Klepper, 1979), quando foi constatado que a sua produção em plantas de soja tratadas com herbicidas era diretamente proporcional à quantidade utilizada do agente químico. Entretanto, a compreensão de que o óxido nítrico participa de um grande número de eventos fisiológicos nas plantas adveio de resultados de pesquisas mais recentes.

O interesse em identificar um sistema de produção de óxido nítrico em plantas levou à identificação da atividade da enzima sintase de óxido nítrico, a qual mostrou ser distinta da encontrada em mamíferos, em raízes e nódulos da leguminosa *Lupinus albus* (Cueto *et al*., 1996); em *Arabidopsis thaliana* foi identificado o gene *AtNOS1,* responsável pela superprodução de NO em plantas mutantes (Guo *et al*., 2003). Apesar de vários grupos de pesquisa defenderem a idéia da existência de uma enzima NOS responsável pela rota de síntese de óxido nítrico dependente da L-arginina e de terem observado a sua atividade em vários tecidos e, a nível celular, em organelas como mitocôndrias e perixossomos, até o presente momento não foram identificados nem a enzima e nem o gene homólogo ao da NOS animal em plantas (Besson-Bard et al., 2009). Atualmente, a principal via enzimática comprovada de produção de óxido nítrico é a da redutase do nitrato.

A proposta de um modelo hipotético de atuação do NO no sistema de defesa vegetal envolve a sua atuação intracelular na ativação da transcrição dos genes relacionados à defesa. Acredita-se que o desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida envolva a associação do óxido nítrico com moléculas de S-nitroso-glutationa, atuando como sinalizadores a longa distância transportados pelo floema (Durner e Klessig, 1999). Além disso, constatou-se que o óxido nítrico apresenta capacidade de indução à morte celular programada em células de calos e folhas de *Kalanchoe daigremontiana* e *Taxus brevifolia* (Pedroso *et al.*, 2000).

Foi constatado que o óxido nítrico desempenha uma série de funções nas situações de estresse para as plantas, tais como a indução do fechamento estomático em período de seca, reduzindo dessa maneira a perda de água por transpiração (García-Mata e Lamattina, 2001), neutralização do efeito de metais pesados e salinidade em *Lupinus luteus* (Kopyra e Gwózdz, 2003), redução da toxicidade provocada pelo alumínio por meio da redução do estresse oxidativo em raiz de *Cassia tora L.* (Wang e Yang, 2005) e aumento da resistência à injúria mecânica em folhas de tomateiro (París *et al.*, 2007).

Quanto ao crescimento e desenvolvimento das plantas, constatou-se que o NO atua de muitas formas, como, por exemplo, estimulando a germinação de sementes

(Kopyra e Gwózdz, 2003); regulando o crescimento e orientação do tubo polínico (Prado *et al.*, 2004); induzindo a xilogênese, controlando a morte celular programada e a lignificação da parede celular (Gabaldón *et al.*, 2005, Neill, 2005); formando raízes adventícias (Pagnussat *et al.*, 2002) e nódulos em leguminosas (Pii *et al.*, 2007). Foi observada uma correlação negativa entre a produção de óxido nítrico e ácido abscísico durante a senescência de tecidos (Leshem e Pinchasov, 2000); essa mesma correlação foi encontrada em relação ao etileno durante a maturação de frutos (Magalhaes *et al.*, 2000). O óxido nítrico é capaz, ainda, de induzir a fotossíntese CAM em *Ananas comosus* que, sem o estímulo dado por esse radical, apresenta comportamento C3 (Freschi *et al.*, 2010).

Até o estágio atual das pesquisas, há poucos estudos relacionando o óxido nítrico com o processo de organogênese vegetal. Um desses estudos diz respeito à necessidade do óxido nítrico para a organogênese de raízes adventícias em plantas de pepino (Pagnussat *et al.*, 2002). Recentemente, foi constatada a relação dose-dependente entre óxido nítrico e peróxido de hidrogênio na formação de raízes adventícias da *Tagetes erecta* L. 'Marvel' (Liao *et al.*, 2009).

O papel do óxido nítrico como molécula sinalizadora apresentado por diversos grupos mostra o seu envolvimento em uma série de vias metabólicas, variando desde defesa em plantas até vários aspectos do desenvolvimento. No entanto, ainda há uma grande escassez de informação no que concerne à organogênese e esse foi um dos motivos que levou à realização do presente trabalho.

I.2. A Química do Óxido Nítrico

O óxido nítrico é uma molécula diatômica, composta por um átomo de oxigênio e um de nitrogênio. A presença de um elétron desemparelhado no orbital π confere à molécula uma alta reatividade e, geralmente, uma meia-vida que varia de um a dez segundos. Foi demonstrado que a reação do óxido nítrico com o oxigênio no ar é cerca de 300 vezes mais rápida que na fase aquosa, devido à maior concentração de oxigênio (Nagano e Yoshimura, 2002). Além disso, foi estimado que em meio fluido contendo uma concentração de óxido nítrico de 1 μM e de oxigênio inferior a 100 μM, a meia-vida do radical pode chegar a 15 minutos.

Assim, a meia-vida do radical depende do meio que o envolve. Quando o óxido nítrico está dissolvido na água, ele é relativamente estável; por outro lado, na presença de ar, o óxido nítrico reage rapidamente com o oxigênio, formando dióxido de nitrogênio (Konstadt, 1995). As equações a seguir mostram as reações que ocorrem com o óxido nítrico dissolvido em água (1) e no ar (2).

$$^{(1)}\ 4NO + O_2 + 2H_2O \rightarrow 4NO_2^- + 4H^+$$

$$^{(2)}\ NO + \tfrac{1}{2}\, O_2 \rightarrow NO_2$$

A produção de óxido nítrico ocorre tanto pela ação do homem quanto naturalmente. A produção antropogênica do radical tem ocorrido ao longo do tempo desde o início da era industrial. Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico, bem como a conscientização das pessoas sobre os impactos provocados pela poluição do ar, medidas têm sido adotadas para se reduzir a emissão de gases para a atmosfera – um exemplo é o tratamento dos gases liberados pelas indústrias e automóveis, através de filtros especiais e uso de catalisadores. Na natureza, a forma mais comum de produção de óxido nítrico ocorre durante a ocorrência de relâmpagos, que provoca a reação do nitrogênio com dióxido de carbono, formando o radical livre. Quando o radical reage com o oxigênio, ocorre a formação de dióxido de nitrogênio que reage com a água, formando a chuva ácida.

O óxido nítrico é um gás tóxico, corrosivo, inodoro e levemente solúvel em água. A sua solubilidade em meio aquoso livre de oxigênio é de 1,9 mM a 25°C. Trata-se de um radical solúvel em solventes orgânicos, tais como metanol (14 mM), tolueno (11 mM) e n-hexano (18 mM) – assim, sugere-se que o óxido nítrico é lipossolúvel e que pode ser rapidamente transportado através da membrana celular (Nagano e Yoshimura, 2002).

Além da forma molecular, a existência do óxido nítrico pode ocorrer em outras formas, de maneira intercambiável, como: radical ($NO^{\bullet}$); cátion nitrosonium (NO^{+}) e radical nitroxil (NO^{-}) (Neill *et al.*, 2003).

Quanto ao modo de ação, o óxido nítrico pode agir de maneira direta ou indireta: na primeira, o radical pode interagir diretamente com biomoléculas, metais complexos e outros radicais livres; por outro lado, o óxido nítrico pode interagir indiretamente, através da sua reação com oxigênio ou superóxido, formando espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês "reactive nitrogen species") capazes de reagir com DNA, proteínas e lipídios (Wink e Mitchell, 1998).

Altas concentrações de NO resultam na produção do peroxinitrito, o qual exerce efeitos deletérios sobre lipídios, DNA e proteínas, da mesma maneira que as espécies derivadas de oxigênio, como o radical hidroxil.

I.3. A Biossíntese do Óxido Nítrico

A biossíntese do óxido nítrico em mamíferos

O óxido nítrico, em animais (mamíferos), pode ser produzido de forma constitutiva ou indutiva pela enzima sintase de óxido nítrico (NOS – do inglês "*Nitric Oxide Synthase*"). A produção constitutiva de óxido nítrico ocorre na presença de cálcio e das enzimas NOS, as quais estão localizadas no endotélio, plaquetas, neurônios e outros tecidos. A produção é transitória e a concentração do radical produzido é da ordem de picomolar. Por outro lado, a produção indutiva do óxido nítrico independe da presença de cálcio e ela se mantém por horas, na ordem de nanomolar – essa alta produção promove a citotoxicidade pelo radical, que desempenha função na imunidade celular. (Konstadt, 1995).

A produção de óxido nítrico pela enzima NOS não é a única via disponível para os animais. Foi constatado que a produção do radical a partir do nitrito ocorre sob condições específicas e que é importante para a vasodilatação em situação de hipóxia. Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que as enzimas óxido-redutases, sob hipóxia, também geram óxido nítrico através da redução do nitrito. O nitrito pode funcionar como um sinal único e significante durante um amplo leque de processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo a alteração da expressão gênica, modificação da sinalização promovida pelo cGMP, inibição da atividade do citocromo P450 e nitrosilação de proteínas (Bright *et al*., 2009).

A tabela 1 lista os principais genes responsáveis pela codificação da enzima NOS em mamíferos (Palavan-Unsal e Arisan, 2009). Recentemente, foi descoberta também a produção mitocondrial de óxido nítrico.

Tabela 1 - Principais genes responsáveis pela produção de óxido nítrico em mamíferos. NOS: "*Nitric Oxide Synthase*", ou seja, sintase do óxido nítrico.

Genes sintase do óxido nítrico	Tamanho
Endotelial (eNOS)	135 kDa
Neuronal (nNOS)	160 kDa – é a enzima com maior tamanho
Formas induzidas (iNOS)	130 kDa – sua expressão é aumentada na presença de interferon
Mitocondrial (mNOS)	Descoberta recentemente

A biossíntese do óxido nítrico em plantas

Em plantas foram propostas, inicialmente, três vias de produção de óxido nítrico: uma não-enzimática e duas enzimáticas, sendo que uma das vias enzimáticas envolve a participação de enzima com atividade semelhante a NOS e a outra é dependente da atividade da enzima redutase do nitrato (Neill *et al.*, 2003).

A via não-enzimática ocorre sob condições específicas em compartimentos acidificados (pH inferior a 4,5 e pK de aproximadamente 3,2), como é o caso do apoplasto, local onde ocorre a redução do nitrito (Bethke *et al.*, 2004, Planchet e Kaiser, 2006).

A proposta de produção de óxido nítrico em plantas através de uma enzima NOS, a exemplo do que ocorre em animais, tem sido tema muito controverso entre a comunidade científica. Nessa via, a enzima NOS promove a conversão da L-arginina em L-citrulina na presença de O_2 e NADPH, gerando óxido nítrico, água e $NADP^+$como subprodutos.

Em cloroplastos é possível que a produção de NO seja devido a ocorrência de ambas as vias, tanto a da enzima semelhante a NOS quanto a da redutase do nitrato (Jasid *et al.*, 2006).

A proposta de produção de óxido nítrico pela NOS não é a mais aceita atualmente, uma vez que até agora essa enzima não foi detectada em plantas. Além disso, não foi localizada uma seqüência homóloga para o gene *NOS* de mamíferos em *Arabidopsis thaliana*, espécie cujo genoma já se encontra completamente seqüenciado (Planchet e Kaiser, 2006, Yamasaki *et al.*, 1999).

A principal via conhecida de biossíntese de óxido nítrico faz parte do metabolismo do nitrogênio e envolve a participação da enzima nitrato redutase que, além de catalisar a oxidação do nitrato (NO_3^-) em nitrito (NO_2^-) é responsável pela oxidação do nitrito em óxido nítrico (Planchet e Kaiser, 2006, Crawford, 2006). A equação seguinte mostra como ocorre a produção de óxido nítrico pela via da redutase do nitrato.

$$NO^-_3 \xrightarrow{NR} NO^-_2 \rightarrow NO$$

Posteriormente, outros mecanismos de síntese de óxido nítrico pela ação da enzima nitrito redutase foram descobertos. Dentre eles, constatou-se a produção de óxido nítrico pelos cloroplastos de soja - *Glycine max* var ADM 4800 (Jasid *et al.*, 2006). Resumidamente, as principais vias de produção de óxido nítrico em plantas estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 - Principais vias conhecidas de produção de óxido nítrico em plantas.

Tipo de produção	Via de produção	Características
Não enzimática	Apoplasto	Redução do nitrito; pH < 4,5; pK ~3,2.
Enzimática	Enzimas semelhantes a NOS	Enzimas ainda não identificadas. Produção de NO em diversos tecidos e organelas (mitocôndria e perixossomo).
	Nitrato/Nitrito redutase	Redução do nitrato em nitrito e do nitrito em óxido nítrico.
	Ni:NOR	A enzima nitrito:NO oxidorredutase promove a redução do nitrato à nitrito no apoplasto em raízes.

I.4. Papel do Óxido Nítrico

O papel do óxido nítrico em mamíferos

O óxido nítrico é a segunda molécula gasosa com função sinalizadora reconhecida pela ciência – antes do NO, apenas o etileno desempenhava tal papel (Wojtaszek, 2000). Desde a sua descoberta, uma série de funções importantes tem sido atribuída ao óxido nítrico, demonstrando a importância universal que o radical possui como molécula sinalizadora. A tabela 3 mostra as principais funções desempenhadas pelo óxido nítrico, em mamíferos.

Tabela 3 - Relação das múltiplas funções que o óxido nítrico (NO) desempenha em mamíferos. Modificado de Wink e Mitchell, 1998.

Papel	Efeitos	
Protetor	Antioxidante	
	Inibição da adesão de leucócitos	
	Proteção contra a toxicidade dada pelos fatores de necrose tumoral	
Regulatório	Tônus vascular	
	Adesão celular	
	Permeabilidade vascular	
	Neurotransmissão	
	Broncodilatação	
	Inibição da adesão de plaquetas	
	Supervisão do sistema imune	
	Função renal	
Deletério	Inibição do funcionamento de enzimas	
	Indução de danos ao RNA	
	Indução da peroxidação de lipídeos	
	Aumento da susceptibilidade à:	Radiação Agentes alcalinizantes Metais tóxicos
	Exaurimento das reservas de antioxidantes	

O óxido nítrico pode atuar de forma direta, como um radical livre, ou de forma indireta, através de compostos resultantes da sua reação com o oxigênio (O_2) ou com o radical superóxido (O_2^-), por exemplo, dando origem às espécies reativas de nitrogênio. No primeiro caso, o óxido nítrico pode interagir diretamente com metais complexos, presentes na hemoglobina/mioglobina, com a enzima guanilato ciclase, com o citocromo P450 e com proteínas responsivas à união com ferro. Além disso, o óxido nítrico pode reagir com radicais de alta energia, tais como radicais baseados em carbono, lipídios e dióxido de nitrogênio. No segundo caso, o óxido nítrico reage com o oxigênio ou o radical superóxido, formando as espécies reativas de nitrogênio, que podem catalizar as seguintes reações: nitrosação, formando como produtos nitrosamina e s-nitrosotiol; oxidação, resultando na quebra de moléculas de DNA, peroxidação de lipídios e hidroxilação; e nitração, formando nitrotirosina.

O papel do óxido nítrico em plantas

Apesar dos estudos relacionando o papel do óxido nítrico em plantas terem começado depois do reconhecimento da importância do radical em muitos processos fisiológicos em mamíferos, uma série de descobertas foi realizada e constatou-se a importância que o NO desempenha em muitos processos do crescimento e desenvolvimento (tabela 4), bem como nas situações de estresses biótico e abiótico.

Tabela 4 - Efeitos do óxido nítrico no crescimento e desenvolvimento das plantas. Modificado de Palavan-Unsal e Arisan, 2009.

	Processo fisiológico	Efeito
Crescimento e Desenvolvimento	Expansão foliar	Indução
	Crescimento radicular	Indução
	Senescência	Retardo
	Germinação de semente	Estimulação
	Desestiolamento	Estimulação
	Alongamento do hipocótilo	Inibição
	Amadurecimento de frutos	Inibição
	Abertura/Fechamento estomático	Estimulação/Inibição

I.5. Metodologia de Pesquisa do NO

As pesquisas sobre o papel que o óxido nítrico desempenha em um determinado processo fisiológico envolvem três abordagens básicas, pré-requisitos para o desenvolvimento de estudos subseqüentes. São elas: emprego de substâncias doadoras ou seqüestradoras de óxido nítrico, a utilização de uma ou mais técnicas para fazer a quantificação do radical e o emprego de algum marcador para a visualização *in situ* dos locais de produção na célula e/ou tecido animal ou vegetal.

I.5.1. Substâncias Doadoras ou Seqüestradoras de NO

Os principais fatores limitantes para a realização de estudos sobre os possíveis papéis que o óxido nítrico desempenha em plantas se devem à falta de mutantes com produção diferencial de NO e ao desconhecimento das moléculas capazes de perceber e traduzir os sinais fornecidos pelo NO (Ederli *et al*., 2009).

Assim, o emprego de substâncias doadoras ou seqüestradoras de óxido nítrico tem sido uma ferramenta amplamente utilizada para realizar estudos de suas funções. Por meio do fornecimento ou seqüestro do radical é possível analisar os efeitos fenotípicos provocados no vegetal em estudo ou, ainda, realizar análises proteômicas e genômicas.

Os reagentes mais utilizados na doação de óxido nítrico são o nitroprussiato de sódio (NPS) e o S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP). Para o sequestro do óxido nítrico, são utilizados o 2-fenil-4,4,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO) e o sal de potássio (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO).

O cPTIO é um reagente usado como seqüestrador de óxido nítrico, muito utilizado nos mais variados tipos de estudos envolvendo o radical. O seu modo de ação consiste na sua reação com o NO, formando carboxi-PTI e dióxido de nitrogênio (Cao e Reith, 2002). A figura 1 mostra a molécula de cPTIO e a sua reação com o óxido nítrico.

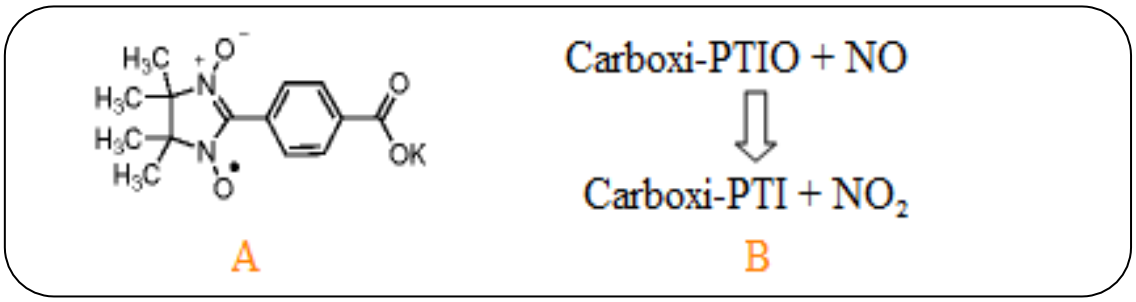


Figura 1 - (A) Molécula de carboxi-PTIO - sal de potássio 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (Sigma-Aldrich®); (B) Reação do cPTIO com o óxido nítrico, formando carboxi-PTI e NO_2. Fórmula Molecular: $C_{14}H_{16}KN_2O_4$; Peso molecular: 315,39.

I.5.2. Técnicas de Quantificação

Várias técnicas foram desenvolvidas para realizar a quantificação de óxido nítrico e cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens em relação ao material que será analisado, que pode ser desde uma planta inteira até um extrato de células, um purificado de mitocôndria ou um purificado da redutase do nitrato (Planchet e Kaiser, 2006).

Há técnicas que permitem quantificar óxido nítrico em tempo real, ou seja, à medida que o radical é liberado pelo material que está sendo analisado. Nesse caso, o material é preservado e permite a sua utilização para outras análises como, por exemplo, quantificação de etileno, dosagem hormonal ou análise proteômica. Entretanto, técnicas que permitem a quantificação de óxido nítrico sem a destruição do material dependem da quantidade do radical produzido, uma vez que é necessário ocorrer a sua difusão para o meio externo, ou seja, para fora das

células e tecidos, de maneira a permitir a sua detecção. Assim, a vantagem de não ter que destruir o material para determinar a quantidade de radical produzido revela uma desvantagem técnica quando o óxido nítrico produzido é liberado em quantidade muito pequena, em concentrações insuficientes para, a partir do local de produção, atravessar organelas, células, tecidos e alcançar o meio externo. Neste caso, as chances de detecção diminuem muito. Uma alternativa a ser adotada é aumentar o número amostral do material, na expectativa de aumentar a concentração de óxido nítrico liberado passível de detecção.

Dentre as técnicas não-invasivas para a detecção de óxido nítrico podemos citar a detecção laser-fotoacústica, a espectrometria de ressonância de spin eletrônico e a quimiluminescência. Por outro lado, há técnicas que exigem um preparo prévio do material a ser analisado para a quantificação de óxido nítrico, como é o caso em que é necessária a obtenção de um extrato para reação com determinados reagentes.

A técnica de quimiluminescência consiste na reação química do NO com o O_3 (ozônio). Dessa reação é formado NO_2 (dióxido de nitrogênio), sendo que uma proporção é formada em um estado eletronicamente excitado (NO_2*) – ao retornar para o estado fundamental, ocorre emissão de luz próximo à faixa do infravermelho, a qual pode ser quantificada por um fotomultiplicador(FEELISCH *et al.*, 2002).

A quantificação por quimiluminescência apresenta uma série de vantagens, dentre elas: alta sensibilidade na detecção de óxido nítrico, alcançando a escala de partes por bilhão ou até mesmo partes por trilhão; alta especificidade para detectar o radical; possibilidade de realizar a quantificação em tempo real (Xu *et al.*, 2004).

A quantificação por quimiluminescência associada a técnicas de cultivo *in vitro* é altamente vantajosa no sentido de não envolver microorganismos, pois bactérias e fungos são grandes produtores de óxido nítrico. Desta maneira, a manutenção de

cultivos em meios de culturas isentos e protegidos de elementos contaminantes permite um maior e melhor controle na detecção do radical.

A tabela 5 relaciona as principais técnicas de quantificação de óxido nítrico, divididas em quantificação direta, quando é o próprio radical que é quantificado, e indireta, quando a quantificação do óxido nítrico é realizada por meio de metabólitos estáveis do radical, tais como nitrato, nitrito ou L-citrulina.

Tabela 5 - Relação das técnicas utilizadas na detecção do óxido nítrico, classificadas de acordo com o tipo de detecção: direta, quando é o próprio radical que é quantificado; ou indireta, quando o produto da quantificação são metabólitos biológicos.

	Técnicas de Quantificação	Princípio
Detecção Direta	Quimiluminescência	Reação do óxido nítrico com ozônio ou luminol.
	Fluorimetria	Utilização de um fluoróforo para óxido nítrico.
	Espectrofotometria	Formação do complexo NO-hemoglobina (NOHb)
	Espectrometria de Ressonância de Spin Eletrônico	Uso de armadilhas para o óxido nítrico, tais como hemoglobina, compostos orgânicos e complexos Fe-ditiol-Carbamato
	Detecção eletroquímica	Detecção através de microeletrodos específicos para óxido nítrico
Detecção Indireta	Fluorimetria	Quantificação de metabólitos biológicos estáveis de óxido nítrico ou L-arginina, como nitrato, nitrito e L-citrulina.
	Espectrofotometria	
	Radiometria	

I.5.3. Bioimagens

A obtenção de bioimagens das células e tecidos produtores de óxido nítrico é feita através da utilização de fluoróforos, que funcionam de maneira ótima sob condições específicas. Três famílias principais de fluoróforos foram desenvolvidas para a detecção de óxido nítrico, sendo elas: DAN – Diaminonaftalenos; DAR – Diaminorodaminas; DAF – diaminofluoresceínas acetato.

A etapa de obtenção de bioimagens está intimamente associada à detecção do óxido nítrico, o que permite a identificação dos sítios produtores do radical.

Um dos fluoróforos mais utilizados é a diaminofluoresceína diacetado (DAF-2 DA). O seu modo de ação pode ser dividido em duas etapas (figura 2): na primeira, ao atravessar a membrana da célula, a molécula DAF-2 DA é hidrolisada pela atividade intracelular das esterases de membrana, formando DAF2; rapidamente, na etapa seguinte, a molécula DAF2, na presença de oxigênio, óxido nítrico e sob pH neutro, é convertida em triazol fluoresceína (DAF-2T), que é a forma fluorescente – nessa condição, quando a molécula é excitada com luz na faixa de 450 nm, ocorre emissão de luz verde-esmeralda a 515 nm que pode ser observada, por exemplo, através de microscopia de fluorescência ou microscopia de varredura a laser confocal.

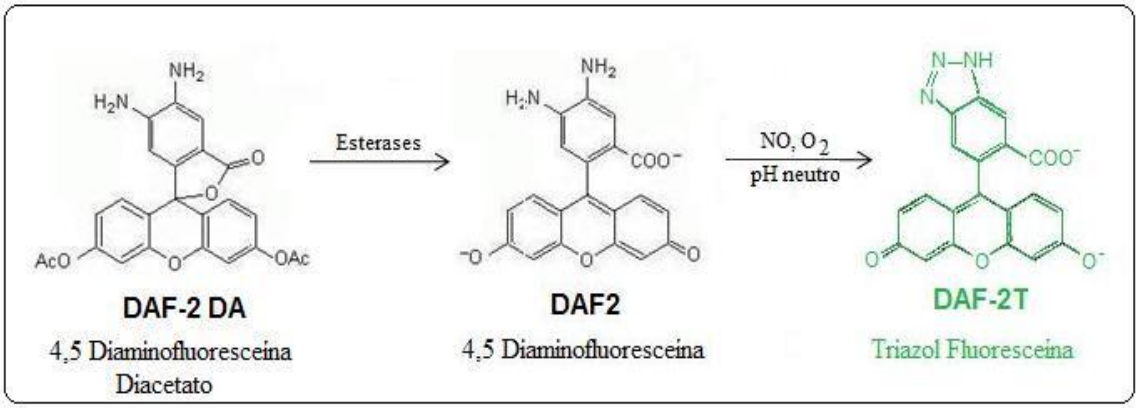


Figura 2 – esquema representativo do modo de ação do marcador para óxido nítrico DAF-2 DA.

Outro fluoróforo bastante utilizado é a diaminorodamina-4M AM (DAR-4M AM). Esse marcador também atravessa a membrana celular e reage com o óxido nítrico, emitindo uma coloração avermelhada a 575 nm quando a molécula é excitada com luz na faixa de 560 nm.

I.6. O Desenvolvimento Vegetal

O desenvolvimento vegetativo de uma planta tem início com a embriogênese, fase na qual se dá o estabelecimento do corpo básico do vegetal e a formação dos meristemas. A capacidade dos meristemas na geração de estruturas altamente repetitivas permite a ocorrência do fenômeno do crescimento indefinido, ou seja, do crescimento aberto. Esse fenômeno é notável em espécies perenes, como é o caso das grandes árvores capazes de crescer por centenas de anos e, em alguns casos, por milhares de anos. Como exemplos da longevidade alcançada por algumas árvores, podemos citar um pinheiro (*Picea abis*) encontrado no Parque Nacional de Fulufjället, província de Dalarna, noroeste da Suécia – a idade da árvore calculada foi de 9.550 anos em 2008. Recentemente, no Condado de Riverside (sul da Califórnia, Estados Unidos), foi encontrada a árvore mais antiga do mundo. Trata-se de um carvalho da espécie *Quercus palmeri* com 13 mil anos, que superou as condições climáticas mais extremas e que tem sobrevivido desde a Era do Gelo (May *et al*., 2009).

Essa grande longevidade alcançada por algumas espécies se deve ao estabelecimento dos meristemas primários durante a fase de embriogênese. Nesta fase, o padrão axial do embrião, com o estabelecimento da região apical e basal, é determinado logo na primeira divisão do zigoto – posteriormente, depois de algumas divisões celulares, a região apical do embrião dá origem ao meristema apical da parte aérea, enquanto que a região basal dá origem ao meristema da raiz. Logo após a fase de germinação, estes meristemas se tornam ativos, sendo o meristema apical caulinar o responsável pela formação de todos os tecidos e órgãos aéreos e o meristema apical radicular, pela extensão da raiz primária. (Doerner, 2003).

I.7. Meristemas – Regulação Gênica e Hormonal do MAC

Regulação Gênica

A função meristemática é regulada por uma grande rede de sistemas, dinâmicos e interconectados, que incluem as redes de transcrição, sinalização intercelular, transporte polarizado de hormônios (Heisler e Jönsson, 2007).

Os meristemas são caracterizados por serem constituídos de populações de células de pequenas dimensões e isodiamétricas. Estas células são responsáveis pela formação de todos os tecidos e órgãos da planta, de acordo com uma rota de diferenciação pré-determinada. Entretanto, um conjunto das células meristemáticas se autoperpetua indefinidamente, com a manutenção da sua pluripotencialidade – são denominadas células-tronco e estão situadas em um microambiente, o nicho de células-tronco, onde a diferenciação é inibida pela sinalização das células localizadas ao seu redor. Células-filhas que se originam da divisão das células-tronco, e que permanecem na região do nicho, persistem como células-tronco; por outro lado, as células-filhas que se formaram fora do nicho assumem uma rota de diferenciação de órgão em resposta à sinalização posicional (Tucker e Laux, 2007). As células-tronco são responsáveis pelo suprimento das células do meristema e, de modo final, por todas as células que compõem os mais variados tecidos e órgãos da planta (raízes, caule, folhas e demais estruturas).

A manutenção dos nichos de células-tronco é regulada geneticamente e o modelo está bem descrito para *Arabidopsis thaliana.* Nesse modelo, o meristema apical caulinar (MAC) é dividido em zona central e periférica. Enquanto as células-tronco são mantidas na zona central, as suas células descendentes são deslocadas em relação à zona central, fazendo parte da zona periférica. O gene *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* é expresso tanto na zona central quanto na periférica, sendo responsável pela manutenção da divisão celular e retardo na diferenciação em órgãos das células; entretanto, a manutenção das células-tronco é dependente também da expressão do gene *WUSCHEL (WUS)* no centro organizador (CO). O gene CLAVATA (CLV) é responsável pela regulação da expressão do gene

WUSCHEL e, conseqüentemente, pelo tamanho da população das células-tronco. Em linhas gerais, a regulação ocorre a partir da produção do peptídeo CLV3, que inibe o *WUS* através da ativação de um receptor transmembrânico do tipo cinase, composto pelas subunidades CLV1 e CLV2. Uma falha na rota regulatória CLV provoca um grande aumento do número de células na zona central, devido a um aumento da proliferação das células da zona central ou a uma redução da passagem das células da zona central para a zona periférica. Um fato interessante é a conversão das células da zona periférica em células com identidade igual àquelas localizadas na zona central, quando se promove a inibição da função da *CLV3* (Sablowski, 2007).

A rota CLAVATA é uma parte do mecanismo que regula precisamente o número de células-tronco. A rota responsável pela inibição da diferenciação das células-tronco e seus descendentes imediatos é dependente dos genes da classe I *KNOTTED1-like homeobox (KNOX)*, como por exemplo, o STM. Quando há uma inibição da expressão dos genes do tipo *KNOX*, ocorre a ativação de genes que antagonizam as funções meristemáticas e tem-se início a formação de órgãos na periferia do meristema (Castellano e Sablowski, 2005), tais como folhas e flores.

Regulação hormonal do MAC

O surgimento de um primórdio foliar na região do meristema apical caulinar deve se ao transporte/acúmulo de auxina e também à inibição dos genes *KNOX*. Depois do estabelecimento do primórdio do órgão, este funciona como um dreno para a auxina, exaurindo-a das células ao seu redor. Desta maneira, outro primórdio foliar somente poderá se estabelecer a certa distância do primeiro já em desenvolvimento, portanto em uma posição distinta onde a auxina possa se acumular (Castellano e Sablowski, 2005). Além da auxina, foi proposto também que as giberelinas poderiam exercer um papel antagonista na expressão dos genes *KNOX* no processo da organogênese. Além disso, a síntese de citocininas é inibida por altas concentrações de auxina, impedindo a expressão de STM e afetando a distribuição da auxina através do controle da filotaxia, influenciando desta maneira no surgimento de um novo primórdio foliar.

I.7.1. A Organogênese Adventícia Induzida *in vitro*

A organogênese adventícia em plantas cultivadas *in vitro* pode ocorrer a partir de explantes (tecidos ou órgãos) incubados em meio de cultura contendo reguladores de crescimento, ou seja, substâncias sintéticas que mimetizam as auxinas e citocininas endógenas. Esse processo é dependente de um fino balanço entre essas substâncias reguladoras do crescimento, sendo responsável pela indução de uma determinada estrutura, por exemplo, eixos caulinares ou raízes (Christianson e Warnick, 1983).

A organogênese *in vitro* pode ser classificada como direta ou indireta: no primeiro caso, a formação de um novo órgão ocorre sem a formação intermediária de calos; no segundo caso, a formação de calos, que são estruturas compostas por grupos de células pluripotentes crescidas em meio de cultura com reguladores de crescimento, ocorre em um estágio anterior à formação da estrutura adventícia. Um exemplo do primeiro caso é a indução da formação de eixos caulinares a partir de bases foliares de abacaxizeiro incubadas sob concentrações específicas de auxina e citocinina (Wang *et al.*, 2009). No segundo caso, a formação indireta de estruturas adventícias pode ser exemplificada por folhas de tabaco. Em um primeiro instante, induz-se a formação e o crescimento de calos; em um segundo momento, com o uso de balanços específicos de auxina e citocinina, os calos são induzidos a formarem raízes ou eixos caulinares (Skoog *et al.*, 1967).

Entretanto, a organogênese adventícia pode ocorrer sem a indução por reguladores de crescimento. Plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) representam um modelo vegetal que exemplifica o fino controle exercido pelo ápice sobre região radicular – o simples isolamento de pontas de raízes e a incubação em meio de cultura sem reguladores de crescimento resultam na formação de plantas inteiras (Kerbauy, 1984).

I.8. O Abacaxizeiro (*Ananas comosus*)

O *Ananas* comosus *(L.) Merr.* (figura 3), conhecido popularmente como abacaxizeiro, pertence à família *Bromeliaceae*, classe Monocotiledônea, e sua infrutescência é um dos principais produtos comercializados nos países tropicais e subtropicais.

Figura 3 - *Ananas comosus.* A – Plantas adultas e suas infrutescências (fonte: www.vuatkerala.org); B – Planta cultivada *in vitro,* obtida a partir de um segmento nodal do eixo caulinar estiolado de uma planta crescida no escuro. Idade aproximada: 3-4 meses; altura: ~ 10 cm.

Originário das Américas, o abacaxizeiro tem como principais produtores os seguintes países: Tailândia, Brasil, Filipinas, Estados Unidos (Havaí), China, Índia e Nigéria (Souza *et al*., 2009). A sua produção mundial em 2008 chegou a mais de 19 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável pela produção de aproximadamente 13% desse total (HTTP://FAOSTAT.FAO.ORG).

No Brasil, os principais estados produtores de abacaxi são a Paraíba, Minas Gerais, Pará, Bahia e Ceará (HTTP://WWW.IBGE.GOV.BR). Conhecido como ibacati (fruta cheirosa) pelos indígenas brasileiros, possui uma série de outros nomes: em espanhol, o abacaxizeiro é conhecido como "*piña*" e, em inglês, como "*pineapple*"; franceses, italianos, holandeses e alemães chamam-na de "*ananas*".

O abacaxizeiro é uma planta perene, de baixa estatura, cujas raízes pequenas e profusas alcançam até 15 cm de profundidade no solo; as folhas são esverdeadas e apresentam forma de calhas, dispostas em espiral ao redor da haste central. No final do desenvolvimento, as flores dão origem a pequenos frutos, denominados bagas, que ficam próximas umas das outras e dispostas ao redor de um eixo central. A infrutescência apresenta forma cilíndrica ou cônica, composta pela parte consumível localizada na base e uma coroa de folhas no ápice. A polpa do fruto apresenta aroma e sabor, além de ser levemente ácido; aproximadamente 75% da massa fresca é composta por açúcares, além de possuir sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e vitaminas (A, B_1, B_2, C e ácido nicotínico) (HTTP://WWW.SEAGRI.BA.GOV.BR).

I.8.1. Organogênese Adventícia em Abacaxizeiro

Estudos sobre a organogênese adventícia em plantas de abacaxizeiro datam desde a década de 70. Nessa época, a busca por técnicas alternativas de propagação assexuada de plantas de importância horticultural resultou na descrição dos fatores que controlam a morfogênese de plantas a partir de eixos caulinares e explantes foliares de abacaxizeiro. Foi constatada a necessidade da aplicação de auxinas e citocininas e suas influências sobre o processo organogenético adventício (Mathews e Rangan, 1979).

Plantas de abacaxizeiro representam um modelo vegetal interessante para o estudo do processo da organogênese adventícia. Plantas crescidas a partir de segmentos nodais estiolados apresentam, na região basal das folhas, células que, quando incubadas em meio de cultura contendo reguladores de crescimento na concentração de 0,53 μM de ácido naftaleno acético para cada 8,87 μM de benzilaminopurina, são capazes de dar início à formação de meristemas adventícios (Souza *et al.*, 2003, Mercier *et al.*, 2003). Além de apresentar uma capacidade intrínseca de formar uma planta diretamente através da indução adventícia do eixo caulinar, o *Ananas comosus* é um modelo vegetal que elimina a necessidade do estabelecimento e manutenção de culturas indiferenciadas (calos) nos laboratórios de pesquisa (Wang *et al.*, 2009).

II - OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivos estudar se o óxido nítrico estaria envolvido com a sinalização da organogênese adventícia que ocorre em bases foliares de plantas de *Ananas comosus* quando essas são cultivadas *in vitro* na presença de reguladores de crescimento, promovendo a formação de eixos caulinares. Além disso, procurou-se conhecer a via de produção e localização *in situ* do NO sintetizado pelos explantes foliares durante a indução e o estabelecimento da organogênese adventícia. Como se tratou de um dos primeiros trabalhos realizados *in vitro* visando à detecção do NO por quimiluminescência do Laboratório de Fisiologia Vegetal, um outro objetivo desta pesquisa foi adequar o método de quantificação de NO em fluxo contínuo para a condição de cultivo asséptico dos explantes foliares de abacaxizeiro.

II.1. Estratégias Experimentais

Para isso, foram realizadas as seguintes experimentações: quantificação do óxido nítrico pela técnica de quimiluminescência; obtenção de bioimagens para identificação dos tecidos responsáveis pela emissão de óxido nítrico durante a organogênese, com uso dos marcadores DAF 2-DA e DAR-4M AM, e verificação da essencialidade do radical para a etapa de indução à organogênese através do cultivo dos explantes em meio indutor da organogênese (SIM, do inglês "Shoot Induction Medium"), contendo o seqüestrador de óxido nítrico, o cPTIO. Adicionalmente, foram realizadas quantificações comparando a produção de óxido nítrico por bases foliares incubadas em meio de cultura SIM, contendo inibidores das vias enzimáticas NR e NOS.

A produção de peróxido de hidrogênio por bases foliares cultivadas em meio de cultura SIM também foi analisada, visando conhecer a existência de um outro possível sinalizador relacionado com a produção de NO.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Material Vegetal

O material vegetal utilizado foi a espécie *Ananas comosus* variedade Smooth Cayenne. Plantas clonadas e cultivadas *in vitro* no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo foram as fontes de explantes foliares para os experimentos.

III.1.1. Obtenção Inicial das Plantas Fornecedoras de Explantes Foliares e Obtenção dos Explantes Foliares

O número necessário de plantas para a obtenção dos explantes foliares foi obtido pelo cultivo de plantas no escuro visando ao seu estiolamento (Souza *et al.*, 2003). O estiolamento e o crescimento de plantas foram realizados em frascos de vidro que receberam 80 mL de meio de cultura da formulação MS (Murashige e Skoog, 1962), cuja composição encontra-se descrita no apêndice (item A).

A figura 4A mostra o procedimento adotado para a multiplicação de plantas utilizadas nos experimentos. Plantas com idade entre 5-6 meses tiveram suas folhas removidas, bem como o excesso de raízes e foram inoculadas no meio de cultura MS e mantidas em ambiente com ausência de luz, por um período mínimo de 3 meses. Ao término do período de estiolamento, os segmentos nodais das plantas estioladas foram isolados e depositados em uma placa de Petri® contendo uma lâmina de água esterilizada para evitar a dessecação. Após o acúmulo de um número suficiente de segmentos nodais isolados, estes foram inoculados em frascos de vidro contendo 80 mL meio de cultura MS, onde cresceram por um período de 3-4 meses (figura 4B). A formação das plantas a partir dos segmentos nodais ocorreu em ambiente controlado, sob fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25±1°C e intensidade luminosa de 50 $\mu moles.m^{-2}s^{-1}$ obtida a partir de lâmpadas brancas fluorescentes.

Na figura 4 (B1-B4) são exibidas as etapas para a obtenção dos explantes foliares utilizados nos experimentos.

Plantas com idade variando de três a quatro meses foram utilizadas para a obtenção dos explantes foliares utilizados nos experimentos. Os explantes foram obtidos a partir da 4ª e 5ª folha do eixo caulinar, através do isolamento da região basal – extremidade final da folha com cerca de 1 centímetro. Uma vez isolado, o explante era mantido em uma placa de Petri® contendo uma lâmina de água esterilizada para evitar seu dessecamento, estando então disponível para utilização nos experimentos.

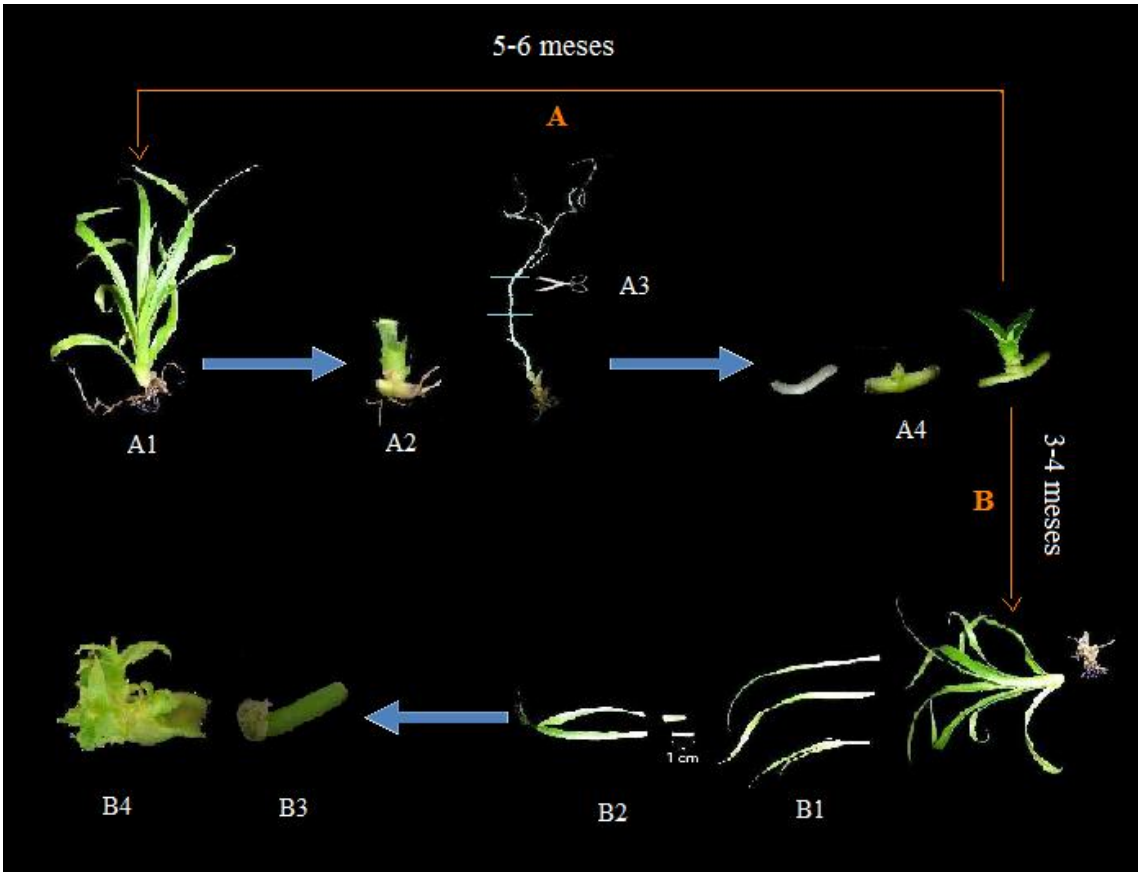


Figura 4 - (A) Procedimento para multiplicação de plantas a partir de segmentos nodais de uma planta estiolada. A1-Planta jovem de 5-6 meses. A2-Planta com as folhas removidas e que foi colocada para estiolar. A3–Remoção do segmento nodal. A4 – Desenvolvimento da gema nodal até eixo caulinar. (B) Obtenção de explantes a partir de uma planta com idade de 3-4 meses. B1–isolamento das 4ª e 5ª folhas. B2-isolamento das bases foliares. B3-formação de protuberâncias em meio de cultura indutor de organogênese. B4-desenvolvimento dos eixos caulinares a partir das protuberâncias.

Dois foram os tipos de tratamentos realizados, conforme o meio de cultura: o primeiro, denominado SIM ("Shoot Induction Medium"), foi o meio de cultura indutor das bases foliares à organogênese, ou seja, à formação de eixos caulinares a partir de estruturas denominadas protuberâncias (figura 4 - B3). Esse meio de cultura continha reguladores de crescimentos e a sua composição está descrita no apêndice A (item B). O segundo meio de cultura foi o meio de Knudson (KN) sem adição de substâncias reguladoras do crescimento e funcionou como controle para o primeiro. Nesse caso, os explantes incubados não sofreram indução, ou seja, não formaram protuberâncias ou eixos caulinares. A composição desse meio está descrita no apêndice A (item C).

III.2. Quantificação do Óxido Nítrico por Quimiluminescência

A quantificação do óxido nítrico foi realizada pela técnica de quimiluminescência, com a utilização do analisador de NO modelo CLD 88 (Eco Physics®), com resolução de leitura na faixa de partes por bilhão ou partes por trilhão (ppb/ppt). O equipamento encontra-se instalado no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Adequações à medida *in vitro*

O nitrogênio (N_2) é o gás mais utilizado para fazer o transporte de moléculas de óxido nítrico (NO) para a quantificação pela técnica da quimiluminescência. O fato de ser um gás inerte é uma das suas principais vantagens, pois não reage com o radical e, dependendo do grau de pureza no seu preparo, é isento de elementos contaminantes ou traços residuais de óxido nítrico que poderiam influenciar nos resultados finais.

Entretanto, a utilização do nitrogênio como gás transportador submete o material vegetal a ser analisado à ausência de oxigênio, ou seja, anóxia, provocando uma série de alterações fisiológicas nas plantas, entre elas a indução da produção do próprio óxido nítrico.

Uma alternativa ao uso do gás nitrogênio foi a utilização de ar sintético – esta opção, apesar de resultar em uma redução na quantificação de óxido nítrico devido à sua reação com o oxigênio presente no ar, é uma opção interessante, pois elimina o problema da anóxia e permite quantificações por aproximadamente 4 dias (quando se utilizar um cilindro com capacidade de 6 m^3). Entretanto, essa solução não atende às necessidades quando as quantificações devem ocorrer por muitos dias consecutivos, pois exige recargas constantes dos cilindros de ar sintético, interrompendo a obtenção dos dados.

Assim, para que fosse possível a quantificação ininterrupta, a alternativa adotada foi utilizar um compressor de ar atmosférico, equipamento responsável pelo fornecimento do gás de arraste necessário para a quantificação do óxido nítrico produzido pelas amostras. O sistema de eliminação de resíduos de óxido nítrico contaminante, baseado em tubos cilíndricos contendo carvão ativado, tem se mostrado eficiente e permite uma leitura confiável dos valores do radical liberado pelo material em estudo. Essa solução já se encontrava implantada e em funcionamento antes da presente proposta de quantificação em fluxo contínuo com ar atmosférico.

O maior problema foi garantir a não contaminação do material *in vitro*, no qual se deseja realizar a quantificação do óxido nítrico, pois o ar atmosférico contém naturalmente uma série de agentes contaminantes para o meio de cultura, dentre eles esporos de fungos e bactérias. Quando em contato com um meio rico em nutriente, esses agentes contaminantes liberam uma grande quantidade de óxido nítrico e interferem na leitura da produção do material que se deseja analisar.

Assim, para contornar esse problema foi necessário implementar um sistema que realizasse a descontaminação do ar atmosférico em uma etapa anterior ao transporte do ar contendo óxido nítrico liberado pelo material de estudo.

Da mesma maneira, foi necessário garantir que o ar atmosférico, que contém uma grande quantidade de óxido nítrico em comparação ao ar sintético e cuja concentração varia ao longo do dia, estivesse isento do radical.

Uma vez solucionadas essas duas maiores dificuldades, as quantificações foram realizadas em fluxo contínuo, com a utilização de ar atmosférico fornecido através de um compressor, segundo as propostas experimentais definidas a seguir.

Experimentos para Quantificação em Fluxo Contínuo (QFC)

A quantificação em fluxo contínuo foi realizada em frascos tipo "Erlenmeyer" com capacidade de 1 litro, contendo 100 mL de meio de cultura SIM ou KN. Sobre o meio de cultura geleificado foram inoculados 100 explantes. Durante o período de quantificação, o frasco foi mantido na câmara de fitotron sob fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25±1°C e intensidade luminosa de 250 μmoles.$m^{-2}s^{-1}$ obtida a partir de lâmpadas brancas fluorescentes. A quantificação foi realizada por um período ininterrupto de 7 dias. Depois, o mesmo frasco foi mantido nas prateleiras iluminadas da câmara de fitotron até completar 60 dias, visando analisar o percentual de explantes com formação de novas plantas. As leituras fornecidas pelo analisador de NO foram registradas através de macro Excel® executada em um computador destinado exclusivamente à realização dessa tarefa. A análise dos resultados foi feita por meio dos softwares MS-Excel® e OriginPro 8.

III.3. Seqüestro de óxido nítrico

Neste projeto, para caracterizar um possível envolvimento do NO na indução à organogênese das bases foliares de *Ananas comosus* ou em uma etapa subseqüente à indução, ou seja, na execução da organogênese propriamente dita, foi utilizada uma solução de cPTIO fornecida aos explantes logo após a sua obtenção.

Determinação da concentração de cPTIO

Testes prévios demonstraram que a concentração de 100μM não mostrou diferenças significativas na taxa de formação de gemas adventícias nos explantes. Entretanto, na literatura consultada, um grande número de trabalhos indicava o emprego do seqüestrador cPTIO na faixa de concentração de 100μM. Optou-se por realizar o experimento utilizando-se 400μM de seqüestrador, tendo em vista os resultados prévios e pelo fato de ser uma concentração quatro vezes superior ao

usualmente utilizado para outras plantas. A tabela abaixo descreve os controles e tratamentos empregados neste experimento.

Tabela 6 – Descrição dos tratamentos realizados para avaliar a participação do óxido nítrico na organogênese em bases foliares de *Ananas comosus.*

Tratamento / Controle	Descrição
Tratamento SIM-cPTIO	Explantes incubados em meio SIM cuja superfície geleificada teve adicionada 3 mL da solução de cPTIO. Foi considerado o volume de 5 mL do meio de cultura para o cálculo da concentração de 400µM de cPTIO.
Controle SIM-H_2O	Explantes obtidos e incubados da mesma maneira que o tratamento SIM, mas que tiveram adicionados, sobre o meio geleificado, 3 mL de água esterilizada.
Controle KN	Controle realizado para com a incubação dos explantes em meio KN, o qual não contém os reguladores de crescimento. Trata-se do controle negativo para o experimento.

Para cada tratamento ou controle foram realizadas duplicatas experimentais e o número amostral adotado foi de 50 explantes por frasco contendo 5 mL de meio de cultura. Foram utilizados "Erlenmeyers" de 125 mL, os quais tiveram os seus bocais fechados com rolhas contendo um furo vedado por algodão embebido com solução de sulfato de cobre.

Preparo da solução de cPTIO 400µM

A solução para o seqüestro do óxido nítrico dos explantes foi preparada com o reagente carboxi-PTIO (Sigma Aldrich™) diluída em água ultrafiltrada. Os materiais utilizados no preparo da solução (béquer, bastão de vidro, filtros da marca Millipore® e água ultrafiltrada) foram previamente esterilizados por autoclavagem e a sua manipulação ocorreu sob condições assépticas, em fluxo laminar.

Dois aspectos em relação ao cPTIO foram considerados na realização desse experimento: a preocupação em realizar o seqüestro do óxido nítrico logo após o

isolamento das bases foliares da planta-mãe e a manutenção da concentração do reagente constante ao longo dos dias de tratamento, levando-se em consideração o volume do meio de cultura geleificado e a degradação natural do seqüestrador ao longo do tempo.

Solução de cPTIO para tratamento dos explantes

A solução de 400µM foi preparada diluindo-se o reagente cPTIO em água esterilizada e disposta em uma placa de Petri ®. À medida que as bases foliares eram isoladas, a cada lote de dez explantes esses foram incubados na solução contendo o seqüestrador, com tempo mínimo de permanência de uma hora, até completar o número amostral do tratamento (n = 50). O objetivo desse procedimento foi realizar o seqüestro prévio de óxido nítrico produzido pelos explantes, antes de se proceder a inoculação dos mesmos no meio de cultura.

Solução de cPTIO para o cultivo *in vitro* dos explantes

A solução de cPTIO foi preparada diariamente e a sua concentração foi calculada de acordo com o meio de cultura. O volume mínimo de meio necessário para que o processo de indução das bases foliares à organogênese foi determinado experimentalmente, considerando-se o espaço necessário para acomodar todos os explantes de um tratamento e a própria distribuição uniforme do meio de cultura no interior do frasco. Dessa maneira optou-se por utilizar frascos do tipo "Erlenmeyer" de 125 mL, contendo 5 mL de meio de cultura geleificado, sobre o qual foram ultrafiltrados de acordo com o tratamento, diariamente, 3 mL da solução de cPTIO. Apenas depois de a solução de cPTIO ter sido ministrada sobre o meio de cultura é que os explantes foram inoculados, dando-se, então, início à contagem do tempo de incubação.

Proposta experimental

Fornecimento diário da solução de cPTIO, variando de 1 a 8 dias consecutivos, com o objetivo de determinar a influência que o seqüestro de óxido nítrico poderia exercer sobre a organogênese e o desenvolvimento dos eixos caulinares. A tabela 7 esquematiza o procedimento adotado para a realização desse experimental.

Tabela 7 – Esquema proposto para a análise da participação do óxido nítrico sobre a organogênese. Tratamentos variam de T1 a T8 – os números indicam a quantidade de dias nos quais a solução de cPTIO foi fornecida para os explantes. Ao término de cada período de tratamento, os explantes foram lavados em água esterilizada e transferidos para o meio de cultura SIM, onde permaneceram por 30 dias.

		Tratamentos acumulativos (400 µM cPTIO)									
		Dias de cultivo *in vitro*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	...	30
Controles/Tratamentos	C0										
	C1										
	C2										
	T1										
	T2										
	T3										
	T4										
	T5										
	T6										
	T7										
	T8										

Legenda	
C	Controle
T	Tratamento
	Meio KN
	Meio SIM
	Meio SIM + água
	Meio SIM + seqüestrador cPTIO (400 µM)

III.4. Localização *in situ* da Produção do Óxido Nítrico

III.4.1. Técnica e Equipamentos

As lâminas contendo o material vegetal para análise em microscopia de fluorescência foram obtidas a partir do emblocamento dos explantes em polietileno glicol (PEG 1500), após incubação prévia em solução aquosa do marcador DAF 2-DA na concentração de 20 μM. Os cortes foram realizados no micrótomo rotatório Leica 2040.

As imagens foram obtidas a partir de uma câmera digital Leica DFC320 acoplada ao microscópio de fluorescência Leica – modelo DMLB; o software de aquisição de imagens foi o Leica IM50 Versão 4.0 Release 132.

Os procedimentos de montagem das lâminas e obtenção de imagens foram realizados no Laboratório de Anatomia do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

III.4.2. Padronização

Testes preliminares de cortes obtidos a mão livre mostraram que camadas de espessuras distintas poderiam induzir a interpretação de uma maior produção de óxido nítrico em regiões de cortes mais grossos em relação aos mais finos, quando observados ao microscópio de fluorescência, dificultando a análise dos resultados apresentados pelo material analisado. Assim, técnicas de anatomia foram utilizadas para a obtenção de cortes uniformes, que permitiram a identificação dos sítios produtores de óxido nítrico e, ao mesmo tempo, possibilitaram a identificação das regiões que dão início à formação das protuberâncias que, posteriormente, resultam na formação dos eixos caulinares.

Durante a fase de padronização, técnicas tradicionais para a obtenção de cortes anatômicos foram testadas, dentre elas a fixação. Constatou-se que a fixação do tecido por paraformaldeído e glutaraldeído inutilizava a marcação pelo fluoróforo. Testes de fixação por nitrogênio líquido também não surtiram o efeito desejado,

uma vez que as células eram danificadas durante o processo. Frente às dificuldades de se aliar o processo de fixação ao da preservação do fluoróforo, que apresenta meia-vida relativamente curta, optou-se por excluir a fase de fixação. Além disso, a etapa de desidratação do material também foi excluída, tendo em vista a inutilização do fluoróforo durante a realização da série etanólica.

III.4.3. Delineamento experimental

Os explantes foram obtidos conforme disposto no item 3.2.2 e incubados no marcador para óxido nítrico diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) na concentração final de 20μM, diluído em água ultrapurificada, mantidos sob agitação constante e protegidos da luz por 1 hora. Ao término do período de marcação, foram realizadas três lavagens consecutivas em água destilada, para remoção do excesso da solução de DAF.

Posteriormente, procedeu-se à infiltração sucessiva dos explantes em soluções de PEG 1500 nas concentrações de 20%, 40%, 60%, 80% e 100%, por uma hora cada. As soluções de PEG, exceto a de 100%, foram preparadas através da sua diluição em água destilada. Durante o período de infiltração, os explantes foram mantidos sob vácuo a 450 mmHg em dessecador de vidro, em uma estufa a 56°C.

Finalizada a etapa de infiltração, os explantes foram imersos em PEG 100% depositados em formas quadradas de papel. O tempo para esfriamento e endurecimento dos blocos durava aproximadamente 45/60 minutos.

Os blocos eram removidos das formas de papel e cortes na espessura de 45 μm foram obtidos através de um micrótomo rotatório e depositados em vidro de relógio contendo água destilada. Logo após a montagem das lâminas com as suas respectivas lamínulas, as imagens foram registradas através de uma câmera digital acoplada ao microscópio de fluorescência. A excitação do marcador DAF-2 DA foi

realizada sob comprimento de onda de 450 nm, com emissão da fluorescência verde-esmeralda a 515 nm.

A figura 5 apresenta um resumo esquemático de todo o procedimento adotado para a visualização *in situ* da produção de óxido nítrico pelo explantes.

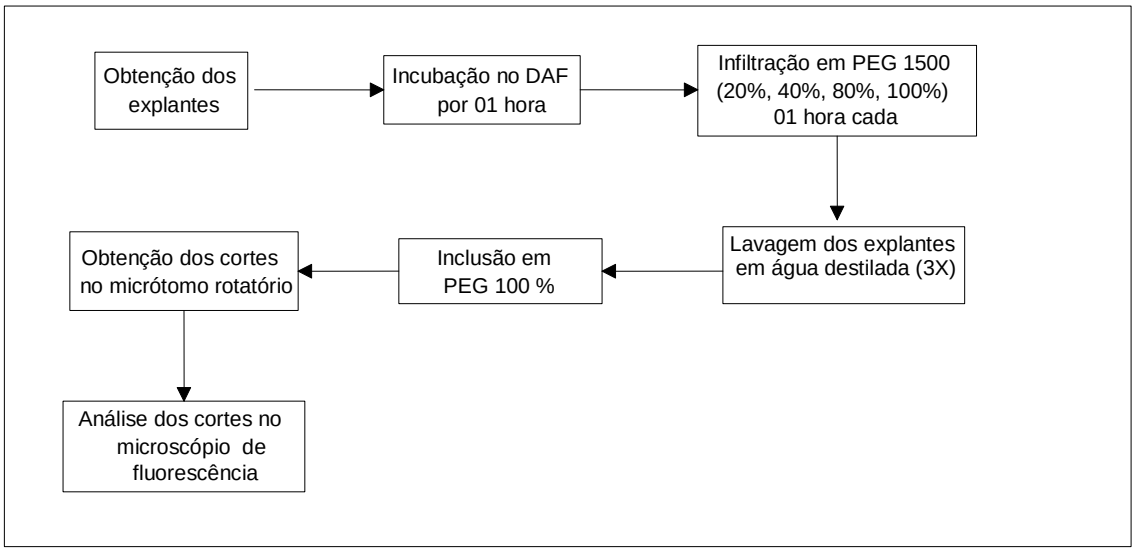


Figura 5 – Esquema para o procedimento de obtenção de cortes anatômicos para visualização *in situ* dos sítios de produção de óxido nítrico pelos explantes foliares de *Ananas comosus*.

Como alternativa ao procedimento de emblocamento das bases foliares em PEG 1500 e processamento em micrótomo rotativo, foram obtidos também cortes através do processamento das bases foliares no micrótomo de Ranvier, após a incubação das mesmas em solução aquosa de DAF-2DA (10 µM) por 15, 30 ou 45 minutos, ou em solução aquosa de DAR-4M AM (10 µM) por 15 minutos. Após a etapa de incubação em um dos marcadores, os cortes foram lavados com água destilada, montados em lâminas, observados no microscópio de fluorescência (DAF: excitação a 450 nm, emissão a 515 nm; DAR: excitação a 560 nm e emissão a 575 nm) e as suas imagens foram registradas por uma câmera digital acoplada ao microscópio.

III.5. Dosagem de Peróxido de Hidrogênio

A dosagem de peróxido de hidrogênio endógeno produzido pelos explantes foliares de *Ananas comosus* foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Van Gestelen *et al.* (1998) – Apêndice B. Os reagentes utilizados estão discriminados no apêndice A, dos itens G ao I.

A curva-padrão foi elaborada em duplicata e a média das leituras foram os valores utilizados nos cálculos. A tabela para a elaboração da curva-padrão está disposta no apêndice C.

As leituras das dosagens de peróxido de hidrogênio foram realizadas durante o período coincidente ao de maior emissão de óxido nítrico, determinado experimentalmente através da dosagem desse radical pela técnica de quimiluminescência.

A dosagem do peróxido de hidrogênio foi realizada com explantes inoculados em meio de cultura SIM ou KN, incubados por um período que variou de um a sete dias (figura 6A) em frascos do tipo "Erlenmeyer" de 125 mL. Durante a etapa de incubação, os frascos foram mantidos no fitotron e somente foram removidos de lá na data da dosagem do peróxido de hidrogênio. Em cada frasco foram incubados 5 explantes e todos os tratamentos para os meios de cultura SIM e KN foram realizados em triplicata.

Foram utilizados recipientes plásticos compartimentalizados, identificados de acordo com o tratamento e o número da replicata (figura 6B). Esses recipientes foram encaixados sobre um agitador magnético e mantidos sob agitação leve e constante. O conjunto foi disposto ao lado do espectrofotômetro, em uma sala com temperatura aproximada de 24°C.

Em cada compartimento do recipiente foram adicionados 4,4 mL de meio de cultura SIM ou KN, de acordo com o tratamento, sem o geleificante Phytagel ®. Na seqüência foram fornecidos 500 µL da solução de DCHBS 100 mM, 50 µL da solução de AAP 10 mM, os 5 explantes e, por fim, 50 µL da solução de peroxidase, na concentração inferior a 1 mg/mL (figura 6C).

Logo após a adição da solução da peroxidase, uma alíquota de 1 mL era retirada do compartimento, depositada em uma cubeta de quartzo e então se processava a leitura no espectrofotômetro, a 510 nm (figura 6D). Depois o volume era devolvido para o seu respectivo compartimento. O procedimento foi repetido a cada hora, até a quarta hora, totalizando 5 leituras para cada um dos tratamentos SIM/KN e as suas respectivas replicatas.

Ao término de todas as leituras, os explantes foram retirados da solução, secos com papel absorvente e pesados para a obtenção da massa fresca. Os valores encontrados das massas frescas foram utilizados no cálculo da concentração da concentração de H_2O_2 através da interpolação das medidas de absorbância com a curva de calibração. Depois do cálculo do valor médio por tratamento a partir de cada triplicata, cada valor de produção horária foi obtido descontando-se o valor médio imediatamente anterior. Dessa maneira, foram obtidos 4 leituras da produção média horária para cada um dos tratamentos SIM/KN, expressos em nmoL $H_2O_2.h^{-1}.g^{-1}$ de massa fresca.

A figura 6 esquematiza todo o procedimento adotado, desde a discriminação dos tratamentos até a aplicação da técnica na dosagem do peróxido de hidrogênio.

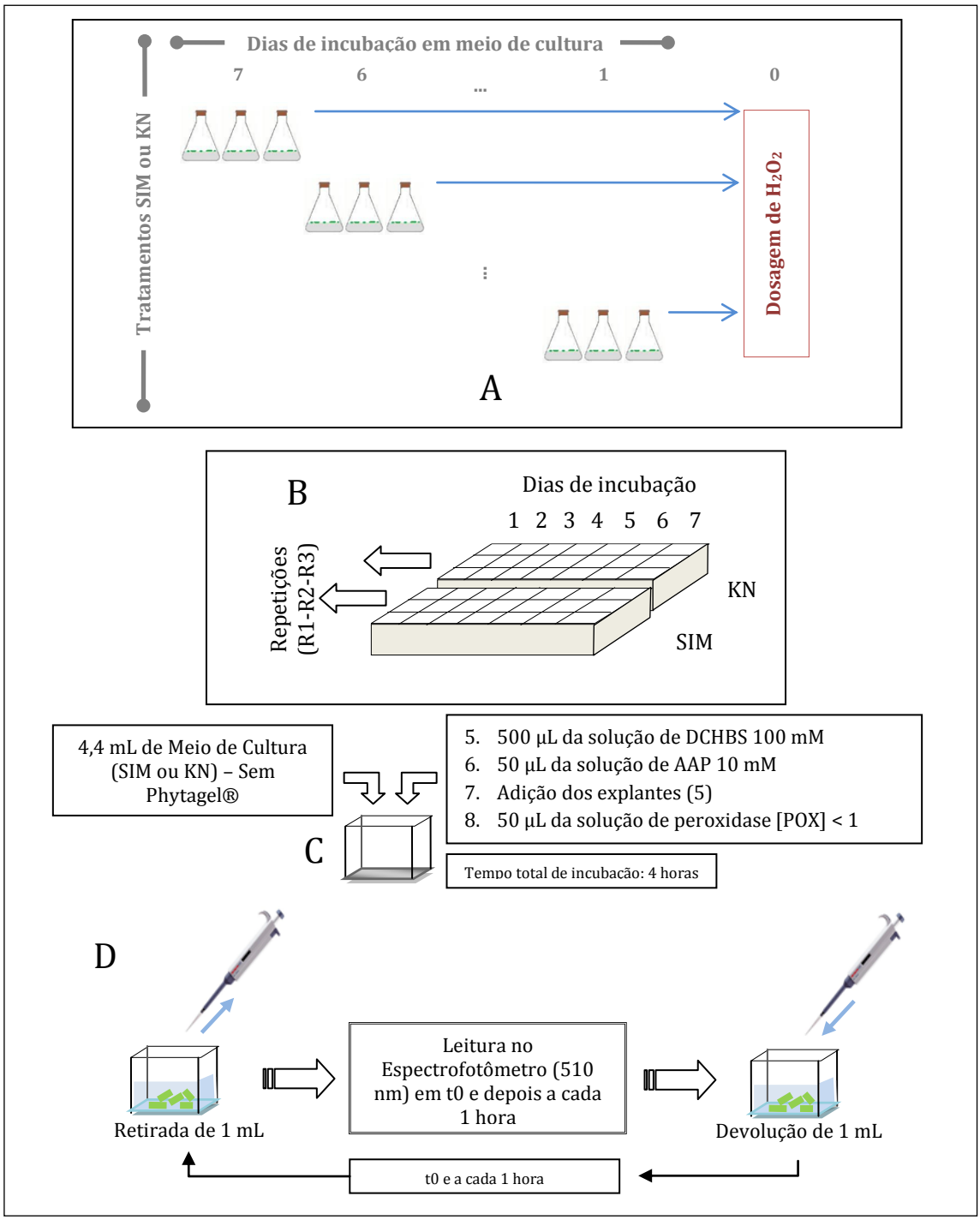


Figura 6: A) Tratamentos SIM e KN e as suas respectivas triplicatas, de acordo com o número de dias de incubação dos explantes em meio de cultura. B) Esquema representando os recipientes plásticos utilizados no processo de dosagem com as devidas identificações. C) Relação de reagentes depositados em cada compartimento. D) Procedimento de retirada de uma alíquota de 1 mL de cada compartimento, leitura no espectrofotômetro e devolução, para o respectivo compartimento, no tempo zero e depois a cada intervalo de um hora, por até 4 horas.

III.6. Investigação sobre as Vias de Produção de NO

A investigação das possíveis vias produtoras de óxido nítrico que estejam relacionadas ao processo da organogênese foi feita através do emprego de substâncias inibidoras de algumas rotas, reconhecidas como responsáveis pela produção do radical e dosagem por quimiluminescência.

A inibição da produção de óxido nítrico pela via da redutase do nitrato foi realizada pela adição, ao meio de cultura SIM, de glutamina ou tungstato de sódio, nas concentrações de 5 mM e 20 mM.

A análise da participação de uma possível enzima NOS foi realizada através da adição do inibidor de sua ação, L-NAME (metil éster de NG-Nitro-L-arginina), ao meio de cultura, na concentração de 100 μM.

Adicionalmente, analisou-se também a ação conjunta da inibição da redutase do nitrato e da via NOS em experimento com adição conjunta de 5 mM de tungstato de sódio e 100 μM de L-NAME ao meio de cultura.

Em relação ao preparo, com exceção do tungstato, o qual foi esterilizado juntamente com o meio de cultura, os demais reagentes foram adicionados ao meio através da ultrafiltragem por filtros da marca Millipore ®, sob condições assépticas em fluxo laminar.

IV - RESULTADOS

IV.1. Adaptações para Quantificação do Óxido Nítrico em Fluxo Contínuo de Ar Atmosférico para Culturas *in vitro*

Sistemas de Quantificação em Fluxo Contínuo (QFC)

A quantificação de óxido nítrico por quimiluminescência de culturas *in vitro* precisou de uma montagem de sistema que possibilitasse a não contaminação do material vegetal e meio de cultura. Assim, o sistema de Quantificação em Fluxo Contínuo (QFC) foi dividido em vários subsistemas, de modo a facilitar a compreensão do funcionamento da metodologia adotada na realização dos experimentos.

A Quantificação em Fluxo Contínuo consistiu nas leituras em tempo real das concentrações de óxido nítrico liberadas pelos explantes, de acordo com o intervalo de tempo desejado – por exemplo, a cada 1, 5 ou 10 segundos.

Essa estratégia de quantificação, para efeito didático, foi subdivida em vários subsistemas integrados, conforme descritos a seguir:

- Subsistema de Transporte (ST): compreende a tubulação que interliga os vários subsistemas, através do qual o gás transportador conduz a amostra do gás a ser analisado. O gás transportador utilizado neste projeto foi o ar atmosférico, fornecido através de um compressor elétrico (fig. 7).

- Subsistema de Controle do Fluxo (SCF): o gás transportador foi fornecido ao sistema através de um compressor de ar e o seu fluxo é controlado por manômetro (fig. 7).

- Subsistema de Catálise de Óxido Nítrico (SCON): o objetivo da filtragem foi eliminar o óxido nítrico presente no ar atmosférico antes de chegar ao frasco contendo o material que teve a emissão de radical analisada. Esse subsistema foi composto por dois tubos cilíndricos interligados (1,0 m e 1,2 m de

comprimento, ambos com 10 cm de diâmetro), cujos interiores foram preenchidos com carvão ativado particulado de diâmetro aproximado de 1 mm para a retenção do óxido nítrico proveniente do ar atmosférico (fig. 7).

- Subsistema de Descontaminação (SD): consistiu na descontaminação do ar atmosférico através da sua passagem em solução de sulfato de cobre ($CuSO_4$, concentração de 25 g/L) (fig. 7).

- Subsistema de Condensação de Umidade (SCU): foi responsável pela retirada da umidade do gás de arraste, logo após a sua passagem pelo frasco contendo as amostras e antes da leitura da concentração de óxido nítrico pelo analisador. A sua montagem consistiu em dois longos tubos de ensaio, vedados com septos de borracha e interligados pela canalização do Subsistema de Transporte (ST) (fig. 7).

- Subsistema de Umidificação (SU): foi composta por um recipiente contendo água esterilizada e sua função foi a de promover a umidificação do gás de arraste (fig. 7).

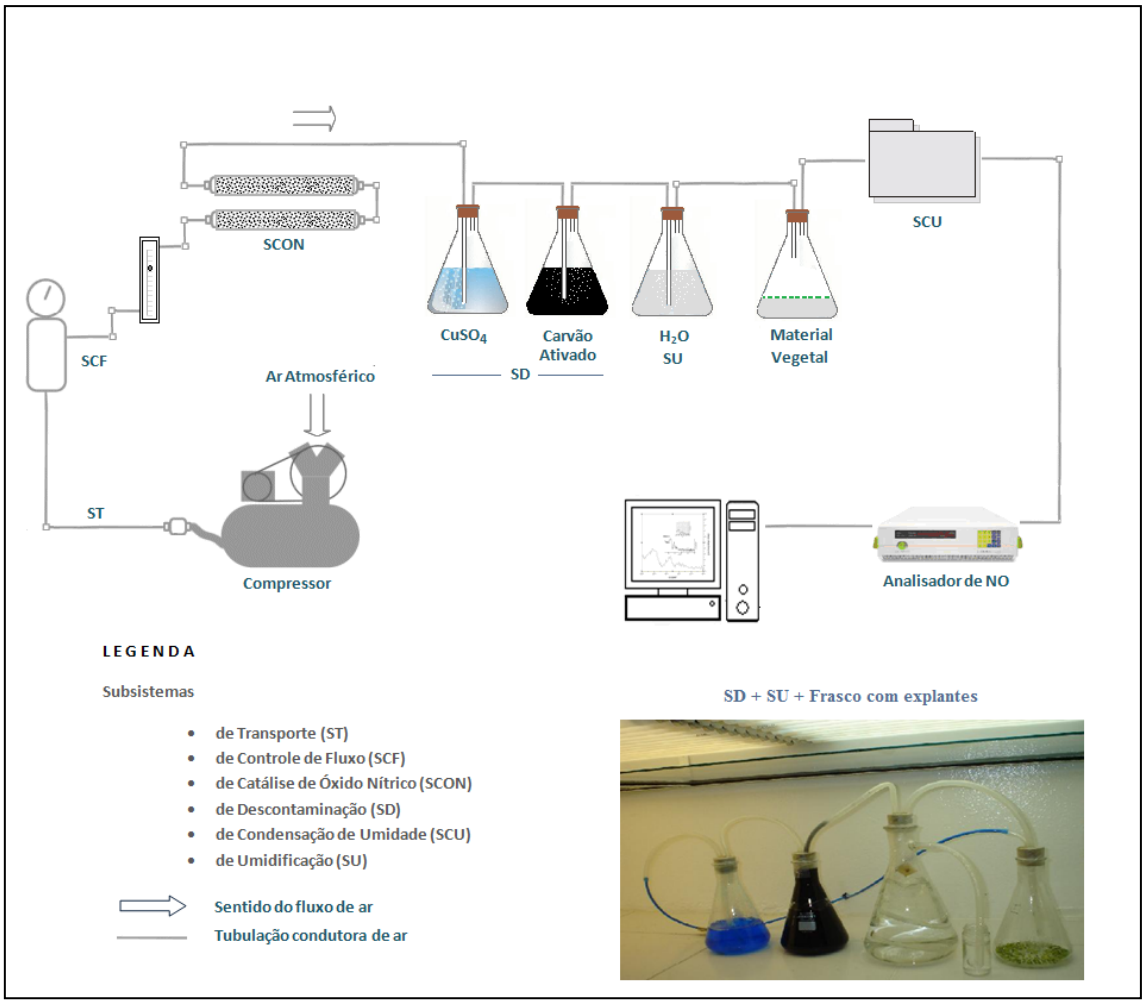


Figura 7 - Representação esquemática dos subsistemas integrados para quantificação do óxido nítrico pela técnica de quimiluminescência em fluxo contínuo de ar atmosférico. No detalhe, é exibido o subsistema de descontaminação (SD), o subsistema de umidificação e o frasco contendo o material vegetal, no interior de uma câmara do fitrotron.

O funcionamento do sistema de Quantificação em Fluxo Contínuo (QFC) iniciou-se com o fornecimento de ar atmosférico pelo compressor ao Subsistema de Transporte (ST). O gás passou consecutivamente pelo Subsistema de Catálise de Óxido Nítrico (SCON), pelo Subsistema de Descontaminação (SD) para evitar a contaminação do meio de cultura e dos explantes com esporos de fungos ou bactérias, e enfim pelo Subsistema de Umidificação (SU).

Depois desta série de tratamentos do ar atmosférico (remoção de resíduos de NO, descontaminação e umidificação), o gás transportou o ar do interior do frasco a ser analisado para o Subsistema de Condensação de Umidade (SCU), para a remoção da umidade do gás e, enfim, para o analisador que quantificou o óxido nítrico produzido pelos explantes.

Por fim, o controle do fluxo de ar foi feito por um conjunto de manômetros, através do Subsistema de Controle do Fluxo (SCF). O analisador de óxido nítrico necessita de um fluxo de gás transportador superior a 300 mL/s, conforme especificações técnicas do equipamento.

IV.2. Controle da Eficiência da Adsorção do NO pelo Carvão Ativado

Uma vez que o gás de arraste utilizado no sistema de quantificação por quimiluminescência foi o ar atmosférico, foi necessário testar a eficiência do sistema que faz a eliminação do óxido nítrico (SCON) tendo em vista que a composição no ar atmosférico do radical está sujeito a flutuações ao longo do dia. Para assegurar a eliminação do óxido nítrico pelo sistema já em uso, através dos tubos de filtragem pelo carvão ativado, foi acrescentado ao SCON uma solução aquosa de carvão ativado, na concentração de 10 g/L em um "Erlenmeyer" com capacidade para 1 litro.

Como doador de óxido nítrico foi utilizado uma solução de nitroprussiato de sódio (sal de potássio), na concentração de 10 mM, diluído em solução aquosa no interior de um frasco vedado com septo de borracha. Amostras do gás do interior do frasco contendo o óxido nítrico produzido pelo sal de potássio foram retiradas em volumes de 5 mL, através de uma seringa, e injetadas em diferentes pontos do sistema responsável pela eliminação do óxido nítrico (SCON).

O gráfico a seguir mostra os valores encontrados de óxido nítrico, de acordo com os diferentes pontos de injeção da amostra do radical. As injeções foram realizadas em duplicata para cada ponto do sistema.

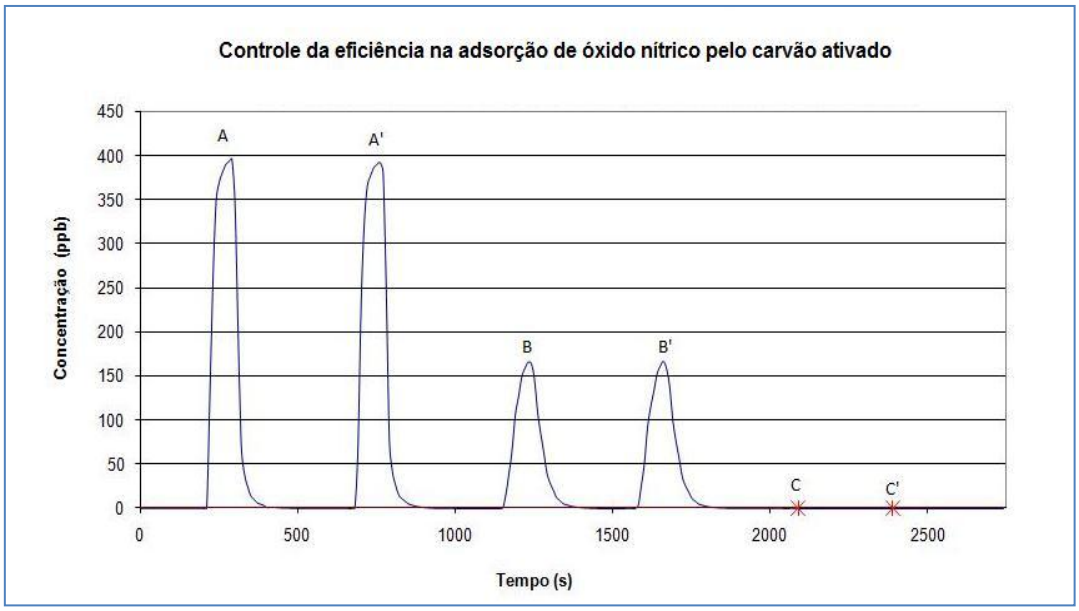


Figura 8 - Concentração de óxido nítrico detectado pelo analisador após injeção de 5 mL do gás contendo óxido nítrico liberado pela solução aquosa de nitroprussiato de sódio (10 mM), em diferentes pontos do sistema de eliminação do radical. A e A': Injeção do gás na região posterior ao sistema de adsorção de NO. B e B': Concentração de óxido nítrico detectada após sua adsorção por 1 litro de solução de carvão ativado na concentração de 10 g/L. C e C': Concentração do radical detectado após adsorção seqüencial pela filtragem em carvão ativado em pó e em solução aquosa.

Testes realizados previamente sem o sistema de adsorção de NO indicaram que a sua concentração presente no ar atmosférico variou ao longo do dia, chegando a algumas dezenas de partes por bilhão. Assim, os resultados obtidos com o uso do carvão ativado na eliminação do óxido nítrico mostraram que o sistema de filtragem adotado foi altamente eficiente, garantindo que o radical presente no ambiente externo não influenciasse as leituras durante quantificação por quimiluminescência.

IV.3. Inclusão do Sistema de Quantificação de Óxido Nítrico em Rede Elétrica com Fornecimento Ininterrupto de Energia

A quantificação em fluxo contínuo requer que todos os equipamentos envolvidos (compressor de ar, computador, analisador de óxido nítrico) funcionem sem interrupção. A mais leve oscilação na rede elétrica ou queda de energia levavam à perda de dados de dias de trabalho, envolvendo desde a obtenção do material vegetal até o próprio experimento que se encontrava em curso.

Assim, foi necessário realizar a adequação da ligação dos equipamentos na rede elétrica para que eles funcionassem a contento. Em uma configuração prévia, todos os equipamentos utilizados na quantificação de óxido nítrico foram ligados a uma rede elétrica protegida por um gerador.

Entretanto, o computador e o analisador de óxido nítrico são equipamentos sensíveis à oscilação de energia e, no breve intervalo antes do funcionamento do gerador durante uma queda de energia da rede pública, costumavam travar ou reinicializar, levando novamente à perda dos dados. Para sanar esse problema, foi necessário instalar uma fonte de alimentação ininterrupta (UPS, do inglês "Universal Power Supply") à rede elétrica protegida pelo gerador. Assim, atualmente, o computador e o analisador de dados se encontram ligados a essa fonte de alimentação ininterrupta, também conhecida como "no-break", que possui também um banco de baterias capaz de manter os equipamentos em funcionamento por um período que varia de 20 a 30 minutos.

Essa capacidade de fornecimento de energia adicional foi mais do que suficiente durante uma queda de energia, pois o gerador entra em funcionamento poucos segundos logo após a interrupção no fornecimento de energia elétrica pela rede pública.

Por outro lado, o compressor de ar é um equipamento robusto. O seu funcionamento se dá em intervalos relativamente longo de tempo (a cada 10 ou 15

minutos) por alguns breves segundos – durante este intervalo, o ar atmosférico sob pressão está acumulado e sendo liberado de acordo com o fluxo desejado e, quando a pressão diminuir abaixo de um determinado valor, o compressor volta a funcionar automaticamente.

Assim, pelo fato do seu funcionamento não ser contínuo, esse equipamento ficou ligado diretamente na rede protegida pelo gerador, pois no caso de uma eventual queda de energia elétrica, o tempo para que o gerador entre em funcionamento não chegou a afetar o funcionamento deste equipamento. A figura 9 mostra esquematicamente como os equipamentos se encontram ligados à rede elétrica e como são protegidos contra queda e oscilação de energia.

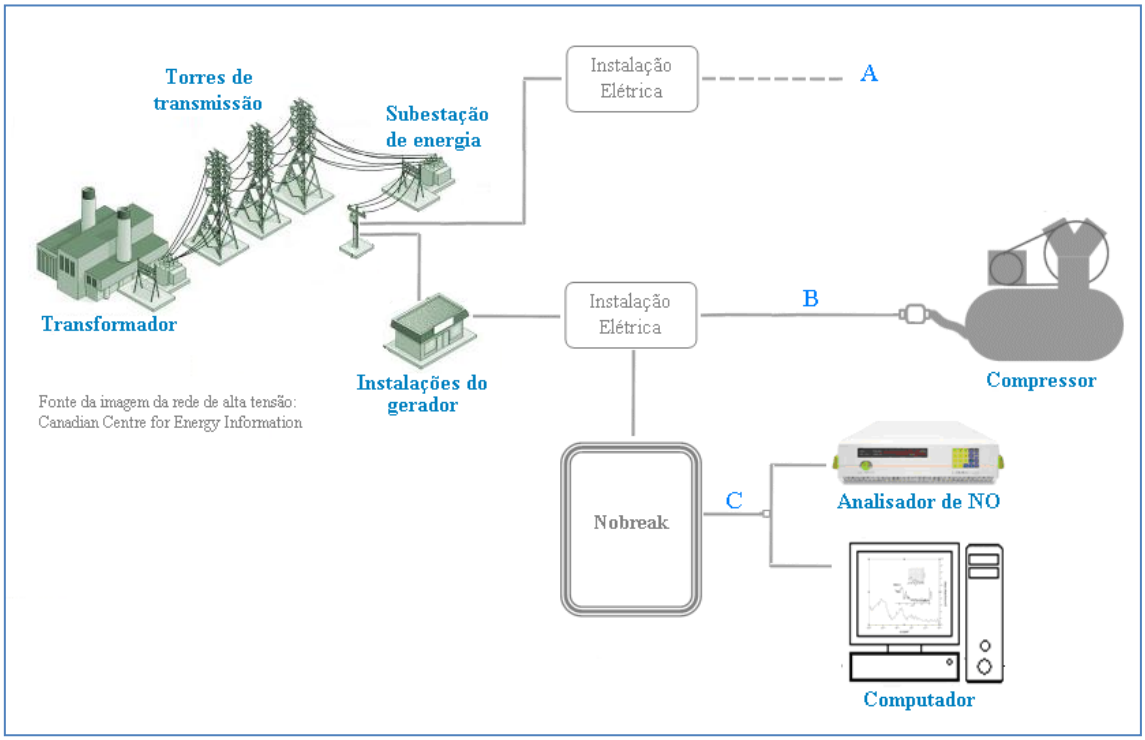


Figura 9 - ESquema que mostra a ligação dos equipamentos na rede elétrica. (A) – Equipamentos ligados diretamente na rede elétrica sofrem parada em situações de interrupção de energia. (B) - Instalação elétrica ligada a um gerador. Atualmente, apenas o compressor se encontra ligado diretamente nesta rede. (C) – Os equipamentos se encontram duplamente protegidos neste tipo de configuração, tanto na situação de falta de energia elétrica pela rede pública, quanto no breve instante entre a falta de energia e o funcionamento do gerador.

IV.4. Quantificação por Fluxo Contínuo (QFC) com Ar Atmosférico

A quantificação em fluxo contínuo de óxido nítrico ocorreu por sete dias consecutivos e foi realizado para explantes incubados em meio de cultura de indução à organogênese (SIM) e para o meio de cultura não-indutor (KN). Os resultados apresentados na figura 10 são representativos de um experimental realizado em duplicata. Ela mostra o perfil de produção de óxido nítrico, ao longo de sete dias, ilustrando a dosagem em tempo real do radical em ppb, sem o desconto dos valores de óxido nítrico liberado pela fotólise do meio de cultura. Cada par de curvas exibidas na cor preta (fase escura) ou vermelha (fase clara) correspondeu a um período de 24 horas (1 dia), sendo cada fase composta de 12 horas.

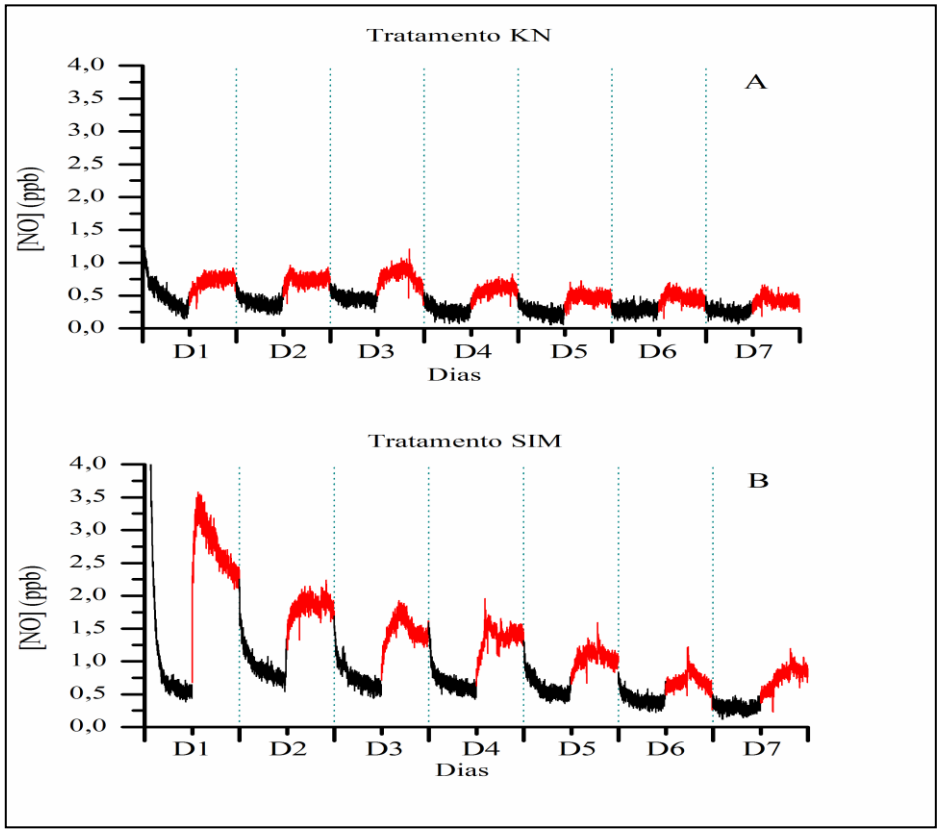


Figura 10 - Perfil de produção de óxido nítrico por bases foliares (n = 100) incubadas em meio de cultura de indução à organogênese (SIM) e meio de cultura não-indutor (KN) por um período de 7 dias. Em vermelho, está representada a fase clara; em preto, a fase escura; cada par (vermelho + preto) representa um período de 24 horas.

Analisando o perfil de produção de NO pelas bases foliares, constatou-se uma maior liberação do radical durante a etapa clara em comparação à escura, em ambos os tratamentos. Além disso, pode-se observar que a quantidade NO produzido no tratamento KN se manteve relativamente constante, tanto na presença quanto na ausência de luz. Por outro lado, pode-se observar que os valores de NO encontrados no tratamento SIM foram superiores logo no primeiro dia, tanto para a fase clara quanto escura, decrescendo ao longo dos dias.

Deve ser salientado que a figura 10 mostra a produção bruta de NO, ou seja, sem o desconto da produção do radical pelo processo de fotólise do meio de cultura. O principal objetivo na exibição desses perfis de emissão foi mostrar as diferenças no padrão de liberação do NO entre o tratamento KN e SIM, uma vez que a quantidade de radical liberado pelo meio de cultura foi o mesmo nos dois tratamentos, já que ambos foram submetidos às mesmas condições de luz, temperatura e umidade no fitotron.

Um controle foi realizado devido ao processo da fotólise e consistiu na dosagem do radical por três dias consecutivos em um frasco contendo apenas o meio de cultura KN. O frasco utilizado e o volume do meio de cultura foram semelhantes aos utilizados nas dosagens de NO dos tratamentos SIM ou KN, ou seja, foi utilizado "Erlenmeyer" com capacidade de 1L contendo 100 mL de meio de cultura.
Os valores encontrados representam uma produção acumulada média diária e foram de 5.863 ppb para a fase escura e de 15.210 ppb para a fase clara. Esses valores foram descontados dos valores brutos acumulados dos tratamentos KN e SIM, para cada uma das etapas escura ou clara, do primeiro ao sétimo dia, os quais estão discriminados a seguir, com valores expressos em ppb: Tratamento KN (D1: 23.386,33/30.564,64; D2: 17.279,76/31.865,73; D3: 19.953,62/34.105,31; D4: 11.810,46/25.136,39; D5: 11.133,51/20.362,57; D6: 12.289,42/20.318,31; D7: 11.168,78/18.636,86); Tratamento SIM (D1: 78.591,46/118.117,00; D2: 40.931,44/79.008,85; D3: 33.414.76/63.673,44; D4: 29.847,32/58.972,46; D5: 26.634,44/45.637,11; D6: 18.552,92/30.209,14; D7: 13.261,71/32,608,63).

Os valores finais foram então convertidos para se determinar a produção líquida de NO pelos explantes expresso em nmol $NO.h^{-1}.g^{-1}$ de massa fresca e estão representados na figura 11.

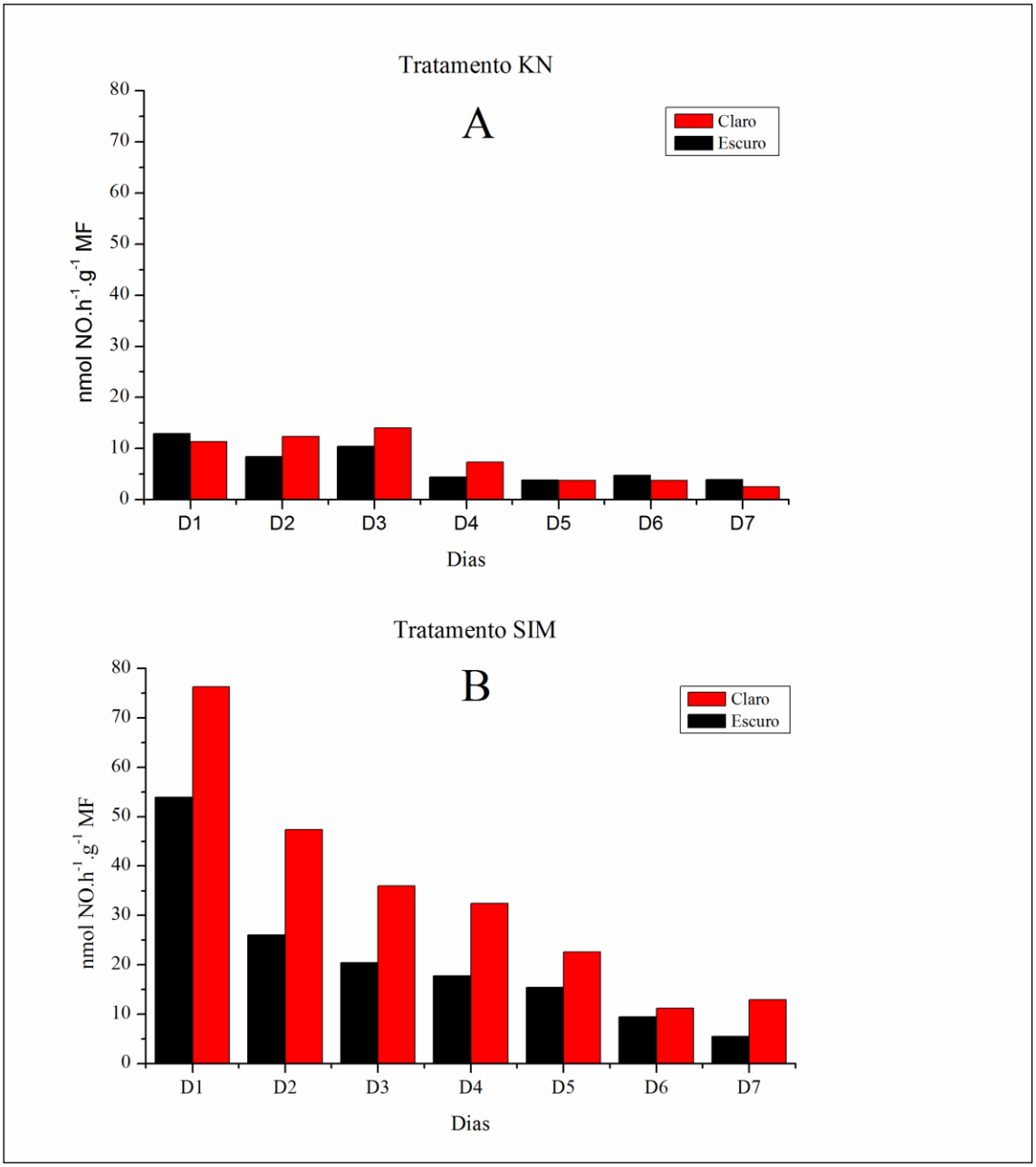


Figura 11 - Taxa de produção de óxido nítrico por bases foliares incubadas em meio de cultura KN (A) e SIM (B), durante os sete dias de incubação. Em vermelho está representada a produção de óxido nítrico na presença de luz; em preto, a produção na ausência de luz. Em ambos os tratamentos, o número amostral foi de 100 explantes.

De acordo com a figura 11, observou-se que a produção diária de óxido nítrico para o tratamento SIM foi superior ao do tratamento KN, tanto na etapa clara quanto na escura.

Quando são comparados os valores de produção de NO para tratamento SIM em relação ao do tratamento KN, numa relação SIM/KN, obtém-se o número de vezes em que a produção de NO pelo primeiro tratamento é superior em relação ao segundo. Para a etapa escura, do primeiro ao sétimo dia, os valores da relação de produção SIM/KN foram de: 4,2; 3,1; 2,0; 4,0; 3,9; 2,0 e 1,4; em relação à etapa clara: 6,7; 3,8; 2,6; 4,4; 5,9; 2,9 e 5,1.

A maior diferença foi observada logo no primeiro dia de incubação dos explantes, quando a produção de NO pelo tratamento SIM em relação ao KN foi superior em 4,2 vezes para a etapa escura e 6,7 vezes para a etapa clara.

Em relação ao tratamento SIM, observou-se que a produção de NO foi maior na etapa clara quando comparada à etapa escura. Além disso, observou-se uma tendência de redução progressiva na produção de NO com o passar dos dias, do primeiro ao sétimo dia, tanto para a etapa clara quanto para a escura. Esse comportamento não foi observado no tratamento KN, que mostrou pouca variação no decorrer desse período.

Tendo em vista a maior produção de óxido nítrico pelos explantes durante a etapa clara, ou seja, na presença de luz, foi elaborado uma figura mostrando o comportamento da produção do radical ao longo das horas, para os 7 dias do tratamento SIM (figura 12).

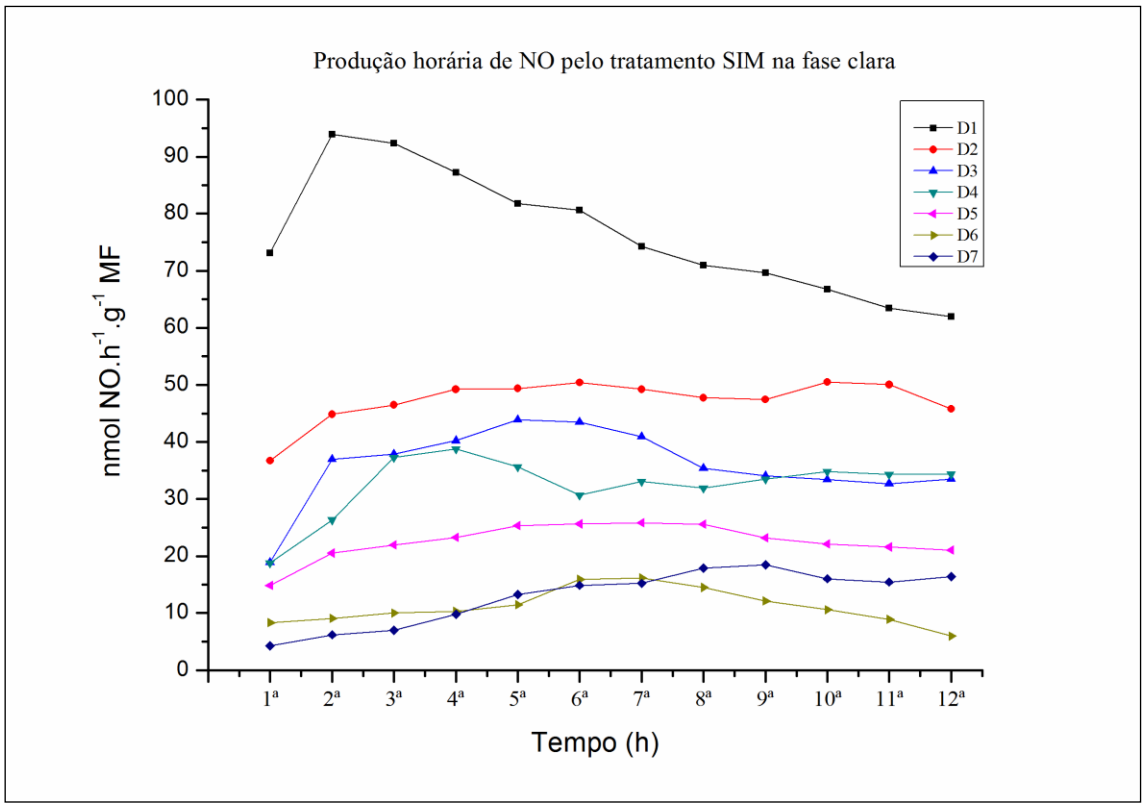


Figura 12 – Produção de óxido nítrico durante a fase clara do tratamento SIM durante os sete dias de quantificação do radical.

De acordo com a figura 12, observou-se que a maior variação na produção de NO aconteceu na primeira hora dos dias 1 e 3 e nas duas primeiras horas do dia 4, logo após o início da etapa clara.

De maneira geral pode ser observado um aumento na produção de NO logo nas primeiras horas da exposição dos explantes à luz. Esse comportamento foi utilizado como referência para se analisar uma possível relação com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelos explantes foliares.

Após o período de 7 dias de quantificação de NO dos tratamentos SIM ou KN e de mais 53 dias de acompanhamento do desenvolvimento dos explantes, foram analisados os dados de formação de gemas adventícias.

O tratamento KN apresentou apenas 1 % de explantes com formação de eixos caulinares, resultado condizente com a necessidade dos explantes por reguladores de crescimento para que apresentem organogênese adventícia.

Por outro lado, na presença dos reguladores de crescimento, o tratamento SIM apresentou 57% de explantes com formação de eixos caulinares e 9% com formação somente de protuberâncias.

IV.5. Dosagem de Óxido Nítrico em Meio de Cultura SIM Contendo Inibidores da Redutase do Nitrato e da Enzima NOS

Para a identificação das possíveis vias de produção de NO, os explantes foram incubados em meio de cultura SIM contendo inibidores da via redutase do nitrato (glutamina ou tungstato) ou inibidor da enzima NOS (L-NAME, ou seja, metil éster de NG-Nitro-L-arginina). As dosagens foram realizadas por três dias consecutivos e, como controles, foram utilizados os tratamentos SIM e KN (ver item 4.4 – figura 12).

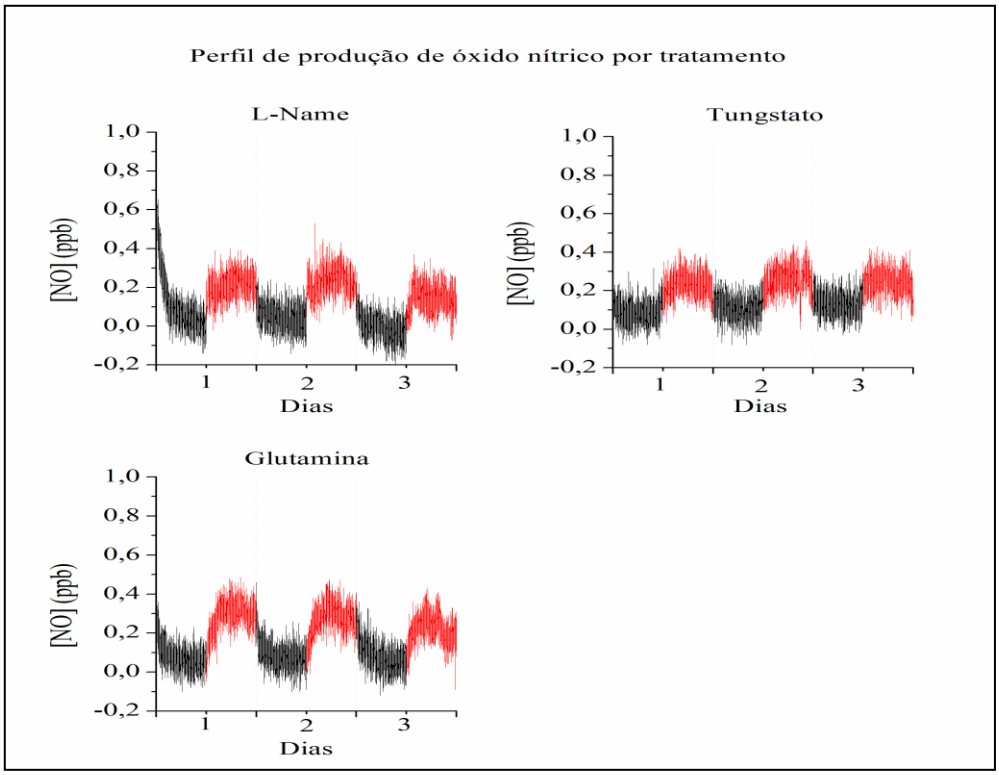


Figura 13 - Perfil da produção de óxido nítrico (sem desconto da liberação pelo meio de cultura) dosado em tempo real pela técnica da quimiluminescência. Tratamentos: L-NAME 100µM, tungstato de sódio 20mM e glutamina 5mM.

Analisando-se os perfis da produção de NO apresentados na figura 13, constatou-se que todos os tratamentos nos quais foram utilizados inibidores apresentaram o mesmo perfil na produção do radical, ou seja, sua maior produção durante a etapa clara em comparação à escura. Em nenhum dos tratamentos foi observada uma

produção destacada do radical no primeiro dia em relação aos dias subseqüentes, como foi observado no tratamento SIM sem a presença dos inibidores da NR ou NOS.

A figura 14 mostra a taxa de produção de óxido nítrico pelos explantes incubados em meio de cultura SIM contendo inibidores da redutase do nitrato ou da NOS, expressa em nmol $NO.h^{-1}.g^{-1}$ de massa fresca.

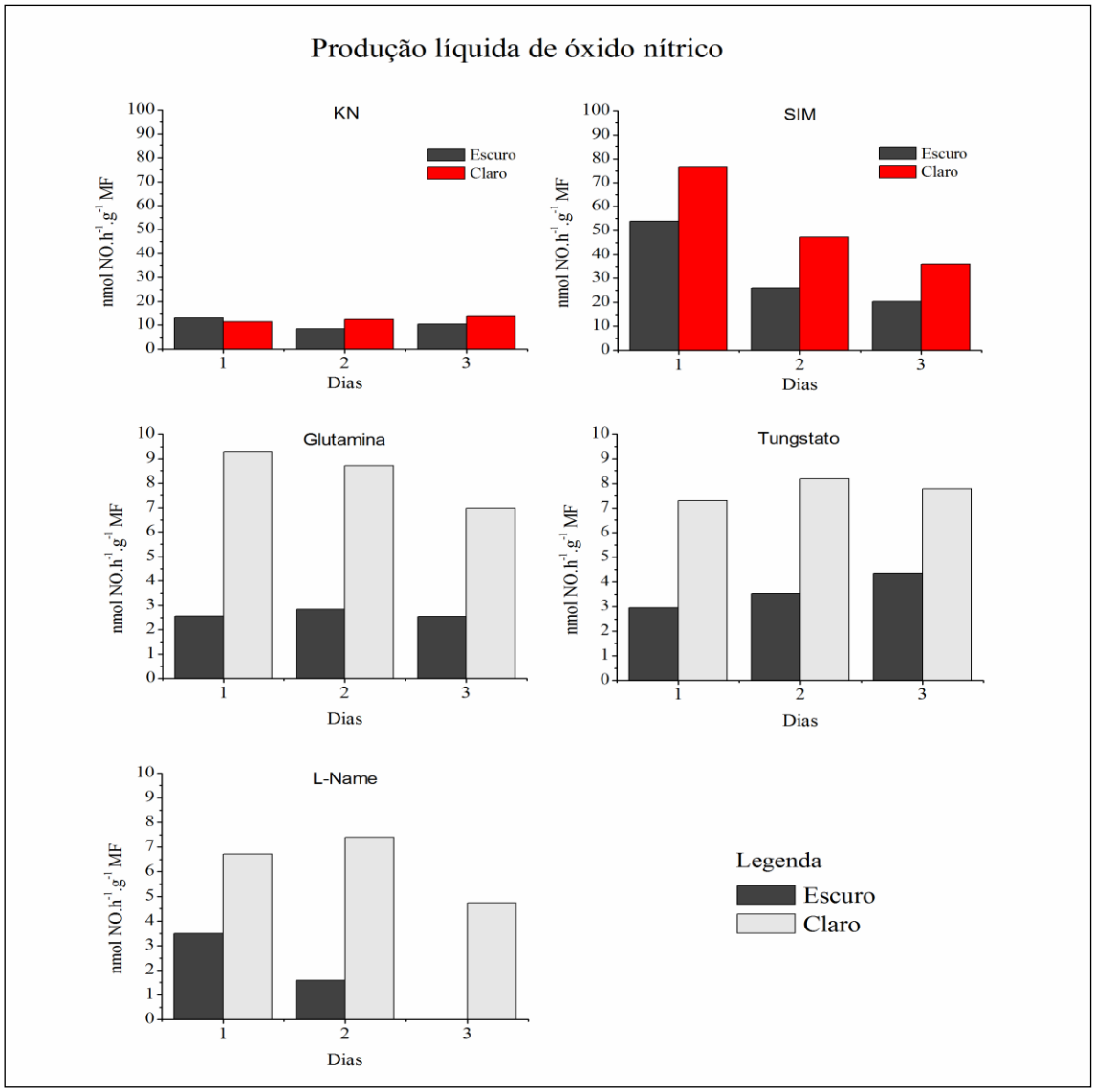


Figura 14 - Produção líquida de óxido nítrico (nmol $NO.h^{-1}.g^{-1}$) por explantes submetidos a diferentes tipos de tratamentos através da adição de inibidores das enzimas NR e NOS ao meio de cultura SIM, descontada a produção do radical pelo processo de fotólise. Concentrações: glutamina 5mM; tungstato de sódio 20mM; L-NAME 100µM.

Os resultados dos tratamentos SIM acrescidos de inibidores da via da redutase do nitrato (tungstato ou glutamina) ou da via NOS (L-NAME) indicaram uma grande diminuição na produção líquida de NO, tanto na fase clara quanto escura, quando comparamos os seus valores com os do controle SIM. Foi observada uma redução considerável quando são comparados esses tratamentos SIM acrescidos de inibidores em relação ao controle KN. Todos os tratamentos SIM contendo inibidores apresentaram uma produção líquida inferior a 9,5 nmol $NO.h^{-1}.g^{-1}$ MF, enquanto que para o controle SIM, a menor taxa é de aproximadamente 20 nmol $NO.h^{-1}.g^{-1}$ MF, correspondente a produção na etapa escura do terceiro dia.

Os tratamentos SIM contendo os inibidores da via da redutase do nitrato (glutamina e tungstato) apresentaram resultados bem semelhantes em relação à taxa de produção de NO, tanto para a etapa clara quanto para a escura.

O tratamento SIM contendo inibidor da NOS apresentou uma redução progressiva na produção de NO na etapa escura, do primeiro ao terceiro dia. Aparentemente, esse inibidor foi capaz de bloquear completamente a produção de NO na etapa escura, no terceiro dia.

Para se analisar os efeitos dos inibidores da NR ou NOS, após o período de três dias de dosagem de NO, os explantes foram transferidos para o meio de cultura SIM sem os tais inibidores e lá foram mantidos até completar 60 dias de incubação para que a organogênese adventícia pudesse acontecer. A figura 15 mostra os resultados dos tratamentos, bem como os valores percentuais de formação de eixos caulinares.

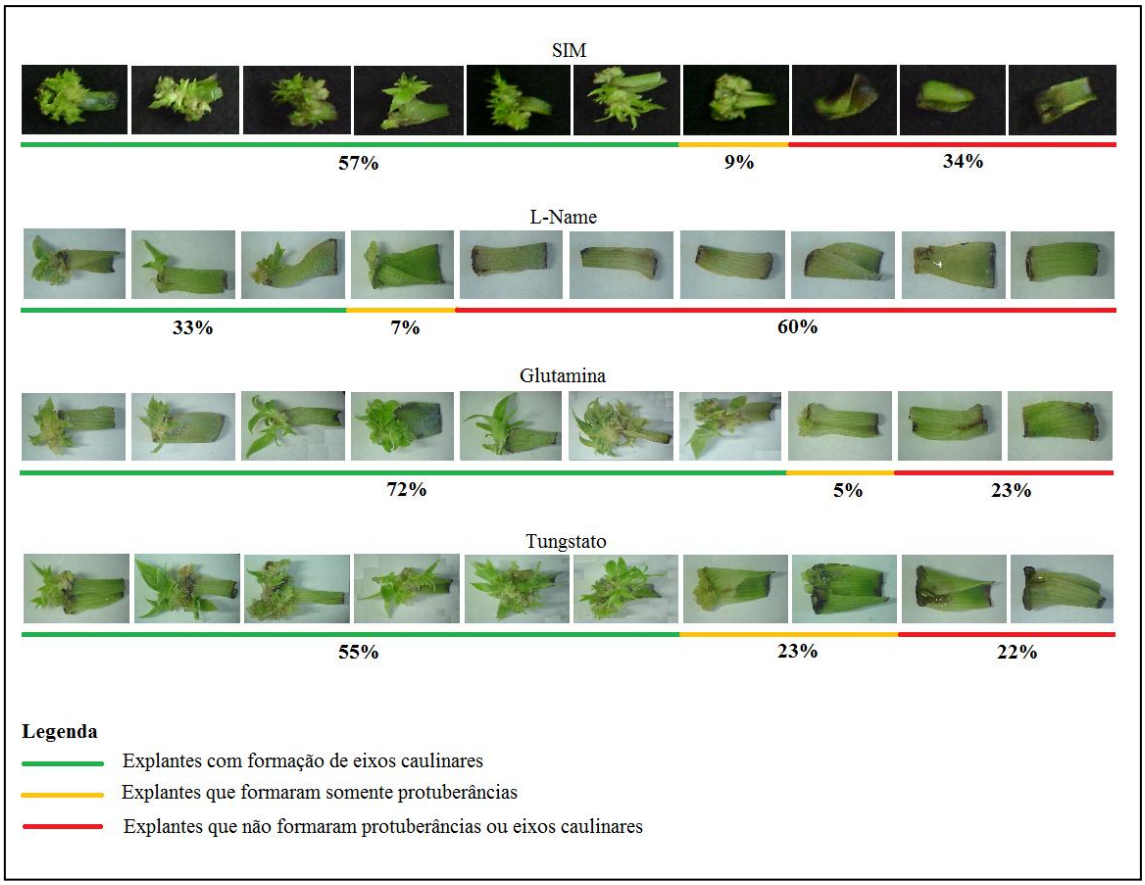


Figura 15 – Taxa de formação de eixos caulinares, protuberâncias ou ausência de ambas as estruturas. Foram selecionadas 10 imagens representativas do total dos explantes, ou seja, 10 % (n=100).

A análise dos resultados baseada na quantidade e tamanho dos eixos caulinares mostrou que o tratamento SIM com tungstato foi o que apresentou resultados bem parecidos ao controle SIM, com 55% de explantes com formação de eixos caulinares comparado com os 57% do controle. O tratamento SIM com glutamina apresentou uma taxa de 72%, ou seja, 15% superior em relação ao controle, entretanto com um percentual maior de explantes com poucos eixos caulinares formados.

De qualquer maneira, a utilização de inibidores da NR, apesar de terem promovido uma grande redução na produção de NO, não afetaram negativamente a taxa de indução à organogênese dos explantes.

Por outro lado, o tratamento SIM com L-NAME foi o que apresentou a menor taxa de indução à organogênese, com apenas 33% de explantes que conseguiram formar eixos caulinares. Além dessa redução quantitativa, houve também uma grande redução no vigor dos eixos caulinares formados, ou seja, eles eram menores em comparação aos demais tratamentos. Esse foi o tratamento que apresentou o maior percentual de explantes (60%) que não formaram protuberâncias.

O tratamento SIM contendo o inibidor da NOS (L-NAME) também provocou uma redução na produção de NO, principalmente na fase escura, quando a produção do radical praticamente foi nula. Esse foi o tratamento cuja taxa de indução à organogênese foi mais comprometida e que apresentou um grande número de explantes que não formaram nem eixos caulinares nem protuberâncias, o que pode ser um indício de que o NO produzido por essa via seja importante na etapa de indução na formação de tais estruturas.

IV.6. Seqüestro do NO e a Formação de Eixos Caulinares

A figura 16 mostra os valores percentuais de explantes que formaram eixos caulinares, de acordo com os controles e tratamentos realizados com o seqüestrador de NO cPTIO na concentração de 400 µM .

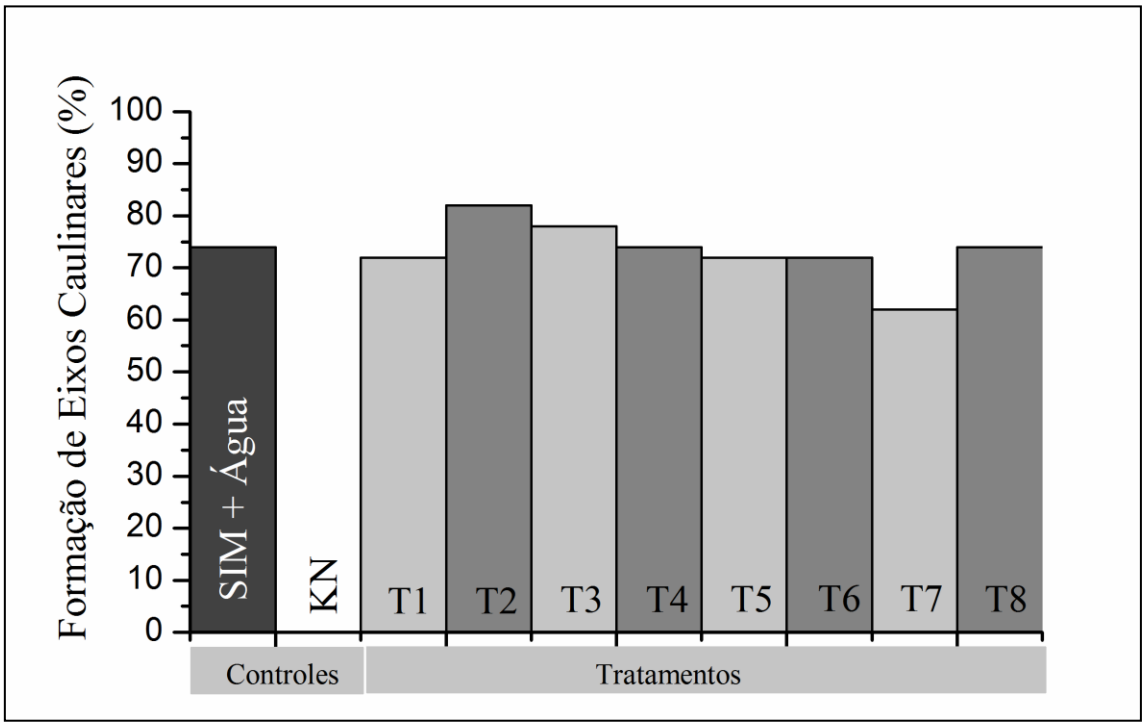


Figura 16 - Valores percentuais de explantes que apresentaram formação de eixos caulinares após 60 dias, de acordo com os controles/tratamento. SIM + H_2O: explantes incubados em meio de cultura acrescida de 3 mL de água durante os primeiros 8 dias, transferidos após esse período para meio de cultura SIM; KN: explantes incubados em meio de cultura KN; T1 a T8: explantes incubados em meio de de cultura acrescido do sequestrador de NO carboxi-pTIO na concentração de 400 µM, por período que variou de 1 a 8 dias consecutivos, de acordo com o tratamento, e transferidos posteriormente para o meio de cultura SIM para completar o período de 60 dias.

A concentração utilizada de cPTIO não chegou a afetar significativamente na taxa de formação de eixos caulinares, ou seja, o processo de indução à organogênese adventícia não foi comprometido.

IV.7. Bioimagens

A figura 17 mostra imagens de fluorescência de NO a partir de cortes obtidos após a incubação em DAF e processados em micrótomo rotativo de bases foliares emblocadas em PEG 1500.

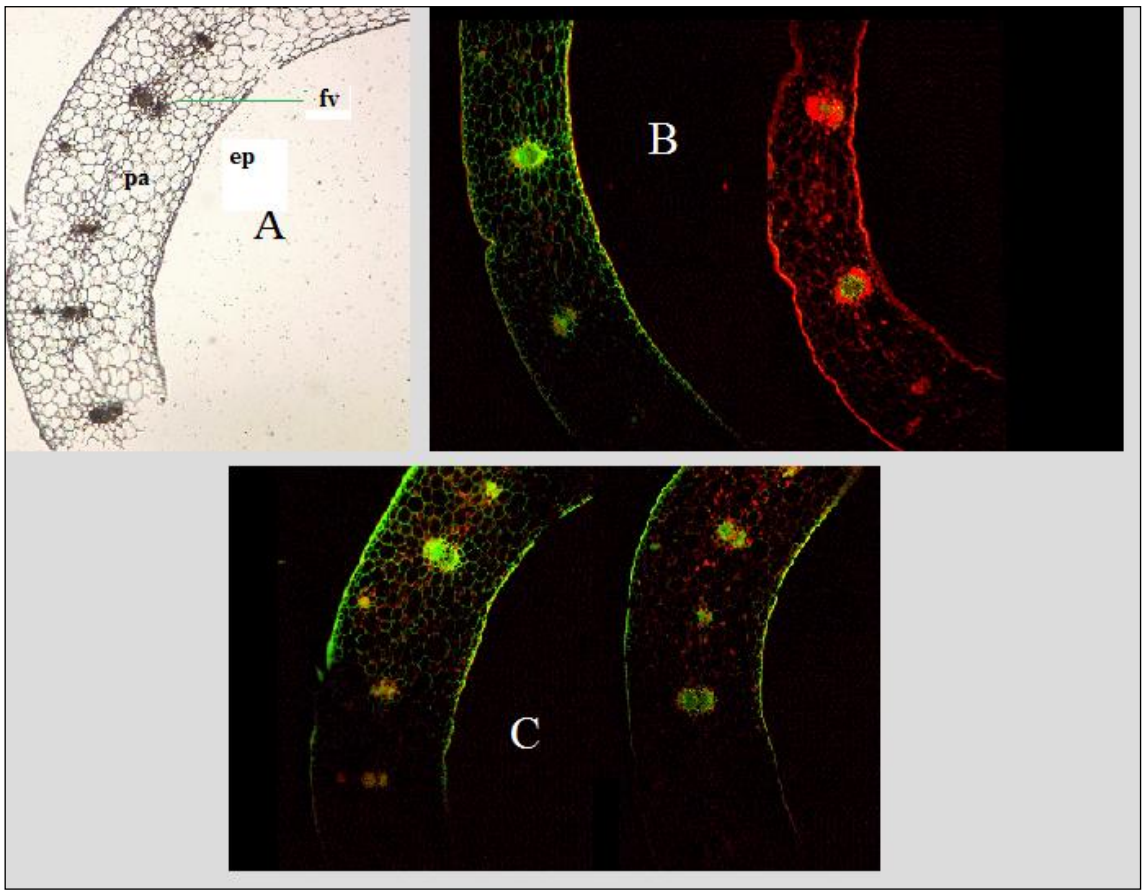


Figura 17 – Análise da produção *in situ* de NO, por microscopia de fluorescência, em bases foliares de *Ananas comosus*, mantidos por 24 horas em solução aquosa de SNP (400µM). Os cortes foram incubados apenas em água e analisados sob luz visível (A). Dois lotes foram preparados. O primeiro lote (B) funcionou como controle e foi incubado em água por 1 hora, seguida pela observação no microscópio de fluorescência (450 nm de excitação e 515 nm de emissão). O segundo lote (C) foi incubado em solução de DAF 20 µM por 1 hora e observado no microscópio de fluorescência. Os cortes foram obtidos pela técnica de emblocamento das bases foliares em PEG 1500 e processamento em micrótomo rotativo, na espessura de 45µm. Legenda: ep – epiderme; fv – feixes vasculares; pa – parênquima.

Explantes que foram incubados em água para controle e que foram submetidos ao emblocamento apresentaram, após o seu processamento no micrótomo, cortes com grande autofluorescência em verde na região da epiderme, feixes vasculares e ao redor das células do parênquima, bem como cortes sem nenhuma autofluorescência (figura 17B). Por outro lado, cortes incubados em DAF apresentaram fluorescência semelhante aos encontrados nos cortes que não foram incubados com o marcador (figura 17C).

Tendo em vista a não-marcação dos cortes pelo DAF, uma hipótese considerada foi a de que o marcador não estivesse sendo absorvido pelo tecido dos explantes e que por isso os resultados tenham sido tão parecidos, o que levaria à necessidade de se alterar o procedimento adotado.

Diante os resultados anteriores, o procedimento foi alterado. A marcação não foi mais realizada com explantes inteiros e a etapa de emblocamento foi eliminada. Os explantes permaneceram 24 horas incubadas em solução aquosa contendo doador de NO (nitroprussiato de sódio – 400 μM). Depois, cortes com espessura constante foram realizados no micrómo de Ranvier, com o material preso entre duas peças de isopor, e incubados em solução aquosa de DAF (20 μM). Depois, procedeu-se a montagem de lâminas para visualização dos cortes no microscópio de fluorescência, a cada 15 minutos. O controle foi realizado incubando-se os cortes em água destilada. Os resultados de fluorescência dos cortes são exibidos na figura 18.

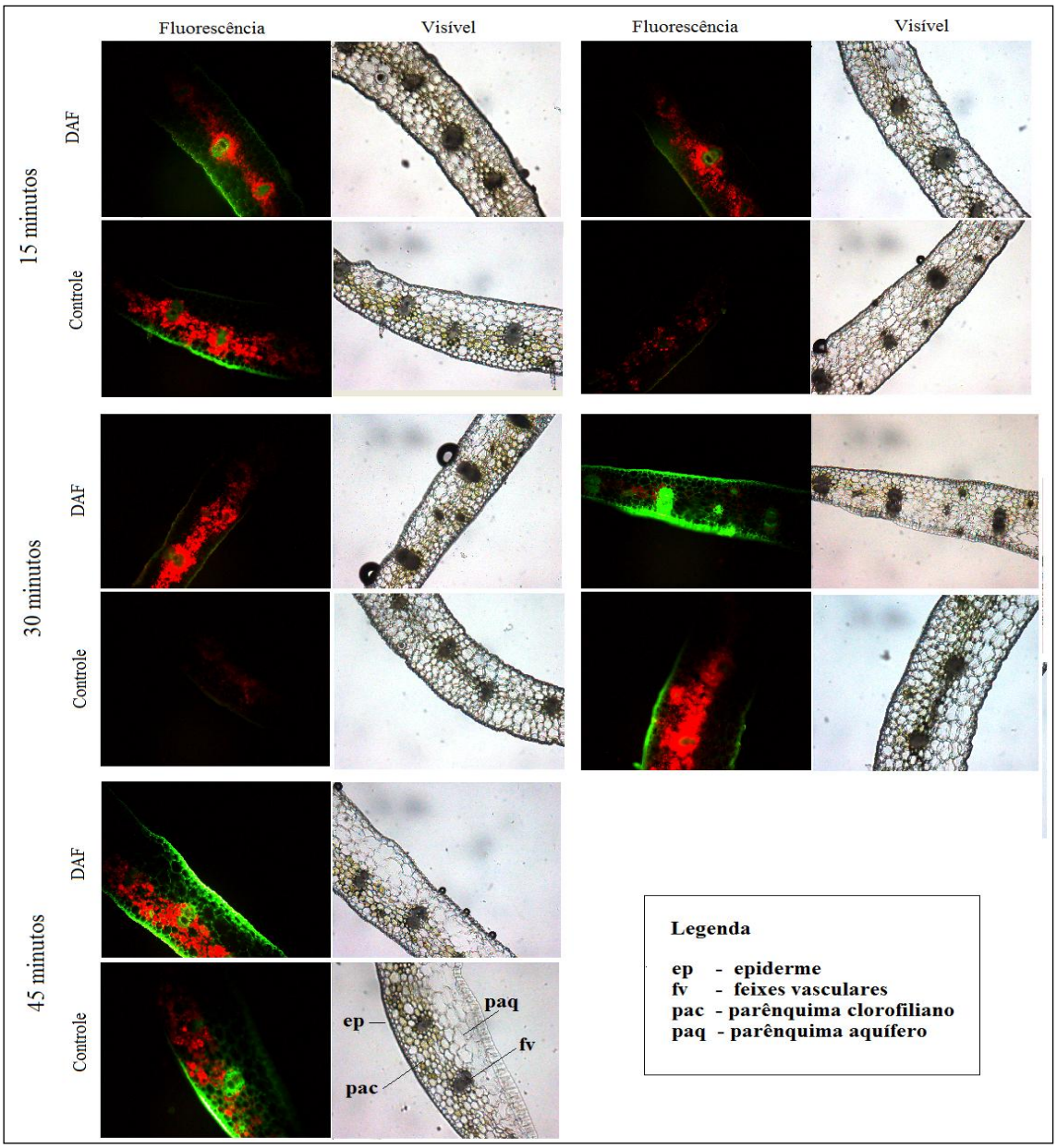


Figura 18 – Análise temporal da produção *in situ* de NO, por microscopia de fluorescência, em bases foliares de *Ananas comosus.* Os explantes foram mantidos por 24 horas em solução aquosa de SNP (400µM). Depois, foram processados no microscópio de Ranvier e dois lotes foram separados. O primeiro foi incubado em água por 1 hora e o segundo na solução aquosa de DAF (20 µM). Depois desse tempo, os cortes foram lavados em água destilada e as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência (450 nm de excitação e 515 de emissão) em 15, 30 e 45 minutos. Cada par de imagens representa uma observação em fluorescência e uma sob luz visível. Foram processadas as duas imagens mais representativas de cada tratamento ou controle, com ou sem marcador, para 15 e 30 minutos, com exceção de 45 minutos, cujas imagens são as que representam o resultado desse último tratamento/controle.

Conforme mostra a figura 18, aos 15 minutos, os cortes que foram incubados na solução contendo DAF 20 μM apresentaram uma leve fluorescência na região da epiderme e dos feixes. Entretanto, cortes incubados em água pelo mesmo período de tempo apresentaram considerável autofluorescência, principalmente na região da epiderme, bem como cortes sem nenhuma fluorescência emitida pelo marcador.

Aos 30 minutos, houve cortes incubados em DAF que apresentaram uma fluorescência muito grande, bem como houve cortes do mesmo tratamento que não apresentaram fluorescência alguma. Uma possível explicação é que o NO liberado pelo SNP também não penetre facilmente nos tecidos de um explante inteiro, ficando restrito às extremidades dos cortes. Os respectivos controles apresentaram uma fluorescência menor, quando comparados aos tratamentos, principalmente na região da epiderme, ou nenhuma fluorescência.

Por fim, aos 45 minutos a autofluorescência dos cortes da base foliar alcançou uma intensidade grande a ponto de não ser mais possível diferenciar um corte do tratamento com SNP do controle com água. Conforme se pode verificar, as regiões da epiderme e feixes vasculares apresentaram forte fluorescência, bem como as células do parênquima.

Devido ao problema da autofluorescência detectada nas marcações das bases foliares do abacaxizeiro pelo DAF 2-DA, foi realizado testes com um fluoróforo alternativo. A diaminorodamina (DAR-4M AM) é um marcador que atravessa a membrana plasmática e que reage com o NO endógeno – nesse caso, a fluorescência proporcionada por esse marcador ocorre em vermelho e pode ser visualizada no microscópio de fluorescência ou confocal.
Foi padronizado o tempo de marcação dos cortes na solução de DAR, bem como a concentração a ser utilizada desse marcador. Os cortes foram obtidos através do micrótomo de Ranvier.

Assim, na concentração de DAR de 10 µM e tempo de incubação de 15 minutos, os cortes na solução aquosa desse fluoróforo apresentaram fluorescência, sendo suficientes para promover a marcação do NO.

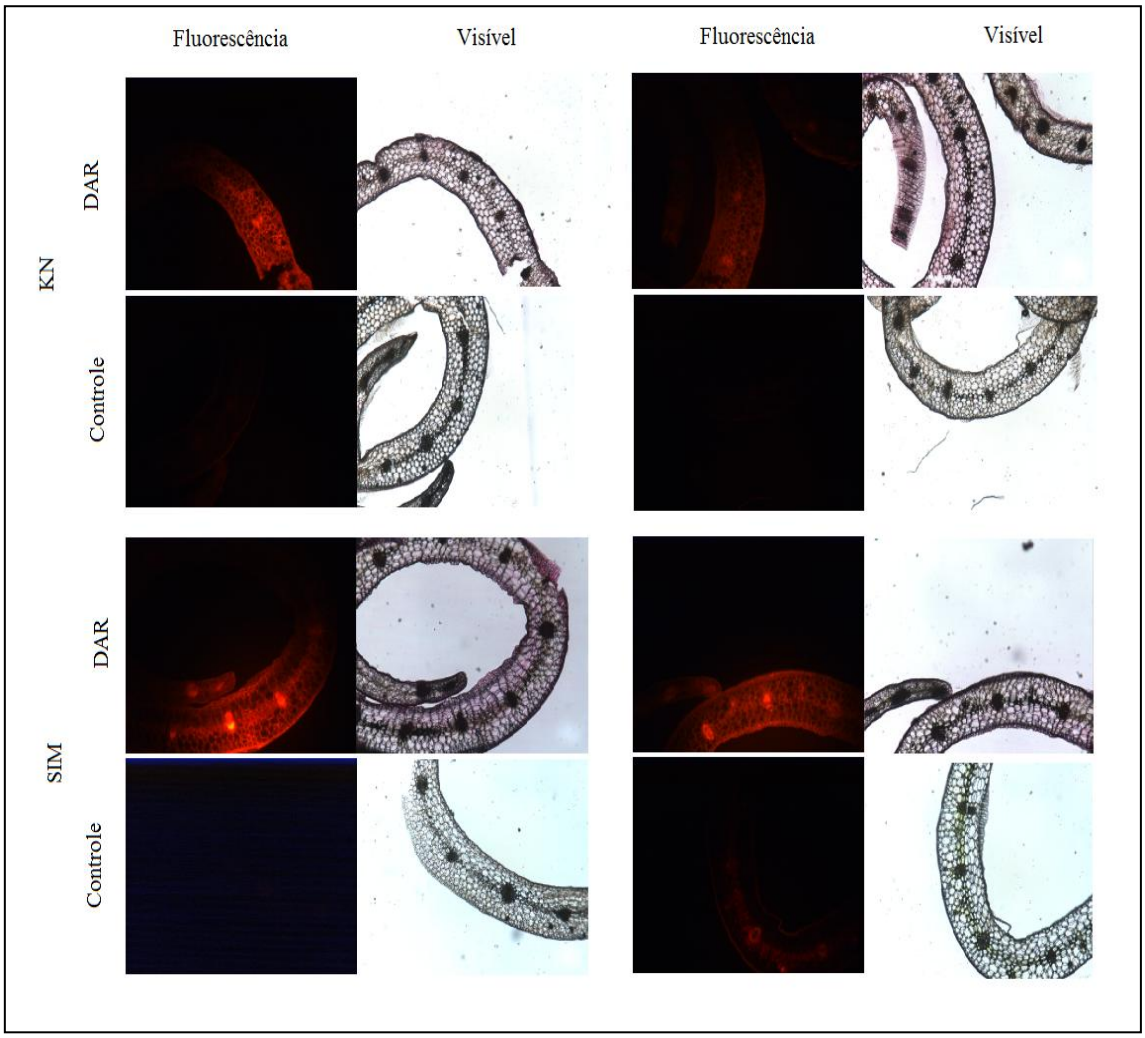


Figura 19 – Análise da produção *in situ* de NO, por microscopia de fluorescência, em bases foliares de *Ananas comosus.* Os explantes foram mantidos por 24 horas em solução aquosa de SNP (400µM). Depois, foram processados no microscópio de Ranvier e dois lotes foram separados. O primeiro foi incubado em água por 15 minutos e o segundo na solução aquosa de DAR-4M AM pelo mesmo tempo. Depois do tempo de incubação no marcador, os cortes foram lavados e as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência (550 nm de excitação e 580 de emissão). Cada par de imagens representa uma observação em fluorescência e uma sob luz visível. Foram processadas as duas imagens mais representativas de cada tratamento ou controle, com ou sem marcador.

Conforme se observa na figura 19, todos os controles que foram incubados em água (identificados na prancha como “Controle”), tanto no tratamento SIM quanto KN, não apresentaram fluorescência ou autofluorescência. Entretanto, constatou-se que o tratamento KN apresentou cortes com pouca ou média fluorescência quando comparados aos do tratamento SIM que, de maneira geral, apresentaram uma maior marcação.

Nos cortes onde foi observada pouca fluorescência, a marcação ocorreu principalmente na região dos feixes vasculares e epiderme. Constatou-se também que quanto maior a fluorescência, as células do parênquima também apresentaram considerável marcação, além dos feixes vasculares e epiderme.

IV.8. Dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e Integração com os Resultados de Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A figura 20 mostra o período no qual foram realizadas as dosagens de peróxido de hidrogênio. Nesse período estão compreendidas as 4 horas em que foram analisadas conjuntamente, hora à hora, a produção de peróxido de hidrogênio e a de óxido nítrico, sendo os valores de NO obtidos por quimiluminescência, por sete dias consecutivos.

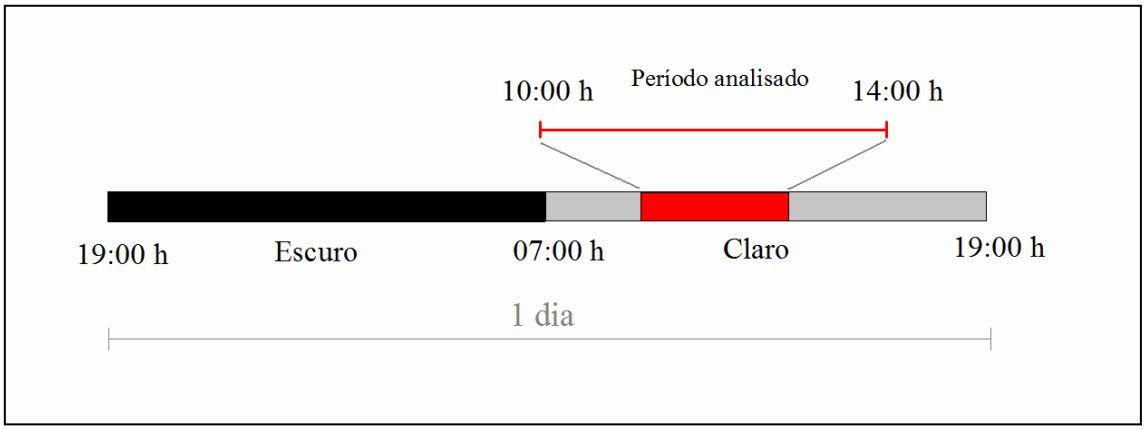


Figura 20 – Dosagens de peróxido de hidrogênio e NO realizados de hora em hora, no período das 10 às 14 horas.

A figura 21 mostra a produção de peróxido de hidrogênio pelos explantes cultivados nos tratamentos KN ou SIM, em cada uma das quatro horas propostas para análise. O período de incubação dos explantes em meio de cultura KN ou SIM variou de 1 a 7 dias.

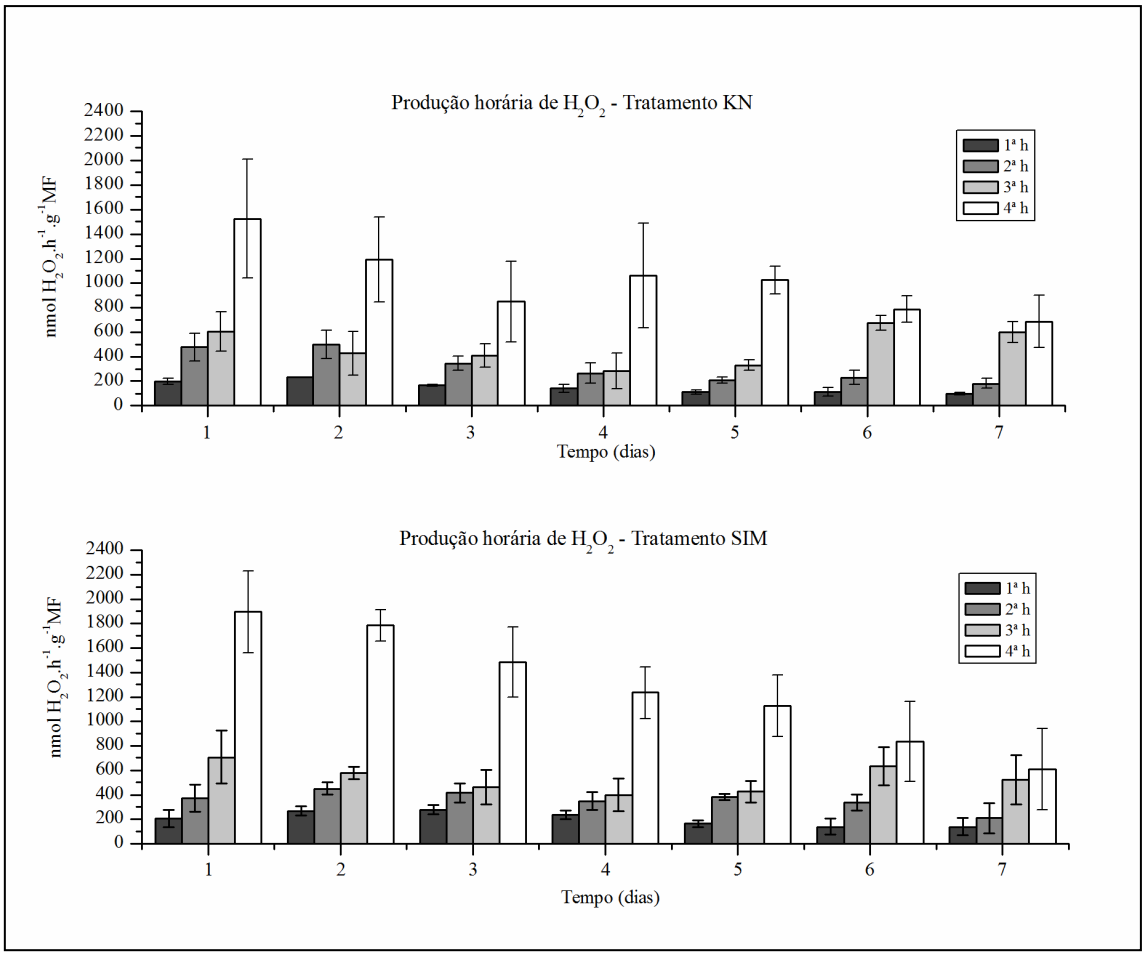


Figura 21 – Produção horária de peróxido de hidrogênio por tempo de incubação das bases foliares em meio de cultura KN ou SIM (1 a 7 dias). As barras indicam o erro padrão.

A análise da produção de peróxido de hidrogênio mostrou que, tanto para o tratamento SIM quanto para o KN, as taxas aumentaram com o passar das horas e que o maior aumento ocorreu da terceira para a quarta hora.

No tratamento KN, as comparações entre as quantidades produzidas de peróxido de hidrogênio da quarta hora em relação à terceira hora foram, do primeiro ao sétimo dia, de: 2,5; 2,8; 2,1; 3,8; 3,1; 1,2 e 1,1. Em relação ao tratamento SIM, os valores foram de: 2,7; 3,1; 3,2; 3,1; 2,6; 1,3 e 1,2. Diante disso, pode-se constatar que as maiores produções foram encontradas nos primeiros cinco dias após a incubação dos explantes em meio de cultura, tanto no SIM quanto no KN.

A análise comparativa dos resultados da produção na quarta hora dos tratamentos SIM e KN indicam uma diferença na produção do peróxido de hidrogênio entre esses dois tratamentos nos quatro primeiros dias, onde a produção do radical pelo tratamento SIM foi sempre maior que a do tratamento KN.

A figura 22 integra os resultados da dosagem de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio.

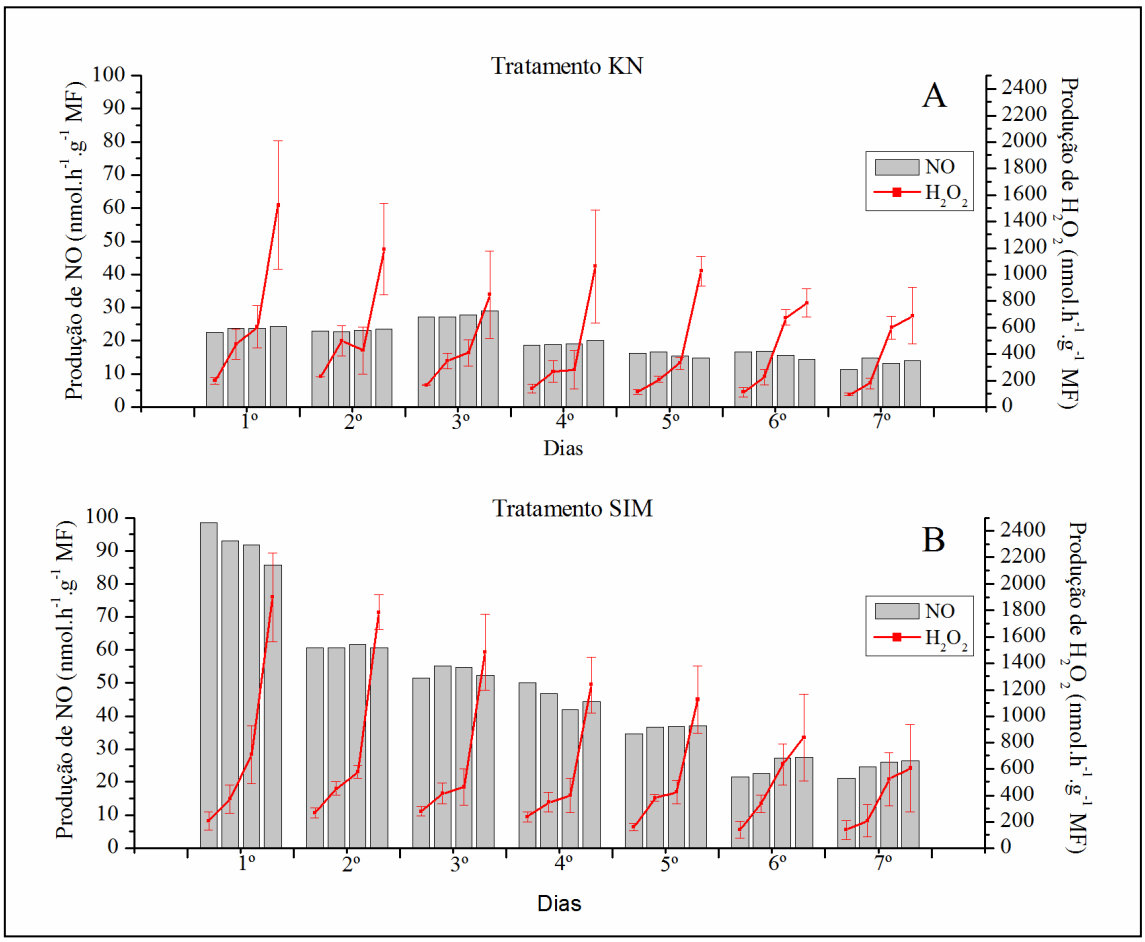


Figura 22 – Integração dos resultados de dosagens de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (A) - Produção horária de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por explantes em meio de cultura não-indutor à organogênese (KN); (B) - Produção do NO em meio de cultura de indução à organogênese (SIM). Nas curvas de produção de peróxido de hidrogênio, as barras indicam o erro padrão.

Observou-se uma possível relação entre a produção de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio, ou seja, a produção de peróxido de hidrogênio ocorreu posteriormente à produção de óxido nítrico para os explantes do tratamento SIM.

Além disso, a figura 22 evidencia uma possível relação entre a produção entre os dois radicais. Quanto maior a quantidade de óxido nítrico produzido, maior a produção de peróxido de hidrogênio nas horas subseqüentes. Isso pode ser observado nos quatro primeiros dias, quando são comparados os resultados entre os tratamentos SIM e KN.

V - DISCUSSÃO

A quantificação por fluxo contínuo (QFC) de óxido nítrico é uma metodologia que apresenta uma série de vantagens e algumas desvantagens. A maior vantagem de se realizar a quantificação por fluxo contínuo é a possibilidade de acompanhar a evolução da produção e liberação do radical em tempo real, sem restrição de tempo – ou seja, é uma opção interessante quando se deseja estudar o comportamento de um material vegetal quanto à produção de óxido nítrico por um tempo relativamente longo (dias ou semanas). Além disso, ela é interessante quando o material libera uma baixa quantidade de óxido nítrico, pois o equipamento é altamente sensível, detectando concentrações na faixa de partes por bilhão (ppb).

O uso de um sistema que realiza a descontaminação do ar atmosférico utilizado no transporte teve resultados satisfatórios e permitiu que o acompanhamento do desenvolvimento do material vegetal pudesse ser realizado por um longo período de tempo, mesmo após o término da fase de dosagem do óxido nítrico.
Até a presente data, trata-se da primeira vez que dosagens de NO foram realizadas utilizando culturas *in vitro* sob fluxo contínuo de ar atmosférico obtido através do uso de um compressor. A padronização dessa técnica permitiu evitar os efeitos da anóxia (através da substituição do gás de arraste, de nitrogênio para ar atmosférico), as trocas freqüentes de cilindros, caso seja utilizado como gás de arraste o ar sintético, bem como possibilitou que o material sob análise não sofresse contaminação durante a etapa de quantificação do radical.

Além disso, após ligação dos equipamentos a uma rede protegida por gerador, além da ligação no "no-break", as interrupções no fornecimento de energia não foram mais problemas durante as dosagens – mesmo com várias interrupções logo após a implantação do arranjo atual dos equipamentos, eles continuaram funcionando perfeitamente bem, sem perda de dados.

A produção de óxido nítrico ocorreu de maneira diferenciada quando se compara explantes expostos ou não aos reguladores de crescimento. Como pudemos constatar durante as quantificações do radical em fluxo contínuo, tanto os tratamentos dos explantes com ou sem reguladores de crescimento apresentaram uma maior produção de óxido nítrico durante a fase de claro, quando comparada à fase escura.

Esse comportamento de produção de NO depende do material vegetal analisado, bem como das condições nas quais foi realizada a dosagem do radical. Um estudo realizado com a alga *Chlorella sorokiniana* mostrou um comportamento semelhante ao do abacaxizeiro, ou seja, maior produção de NO na presença de luz e sua redução no escuro, sob condições de normóxia. Entretanto, sob condições de anóxia, a produção do radical aumentou consideravelmente (Tischner *et al.*, 2004). Além disso, mutantes deficientes para a redutase do nitrito dessa mesma espécie de alga não apresentaram diferença na produção de NO tanto na presença quanto na ausência de luz em condições de normóxia, ao passo que foi constatado um comportamento invertido na produção do radical sob condições de anóxia. A técnica utilizada na dosagem de NO nesse estudo foi a da quimiluminescência, com um equipamento semelhante ao instalado no Laboratório de Fisiologia Vegetal – IB/USP.

No caso do abacaxizeiro foi constatado que, tanto na fase clara quanto escura, os explantes submetidos ao tratamento com reguladores de crescimento apresentaram uma produção significativamente maior de NO em relação aos explantes não expostos aos reguladores, indicando que o radical pode desempenhar algum papel para o processo organogenético, desde a indução até etapas posteriores.

O processo da organogênese vegetal *in vitro* pode ser dividido em três fases: desdiferenciação celular para aquisição da competência organogenética (que nem sempre precisa ocorrer); determinação celular para a formação de um órgão específico em resposta aos reguladores de crescimento e, por fim, a continuidade

na formação desse órgão independentemente da presença desses reguladores (Sugiyama, 1999). A formação de um novo primórdio foliar é dependente da concentração da auxina endógena em determinadas regiões de um meristema. Após estabelecimento desse primórdio foliar, aumenta a força do dreno de auxina das células ao seu redor. Dessa maneira, o surgimento de um novo primórdio foliar somente poderá ocorrer a certa distância, numa posição onde a auxina possa ser acumulada (Castellano e Sablowski, 2005). No caso das folhas de abacaxi, novos meristemas são formados em um processo dependente de auxinas e citocininas endógenas (Mercier *et al.*, 2003). O processo de indução da organogênese em bases foliares de abacaxizeiro pode ser melhorado através da suplementação do meio de cultura SIM com glutamina 8 mM, elevando a taxa de formação de gemas adventícias de 46% para 70%. Foi constatado que, associado ao aumento na taxa de regeneração, ocorreu um aumento considerável nas concentrações endógenas do ácido indolil-3-acético e das citocininas (Hamasaki *et al.*, 2005).

Por outro lado, a produção de NO em plantas pode ocorrer por uma série de motivos, que variam desde crescimento e desenvolvimento a respostas às situações de estresse (Planchet e Kaiser, 2006). O processo de obtenção dos explantes a partir das folhas de abacaxizeiro pode ser considerado um fator de estresse, pois consiste na separação física da região de interesse através de cortes da planta mãe e a sua incubação em meio de cultura contendo uma série de substâncias químicas. Fatores de estresse abióticos como metais pesados, salinidade, altas temperaturas, desidratação, radiação ultravioleta, dentre outros, estão relacionados à indução do estresse oxidativo do qual o NO faz parte (Neill *et al.*, 2008).

Assim, provavelmente parte do NO produzido e dosado por quimiluminescência pode estar relacionada à situação de estresse pela qual os explantes passaram durante a sua obtenção. Entretanto, a constatação de uma produção maior de NO por explantes que foram incubados em meio de cultura indutor da organogênese (SIM), além da sua maior concentração nos primeiros dias de incubação, sugerem a participação do radical na fase de indução da organogênese adventícia. Hamasaki

et al. (2005) havia demonstrado para esse mesmo material que o período de indução ocorre nos primeiros 7 dias de cultivo em SIM.

Em pepino (*Cucumis sativus*) foi demonstrada a participação do NO para a formação de raízes adventícias induzidas pelo ácido indol-3-acético (AIA) (Pagnussat *et al.*, 2002). Além disso, foi encontrada uma correlação entre o controle da filotaxia e formação de um novo primórdio foliar em *Arabidopsis thaliana* com a distribuição da auxina (Shani *et al.*, 2006). Assim, situação semelhante poderia ocorrer durante a formação adventícia de eixos caulinares em bases foliares de abacaxizeiro, ou seja, o NO poderia estar atuando na distribuição da auxina durante o processo de organogênese.

O *Ananas comosus* tem se mostrado um material interessante para se estudar a organogênese induzida por reguladores de crescimento. Entretanto, uma pergunta pendente de resposta seria: por que motivo a regeneração não ocorre em 100% dos explantes? Todo o material vegetal foi proveniente de clones, obtidos a partir de material estiolado ao longo de muitas gerações. A análise de resultados em estudos futuros poderia ser facilitada se houvesse maior uniformidade nos estágios de desenvolvimento dos explantes submetidos à regeneração como, por exemplo, indução à organogênese de 100% de explantes tratados com reguladores de crescimento, todos formando novas plantas após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Uma hipótese seria que a percepção dos reguladores de crescimento pelos explantes pudesse não ocorrer de maneira similar. Ou seja, mesmo inoculando todas as bases foliares com a porção abaxial voltada para o meio de cultura, elas não estariam igualmente expostas aos reguladores de crescimento e a absorção poderia estar ocorrendo de maneira diferenciada pelos explantes. Um teste para avaliar essa hipótese seria a incubação de bases foliares em meio de cultura SIM não geleificado, ou seja, sem a adição de Phytagel®, no intuito de permitir uma maior absorção dos reguladores de crescimento pelos explantes.

Por outro lado, quando o aminoácido glutamina foi adicionado ao meio de cultura SIM, ocorreu o aumento na competência das bases foliares de abacaxizeiro à

regeneração (Hamasaki *et al.*, 2005). Assim, a incubação de bases foliares em meio de cultura SIM não geleificado e suplementado com glutamina pode ser uma alternativa interessante para aumentar a taxa de regeneração. Convém salientar que, dependendo da concentração fornecida de glutamina, esta pode ter um efeito inibitório da via da NR.

Os resultados relativos ao uso de inibidores da via da NR e da NOS indicaram que de alguma maneira o uso de tungstato, glutamina e L-NAME influenciaram negativamente a produção de óxido nítrico nos explantes de abacaxizeiro comparada àquela obtida pelos explantes incubados apenas na presença de meio de cultura sem reguladores de crescimento. A produção de NO para o tratamento SIM durante os três primeiros dias ficou na faixa de 20-80 nmol $NO.h^{-1}.g^{-1}$ MF, enquanto que a produção pelos explantes tratados com glutamina, tungstato e L-NAME não chegou a 10 nmol $NO.h^{-1}.g^{-1}$ MF.

A inibição da via da redutase do nitrato através da glutamina não afetou significativamente a formação de eixos caulinares pelos explantes após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura KN; o mesmo ocorreu para o tratamento com o tungstato, o qual apresentou resultados muito similares quando comparados ao tratamento com glutamina, em termos de percentual de novos eixos caulinares produzidos. Entretanto, o tratamento com o L-NAME – responsável pela inibição da via enzimática NOS em animais – apresentou resultados interessantes. A produção de óxido nítrico na fase escura reduziu constantemente ao longo dos dias, praticamente zerando no terceiro dia de quantificação. Esse tratamento acarretou uma grande diminuição do percentual de explantes que foram induzidos à organogênese adventícia. Houve uma redução significativa no número de eixos caulinares formados, isto é, somente cerca de 33% dos explantes apresentaram eixos caulinares contra 72% do tratamento com glutamina e 55% do tratamento com tungstato após 60 dias de cultivo *in vitro*.

O uso do L-NAME para inibir a síntese de óxido nítrico pela enzima NOS é comum em mamíferos, inclusive em humanos. A sua forma de ação consiste em competir

com o aminoácido L-arginina pela participação na rota de biossíntese de NO e, dessa maneira, interferindo na produção do radical (Besson-Bard *et al.*, 2009). No entanto, a enzima NOS ainda não foi identificada em plantas, bem como nenhuma seqüência homóloga do gene *NOS* de mamíferos foi encontrada em *Arabidopsis thaliana* ((Yamasaki *et al.*, 1999, Planchet e Kaiser, 2006).

Apesar dessa aparente incoerência, foi constatado que o L-NAME inibe a produção de NO em diversas espécies de plantas, como cevada (Valentovicová *et al.*, 2009) e milho (Tossi *et al.*, 2009), por exemplo. Apesar da rota NOS não ter sido ainda identificada, é possível que biossíntese de NO esteja ocorrendo por uma via alternativa e que o L-NAME possa interferir nessa rota.

Um experimento adicional que poderia confirmar a importância do NO para o processo da organogênese nas bases foliares de abacaxizeiro seria a incubação dos explantes em meio de cultura SIM contendo L-NAME e o fornecimento de NO exógeno, gasoso, durante a fase escura, com o objetivo de reverter a baixa taxa de regeneração e o vigor reduzido das novas bases foliares formadas.

O uso do carboxi-PTIO(cPTIO) como agente seqüestrador de óxido nítrico em bases foliares de *Ananas comosus* não resultou em diferenças significativas tanto na massa das protuberâncias e eixos caulinares quanto no número de eixos caulinares, de acordo com o teste de comparação de médias Tukey em nível de 5% de significância. O índice de Duncan mostrou algumas diferenças entre os tratamentos, entretanto nada que permitisse concluir sobre um padrão de desenvolvimento dos explantes.

Os resultados obtidos podem indicar que a concentração de cPTIO, mesmo que tenha sido superior à utilizada em muitos experimentos descritos na literatura com uma série de outras plantas, não foi efetiva para o abacaxizeiro e, portanto, não deve ter seqüestrado todo o óxido nítrico liberado pelo explante. Ou ainda, outra possibilidade a ser considerada seria a de que o cPTIO não conseguiu penetrar no tecido foliar. Nenhum relato indicando problemas de concentração ou

de penetração do cPTIO no material vegetal foi encontrado na literatura e que pudesse ser referência para o abacaxizeiro. Uma alternativa a essa questão seria a utilização de algum outro seqüestrador em substituição ao cPTIO.

Estudos indicam que as hemoglobinas poderiam funcionar como seqüestradores *in vivo* de NO, tanto em plantas como em animais (Kundu *et al.*, 2003). Por exemplo, as flavohemoglobinas são proteínas responsáveis pelo seqüestro de NO em algumas bactérias e levedura.

Assim, no caso do abacaxizeiro, uma alternativa ao cPTIO seria o emprego da hemoglobina bovina como seqüestrador de NO. Sementes de mutantes da *Arabidopsis thaliana* ΔAtGLB3 tem a sua germinação inibida por alta temperatura (32°C), a qual é restabelecida quando o NO é seqüestrado. O emprego da hemoglobina como agente seqüestrador permitiu o restabelecimento da taxa de germinação de maneira eficiente, mais rápido que com o cPTIO (Hossain *et al.*, 2010). O uso da hemoglobina como agente seqüestrador de NO é uma opção que será testada futuramente no Laboratório de Fisiologia Vegetal – IB/USP.

O emprego de alguma técnica que permitisse a dosagem do NO endógeno seria uma abordagem interessante, pois possibilitaria verificar a efetividade do reagente (tanto do cPTIO quando da hemoglobina) no seqüestro do radical.

Uma técnica que talvez possa ser empregada para confirmar o seqüestro do NO seria a espectrofluorimetria, a qual permite a dosagem de NO endógeno através do uso de marcadores para NO como o DAF-2 e o DAR, ao contrário da técnica de quimiluminescência, que quantifica o NO liberado pelo material analisado.

O uso de técnicas de microscopia para a obtenção de imagens dos sítios de produção de óxido nítrico tem se revelado como uma opção para a realização de cortes no micrótomo. Porém, a técnica ainda precisa ser aperfeiçoada, pois não permitiu alcançar os resultados desejados com as bases foliares de abacaxizeiro.

Além disso, não há literatura descrevendo a aplicação da técnica de infiltração e emblocamento em PEG 1500 para obtenção de cortes.

Um dos maiores problemas residiu no fato do procedimento ser demorado – leva até 12 horas para ser realizado sem interrupções, e esse tempo todo de tratamento pode afetar o funcionamento do fluoróforo DAF 2-DA. Além dos cuidados de não expor os explantes tratados com o fluoróforo à luz, uma série de outros fatores pode influenciar na identificação dos sítios produtores de NO. Por exemplo, podemos citar o grande número de horas que as bases foliares devem passar dentro de uma estufa durante o processo de infiltração no PEG 1500 (entre 5 e 6 horas) e a própria manipulação do material durante a sua transferência na série de concentrações do PEG 1500.

Assim, a produção de uma quantidade muito pequena de NO pode ter a sua identificação dificultada devido ao processo de autofluorescência. No caso do abacaxizeiro, foi constatado que as bases foliares autofluorescem no mesmo comprimento de onda do DAF-2T. Nesse caso, a alternativa foi utilizar um fluoróforo alternativo, o DAR, que fluoresce na faixa do vermelho.

O marcador DAF 2-DA é um fluoróforo muito utilizado para a localização de NO. Entretanto, devido à alta autofluorescência emitida pelos cortes de bases foliares de abacaxizeiro, o marcador não tem se mostrado um indicador confiável para a identificação dos sítios de produção de NO.

Uma alternativa foi o emprego de um marcador com fluorescência diferente do DAF 2-DA. O DAR 4M-AM foi uma opção que melhor se adequou ao abacaxizeiro no que diz respeito à autofluorescência.

Assim, apesar do DAR apresentar um limite de detecção de NO superior ao do DAF, 7 nM contra 5 nM (von Bohlen und Halbach, 2003), foi o reagente que apresentou melhores resultados. Além disso, convém salientar que os valores de produção diária de NO encontrados para o tratamento SIM ou KN pela técnica de

quimiluminescência foram dosados para um número amostral de 100 explantes, ou seja, muito pouco NO foi produzido em cada explante.
Apesar disso, o tratamento SIM apresentou regiões no cortes indicando maior fluorescência quando comparado ao KN, principalmente na região do parênquima e dos feixes vasculares. Essa maior fluorescência para o tratamento SIM está de acordo com a maior produção de óxido nítrico detectado pela técnica de quimiluminescência, quando comparada a fluorescência e quantidade de radical produzida pelo tratamento KN.

O peróxido de hidrogênio também está associado a uma série de eventos fisiológicos, a exemplo do óxido nítrico. A produção de peróxido de hidrogênio em plantas também é induzida por situações de estresse. Suspensão de células de tabaco, na presença de metais pesados (cádmio, zinco, cobre ou ferro), resultou na formação de espécies reativas de oxigênio, dentre eles o peróxido de hidrogênio (Źróbek-Sokolnik *et al.*, 2007).

Uma relação entre óxido nítrico e peróxido de hidrogênio foi encontrada quando uma suspensão de células de *Arabidopsis thaliana* foi exposta ao cádmio. Constatou-se que esse metal pesado induziu uma produção inicial elevada de óxido nítrico e que, em um evento posterior, resultou na síntese de peróxido de hidrogênio antes do aumento na taxa de morte celular (De Michele *et al.*, 2009).

Por outro lado, o peróxido de hidrogênio também está relacionado com o desenvolvimento vegetal. Foi constatado que o fornecimento exógeno de peróxido de hidrogênio levou à formação de raízes adventícias em plantas de mucuna (*Mucuna pririens*) a partir de sua semeadura (Li *et al.*, 2009). Situação semelhante àquela induzida por óxido nítrico, radical necessário para a formação de raízes adventícias em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) (Pagnussat *et al.*, 2002).
A formação de raízes adventícias em tagetes, ou cravo-de-defunto (*Tagetes erecta* L.'Marvel') ocorreu de sob efeito do óxido nítrico e do peróxido de hidrogênio de maneira dose-dependente, ou seja, o número e comprimento dessas estruturas foram significativamente maiores quando as plantas eram tratadas

simultaneamente com esses dois radicais do que com apenas um (Liao *et al.*, 2009). Esse mesmo trabalho mostrou que a aplicação de NO através de doadores aumentou o nível intracelular de H_2O_2 em hipocótilos.

Os resultados obtidos quanto às dosagens de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio para as bases foliares de abacaxizeiro indicaram uma possível relação entre esses dois radicais durante o processo organogenético para a formação de eixos caulinares. O aumento na concentração endógena de peróxido de hidrogênio nos explantes foliares após o aumento da produção de óxido nítrico na presença de luz sugere que essa sinalização ocorra após a sinalização dada pelo NO. Experimentos adicionais poderiam comprovar essa hipótese, por exemplo, através do emprego de um inibidor de H_2O_2, como a catalase, adicionado ao meio de cultura SIM.

Portanto, levando-se em conta os resultados anteriores do laboratório sobre os hormônios endógenos produzidos durante a fase de indução os explantes foliares de abacaxizeiro cultivados em SIM (Mercier *et al.*, 2003), percebeu-se que a cascata de sinalização da organogênese inicia-se com o pico na produção de NO no primeiro dia de cultivo, seguido por um aumento do teor de H_2O_2 e finalmente por incrementos nas concentrações endógenas de auxinas e citocininas (3º dia).

Assim, esta pesquisa permitiu inserir temporalmente dois outros compostos (NO e H_2O_2) à cadeia de eventos de sinalização da formação de meristemas adventícios em explantes foliares de abacaxizeiro.

VI - CONCLUSÕES

Há fortes indícios de que o óxido nítrico está relacionado à indução da formação de meristemas adventícios em bases foliares de *Ananas comosus.* O radical faria parte de uma cascata de sinalização na qual o peróxido de hidrogênio seria um outro componente, vindo em seguida ao NO, logo nas primeiras horas de cultivo *in vitro*.

A via de produção de NO pela redutase do nitrato pareceu não exercer diretamente uma influência na organogênese adventícia, apesar de ter havido uma grande redução na produção desse radical quando foram empregadas substâncias inibidoras dessa rota de síntese, como o tungstato e a glutamina. O número de explantes que formaram eixos caulinares ao final de 60 dias de cultivo *in vitro* foi semelhante ou superior aos resultados obtidos no tratamento controle sem inibidores. Ao contrário, o emprego do L-NAME, substância inibidora da via NOS em mamíferos, exerceu grande influência na organogênese das bases foliares, afetando significativamente a formação de gemas adventícias e no vigor dos poucos eixos caulinares formados pelos explantes, quando comparado ao controle sem a presença desse inibidor.

Quanto à localização do NO nos explantes foliares cultivados em SIM, por meio do emprego do fluoróforo DAR, detectou-se um aumento da fluorescência no parênquima e na região dos feixes vasculares.

VII. RESUMO

O óxido nítrico (NO) tem se mostrado um sinalizador presente em muitas fases do desenvolvimento vegetal e elemento essencial nas respostas aos estresses bióticos e abióticos em plantas. Entretanto, poucos estudos correlacionam esse radical à organogênese vegetal. Folhas de *Ananas comosus* (Bromeliaceae) podem ser consideradas um modelo interessante para o estudo da organogênese, pois sua região basal possui um conjunto de células que, sob cultivo *in vitro* e balanço adequado de certos reguladores de crescimento, dá início à proliferação celular e formação de meristemas adventícios. Primeiramente, formam-se estruturas denominadas protuberâncias que, depois, se desenvolvem em novos eixos caulinares, sem formação intermediária de calos. A relação ótima dos reguladores de crescimento para a indução da organogênese adventícia é 0,53 μM de ácido naftalenoacético e 8,87 μM de benziladeninapurina e sabe-se que o balanço hormonal entre auxinas e citocininas endógenas é alterado nesses explantes, encontrando-se um pico desses hormônios no terceiro dia da indução. Esse trabalho teve como objetivo verificar se o NO participaria da cascata de sinalizações que leva à organogênese adventícia, utilizando bases foliares de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*. A quantificação do NO foi determinada pela técnica de quimiluminescência durante um período de 7 dias a partir da obtenção dos explantes. Essa produção foi dosada em fluxo contínuo com medições feitas a cada 10 segundos. O tratamento indutor de organogênese mostrou um aumento significativo na produção de NO em comparação aos explantes incubados em meio de cultura sem reguladores de crescimento, indicando uma possível participação do óxido nítrico no processo da organogênese. Houve um pico de NO no primeiro dia logo nas primeiras horas de cultivo em meio indutor. Além disso, foi realizada a dosagem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e foi encontrada uma correlação com a produção de óxido nítrico durante a fase clara do fotoperíodo. A produção de H_2O_2 aumentou em seguida ao incremento de NO no primeiro dia de cultivo no meio de cultura com reguladores de crescimento. Finalmente, o tratamento com L-NAME mostrou ser a enzima NOS uma possível rota de síntese de NO, já que reduziu

significativamente o número de novos meristemas adventícios e, conseqüentemente, de novos eixos caulinares formados após 60 dias de cultivo em meio não indutor da organogênese. A localização *in situ* do NO pareceu indicar que o aumento da produção estaria mais relacionado com células do parênquima foliar e dos feixes vasculares. Assim, esta pesquisa permitiu incluir temporalmente dois novos possíveis sinalizadores (NO e H_2O_2) à cascata de sinalização da organogênese adventícia em folhas de abacaxizeiro. A sinalização parece iniciar-se com o NO e logo em seguida, ainda no primeiro dia, viria o aumento de H_2O_2 e dos hormônios auxinas e citocininas no terceiro dia (resultados anteriores do grupo) do período de indução.

VIII - ABSTRACT

The nitric oxide (NO) was shown to be an ubiquitous molecule for many phases of the development of a plant and an important element for biotic and abiotic stress responses. However, few studies correlate this radical with the organogenesis in plants. Ananas comosus (Bromeliaceae) leaves can be considered an interesting model for the organogenesis studies, because the basal region have a set of cell which, under in vitro cultivation and fine growth regulators balance, start cell division and form adventitious meristems. Firstly, structures named protuberances are formed, which develop forming new buds, without the intermediary formation of callus. The optimum rate of the growth regulators for the induction to organogenesis is 0.53 µM of naphthalene acetic acid and 8.87 µM of benziladeninepurine. It is known that the endogenous hormonal balance between auxins and cytokinins is altered in these explants, and a peak of these hormones is found at the third day of induction. This work intended to verify whether the NO would participate on the signaling cascade that led to the adventitious organogenesis, using basal leaves of pineapple cultivated in vitro. The nitric oxide quantification was made by chemiluminescence for a period of 7 days after the explants obtainment. The production was dosed in continuous flow air with measurements made every 10 seconds. The inductive treatment to organogenesis showed a significant rise in NO production in comparison to the explants incubated in medium culture without growth regulators, indicating a possible participation of NO at the organogenesis process. There was a NO peak at the first day, soon at the first hours of cultivation at inductive medium. Besides, the dosage of hydrogen peroxide (H_2O_2) was done and a correlation was found to the NO production at the light phase of the photoperiod. The H_2O_2 production rose after the increase of NO at the first day of cultivation in medium containing growth regulators. Finally, the treatment with L-NAME showed the NOS enzyme as a possible pathway involved with the NO production, since the number of new adventitious meristems reduced significantly and subsequently, of new shoots after 60 days of cultivation in inductive to organogenesis medium. The in situ localization of NO seemed to indicate that the rise in production could be related

to the cells of the leaf parenchyma and vascular tissues. Thus, this research permitted to include temporally two new possible signals (NO and H_2O_2) to the signalization cascade of the adventitious organogenesis in pineapple leaves. The signalization seems to initiate with NO followed by H_2O_2 at the first day and by the auxins and cytokinins hormones at the third day (previous results of the group) of the induction period.

IX. APÊNDICE A

Meios de cultura

Nas tabelas A-F estão relacionados os reagentes que fizeram parte da composição dos meios de cultura utilizados neste projeto. Em todos os tipos de meio de cultura o pH foi ajustado para 5,8 através da adição de HCl ou NaOH, antes da adição do agente geleificante Phytagel®.

A. Meio de cultura básico de Murashige e Skoog (1962) – MS

Reagentes	1 litro de meio de cultura
$CaCl_2.2H_2O$	8,8 g
Macronutrientes Murashige e Skoog	Item D – 50 mL
Micronutrientes Murashige e Skoog	Item E – 5 mL
Fe-EDTA	Item F – 10 mL
Tiamina	0,1 mg
Mio-Inositol	100 mg
Sacarose	30 g
Ajuste do pH para 5,8 com HCl ou NaOH	
Phytagel ®	2 g

B. Meio de cultura para indução da organogênese – SIM

Reagentes	1 litro de meio de cultura
Macronutrientes Knudson	
1. $(NH_4)_2SO_4$	500 mg
2. $Ca(NO_3)_2$	1000 mg
3. KH_2PO_4	250 mg
4. $MgSO_4$	250 mg
Micronutrientes Murashige e Skoog	Item E – 5 mL
Fe-EDTA	Item F – 10 mL
Sacarose	20 g
Benziladeninapurina (BAP)	2 mg
Ácido Naftaleno-Acético (ANA)	1 mg
Ajuste do pH para 5,8 com HCl ou NaOH	
Phytagel	2 g

C. Meio de cultura de Knudson (1946) modificado – KN

Reagentes	1 litro de meio de cultura
Macronutrientes Knudson	
5. $(NH_4)_2SO_4$	500 mg
6. $Ca(NO_3)_2$	1000 mg
7. KH_2PO_4	250 mg
8. $MgSO_4$	250 mg
Micronutrientes Murashige e Skoog	Item E – 5 mL
Fe-EDTA	Item F – 10 mL
Sacarose	20 g
Ajuste do pH para 5,8 com HCl ou NaOH	
Phytagel	2 g

D. Macronutrientes da formulação de Murashige e Skoog (MS) - 1962

Reagentes	1 litro
KNO_3	38 g
NH_4NO_3	33 g
$MgSO_4.7H_2O$	7,4 g
KH_2PO_4	3,4 g

E. Micronutrientes da formulação de Murashige & Skoog (MS) - 1962

Reagentes	1 litro
$MnSO_4.4H_2O$	4,46 g
$ZnSO_4.7H_2O$	1,72 g
H_3BO_3	1,24 g
KI	0,166 g
$NaMoO_4.2H_2O$	0,05 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,005 g
$CoCl_2.6H_2O$	0,005 g

F. Solução-estoque de Fe-EDTA

Reagentes	1 litro de meio de água
Na_2EDTA	3,730 g
$FeSO_4.7H_2O$	2,780 g

Reagentes Para Dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Nos itens G-I estão relacionados os reagentes utilizados na dosagem de peróxido de hidrogênio, com as suas respectivas concentrações. O meio de cultura KN, sem a adição do geleificante Phytagel ®, foi utilizado no preparo das suas soluções.

G. Solução de DCHBS (3,5-Dicloro-2-Hidroxibenzenossulfônico)

Solução-estoque de DCHBS foi preparada na concentração de 100 mM e mantida em gelo.

H. Solução-estoque de AAP (4-Aminoantipirina)

Solução-estoque de AAP foi preparada na concentração d 10 mM e mantida em gelo.

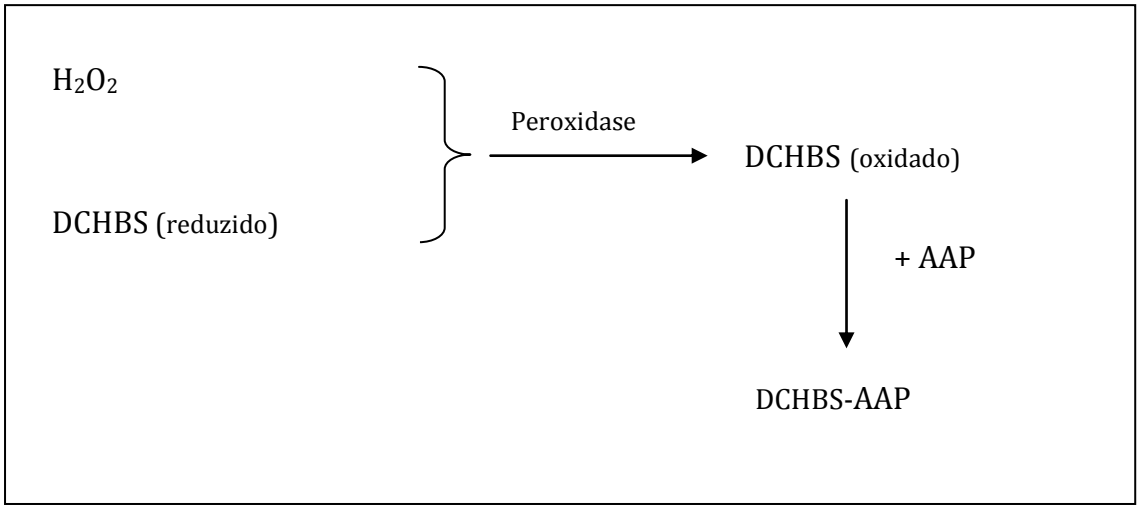
I. Solução de peroxidase

A solução de peroxidase foi preparada na concentração de aproximadamente 1 mg/L, mantida no gelo e protegida da luz.

APÊNDICE B

Princípio Da Técnica de Dosagem de H_2O_2

Protocolo para dosagem de H_2O_2 estabelecido por Van Gestelen *et al.* (1998). O método consiste na oxidação do ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfônico (DCHBS) até a sua forma quinona pela peroxidase. Uma vez oxidada, a quinona reage com a 4-aminoantipirina (AAP) e forma um complexo molecular cuja detecção no espectrofotômetro foi medida no comprimento de onda de 510 nm.



APÊNDICE C

Curva-Padrão Para Dosagem de H_2O_2

A tabela I foi utilizada na elaboração da curva-padrão para o cálculo da produção de peróxido de hidrogênio pelos explantes foliares de *Ananas comosus.* De acordo com o aumento na concentração de H_2O_2 é formado um gradiente de coloração rósea.

Tabela I – Volumes de H_2O_2, meio de cultura KN, soluções de DCHBS, AAP e peroxidase utilizados na determinação da curva-padrão.

Concentração (µM)	H_2O_2 (1 mM)	Meio de cultura (µL)	DCHBS (100 mM)	AAP (10 mM)	Peroxidase (< 1 mg/mL)	Total (µL)
0	0	880	100	10	10	1000
1	1	879	100	10	10	1000
2	2	878	100	10	10	1000
3	3	877	100	10	10	1000
4	4	876	100	10	10	1000
5	5	875	100	10	10	1000
7,5	7,5	872,5	100	10	10	1000
10	10	870	100	10	10	1000
20	20	860	100	10	10	1000
30	30	850	100	10	10	1000
40	40	840	100	10	10	1000
50	50	830	100	10	10	1000
75	75	805	100	10	10	1000
100	100	780	100	10	10	1000

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESSON-BARD, A.; ASTIER, J.; RASUL, S.; WAWER, I.; DUBREUIL-MAURIZI, C.; JEANDROZ, S. WENDEHENNE, D. 2009. Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Science,* 177**,** 302-309.

BETHKE, P. C.; BADGER, M. R. JONES, R. L. 2004. Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *Plant Cell,* 16**,** 332-341.

BRIGHT, J.; HISCOCK, S. J.; JAMES, P. E. HANCOCK, J. T. 2009. Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. *Plant Physiology and Biochemistry,* 47**,** 49-55.

CAO, B.-J. REITH, M. E. A. 2002. Nitric oxide scavenger carboxy-PTIO potentiates the inhibition of dopamine uptake by nitric oxide donors. *European Journal of Pharmacology,* 448**,** 27-30.

CASTELLANO, M. M. SABLOWSKI, R. 2005. Intercellular signalling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. *Current Opinion in Plant Biology,* 8**,** 26-31.

CHRISTIANSON, M. L. WARNICK, D. A. 1983. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Developmental Biology,* 95**,** 288-293.

CRAWFORD, N. M. 2006. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.,* 57**,** 471-478.

CUETO, M.; HERNÁNDEZ-PERERA, O.; MARTÍN, R.; BENTURA, M. L.; RODRIGO, J.; LAMAS, S. GOLVANO, M. P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters,* 398**,** 159-164.

DE MICHELE, R.; VURRO, E.; RIGO, C.; COSTA, A.; ELVIRI, L.; DI VALENTIN, M.; CARERI, M.; ZOTTINI, M.; SANITA DI TOPPI, L. LO SCHIAVO, F. 2009. Nitric Oxide Is Involved in Cadmium-Induced Programmed Cell Death in Arabidopsis Suspension Cultures. *Plant Physiol.,* 150**,** 217-228.

DOERNER, P. 2003. Plant Meristems: A Merry-Go-Round of Signals Review. *Current Biology,* 13**,** R368-R374.

EDERLI, L.; REALE, L.; MADEO, L.; FERRANTI, F.; GEHRING, C.; FORNACIARI, M.; ROMANO, B. PASQUALINI, S. 2009. NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. *Plant Physiology and Biochemistry,* 47**,** 42-48.

FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N.; BRYAN, N. S.; JOURD'HEUIL, D. KELM, M. 2002. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.,* 16**,** 1775-1785.

FRESCHI, L.; RODRIGUES, M. A.; DOMINGUES, D. S.; PURGATTO, E.; VAN SLUYS, M.-A.; MAGALHAES, J. R.; KAISER, W. M. MERCIER, H. 2010. Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiol.***,** pp.109.151613.

GABALDÓN, C.; ROS, L. V. G.; PEDREÑO, M. A. BARCELÓ, A. R. 2005. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans. New Phytologist,* 165**,** 121-130.

GARCÍA-MATA, C. LAMATTINA, L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptative plant responses against drought stress. *Plant Physiology,* 126**,** 1196-1204.

GUO, F.-Q.; OKAMOTO, M. CRAWFORD, N. M. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science,* 302**,** 100-103.

HAMASAKI, R. M.; PURGATTO, E. MERCIER, H. 2005. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated in vitro. *Brazilian Journal of Plant Physiology,* 17**,** 383-389.

HEISLER, M. G. JÖNSSON, H. 2007. Modelling meristem development in plants. *Current Opinion in Plant Biology,* 10**,** 92-97.

HOSSAIN, K.; ITOH, R.; YOSHIMURA, G.; TOKUDA, G.; OKU, H.; COHEN, M. YAMASAKI, H. 2010. Effects of nitric oxide scavengers on thermoinhibition of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Russian Journal of Plant Physiology,* 57**,** 222-232.

JASID, S.; SIMONTACCHI, M.; BARTOLI, C. G. PUNTARULO, S. 2006. Chloroplasts as a Nitric Oxide Cellular Source. Effect of Reactive Nitrogen Species on Chloroplastic Lipids and Proteins. *Plant Physiol.,* 142**,** 1246-1255.

KERBAUY, G. B. 1984. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of roots tips of *Catasetum* (Orchidaceae). *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie,* 113**,** 287-291.

KLEPPER, L. 1979. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO_2) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment,* 13**,** 537-542.

KONSTADT, S. 1995. Nitric oxide: Has it progressed from molecule of the year to wonder drug of the decade? *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia,* 9**,** 625-626.

KOPYRA, M. GWÓZDZ, E. A. 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry,* 41**,** 1011-1017.

KUNDU, S.; TRENT, J. T. HARGROVE, M. S. 2003. Plants, humans and hemoglobins. *Trends in Plant Science,* 8**,** 387-393.

LESHEM, Y. A. Y. PINCHASOV, Y. 2000. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries Fragaria anannasa (Duch.) and avocados Persea americana (Mill.). *J. Exp. Bot.,* 51**,** 1471-1473.

LI, S.-W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H. AN, L. 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany,* 65**,** 63-71.

LIAO, W.; XIAO, H. ZHANG, M. 2009. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold. *Acta Physiologiae Plantarum,* 31**,** 1279-1289.

MAGALHAES, J. R.; MONTE, D. C. DURZAN, D. 2000. Nitric oxide and ethylene emission in Arabidopsis thaliana. *Physiol. Mol. Biol. Plants,* 6**,** 117-127.

MATHEWS, V. H. RANGAN, T. S. 1979. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant in vitro cultures of pineapple. *Scientia Horticulturae,* 11**,** 319-328.

MAY, M. R.; PROVANCE, M. C.; SANDERS, A. C.; ELLSTRAND, N. C. ROSS-IBARRA, J. 2009. A Pleistocene Clone of Palmer's Oak Persisting in Southern California. *PLoS ONE,* 4**,** e8346.

MERCIER, H.; SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; HAMASAKI, R. M. SOTTA, B. 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. *Brazilian Journal of Plant Physiology,* 15**,** 107-112.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.,* 15**,** 473-497.

NAGANO, T. YOSHIMURA, T. 2002. Bioimaging of Nitric Oxide. *Chemical Reviews,* 102**,** 1235-1270.

NEILL, S. 2005. NO way to die - nitric oxide, programmed cell death and xylogenesis. *New Phytologist,* 165**,** 2-5.

NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D. WILSON, I. 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.,* 59**,** 165-176.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R. HANCOCK, J. T. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist,* 159**,** 11-35.

PAGNUSSAT, G. C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S. LAMATTINA, L. 2002. Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *Plant Physiol.,* 129**,** 954-956.

PALAVAN-UNSAL, N. ARISAN, D. 2009. Nitric Oxide Signalling In Plants. *The Botanical Review,* 75**,** 203-229.

PARÍS, R.; LAMATTINA, L. CASALONGUÉ, C. A. 2007. Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets. *Plant Physiology and Biochemistry,* 45**,** 80-86.

PEDROSO, M. C.; MAGALHAES, J. R. DURZAN, D. 2000. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal of Experimental Botany,* 51**,** 1027-1036.

PII, Y.; CRIMI, M.; CREMONESE, G.; SPENA, A. PANDOLFINI, T. 2007. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biology,* 7**,** 1-11.

PLANCHET, E. KAISER, W. M. 2006. Nitric oxide production in plants: facts and fictions. Landes Bioscience.

PRADO, A. M.; PORTERFIELD, D. M. FEIJÓ, J. A. 2004. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development,* 131**,** 2707-1714.

SABLOWSKI, R. 2007. The dynamic plant stem cell niches. *Current Opinion in Plant Biology,* 10**,** 639-644.

SHANI, E.; YANAI, O. ORI, N. 2006. The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current Opinion in Plant Biology,* 9**,** 484-489.

SKOOG, F.; HAMZI, H. Q.; SZWEYKOWSKA, A. M.; LEONARD, N. J.; CARRAWAY, K. L.; FUJII, T.; HELGESON, J. P. LOEPPKY, R. N. 1967. Cytokinins: Structure/activity relationships. *Phytochemistry,* 6**,** 1169-1192.

SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; ENDRES, L. MERCIER, H. 2003. Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of Ananas comosus nodal segments. *Plant Physiology and Biochemistry,* 41**,** 733-739.

SOUZA, O. P. D.; TEODORO, R. E. F.; MELO, B. D. TORRES, J. L. R. 2009. Qualidade do fruto e produtividade do abacaxizeiro em diferentes densidades de plantio e lâminas de irrigação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* 44**,** 471-477.

SUGIYAMA, M. 1999. Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Plant Biology,* 2**,** 61-64.

TISCHNER, R.; PLANCHET, E. KAISER, W. M. 2004. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga Chlorella sorokiniana. *FEBS letters,* 576**,** 151-155.

TOSSI, V.; CASSIA, R. LAMATTINA, L. 2009. Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. *Journal of Plant Physiology,* 166**,** 1336-1341.

TUCKER, M. R. LAUX, T. 2007. Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends in Cell Biology,* 17**,** 403-410.

VALENTOVICOVÁ, K.; HALUSKOVÁ, L. U.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. TAMÁS, L. 2009. Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *Journal of Plant Physiology,* In Press, Corrected Proof.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. 2003. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide,* 9**,** 217-228.

WANG, M. L.; URUU, G.; XIONG, L.; HE, X.; NAGAI, C.; CHEAH, K.; HU, J.; NAN, G. L.; SIPES, B.; ATKINSON, H.; MOORE, P.; ROHRBACH, K. PAULL, R. 2009. Production of transgenic pineapple (Ananas cosmos (L.) Merr.) plants via adventitious bud regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant,* 45**,** 112-121.

WANG, Y. S. YANG, Z. M. 2005. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.,* 46**,** 1915-1923.

WINK, D. A. MITCHELL, J. B. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide - From physiology to diseases. *Free Radical Biology and Medicine,* 25**,** 434-456 85 86.

WOJTASZEK, P. 2000. Nitric oxide in plants: To NO or not to NO. *Phytochemistry,* 54**,** 1-4.

XU, Y. C.; CAO, Y. L.; GUO, P.; TAO, Y. ZHAO, B. L. 2004. Detection of nitric oxide in plants by electron spin resonance. *Phytopathology,* 94**,** 402-407.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. TAKAHASHI, S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science,* 4**,** 128-129.

ŹRÓBEK-SOKOLNIK, A.; GÓRSKA, K. GÓRECKI, R. 2007. Heavy Metals-Induced Hydrogen Peroxide Production in Tobacco Cells. *Polish Journal of Natural Science,* 22**,** 196-203.