UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FLÁVIA REGINA CAPALDI

Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez

Piracicaba

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FLÁVIA REGINA CAPALDI

Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez

Piracicaba

2006

FLÁVIA REGINA CAPALDI

Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello

Piracicaba

2006

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Capaldi, Flávia Regina
Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez / Flávia Regina Capaldi; orientador Victor Alexandre Vitorello. - - Piracicaba, 2006.
150. f. : fig.

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

1. Cultura de células vegetais 2. Enzimas 3. Membrana plasmática 4. Proteínas da membrana 5. Toxicidade do alumínio I. Título

CDU 576.3:546.62

Dedico este trabalho

Às pessoas que sempre estiveram e que estão ao meu lado, de forma incondicional,
me apoiando, me estimulando, me socorrendo e,
que são o melhor da minha essência.

Meus pais, Inês e Sergio (*in memorian*).
Meu namorado Rodrigo.

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que elas acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis
e pessoas incomparáveis
(*Fernando Pessoa*)

Ser profundamente amado por alguém nos dá força; amar alguém profundamente
nos dá coragem.
(*Lao-Tsé*)

Se eu pudesse deixar algum presente a você,
deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo afora.
Lembraria os erros que foram cometidos, como sinais
para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável:
alem do pão, o trabalho e a ação.
E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria, se pudesse, um segredo. O de buscar no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída.

(*Mahatma Gandhi*)

Agradecimentos

A Deus, sempre presente, conhecedor de todos os detalhes que procuramos entender, luz primordial em nossas vidas.

À minha família, de modo especial aos meus pais, Sergio (*in memorian*) e Inês, pelo estímulo, pela força, pelos ensinamentos e pela lição de vida; à Sandra, ao Marco e à pequena Laura, motivo de muita alegria.

Ao Rodrigo, pelo seu amor, pela sua presença constante, pelo estímulo, pela sua incondicional atenção a mim sempre dispensada.

Ao Prof. Dr Victor Alexandre Vitorello pela orientação, pelos ensinamentos, pela compreensão e pela amizade.

Ao amigo Vanderlei Antonio Stefanuto, pela amizade, pela convivência e por toda a ajuda prestada.

Ao Clovis Arruda de Souza, companheiro de doutorado e professor da UDESC/SC, por todos os ensinamentos, discussões, pela convivência e amizade.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e pela estrutura oferecida.

À Coordenadoria de Apoio à Pesquisa (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr Ricardo Antunes de Azevedo (Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP) por todo o auxílio e estrutura oferecidos durante a execução deste trabalho e pela amizade.

À bióloga Priscila L. Gratão (Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP) pelo auxílio prestado durante os ensaios enzimáticos e pela amizade.

À Drª Salete Ap. Gaziola (Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP) pela disponibilidade durante todo o trabalho e pela amizade.

Ao Alejandro A. Toro (Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP), pelo auxílio no uso do software Melanie.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Neusa Nogueira e à bióloga Mônica Lanzoni Rossi (Lab. Histopatologia Vegetal, CENA/USP), por todo o auxílio prestado em microscopia eletrônica e de varredura.

Ao Prof. Dr Arnoldo Rocha Façanha (Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF/RJ), pelo auxílio e sugestões nas análises de ATPases.

À Dr^{a}. Cláudia de Matos Belatto pelo auxílio e discussões sobre os géis de eletroforese 2D.

À Prof^{a} Dr^{a}. Siu Mui Tsai pela concessão de uso dos equipamentos para a focalização isoelétrica e aparato de corrida dos géis.

Aos técnicos e auxiliares do Lab. Biologia Celular e Molecular Francisco Carlos Montrazi, Fábio Rodrigo S. Duarte e Wagner Piccinini por todo o auxílio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge A. Marques Rezende (Virologia Vegetal, ESALQ/USP), pela disponibilidade de uso da ultracentrfuga.

Ao Prof. Flávio Tavares (Genética de Leveduras, ESALQ/USP) pelo uso da ultracentrífuga.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Beatriz Mendes e à Prof^{a}. Dr^{a}. Adriana P. M. Rodriguez (Biotecnologia Vegetal, CENA/USP) pelo uso do microscópio de epifluorescência.

Ao Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis (Química Analítica, CENA/USP), pela concessão de uso do fluorímetro.

Ao Prof. Dr Cássio Hamilton Abreu Jr. e à bióloga Henriqueta M. G. Fernandes (Nutrição Mineral de Plantas, CENA/USP), pelo auxílio no uso do ICP-MS.

À Profª. Drª Maria Júlia Marques (Instituto de Biologia, UNICAMP), pelo uso do microscópio confocal.

À Profª. Drª. Ana Novembre (Lab. Sementes, ESALQ/USP) pelo uso do psicrômetro.

Aos estagiários: Ricardo Borges, Ana Carolina Giglio e Natália Diehl, pela ajuda prestada.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Expressar em palavras toda a gratidão pela ajuda que recebi durante o desenvolvimento deste trabalho é impossível, porém, ficam a lembrança a todos e de todos que contribuíram e as amizades feitas durante este período.

Para todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES i

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS x

RESUMO xi

ABSTRACT xiv

1 INTRODUÇÃO 01

1.1 Objetivos 05

2 REVISÃO DE LITERATURA 06

2.1 Os solos ácidos e a toxicidade por Al 06

2.2 Toxicidade e sensibilidade celular ao Al 06

2.3 Estresse oxidativo 10

2.3.1 Enzimas do sistema antioxidante celular..... 13

2.4 Interações entre o Al e a membrana plasmática (MP) 16

2.5 *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 19

3 METODOLOGIA 22

3.1 Cultivo de suspensões celulares de tabaco cv. BY-2 22

3.2 Monitoramento do crescimento da cultura 22

3.3 Viabilidade celular (VC%) 23

3.4 Determinação das condições de exposição celular aos tratamentos 23

3.5 Exposição celular aos tratamentos 24

3.6 Cultivo das células e viabilidade celular após a exposição aos tratamentos 25

3.7 Experimentos com diferentes concentrações de sacarose e manitol 25

3.8 Conteúdo de carboidratos solúveis totais 26

3.9 Quantificação do Al acumulado nas células 27

3.9.1 Acúmulo de Al por fluorimetria 27

3.9.2 Quantificação de Al por espectrometria de massa acoplada com fonte de plasma (ICP-MS) 27

3.10 Técnicas de microscopia utilizadas para visualização do Al nas células 29

3.10.1 Microscopia confocal de varredura a laser 29

3.11 Uso do BHA (Butylated Hydroxyanisole) 30

3.12 Avaliações do processo de estresse oxidativo 31

3.12.1 Peroxidação lipídica 31

3.12.2 Quantificação de H_2O_2 32

3.12.3 Atividades de enzimas antioxidantes 32

3.12.3.1 Superóxido dismutase - SOD (EC 1.15.1.1) 33

3.12.3.2 Catalase - CAT (EC 1.11.1.6) 34

3.12.3.3 Glutationa redutase - GR (EC 1.6.4.2) 34

3.12.3.4 Glutationa-S-Transferase - GST (EC 2.5.1.18) 35

3.12.3.5 Ascorbato peroxidase - APx (EC 1.11.1.11) 35

3.13 Análises sobre a membrana plasmática 35

3.13.1 Isolamento de frações enriquecidas da membrana plasmática 35

3.13.2 Perfil protéico por eletroforese bi-dimensional (2D) 37

3.13.2.1 Focalização Isoelétrica 37

3.13.2.2 Reidratação e preparo das tiras para a 2ª. dimensão (“equilíbrio das tiras”)..... 39

3.13.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 40

3.13.2.4 Análise das imagens 42

3.14 Análise dos dados 42

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 43

4.1 Comportamento geral da cultura de células de tabaco cv. BY-2 43

4.2 Determinação das condições e do tempo de exposição ao Al 46

4.2.1 Tratamentos utilizando-se sacarose e manitol 49

4.3 Diferenças na sensibilidade das células de tabaco cv. BY-2 aos tratamentos 55

4.3.1 Diferenças na sensibilidade celular ao Al 55

4.3.2 Diferenças sensibilidade celular ao baixo pH 59

4.3.3. Conteúdo de carboidratos solúveis totais 61

4.4 Correlação entre fluorimetria (Al-morin) e espectrometria de massa com fonte de plasma acoplada (ICP-MS) 63

4.5 Estresse oxidativo decorrente da exposição ao Al e à acidez 67

4.5.1 Peroxidação lipídica 67

4.5.2 Níveis de H_2O_2 69

4.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes 73

4.5.3.1 Superóxido Dismutase (SOD) 73

4.5.3.2 Catalase (CAT) 74

4.5.3.3 Ascorbato peroxidase (APX) 75

4.5.3.4 Glutationa-S-transferase (GST) 77

4.5.3.5 Glutationa Redutase (GR) 79

4.6 Uso do antioxidante BHA (Butylated Hydroxyanisole) 81

5.6.1 Crescimento e viabilidade celular após a exposição aos tratamentos e com o uso do BHA 85

4.7 Análises sobre a membrana plasmática 88

4.7.1 Perfil Protéico de frações enriquecidas com Membrana Plasmática ... 88

4.8 Sensibilidade diferencial ao Al e estresse oxidativo 94

4.9 Interação entre Al, osmólitos e membrana plasmática 96

5 CONCLUSÕES 101

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 105

APÊNDICE 1 129

LISTA DE ABREVIAÇÕES

$^1O_2$	Oxigênio singlet
2-D, 2D	Two Dimensional Electrophoresis; eletroforese bidimensional
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacetic acid; ácido 2,4-diclorofenoxiacético
APX	Ascorbato Peroxidase
ASB-14	Aminosulfobetaine 14; amino sulfo betaína 14
BHA	Butylated Hydroxyanisole; Butil Hidroxi anizol
BY-2	Bright Yellow 2
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DAPI	4',6'-diamino-phenylindole; 4',6'-diaminofenil-indole
DTNB	5,5"-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); 5,5"–ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)
DTT	Dithiothreitol; ditiotreitol
EAO's	Espécies ativas de oxigênio
EC	Enzyme Commission
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrometry; Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa-S-Transferase
$HO_2^{\bullet}$	Radical hidroperoxila
IAA	Iodoacetamide; iodoacetamida
ICC%	Índice de células compactadas (%)
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry; Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; Espectrometria de massa com fonte de plasma acoplada
IEF	Isoeletric focalization; focalização isoelétrica
IPG	Immobilized pH Gradient; gradiente de pH imobilizado
man	Manitol

MDA	Malonaldeyde; malonaldeído
MES	(2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid); ácido morfolino etano sulfônico
MF	Massa vegetal fresca
$O_2^{-\bullet}$	Radical superóxido
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxila
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis; eletroforese em gel de poliacrilamida
PFA	Perfluoroalkoxy Teflon®
PI	Ponto isoelétrico
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride; fenilmetilsulfonilfluoreto
ROS	Reactive Oxygen Species; espécies reativas de oxigênio
RT	Immobiline Drystrip Reswelling Tray
sac	Sacarose
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate; dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	2-Thiobarbituric acid; ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Trichloroacetic acid; ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra methylenodiamine; N,N,N',N'–tetrametilenodiamina
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethane; Tris(hidroximetil)-aminometano
VC%	Viabilidade celular (%)
XO	Xylenol orange; alaranjado de xilenol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação geral envolvendo a glutationa redutase, recuperando a condição reduzida da glutationa que foi exposta ao agente oxidante. Fonte: Pereira (2004)..... 15

Figura 2: Exemplo de frascos de cultura de células de tabaco cv. BY-2 nas fases (A) log, com 2 dias de idade e (B) estacionária de crescimento, com 7 dias de idade..... 21

Figura 3: Esquema geral dos processos envolvidos no funcionamento do ICP-MS. Fonte: Ruíz, 2003..... 28

Figura 4: (A) Gradiente de sacarose formado. A amostra fica por sobre a camada de solução de sacarose 25%. As soluções separam-se por densidade; (B) após a ultracentrifugação, pode-se coletar a porção enriquecida de membrana plasmática da interface inferior do tubo..... 37

Figura 5: Etapas para a colocação da amostra e da fita no sarcófago. (A) coloca-se a amostra no centro do sarcófago com o auxílio de uma micropipeta; (B) após a retirada da fita protetora do gel, coloca-se a fita sobre a amostra, deslizando-a suavemente para evitar a formação de bolhas, com o gel voltado para cima e observando a polaridade do gel e do sarcófago, geralmente com o auxílio de uma pinça; (C) após o término da colocação da fita e do óleo mineral, tampa-se o sarcófago. Fonte: Amersham Biosciences, 2006..... 38

Figura 6: Sarcófagos fechados e colocados no Ettan™ IPGphor™ II IEF System para o processo de focalização isoelétrica, observando-se a posição do sarcófago correspondendo à posição dos eletrodos positivo e negativo, para a passagem da corrente elétrica. A programação do equipamento é realizada no painel de controle, através do binômio tempo e voltagem. Fonte: Amersham Biosciences, 2006..... 39

Figura 7: Immobiline Drystrip Reswelling Tray (RT). Após a focalização isoelétrica, as fitas são transferidas para as canaletas do RT para o processo denominado “equilíbrio”, que é o preparo da mesma para a segunda dimensão da eletroforese. Fonte: Amersham Biosciences, 2006..... 40

Figura 8: Colocação da fita no gel (SDS-PAGE). Sobre o gel é colocada uma solução de agarose 0,5% quente para que a fita deslize com mais facilidade e fique em contato com a superfície do gel. Também é colocado um espaçador para a colocação do padrão de massas moleculares conhecidas..... 41

Figura 9: Desenvolvimento da cultura de células de tabaco BY-2 durante 1 ciclo de cultivo sob condições normais. (A) Crescimento da cultura medido pelo índice de células compactadas (ICC%) após centrifugação a 200*g* por 2 min e viabilidade celular (VC%), obtida por coloração com Trypan Blue. (B) Ilustração do crescimento da cultura por decantação do volume de células..... 45

Figura 10: Acúmulo relativo de Al (%) durante 180 min de exposição a 50 µM de Al. No ensaio padrão (♦), as células foram expostas ao Al em solução padrão a pH4,2; no tratamento 80/0mM sac (■), as células foram lavadas em solução padrão pH4,2 acrescida de 80 mM sacarose e expostas ao Al em condições padrão e no tratamento 80/40 mM sac (□), as lavagens foram feitas em solução padrão pH4,2 acrescida de 80 mM sacarose e a exposição ao Al foi feita em solução padrão acrescida de 40 mM sacarose. O acúmulo de Al em células na fase estacionária sob a condição 0/0 foi insignificante (0,9%)..... 48

Figura 11: Microfotografias obtidas por microscopia confocal ilustrando o acúmulo de Al ao longo do tempo em células de tabaco BY-2 da fase log de crescimento. As células foram expostas a 50µM Al por 30, 60 e 120 min e depois coradas com morin. As imagens foram obtidas por fluorescência, deixando-se passar a luz transmitida de baixa intensidade para a visualização da célula. As setas exemplificam a fluorescência do complexo Al-morin..... 49

Figura 12: (A) Acúmulo relativo de alumínio (%) medido por fluorimetria pelo complexo Al-morin em células BY-2 na fase log tratadas com diferentes concentrações de sacarose (●) e manitol (○) e (B) Viabilidade celular (VC%) para células da mesma amostra coradas com Trypan blue 0,4%. Contagem por microscopia óptica..... 53

Figura 13: (A) Crescimento celular (%) e (B) viabilidade celular (%),

durante um subcultivo, em meios de cultura contendo sacarose (●) ou manitol (○) como fonte de carbono. O inóculo inicial foi de 4% para os dois tratamentos e a concentração de sacarose ou manitol foi de 87,4mM no meio de cultura..... 54

Figura 14: Acúmulo relativo de Al (□) e viabilidade celular (VC%, ■) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log e estacionária de crescimento. Tratamentos: ensaio padrão (as células foram expostas a 50 µM Al em solução padrão pH4,2); 80/40mM sac (a solução padrão foi acrescida de 80mM de sacarose nas lavagens e 40mM de sacarose na exposição, juntamente com o Al) e 80/0mM sac (a solução padrão recebeu 80mM de sacarose nas lavagens e as células foram expostas a 50µM Al)..... 57

Figura 15: Correlação entre o acúmulo relativo de Al e a viabilidade celular em células de tabaco cv. BY-2. Foram utilizados dados de todos os tratamentos aplicados de células tanto na fase log como na estacionária de crescimento..... 58

Figura 16: Viabilidade celular (VC%) em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log e estacionária de crescimento (observar as chaves). Tratamentos: controle pH 4,2 (células lavadas e expostas em solução padrão pH 4,2, tanto na fase log como estacionária); 80/40 mM sac (solução de lavagem foi acrescida de 80mM de sacarose e a solução de exposição recebeu 40mM de sacarose); 80/0 mM sac (solução de lavagem recebeu 80mM de sacarose porém as células foram expostas em solução padrão a pH 4,2)..... 61

Figura 17: Curva de calibração de glicose (µg/mL) para a quantificação dos carboidratos solúveis totais..... 62

Figura 18: Carboidratos solúveis totais (µg/mg MF) em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (lavagens e exposição a pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol. padrão pH4,2 e exposição na mesma solução + Al); 80/40 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al + 40 mM sacarose ou manitol); 80/0mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição em sol. padrão + Al..... 62

Figura 19: Concentração de Al (ppb) em células de tabaco cv. BY-2 nas

fases log (□) e estacionária (■) obtida em ICP-MS. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH 5,6); pH4,2 (idem, a pH 4,2); ensaio padrão (células lavadas em sol. padrão pH 4,2 e expostas a 50 µM Al); 80/40mM (lavagens em solução padrão + 80 mM sacarose ou manitol e expostas a 50 µM Al + 40mM sacarose ou manitol); 80/0mM (lavagens em solução padrão + 80mM sacarose ou manitol e expostas a 50 µM Al)..... 65

Figura 20: Correlação entre Al acumulado entre as metodologias de fluorimetria pelo complexo Al-morin e por ICP-MS em células de tabaco cv. BY-2, nas fases log e estacionária, com coeficiente de correlação entre as metodologias igual a: R^2=0,96..... 67

Figura 21: Peroxidação lipídica em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■), medida pelo teste TBA. Resultados expressos em mmol MDA/mg MF. Os resultados em células na fase estacionária foram próximos de zero, considerados desprezíveis. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 68

Figura 22: Curva de calibração com concentrações de H_2O_2, medida a 560nm. O coeficiente de correlação para a curva foi de R^2 = 0,9965..... 69

Figura 23 Concentração de H_2O_2 em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 70

Figura 24: Correlação entre a peroxidação lipídica e o conteúdo de H_2O_2 em

células de tabaco cv. BY-2. Foram utilizados dados de todos os tratamentos aplicados em células tanto na fase log como na estacionária para traçar o gráfico..... 71

Figura 25: Correlação entre a peroxidação lipídica e o acúmulo de Al medido por ICP-MS (□), com R^2 = 0,6558 e correlação entre o conteúdo de H_2O_2 e o acúmulo de Al medido por ICP-MS (■), com R^2 = 0,1047 em células de tabaco cv. BY-2. Foram considerados os dados de todos os tratamentos aplicados às células tanto na fase log, como na fase estacionária de crescimento..... 72

Figura 26: Correlação entre a peroxidação lipídica e a viabilidade celular (■), com R^2 = 0,6152 e correlação entre o conteúdo de H_2O_2 e a viabilidade celular (□), com R^2 = 0,604 em células de tabaco cv. BY-2. Foram considerados os dados de todos os tratamentos aplicados às células tanto na fase log, como na fase estacionária de crescimento..... 72

Figura 27: Bandas de SOD em PAGE 9%. P (padrão SOD-bovina) e tratamentos: pH5,6; pH4,2; 50µM $AlCl_3$; 80/40sac (lavagens com a solução padrão acrescida de 80mM sacarose e exposição ao Al em solução padrão acrescida de 40mM sacarose, pH4,2) e 80/0sac (idem ao tratamento anterior, porém a exposição ao Al foi feita em solução padrão pH4,2). Corridas simultâneas, a 4˚C, 15mA/gel, utilizando-se 60µg de proteínas/amostra..... 74

Figura 28: Identificação das diferentes isoenzimas de SOD. Estão presentes a Mn-SOD, resistente aos dois inibidores usados e a Fe-SOD, resistente ao KCN e inibida pelo H_2O_2. A primeira parte (controle) foi revelada através do procedimento padrão para SOD. A corrida do gel foi realizada a 4˚C, 15mA/gel por um tempo médio de 3h, em cuba Pharmacia para mini-gel..... 74

Figura 29: Atividade da catalase em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 75

Figura 30: Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em células de tabaco BY-2

nas fases log (□) e estacionária (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 76

Figura 31: Atividade da glutationa-S-transferase em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 79

Figura 32: Atividade da Glutationa redutase (GR) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 81

Figura 33: Peroxidação lipídica medida pelo teste TBA em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento, sob condições de acúmulo de Al padrão, com o uso de 20 µM BHA e com 100 µM BHA tanto nas lavagens precedentes à exprosição, como durante as 2h de exposição ao Al. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)... 83

Figura 34: Viabilidade celular (VC%) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento. O tratamento sem BHA é o experimento padrão de exposição ao Al; o tratamento 20µM BHA recebeu esta concentração do antioxidante nas soluções de lavagens e durante a exposição; idem para o tratamento 100 µM BHA. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 85

Figura 35: (A) Viabilidade celular (VC%) e (B) crescimento celular (ICC%) da cultura de células BY-2 submetida aos diferentes tratamentos na presença de 20µM BHA. O ICC foi medido a cada ao final das 2h de exposição e a cada 24h até 96h após a realização do experimento. A medição deu-se por centrifugação da suspensão celular a 200*g* por 2min..... 86

Figura 36: (A) Viabilidade celular (VC%) e (B) crescimento celular (ICC%) da cultura de células de tabaco cv. BY-2 na fase log submetidas aos diferentes tratamentos na presença de 100µM BHA após a exposição. O índice de compactação celular foi medido a cada ao final das 2h de exposição aos tratamentos e a cada 24h até 96h após a realização do experimento. A medição deu-se por centrifugação da suspensão celular a 200*g* por 2min..... 87

Figura 37: Perfil protéico das células tratadas sob condições de pH 5,6. Os géis correspondem a (A) fase log e (B) fase estacionária de crescimento. As proteínas foram separadas na 1ª. Dimensão com o uso de fitas de pH imobilizado na faixa de 3 a 10 e na 2ª. Dimensão por SDS-PAGE gradiente 8-16%. Foram usadas 75µg proteína em cada gel..... 90

Figura 38: Perfil protéico das células tratadas com Al. Géis: (A) fase log e (B) fase estacionária. As proteínas foram separadas por IEF pH 3 a 10 e SDS-PAGE 8-16%. Foram usadas 75 µg proteína em cada gel..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos utilizados durantes os experimentos 24

RESUMO

CAPALDI, F.R. **Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez**. 2006. 150f. Tese (Doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

O alumínio é limitante à atividade agrícola em todo o mundo. Nos solos ácidos a disponibilidade de Al aumenta. Estes solos constituem a maioria dos solos do mundo e dois terços dos solos brasileiros. O problema da acidez do solo e da toxicidade por Al é altamente significativo para as perdas na produtividade agrícola e florestal. Para se ter Al disponível, primeiramente tem que se ter condições de pH baixo. O primeiro sintoma causado pela toxicidade por Al é a inibição no alongamento do sistema radicular. Existem trabalhos vinculando a inibição a alterações nos processos de divisão e expansão celular. Embora os mecanismos de toxicidade e resistência ao Al não estejam totalmente elucidados, admite-se que em algumas plantas, a quelação do Al por ácidos orgânicos é um dos mecanismos que confere resistência das células ao Al, assim como em outras plantas a elevação do pH da rizosfera, por compostos liberados pelo sistema radicular, atua na queda da disponibilidade do Al na solução do solo. Porém, existem outras alternativas que vêm sendo propostas na literatura como possíveis mecanismos de resistência das plantas ao Al, principalmente ao nível celular e molecular. Alterações nas composições lipídica e protéica da membrana plasmática, assim como na sua estrutura física; ativação do sistema antioxidante celular; alterações na sinalização celular e de atividade dos canais de troca da membrana plasmática vêm sendo estudados como possíveis contribuintes para os mecanismos de resistência ao Al. A

sensibilidade celular ao Al depende do seu estágio de desenvolvimento. As células sensíveis ao Al acumulam o metal, enquanto que as resistentes acumulam muito pouco. Foi constatado em nosso trabalho que as células sensíveis ao Al também são sensíveis ao baixo pH. As células sensíveis não conseguem recuperar seu crescimento e sua viabilidade celular após a exposição ao Al ou ao baixo pH.

A sacarose ou manitol conferiram proteção às células quanto ao acúmulo de Al. Isso fez com que a viabilidade mantivesse-se em níveis próximos ao controle (pH5,6) e a cultura conseguisse recuperar seu crescimento e viabilidade após a exposição ao Al e ao baixo pH. O efeito protetor não foi devido ao caráter energético da sacarose, pois o manitol não é metabolizado pelas células BY-2 e os resultados foram semelhantes quando se usou sacarose ou manitol, nas mesmas concentrações.

Sabe-se que o Al aumenta a peroxidação lipídica e a oxidação protéica da membrana plasmática, pela geração de EAO's, desencadeando o processo de estresse oxidativo na célula. Em nosso estudo, nas células sensíveis houve peroxidação dos lipídios, ativação do sistema de enzimas antioxidantes, como SOD, GST, GR, CAT e APX, alteração nos níveis de carboidratos e alteração no perfil protéico de frações enriquecidas de membrana plasmática, obtido por eletroforese 2D. O mesmo comportamento foi verificado em células sensíveis tratadas a baixo pH.

Pode-se concluir que o sistema antioxidante celular foi ativado na presença de baixo pH ou Al, pela ocorrência de peroxidação lipídica, que gera maiores concentrações de H_2O_2 nas células sensíveis (fase log). E que existem diferenças no perfil protéico de células tratadas com Al em relação a células mantidas sob

condições de cultivo, tanto em presença de spots como em expressão diferencial. Porém estas diferenças necessitam ser melhores exploradas.

A peroxidação lipídica é um bom indicador da sensibilidade celular ao Al e ao baixo pH, assim como a ativação do sistema antioxidante e a geração do peróxido de hidrogênio. Poderiam ser realizados experimentos no tempo, medindo-se o acúmulo de Al e relacionando-o aos níveis de peroxidação lipídica, atividade das enzimas antioxidantes e geração do peróxido, para que pudéssemos indicar talvez um processo que se iniciasse antes que outro, ou mesmo que decaísse antes do outro. Assim como um monitoramento das condições de oxidação protéica na presença de Al.

Palavras-chave: cultura de células vegetais; enzimas antioxidantes; membrana plasmática; proteínas da membrana; toxicidade por alumínio.

ABSTRACT

CAPALDI, F.R. **Oxidative stress and differences in sensibility of tobacco cells (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 to aluminum and acidity.** 2006. 150f**.** Thesis (Doctorate). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

Aluminum limits crop production in all over the world. In acid solis the Al disponibility is larger. Acid soils compose the major part of the brazillian soils. The problem of acidity and Al toxicity results in losses of productivity in agriculture and forestry. The first symptom of Al toxicity is inhibition of root growth. There is many studies that indicate relations between the inhibition of root growth and cell division and expansion alterations. The mechanisms of Al toxicity and resistance aren't completely understood in plants. The resistance mechanism of Al chelation by organic acid is one of the mechanisms accept, like the elevation of the rizosphere pH by substances exsudated by the root system. Other possible mechanisms that are being mentionated are the alterations in plasma membrane composition and structure, antioxidant cell system activation, alterations in cell signal and alterations in the membrane channels activity. Aluminum cell sensibility depends of the status cellular. The cells that are sensible to Al, are in the log phase of growth and accumulate the metal, whereas the resistant cells do not accumulate and were in the stationary phase of growth. In our work, we observed that the sensible cells are sensible to low pH too. The sensible cells don't recover their growth rate and cellular viability after the treatment exposition.

Sucrose or mannitol confers cellular protection against the Al. The cellular viability was high (next to the control, pH5,6) and the cell culture recovery their growth and viability after the Al or low pH exposition.

The protective effect don't occurs in response to the energetic role of sucrose, because cells treated with mannitol showed the same results and the mannitol did not metabolizated by tobacco BY-2 cells.

Al induces lipid peroxidation and protein oxidation in plasma membrane, by the ROS generation promoting the oxidative stress. We found that sensible Al cells showed lipid peroxidation, H_2O_2 generation, antioxidant enzymes activation (SOD, GST, GR, CAT and APX), alterations in the total soluble carbohydrate levels and protein profile alterations by 2D electrophoresis. The same responses were observed in the pH sensible cells, at log phase of growth. This differences should be more explored.

We concluded that the lipid peroxidation is an indicator of sensitivity to Al and low pH, like the antioxidant enzymes activities and the H_2O_2 generation. Studies should be done with the Al accumulated in time, measuring the activities of antioxidant system and the lipid peroxidation with the objective to indicated what process could start firstly.

Key-words: plant cell culture; antioxidant enzymes; plasma membrane; membrane proteins; aluminum toxicity.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Capaldi, Flávia Regina
Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez / Flávia Regina Capaldi; orientador Victor Alexandre Vitorello. - - Piracicaba, 2006.
150. f. : fig.

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

1. Cultura de células vegetais 2. Enzimas 3. Membrana plasmática 4. Proteínas da membrana 5. Toxicidade do alumínio I. Título

CDU 576.3:546.62

Dedico este trabalho

Às pessoas que sempre estiveram e que estão ao meu lado, de forma incondicional, me apoiando, me estimulando, me socorrendo e, que são o melhor da minha essência.

Meus pais, Inês e Sergio (*in memorian*).

Meu namorado Rodrigo.

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que elas acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis
e pessoas incomparáveis
(*Fernando Pessoa*)

Ser profundamente amado por alguém nos dá força; amar alguém profundamente nos dá coragem.
(*Lao-Tsé*)

Agradecimentos

A Deus, sempre presente, conhecedor de todos os detalhes que procuramos entender, luz primordial em nossas vidas.

À minha família, de modo especial aos meus pais, Sergio (*in memorian*) e Inês, pelo estímulo, pela força, pelos ensinamentos e pela lição de vida; à Sandra, ao Marco e à pequena Laura, motivo de muita alegria.

Ao Rodrigo, pelo seu amor, pela sua presença constante, pelo estímulo, pela sua incondicional atenção a mim sempre dispensada.

Ao Prof. Dr Victor Alexandre Vitorello pela orientação, pelos ensinamentos, pela compreensão e pela amizade.

Ao amigo Vanderlei Antonio Stefanuto, pela amizade, pela convivência e por toda a ajuda prestada.

Ao Clovis Arruda de Souza, companheiro de doutorado e professor da UDESC/SC, por todos os ensinamentos, discussões, pela convivência e amizade.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e pela estrutura oferecida.

À Coordenadoria de Apoio à Pesquisa (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr Ricardo Antunes de Azevedo (Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP) por todo o auxílio e estrutura oferecidos durante a execução deste trabalho e pela amizade.

À bióloga Priscila L. Gratão (Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP) pelo auxílio prestado durante os ensaios enzimáticos e pela amizade.

À Drª Salete Ap. Gaziola (Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP) pela disponibilidade durante todo o trabalho e pela amizade.

Ao Alejandro A. Toro (Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP), pelo auxílio no uso do software Melanie.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Neusa Nogueira e à bióloga Mônica Lanzoni Rossi (Lab. Histopatologia Vegetal, CENA/USP), por todo o auxílio prestado em microscopia eletrônica e de varredura.

Ao Prof. Dr Arnoldo Rocha Façanha (Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF/RJ), pelo auxílio e sugestões nas análises de ATPases.

À Dr^{a}. Cláudia de Matos Belatto pelo auxílio e discussões sobre os géis de eletroforese 2D.

À Prof^{a} Dr^{a}. Siu Mui Tsai pela concessão de uso dos equipamentos para a focalização isoelétrica e aparato de corrida dos géis.

Aos técnicos e auxiliares do Lab. Biologia Celular e Molecular Francisco Carlos Montrazi, Fábio Rodrigo S. Duarte e Wagner Piccinini por todo o auxílio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge A. Marques Rezende (Virologia Vegetal, ESALQ/USP), pela disponibilidade de uso da ultracentrfuga.

Ao Prof. Flávio Tavares (Genética de Leveduras, ESALQ/USP) pelo uso da ultracentrífuga.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Beatriz Mendes e à Prof^{a}. Dr^{a}. Adriana P. M. Rodriguez (Biotecnologia Vegetal, CENA/USP) pelo uso do microscópio de epifluorescência.

Ao Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis (Química Analítica, CENA/USP), pela concessão de uso do fluorímetro.

Ao Prof. Dr Cássio Hamilton Abreu Jr. e à bióloga Henriqueta M. G. Fernandes (Nutrição Mineral de Plantas, CENA/USP), pelo auxílio no uso do ICP-MS.

À Prof^{a}. Drª Maria Júlia Marques (Instituto de Biologia, UNICAMP), pelo uso do microscópio confocal.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Ana Novembre (Lab. Sementes, ESALQ/USP) pelo uso do psicrômetro.

Aos estagiários: Ricardo Borges, Ana Carolina Giglio e Natália Diehl, pela ajuda prestada.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Expressar em palavras toda a gratidão pela ajuda que recebi durante o desenvolvimento deste trabalho é impossível, porém, ficam a lembrança a todos e de todos que contribuíram e as amizades feitas durante este período.

Para todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

Se eu pudesse deixar algum presente a você,
deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo afora.
Lembraria os erros que foram cometidos, como sinais
para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável:
alem do pão, o trabalho e a ação.
E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria, se pudesse, um segredo.
O de buscar no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída.

(*Mahatma Gandhi*)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES i

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS X

RESUMO xi

ABSTRACT xiv

1 INTRODUÇÃO 01

1.1 Objetivos 05

2 REVISÃO DE LITERATURA 06

2.1 Os solos ácidos e a toxicidade por Al 06

2.2 Toxicidade e sensibilidade celular ao Al 06

2.3 Estresse oxidativo 10

2.3.1 Enzimas do sistema antioxidante celular..... 13

2.4 Interações entre o Al e a membrana plasmática (MP) 16

2.5 *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 19

3 METODOLOGIA 22

3.1 Cultivo de suspensões celulares de tabaco cv. BY-2 22

3.2 Monitoramento do crescimento da cultura 22

3.3 Viabilidade celular (VC%) 23

3.4 Determinação das condições de exposição celular aos tratamentos 23

3.5 Exposição celular aos tratamentos 24

3.6 Cultivo das células e viabilidade celular após a exposição aos tratamentos 25

3.7 Experimentos com diferentes concentrações de sacarose e manitol 25

3.8 Conteúdo de carboidratos solúveis totais 26

3.9 Quantificação do Al acumulado nas células 27

3.9.1 Acúmulo de Al por fluorimetria 27

3.9.2 Quantificação de Al por espectrometria de massa acoplada com fonte de plasma (ICP-MS) 27

3.10 Técnicas de microscopia utilizadas para visualização do Al nas células 29

3.10.1 Microscopia confocal de varredura a laser 29

3.11 Uso do BHA (Butylated Hydroxyanisole) 30

3.12 Avaliações do processo de estresse oxidativo 31

3.12.1 Peroxidação lipídica 31

3.12.2 Quantificação de H_2O_2 32

3.12.3 Atividades de enzimas antioxidantes 32

3.12.3.1 Superóxido dismutase - SOD (EC 1.15.1.1) 33

3.12.3.2 Catalase - CAT (EC 1.11.1.6) 34

3.12.3.3 Glutationa redutase - GR (EC 1.6.4.2) 34

3.12.3.4 Glutationa-S-Transferase - GST (EC 2.5.1.18) 35

3.12.3.5 Ascorbato peroxidase - APx (EC 1.11.1.11) 35

3.13 Análises sobre a membrana plasmática 35

3.13.1 Isolamento de frações enriquecidas da membrana plasmática 35

3.13.2 Perfil protéico por eletroforese bi-dimensional (2D) 37

3.13.2.1 Focalização Isoelétrica 37

3.13.2.2 Reidratação e preparo das tiras para a 2ª. dimensão (“equilíbrio das tiras”)..... 39

3.13.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 40

3.13.2.4 Análise das imagens 42

3.14 Análise dos dados 42

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 43

4.1 Comportamento geral da cultura de células de tabaco cv. BY-2 43

4.2 Determinação das condições e do tempo de exposição ao Al 46

4.2.1 Tratamentos utilizando-se sacarose e manitol 49

4.3 Diferenças na sensibilidade das células de tabaco cv. BY-2 aos tratamentos 55

4.3.1 Diferenças na sensibilidade celular ao Al 55

4.3.2 Diferenças sensibilidade celular ao baixo pH 59

4.3.3. Conteúdo de carboidratos solúveis totais 61

4.4 Correlação entre fluorimetria (Al-morin) e espectrometria de massa com fonte de plasma acoplada (ICP-MS) 63

4.5 Estresse oxidativo decorrente da exposição ao Al e à acidez 67

4.5.1 Peroxidação lipídica 67

4.5.2 Níveis de H_2O_2 69

4.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes 73

4.5.3.1 Superóxido Dismutase (SOD) 73

4.5.3.2 Catalase (CAT) 74

4.5.3.3 Ascorbato peroxidase (APX) 75

4.5.3.4 Glutationa-S-transferase (GST) 77

4.5.3.5 Glutationa Redutase (GR) 79

4.6 Uso do antioxidante BHA (Butylated Hydroxyanisole) 81

5.6.1 Crescimento e viabilidade celular após a exposição aos tratamentos e com o uso do BHA 85

4.7 Análises sobre a membrana plasmática 88

4.7.1 Perfil Protéico de frações enriquecidas com Membrana Plasmática ... 88

4.8 Sensibilidade diferencial ao Al e estresse oxidativo 94

4.9 Interação entre Al, osmólitos e membrana plasmática 96

5 CONCLUSÕES 101

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 105

APÊNDICE 1 129

LISTA DE ABREVIAÇÕES

$^1O_2$	Oxigênio singlet
2-D, 2D	Two Dimensional Electrophoresis; eletroforese bidimensional
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacetic acid; ácido 2,4-diclorofenoxiacético
APX	Ascorbato Peroxidase
ASB-14	Aminosulfobetaine 14; amino sulfo betaína 14
BHA	Butylated Hydroxyanisole; Butil Hidroxi anizol
BY-2	Bright Yellow 2
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DAPI	4',6'-diamino-phenylindole; 4',6'-diaminofenil-indole
DTNB	5,5"-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); 5,5"–ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)
DTT	Dithiothreitol; ditiotreitol
EAO's	Espécies ativas de oxigênio
EC	Enzyme Commission
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrometry; Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa-S-Transferase
$HO_2^{\bullet}$	Radical hidroperoxila
IAA	Iodoacetamide; iodoacetamida
ICC%	Índice de células compactadas (%)
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry; Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; Espectrometria de massa com fonte de plasma acoplada
IEF	Isoeletric focalization; focalização isoelétrica
IPG	Immobilized pH Gradient; gradiente de pH imobilizado
man	Manitol

MDA	Malonaldeyde; malonaldeído
MES	(2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid); ácido morfolino etano sulfônico
MF	Massa vegetal fresca
$O_2^{-\bullet}$	Radical superóxido
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxila
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis; eletroforese em gel de poliacrilamida
PFA	Perfluoroalkoxy Teflon®
PI	Ponto isoelétrico
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride; fenilmetilsulfonilfluoreto
ROS	Reactive Oxygen Species; espécies reativas de oxigênio
RT	Immobiline Drystrip Reswelling Tray
sac	Sacarose
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate; dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	2-Thiobarbituric acid; ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Trichloroacetic acid; ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra methylenodiamine; N,N,N',N'–tetrametilenodiamina
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethane; Tris(hidroximetil)-aminometano
VC%	Viabilidade celular (%)
XO	Xylenol orange; alaranjado de xilenol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação geral envolvendo a glutationa redutase, recuperando a condição reduzida da glutationa que foi exposta ao agente oxidante. Fonte: Pereira (2004)..... 15

Figura 2: Exemplo de frascos de cultura de células de tabaco cv. BY-2 nas fases (A) log, com 2 dias de idade e (B) estacionária de crescimento, com 7 dias de idade..... 21

Figura 3: Esquema geral dos processos envolvidos no funcionamento do ICP-MS. Fonte: Ruíz, 2003..... 28

Figura 4: (A) Gradiente de sacarose formado. A amostra fica por sobre a camada de solução de sacarose 25%. As soluções separam-se por densidade; (B) após a ultracentrifugação, pode-se coletar a porção enriquecida de membrana plasmática da interface inferior do tubo..... 37

Figura 5: Etapas para a colocação da amostra e da fita no sarcófago. (A) coloca-se a amostra no centro do sarcófago com o auxílio de uma micropipeta; (B) após a retirada da fita protetora do gel, coloca-se a fita sobre a amostra, deslizando-a suavemente para evitar a formação de bolhas, com o gel voltado para cima e observando a polaridade do gel e do sarcófago, geralmente com o auxílio de uma pinça; (C) após o término da colocação da fita e do óleo mineral, tampa-se o sarcófago. Fonte: Amersham Biosciences, 2006..... 38

Figura 6: Sarcófagos fechados e colocados no Ettan™ IPGphor™ II IEF System para o processo de focalização isoelétrica, observando-se a posição do sarcófago correspondendo à posição dos eletrodos positivo e negativo, para a passagem da corrente elétrica. A programação do equipamento é realizada no painel de controle, através do binômio tempo e voltagem. Fonte: Amersham Biosciences, 2006..... 39

Figura 7: Immobiline Drystrip Reswelling Tray (RT). Após a focalização isoelétrica, as fitas são transferidas para as canaletas do RT para o processo denominado “equilíbrio”, que é o preparo da mesma para a segunda dimensão da eletroforese. Fonte: Amersham Biosciences, 2006..... 40

Figura 8: Colocação da fita no gel (SDS-PAGE). Sobre o gel é colocada uma solução de agarose 0,5% quente para que a fita deslize com mais facilidade e fique em contato com a superfície do gel. Também é colocado um espaçador para a colocação do padrão de massas moleculares conhecidas..... 41

Figura 9: Desenvolvimento da cultura de células de tabaco BY-2 durante 1 ciclo de cultivo sob condições normais. (A) Crescimento da cultura medido pelo índice de células compactadas (ICC%) após centrifugação a 200*g* por 2 min e viabilidade celular (VC%), obtida por coloração com Trypan Blue. (B) Ilustração do crescimento da cultura por decantação do volume de células..... 45

Figura 10: Acúmulo relativo de Al (%) durante 180 min de exposição a 50 µM de Al. No ensaio padrão (♦), as células foram expostas ao Al em solução padrão a pH4,2; no tratamento 80/0mM sac (■), as células foram lavadas em solução padrão pH4,2 acrescida de 80 mM sacarose e expostas ao Al em condições padrão e no tratamento 80/40 mM sac (□), as lavagens foram feitas em solução padrão pH4,2 acrescida de 80 mM sacarose e a exposição ao Al foi feita em solução padrão acrescida de 40 mM sacarose. O acúmulo de Al em células na fase estacionária sob a condição 0/0 foi insignificante (0,9%)..... 48

Figura 11: Microfotografias obtidas por microscopia confocal ilustrando o acúmulo de Al ao longo do tempo em células de tabaco BY-2 da fase log de crescimento. As células foram expostas a 50µM Al por 30, 60 e 120 min e depois coradas com morin. As imagens foram obtidas por fluorescência, deixando-se passar a luz transmitida de baixa intensidade para a visualização da célula. As setas exemplificam a fluorescência do complexo Al-morin..... 49

Figura 12: (A) Acúmulo relativo de alumínio (%) medido por fluorimetria pelo complexo Al-morin em células BY-2 na fase log tratadas com diferentes concentrações de sacarose (●) e manitol (○) e (B) Viabilidade celular (VC%) para células da mesma amostra coradas com Trypan blue 0,4%. Contagem por microscopia óptica..... 53

Figura 13: (A) Crescimento celular (%) e (B) viabilidade celular (%), durante um subcultivo, em meios de cultura contendo sacarose (●) ou manitol (○) como fonte de carbono. O inóculo inicial foi de 4% para os dois tratamentos e a concentração de sacarose ou manitol foi de 87,4mM no meio de cultura..... 54

Figura 14: Acúmulo relativo de Al (□) e viabilidade celular (VC%, ■) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log e estacionária de crescimento. Tratamentos: ensaio padrão (as células foram expostas a 50 µM Al em solução padrão pH4,2); 80/40mM sac (a solução padrão foi acrescida de 80mM de sacarose nas lavagens e 40mM de sacarose na exposição, juntamente com o Al) e 80/0mM sac (a solução padrão recebeu 80mM de sacarose nas lavagens e as células foram expostas a 50µM Al)..... 57

Figura 15: Correlação entre o acúmulo relativo de Al e a viabilidade celular em células de tabaco cv. BY-2. Foram utilizados dados de todos os tratamentos aplicados de células tanto na fase log como na estacionária de crescimento..... 58

Figura 16: Viabilidade celular (VC%) em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log e estacionária de crescimento (observar as chaves). Tratamentos: controle pH 4,2 (células lavadas e expostas em solução padrão pH 4,2, tanto na fase log como estacionária); 80/40 mM sac (solução de lavagem foi acrescida de 80mM de sacarose e a solução de exposição recebeu 40mM de sacarose); 80/0 mM sac (solução de lavagem recebeu 80mM de sacarose porém as células foram expostas em solução padrão a pH 4,2)..... 61

Figura 17: Curva de calibração de glicose (µg/mL) para a quantificação dos carboidratos solúveis totais..... 62

Figura 18: Carboidratos solúveis totais (µg/mg MF) em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (lavagens e exposição a pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol. padrão pH4,2 e exposição na mesma solução + Al); 80/40 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al + 40 mM sacarose ou manitol); 80/0mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição em sol. padrão + Al..... 62

Figura 19: Concentração de Al (ppb) em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■) obtida em ICP-MS. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH 5,6); pH4,2 (idem, a pH 4,2); ensaio padrão (células lavadas em sol. padrão pH 4,2 e expostas a 50 µM Al); 80/40mM (lavagens em solução padrão + 80 mM sacarose ou manitol e expostas a 50 µM Al + 40mM sacarose ou manitol); 80/0mM (lavagens em solução padrão + 80mM sacarose ou manitol e expostas a 50 µM Al)..... 65

Figura 20: Correlação entre Al acumulado entre as metodologias de fluorimetria pelo complexo Al-morin e por ICP-MS em células de tabaco cv. BY-2, nas fases log e estacionária, com coeficiente de correlação entre as metodologias igual a: R^2=0,96..... 67

Figura 21: Peroxidação lipídica em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■), medida pelo teste TBA. Resultados expressos em mmol MDA/mg MF. Os resultados em células na fase estacionária foram próximos de zero, considerados desprezíveis. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 68

Figura 22: Curva de calibração com concentrações de H_2O_2, medida a 560nm. O coeficiente de correlação para a curva foi de R^2 = 0,9965..... 69

Figura 23 Concentração de H_2O_2 em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 70

Figura 24: Correlação entre a peroxidação lipídica e o conteúdo de H_2O_2 em células de tabaco cv. BY-2. Foram utilizados dados de todos os tratamentos aplicados em células tanto na fase log como na estacionária para traçar o gráfico..... 71

Figura 25: Correlação entre a peroxidação lipídica e o acúmulo de Al medido por ICP-MS (□), com R^2 = 0,6558 e correlação entre o conteúdo de H_2O_2 e o acúmulo de Al medido por ICP-MS (■), com R^2 = 0,1047 em células de tabaco cv. BY-2. Foram considerados os dados de todos os tratamentos aplicados às células tanto na fase log, como na fase estacionária de crescimento..... 72

Figura 26: Correlação entre a peroxidação lipídica e a viabilidade celular (■), com R^2 = 0,6152 e correlação entre o conteúdo de H_2O_2 e a viabilidade celular (□), com R^2 = 0,604 em células de tabaco cv. BY-2. Foram considerados os dados de todos os tratamentos aplicados às células tanto na fase log, como na fase estacionária de crescimento..... 72

Figura 27: Bandas de SOD em PAGE 9%. P (padrão SOD-bovina) e tratamentos: pH5,6; pH4,2; 50µM $AlCl_3$; 80/40sac (lavagens com a solução padrão acrescida de 80mM sacarose e exposição ao Al em solução padrão acrescida de 40mM sacarose, pH4,2) e 80/0sac (idem ao tratamento anterior, porém a exposição ao Al foi feita em solução padrão pH4,2). Corridas simultâneas, a 4˚C, 15mA/gel, utilizando-se 60µg de proteínas/amostra..... 74

Figura 28: Identificação das diferentes isoenzimas de SOD. Estão presentes a Mn-SOD, resistente aos dois inibidores usados e a Fe-SOD, resistente ao KCN e inibida pelo H_2O_2. A primeira parte (controle) foi revelada através do procedimento padrão para SOD. A corrida do gel foi realizada a 4˚C, 15mA/gel por um tempo médio de 3h, em cuba Pharmacia para mini-gel..... 74

Figura 29: Atividade da catalase em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 75

Figura 30: Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em células de tabaco BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 76

Figura 31: Atividade da glutationa-S-transferase em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 79

Figura 32: Atividade da Glutationa redutase (GR) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 81

Figura 33: Peroxidação lipídica medida pelo teste TBA em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento, sob condições de acúmulo de Al padrão, com o uso de 20 µM BHA e com 100 µM BHA tanto nas lavagens precedentes à exprosição, como durante as 2h de exposição ao Al. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)... 83

Figura 34: Viabilidade celular (VC%) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento. O tratamento sem BHA é o experimento padrão de exposição ao Al; o tratamento 20µM BHA recebeu esta concentração do antioxidante nas soluções de lavagens e durante a exposição; idem para o tratamento 100 µM BHA. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2)..... 85

Figura 35: (A) Viabilidade celular (VC%) e (B) crescimento celular (ICC%) da cultura de células BY-2 submetida aos diferentes tratamentos na presença de 20µM BHA. O ICC foi medido a cada ao final das 2h de exposição e a cada 24h até 96h após a realização do experimento. A medição deu-se por centrifugação da suspensão celular a 200*g* por 2min..... 86

Figura 36: (A) Viabilidade celular (VC%) e (B) crescimento celular (ICC%) da cultura de células de tabaco cv. BY-2 na fase log submetidas aos diferentes tratamentos na presença de 100µM BHA após a exposição. O índice de compactação celular foi medido a cada ao final das 2h de exposição aos tratamentos e a cada 24h até 96h após a realização do experimento. A medição deu-se por centrifugação da suspensão celular a 200*g* por 2min..... 87

Figura 37: Perfil protéico das células tratadas sob condições de pH 5,6. Os géis correspondem a (A) fase log e (B) fase estacionária de crescimento. As proteínas foram separadas na 1ª. Dimensão com o uso de fitas de pH imobilizado na faixa de 3 a 10 e na 2ª. Dimensão por SDS-PAGE gradiente 8-16%. Foram usadas 75µg proteína em cada gel..... 90

Figura 38: Perfil protéico das células tratadas com Al. Géis: (A) fase log e (B) fase estacionária. As proteínas foram separadas por IEF pH 3 a 10 e SDS-PAGE 8-16%. Foram usadas 75 µg proteína em cada gel..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos utilizados durantes os experimentos 24

RESUMO

CAPALDI, F.R. **Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez**. 2006. 150f. Tese (Doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

O alumínio é limitante à atividade agrícola em todo o mundo. Nos solos ácidos a disponibilidade de Al aumenta. Estes solos constituem a maioria dos solos do mundo e dois terços dos solos brasileiros. O problema da acidez do solo e da toxicidade por Al é altamente significativo para as perdas na produtividade agrícola e florestal. Para se ter Al disponível, primeiramente tem que se ter condições de pH baixo. O primeiro sintoma causado pela toxicidade por Al é a inibição no alongamento do sistema radicular. Existem trabalhos vinculando a inibição a alterações nos processos de divisão e expansão celular. Embora os mecanismos de toxicidade e resistência ao Al não estejam totalmente elucidados, admite-se que em algumas plantas, a quelação do Al por ácidos orgânicos é um dos mecanismos que confere resistência das células ao Al, assim como em outras plantas a elevação do pH da rizosfera, por compostos liberados pelo sistema radicular, atua na queda da disponibilidade do Al na solução do solo. Porém, existem outras alternativas que vêm sendo propostas na literatura como possíveis mecanismos de resistência das plantas ao Al, principalmente ao nível celular e molecular. Alterações nas composições lipídica e protéica da membrana plasmática, assim como na sua estrutura física; ativação do sistema antioxidante celular; alterações na sinalização celular e de atividade dos canais de troca da membrana plasmática vêm sendo estudados como possíveis contribuintes para os mecanismos de resistência ao Al. A

sensibilidade celular ao Al depende do seu estágio de desenvolvimento. As células sensíveis ao Al acumulam o metal, enquanto que as resistentes acumulam muito pouco. Foi constatado em nosso trabalho que as células sensíveis ao Al também são sensíveis ao baixo pH. As células sensíveis não conseguem recuperar seu crescimento e sua viabilidade celular após a exposição ao Al ou ao baixo pH.

A sacarose ou manitol conferiram proteção às células quanto ao acúmulo de Al. Isso fez com que a viabilidade mantivesse-se em níveis próximos ao controle (pH5,6) e a cultura conseguisse recuperar seu crescimento e viabilidade após a exposição ao Al e ao baixo pH. O efeito protetor não foi devido ao caráter energético da sacarose, pois o manitol não é metabolizado pelas células BY-2 e os resultados foram semelhantes quando se usou sacarose ou manitol, nas mesmas concentrações.

Sabe-se que o Al aumenta a peroxidação lipídica e a oxidação protéica da membrana plasmática, pela geração de EAO's, desencadeando o processo de estresse oxidativo na célula. Em nosso estudo, nas células sensíveis houve peroxidação dos lipídios, ativação do sistema de enzimas antioxidantes, como SOD, GST, GR, CAT e APX, alteração nos níveis de carboidratos e alteração no perfil protéico de frações enriquecidas de membrana plasmática, obtido por eletroforese 2D. O mesmo comportamento foi verificado em células sensíveis tratadas a baixo pH.

Pode-se concluir que o sistema antioxidante celular foi ativado na presença de baixo pH ou Al, pela ocorrência de peroxidação lipídica, que gera maiores concentrações de H_2O_2 nas células sensíveis (fase log). E que existem diferenças no perfil protéico de células tratadas com Al em relação a células mantidas sob

condições de cultivo, tanto em presença de spots como em expressão diferencial. Porém estas diferenças necessitam ser melhores exploradas.

A peroxidação lipídica é um bom indicador da sensibilidade celular ao Al e ao baixo pH, assim como a ativação do sistema antioxidante e a geração do peróxido de hidrogênio. Poderiam ser realizados experimentos no tempo, medindo-se o acúmulo de Al e relacionando-o aos níveis de peroxidação lipídica, atividade das enzimas antioxidantes e geração do peróxido, para que pudéssemos indicar talvez um processo que se iniciasse antes que outro, ou mesmo que decaísse antes do outro. Assim como um monitoramento das condições de oxidação protéica na presença de Al.

Palavras-chave: cultura de células vegetais; enzimas antioxidantes; membrana plasmática; proteínas da membrana; toxicidade por alumínio.

ABSTRACT

CAPALDI, F.R. **Oxidative stress and differences in sensibility of tobacco cells (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 to aluminum and acidity.** 2006. 150f**.** Thesis (Doctorate). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

Aluminum limits crop production in all over the world. In acid solis the Al disponibility is larger. Acid soils compose the major part of the brazillian soils. The problem of acidity and Al toxicity results in losses of productivity in agriculture and forestry. The first symptom of Al toxicity is inhibition of root growth. There is many studies that indicate relations between the inhibition of root growth and cell division and expansion alterations. The mechanisms of Al toxicity and resistance aren't completely understood in plants. The resistance mechanism of Al chelation by organic acid is one of the mechanisms accept, like the elevation of the rizosphere pH by substances exsudated by the root system. Other possible mechanisms that are being mentionated are the alterations in plasma membrane composition and structure, antioxidant cell system activation, alterations in cell signal and alterations in the membrane channels activity. Aluminum cell sensibility depends of the status cellular. The cells that are sensible to Al, are in the log phase of growth and accumulate the metal, whereas the resistant cells do not accumulate and were in the stationary phase of growth. In our work, we observed that the sensible cells are sensible to low pH too. The sensible cells don't recover their growth rate and cellular viability after the treatment exposition.

Sucrose or mannitol confers cellular protection against the Al. The cellular viability was high (next to the control, pH5,6) and the cell culture recovery their growth and viability after the Al or low pH exposition.

The protective effect don't occurs in response to the energetic role of sucrose, because cells treated with mannitol showed the same results and the mannitol did not metabolizated by tobacco BY-2 cells.

Al induces lipid peroxidation and protein oxidation in plasma membrane, by the ROS generation promoting the oxidative stress. We found that sensible Al cells showed lipid peroxidation, H_2O_2 generation, antioxidant enzymes activation (SOD, GST, GR, CAT and APX), alterations in the total soluble carbohydrate levels and protein profile alterations by 2D electrophoresis. The same responses were observed in the pH sensible cells, at log phase of growth. This differences should be more explored.

We concluded that the lipid peroxidation is an indicator of sensitivity to Al and low pH, like the antioxidant enzymes activities and the H_2O_2 generation. Studies should be done with the Al accumulated in time, measuring the activities of antioxidant system and the lipid peroxidation with the objective to indicated what process could start firstly.

Key-words: plant cell culture; antioxidant enzymes; plasma membrane; membrane proteins; aluminum toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O alumínio é limitante ao crescimento e desenvolvimento das culturas agrícolas em grandes áreas do mundo. Um dos primeiros sintomas da toxicidade por Al é a inibição do crescimento radicular. O estudo do seu impacto sobre as culturas agrícolas tem elevada importância nas mais diversas áreas de estudo que compreendem a Agronomia, Medicina e a Biologia (UEXKULL; MUTERT, 1995; KERR et al., 1992; MCLACHLAN et al., 1992). A disponibilidade do Al é aumentada em solos ácidos (pH<5,5), os quais recobrem cerca de 40% da área agricultável do mundo e constituem cerca de dois terços dos solos no Brasil (VITORELLO et al., 2005).

A existência de variabilidade genética quanto à resistência ao Al é conhecida e a importância dos programas de melhoramento genético no Brasil estão bem exemplificadas em relação ao trigo e ao milho (CAMARGO et al., 1998; PANDEY et al., 1994; PARENTONI et al., 2001). Vários estudos apontam diferentes hipóteses para os mecanismos de toxicidade e resistência ao Al em plantas, como: alterações na membrana plasmática, indução de estresse oxidativo via peroxidação de lipídios, interferência na sinalização celular e exclusão de Al por exsudação de ácidos orgânicos e/ou elevação do pH da rizosfera, entre outras (PELLET et al., 1995; JONES; KOCHIAN, 1997; DEGENHARDT et al., 1998; PINEROS et al., 2002; AHN et al., 2001). Há evidências indiretas que favorecem cada uma destas hipóteses, entretanto, diretamente, não há dados suficientes para que uma hipótese possa ser favorecida sobre outra (RICHARDS et al., 1998).

Em suma, os mecanismos de toxicidade e resistência ao Al não estão totalmente esclarecidos.

Além das diferenças genotípicas, é necessário considerar que a sensibilidade celular ao Al depende do seu estado fisiológico de desenvolvimento. Células da zona de transição distal são as mais sensíveis ao Al, encontrando-se no final do ciclo de divisão celular e preparando-se para a fase de elongação celular (SIVAGURU et al., 1999; BLANCAFLOR et al., 1998; VITORELLO et al., 2005). As diferenças na sensibilidade celular ao Al também podem ser observadas em células de crescimento polar (JONES et al., 1995; CARE, 1995; DONCHEVA et al., 2005).

Células da região apical de raízes de milho e aveia expostas ao Al apresentaram alterações em sua estrutura em relação ao controle, sobretudo na epiderme e córtex, resultando em diminuição da divisão celular e redução do crescimento radicular, ocasionando morte celular (CIAMPOROVÁ, 2000; PAN et al., 2001).

Células de tabaco cultivadas em suspensão, também apresentam diferenças na sensibilidade ao Al, dependendo da fase de crescimento em que se encontram. Células na fase log de crescimento são sensíveis, enquanto que células na fase estacionária são resistentes (YAMAMOTO et al., 1994; VITORELLO; HAUG, 1996 e 1999). Pode-se conferir resistência às células sensíveis pela retirada de fósforo ou de todos os nutrientes do meio de cultura (YAMAMOTO et al., 1996; EZAKI et al., 1995; VITORELLO; HAUG, 1999). Vitorello e Haug (1999) constataram que o acúmulo de Al atingia níveis insignificantes e que, a transição de um estado sensível a um resistente era inibida por Brefeldin A (inibidor do tráfico de vesículas). Este resultado pode estar relacionado a alguma alteração na estrutura que envolve a parede celular, a membrana plasmática e o citoesqueleto (VITORELLO et al., 2005).

Geralmente, o acúmulo de Al é maior em células sensíveis ao Al do que em células resistentes. Os motivos pelos quais há diferenças no acúmulo de Al entre

células sensíveis e resistentes ainda não estão claros. Nos últimos anos, diversos trabalhos têm relatado que a exclusão de Al, através da exsudação de ácidos orgânicos ou a elevação de pH da rizosfera podem ser os principais mecanismos de resistência ao Al (DE LA FUENTE et al., 1997; MA et al., 2001; HAMILTON et al., 2001; DELHAIZE et al., 2001; KOCHIAN et al., 2004; PINEROS et al., 2005; YANG et al., 2005). No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que nem sempre é o caso e que outros mecanismos, embora desconhecidos, devem existir, como é o caso da *Brachiaria decumbens* (WENZL, 2001).

As diferenças no acúmulo de Al podem estar relacionadas com alterações na membrana plasmática, podendo envolver as suas composições lipídica e protéica, assim como na sua estrutura física.

Vários estudos têm relacionando o Al à ocorrência de estresse oxidativo, principalmente a peroxidação dos lipídios e proteínas da membrana plasmática (CAKMAK; HORST, 1991; YAMAMOTO et al., 2001). É possível que o acúmulo de Al seja uma consequência de danos causados pela peroxidação da membrana e, portanto, diferenças no acúmulo de Al sejam apenas consequência da suscetibilidade das células à peroxidação.

A possibilidade de existência de outros mecanismos de resistência celular ao Al está clara, como o aumento da expressão de enzimas antioxidantes (GST e peroxidases) em células sensíveis e a diminuição do conteúdo de MDA em células tolerantes (EZAKI et al., 1995; 2000; 2001; RICHARDS et al., 1998; YAMAMOTO et al., 2001; TAKAHASHI; NAGATA, 1992; GYSEL et al., 1993; KOCHIAN et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2003).

Ezaki et al. (2005) identificaram as funções de dois genes envolvidos com mecanismos de tolerância ao Al em plantas, estando um deles associado à membrana plasmática e outro relacionado à ativação do efluxo de Al.

Nosso trabalho se insere em uma linha de pesquisa que procura explorar as diferenças de sensibilidade ao Al que ocorrem entre células, em função de seu crescimento ou desenvolvimento, para tentar melhor elucidar os mecanismos de toxicidade e tolerância ao Al. Assim, procurou-se estudar as diferenças na sensibilidade de células de tabaco cv. BY-2 nas fases log e estacionária de crescimento.

O material vegetal utilizado neste trabalho, a cultura de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 foi escolhido porque este sistema apresenta vantagens sobre o uso de sistemas radiculares. As raízes apresentam zonas de crescimento diferenciado que possuem acúmulo e sensibilidade também diferenciada ao Al. Porém, o limite entre as células que são sensíveis e as tolerantes é mal definido e a separação destas células é quase impossível, com problemas tanto relacionados à pureza quanto à quantidade de material para estudo. Além disto, o uso de culturas de células permite maior homogeneidade no tratamento das células. A linhagem BY-2 de tabaco apresenta alta homogeneidade da cultura e crescimento rápido, além de se prestar bem a experimentos de sincronização celular.

Neste estudo, primeiramente analisamos o comportamento das células na presença de Al, através do acúmulo relativo de Al e da viabilidade celular. Procuramos também associar as alterações na sensibilidade ao Al à ocorrência de peroxidação lipídica, como indicador de estresse oxidativo.

Após a constatação que as células sensíveis ao Al exibiam peroxidação lipídica, enfocamos o estudo sobre o sistema de enzimas antioxidantes da célula e das proteínas de frações enriquecidas de membrana plasmática.

Considerando que a membrana plasmática é a barreira primária às trocas entre as células e também a barreira inicial que o Al encontra para acumular nas células, as alterações provocadas na MP pela toxicidade por Al podem ser um resultado da ação conjunta do sistema antioxidante com a expressão diferencial de proteínas ou mesmo uma seqüência de reações e processos, iniciados pela geração das EAO's, que resultaram em alterações lipídicas e protéicas da MP.

1.1 Objetivos

Estudar a razão da ocorrência das diferenças no grau de sensibilidade celular ao Al, entre células de tabaco cv. BY-2 em diferentes estágios de desenvolvimento:

- Verificar se há diferenças na peroxidação lipídica da membrana plasmática entre células que acumulam Al (sensíveis, fase log) e células que não acumulam Al (resistentes, fase estacionária)
- Examinar se as diferenças na peroxidação lipídica da membrana entre células sensíveis e resistentes relacionam-se a diferenças na atividade do sistema antioxidante celular ou à geração de EAO's, ou ainda à composição protéica da membrana, considerando-a como barreira inicial à entrada de Al na célula,
- Examinar diferenças no perfil protéico da membrana plasmática entre células sensíveis e resistentes, objetivando encontrar proteínas candidatas que possam estar relacionadas a estas diferenças de sensibilidade.
- Relacionar o papel dos osmólitos no acúmulo diferencial de Al entre células sensíveis e tolerantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Além da revisão de literatura aqui apresentada, encontra-se no Apêndice 1 a revisão de VITORELLO et al. (2005), de nossa co-autoria.

2.1 Os solos ácidos e a toxicidade por Al

A produtividade das culturas agrícolas e florestais é altamente influenciada por todos os tipos de estresses ambientais, tais como, geadas, seca, encharcamentos/inundações, acidez do solo e toxicidade por metais (AHN et al., 2004).

A acidez é uma condição que abrange solos de todo o mundo, estimando-se que há cerca de 3,95 bilhões de hectares recobertos por estes solos (FOY, 1984; UEXKULL; MUTERT, 1995). Nas regiões tropicais e subtropicais, os solos são naturalmente ácidos, devido à elevada precipitação e consequente lixiviação de bases trocáveis como o Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} e Na^{+} (CUSTÓDIO et al., 2002). A acidez interfere negativamente no estabelecimento das culturas agrícolas, reduzindo a produtividade e a biomassa vegetal (HAUG, 1984). Nestes solos, a disponibilidade de Al é aumentada pelos valores de pH abaixo de 5,0.

A maioria das espécies vegetais é sensível a valores de pH abaixo de 5,0. Sob estas condições, também são sensíveis a concentrações de Al da ordem de micromolares, de modo que perdas expressivas na produtividade agrícola são causadas pela toxicidade por Al (TAMÁS et al., 2003).

2.2 Toxicidade e sensibilidade celular ao Al

A inibição do alongamento radicular é o primeiro efeito da toxicidade do Al nas plantas. Esta inibição pode estar associada a disfunções nos processos de

divisão e alongamento celular (HORST, 1995; KOCHIAN, 1995; TAYLOR, 1995; MATSUMOTO, 2000). Entretanto, os mecanismos primários desta inibição não se encontram totalmente elucidados (KINRAIDE, 1993; EZAKI et al., 2005).

A região do ápice radicular é o primeiro local onde nota-se o efeito inibitório provocado pelo Al e esta região desempenha um importante papel na toxicidade e na resistência ao Al (SIVAGURU; HORST, 1998; AHN et al., 2001). Entretanto, os mecanismos de toxicidade e resistência ao Al em plantas são pouco conhecidos (MATSUMOTO, 2000; AHN et al., 2004; VITORELLO et al., 2005).

Alguns mecanismos de resistência ao Al têm sido sugeridos na literatura, sendo a quelação do Al por ácidos orgânicos o mais conhecido deles. Já foram relatados mecanismos de quelação por citrato (MIYASAKA et al., 2001), malato (RYAN et al., 1995; DELHAIZE et al., 2003) e oxalato (MA et al., 2001). Outro mecanismo é a excreção do Al pelos ápices radiculares (AHN et al., 2004).

Outros mecanismos de toxicidade por Al vêm sendo propostos na literatura, tais como o desbalanço da homeostase do cálcio livre citoplasmático (JONES et al., 1998; RENGEL; ZHANG, 2003), alterações no potencial da superfície celular (KINRAIDE et al., 1998), ruptura da integridade da membrana plasmática, inibição do fluxo de íons, inibição das vias de sinalização celular e alterações na estrutura do citoesqueleto celular (KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000; ROUT et al., 2001).

De la Fuente e Estrella (1999) e Matsumoto (2000) destacam o potencial da existência de diferentes mecanismos celulares operando na conferência de resistência ao Al em plantas e a importância de entender-se as razões da ocorrência de diferentes graus de sensibilidade entre as plantas de diferentes ou pertencentes a um mesmo genótipo.

O Al, assim como outros íons metálicos, apresentam associação seletiva com polinucleotídeos e RNA. Foi reportado que a interação com o DNA afeta propriedades físico-químicas e funções biológicas como divisão e elongação celular e síntese de RNA e DNA (KARLIK et al., 1989; EZAKI et al., 1996).

Yamamoto et al. (1994; 2001) estudaram células de tabaco cv. Samsun cultivadas na presença de Al, concluindo que a sensibilidade das células ao Al depende da fase de crescimento em que se encontram. Células na fase log de crescimento apresentam sensibilidade ao Al, enquanto que células na fase estacionária são resistentes à presença de Al no meio, havendo boa correlação entre o acúmulo de Al e a inibição do crescimento celular.

Resultados semelhantes foram encontrados por Vitorello e Haug (1996) estudando a relação entre acúmulo de Al e crescimento das células de tabaco cv. BY-2. O acúmulo de Al foi dependente da idade das células, sendo os maiores valores de acúmulo quantificados aos 2 dias de cultivo (fase log). O maior crescimento relativo das células foi observado no mesmo período e o pico do índice mitótico foi observado 2 a 3 dias de cultivo. Pôde-se, portanto, correlacionar o acúmulo de Al à taxa de crescimento relativo e indicar que a fase de crescimento em que as células se encontram pode determinar sua sensibilidade ao Al.

Existem evidências relacionando a sensibilidade ao Al com eventos do ciclo celular. Essas evidências foram comprovadas por Souza (2004), através de ensaios de sincronização do ciclo celular, apontando diferenças na capacidade de acúmulo de Al pelas células BY-2 em função da fase do ciclo celular em que se encontram.

Usando um inibidor do processo secretório que impede a completa formação da placa de divisão celular (cafeína), Souza (2004) verificou que também foi alterada a capacidade das células de tabaco BY-2 em acumular Al, concluindo que a

atividade de secreção junto à membrana plasmática influencia a capacidade celular de acumular Al.

Segundo Ezaki et al. (2000), mais de 20 genes induzidos pelo Al têm sido isolados em espécies como tabaco, trigo, milho, arabidopsis, entre outras. A grande maioria destes genes também está relacionada à ocorrência de diversos tipos de estresses em plantas, incluindo o estresse oxidativo. Os autores consideram que os mecanismos de toxicidade por Al e estresse oxidativo estão fortemente ligados em plantas.

Genes como SOD, CAT, GST e peroxidases indicam alta relação entre toxicidade por Al e estresse oxidativo em plantas. (SUGIMOTO; SAKAMOTO, 1997; RICHARDS et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2004; EZAKI et al., 2005)

Os íons Al têm uma forte afinidade por biomembranas, podendo alterar suas características e provocar a peroxidação dos lipídios da bicamada (YAMAMOTO et al., 2002).

A avaliação dos danos causados pelo Al é complexa. O modo mais aceito é quantificar a alteração no crescimento do material analisado causada pela exposição ao Al (MOON et al., 1997; McDONALD-STEPHENS; TAYLOR, 1995; ZHANG; TAYLOR, 1990). O detalhe mais importante deste método é o tempo de espera entre a exposição ao Al e a ocorrência das diferenças mensuráveis de volume, massa e/ou comprimento. Um dos métodos mais eficientes é o acúmulo de Al no tecido (WISSEMEIER et al., 1987; KANEKO et al., 1999; MASSOT et al., 1999; HORST et al., 1999).

2.3 Estresse oxidativo

Uma das mais importantes funções das células das plantas é a sua habilidade em responder às flutuações ambientais. Entender as conexões entre as respostas iniciais das plantas aos variados tipos de estresses que conferem a ela sucesso no ajuste às condições de crescimento alteradas é uma das grandes metas da biologia de plantas (GRENE, 2002).

Sabe-se que os radicais livres e outras EAO's (como o peróxido de hidrogênio) são produzidos de forma contínua em qualquer sistema vivo. Consequentemente, os organismos desenvolveram diversos sistemas antioxidantes de defesa, visando a proteção contra os possíveis danos causados pelas EAO's (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Quando há uma produção excessiva destes radicais, acima da capacidade antioxidante celular, fica caracterizado o processo de estresse oxidativo. Qualquer circunstância em que o equilíbrio redox celular é alterado pode gerar o estresse oxidativo ou a geração de EAO's (ASADA, 1994). A resposta das plantas ao estresse oxidativo não é bem conhecida como no caso das bactérias, leveduras e dos seres humanos (SOARES NETTO, 2001).

As EAO's podem ser geradas a partir de uma desestabilização nas camadas de elétrons do O_2, formando o $^1O_2$ (oxigênio singlet) ou de uma adição seqüencial de elétrons ao O_2, formando os radicais: $O_2^{-\bullet}$; H_2O_2; $HO_2^{\bullet}$ e $OH^{\bullet}$. Desempenham um papel importante na ativação das endonucleases e consequentemente nos danos ao DNA (HAGAR et al., 1996).

Os radicais hidroxilas são formados rapidamente nas células e podem causar danos à diversas classes de macromoléculas, especialmente aos ácidos nucléicos. Também podem alterar proteínas, tornando-as susceptíveis ao ataque proteolítico (DAVIES, 1987).

A peroxidação lipídica é uma das conseqüências mais relevantes da cadeia de reação dos radicais livres. Os radicais mais reativos (como os superóxidos) atacam as moléculas biológicas pela abstração do hidrogênio e este mecanismo desencadeia a peroxidação lipídica (HALLIWELL; CHIRICO, 1993)

A ocorrência da peroxidação lipídica em biomembranas causa danos na estrutura e funcionamento da mesma, alterando sua fluidez, inativando receptores e enzimas da membrana e aumentando a permeabilidade a íons como o Ca^{2+} (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

A iniciação da peroxidação ocorre pelo ataque aos ácidos graxos, ou a um lado específico da cadeia de qualquer substância química que tenha reatividade suficiente para abstrair um H^+ da cadeia do ácido graxo. Os ácidos graxos polinsaturados são particularmente sensíveis à peroxidação (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

Os radicais peróxidos podem combinar-se entre si ou podem atacar proteínas da membrana plasmática, sendo capazes também de abstrair H^+ de outras cadeias e de outros ácidos graxos, propagando a reação em cascata. A velocidade da propagação da reação é função de vários fatores, como a relação lipídio/proteína na membrana, a composição de ácidos graxos, a concentração de oxigênio e a presença de antioxidantes (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

O Al aumenta a peroxidação da membrana via produção de radicais livres mediada pelo ferro. O Al causa um aumento na atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em ápices radiculares de soja e de sorgo (GUTTERIDGE et al. 1985; DEVI et al. 2003). A peroxidação dos lipídios seria resultado dos efeitos do Al sobre a estrutura da membrana plasmática, aumentando a susceptibilidade desta

organela à peroxidação (CAKMAK; HORST, 1991; PEIXOTO et al., 1999; DONCHEVA et al., 2005).

Sabe-se também que a toxicidade por Al pode aumentar a peroxidação de lipídios da membrana por outros fatores como a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio ou pela diminuição da capacidade de desintoxicação destas espécies. Como conseqüência, pode haver uma mudança significativa na permeabilidade da membrana, no transporte de íons e na atividade de algumas enzimas (COOKE; BURDEN, 1990; RYYPPO et al., 1994).

A toxicidade por Al e a ocorrência do estresse oxidativo afetam a atividade de enzimas do sistema antioxidante da célula e os níveis de compostos antioxidantes (ascorbato e glutationa), presumivelmente, na tentativa de amenizar o efeito tóxico do Al sobre a célula. O ascorbato é um dos principais antioxidantes na proteção das células aos danos causados pelos produtos do estresse oxidativo (principalmente H_2O_2), cuja ação é catalisada pela ascorbato-peroxidase. Existem evidências de que o α-tocoferol pode ser convertido a tocoferol pela redução do ácido ascórbico na superfície das membranas biológicas (KATO; ESAKA, 1999; POTTERS et al., 2002).

A catalase também tem função essencial na quebra da molécula de H_2O_2 reduzindo seu efeito tóxico sobre a célula (HOREMANS et al., 2000; POTTERS et al., 2002).

Além da peroxidação lipídica, as EAO's causam oxidação de proteínas e a geração de aldeídos reativos. As proteínas podem ser afetadas diretamente pela oxidação da cadeia de aminoácidos, produzindo grupos carbonil na molécula da proteína. As proteínas modificadas podem expor regiões hidrofóbicas, produzindo agregados (REINHECKEL et al., 1998; PACIFICI; DAVIES, 1990; ROMERO-PUERTAS et al., 2002).

2.3.1 Enzimas do sistema antioxidante celular

Para aliviar os danos causados pelos radicais livres e EAO's, as plantas apresentam uma série de mecanismos de defesa, os quais incluem a síntese de compostos antioxidantes não-enzimáticos, como o α-tocoferol e carotenóides e enzimáticos, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutationa redutase (GR), a ascorbato peroxidase (APX) dentre outras. O sistema enzimático , sobretudo catalases e preoxidases, protege a célula contra o peróxido de hidrogênio, através das reações (PRASAD, 1995; NOCTOR; FOYER, 1998):

$$\text{Catalases: } 2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

$$\text{Peroxidases: } SH_2 + H_2O_2 \rightarrow S + 2H_2O$$

A SOD está presente em todos os organismos aeróbicos e caracteriza uma classe de metaloenzimas catalisadoras da formação de H_2O_2 a partir de radicais superóxidos. Portanto, a SOD consome o radicais superóxidos, mas gera o peróxido de hidrogênio (ALSCHER et al., 2002). Segundo Olmos et al. (2003), é a primeira enzima que age no sistema antioxidante celular. São as únicas enzimas cujas atividades determinam as concentrações de $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2, os dois substratos da reação Haber-Weiss[1], que origina os radicais $OH^{\bullet}$ e talvez por isso, as SOD's representem o mecanismo central de defesa do organismo (BOWLER et al., 1992; 1994; ALSCHER et al., 1998). Reação geral da SOD:

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

[1] O Ciclo Haber-Weiss consiste nas seguintes reações: $HO^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2^{\bullet -} + H^+$ e $O_2^{\bullet -} + H^+ + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO^{\bullet} + H_2O$ (KOPPENOL, 2001).

Por ser uma metaloenzima, apresenta isoformas que variam conforme o metal utilizado pela enzima. Assim, tem-se a Mn-SOD, Fe-SOD e Cu/Zn-SOD, localizadas em diferentes compartimentos celulares. As isoformas catalisam a mesma reação, a reação de dismutação do radical superóxido. A Mn-SOD normalmente localiza-se na mitocôndria, a Cu/Zn-SOD e a Fe-SOD estão associadas aos cloroplastos.

As catalases (CAT) têm a função de quebrar o peróxido de hidrogênio, resultando em água e oxigênio estável, pela β-oxidação dos ácidos graxos dos peroxissomos ou por outros processos (WILLEKENS et al., 1997; SOARES NETTO, 2001). Sua atividade depende do NADPH. É a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores da célula e que possui mecanismo muito eficiente para a remoção do peróxido de hidrogênio formado sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000).Existem três classes de isoenzimas de CAT já conhecidas: CAT1; CAT2 e CAT3 (SCANDALIOS, 1993).

A ascorbato peroxidade (APX) é outra enzima chave no controle da concentração de H_2O_2, tendo como catalisador da reação o ascorbato (SMIRNOFF, 2000). A seqüência desta enzima (hemeproteína) difere das outras peroxidases e isoformas da ascorbato peroxidase estão presentes nos cloroplastos, no citosol, na mitocôndria e nos peroxissomos (SOARES NETTO, 2001). A enzima age utilizando moléculas de H_2O_2 e transformando em dehidroascorbato e água.

A glutationa reduzida (GSH) é um dos principais antioxidantes não enzimáticos presentes na célula vegetal, combatendo principalmente H_2O_2 e $O_2^{\bullet -}$, por meio do ciclo Halliwell-Asada. Após a exposição GSH ao oxidante e a sua conseqüente oxidação (GSSG), a glutationa redutase (GR), localizada no citosol,

recupera a glutationa oxidada, processo essencial para que o sistema antioxidante celular mantenha-se íntegro (SOARES NETTO, 2001).

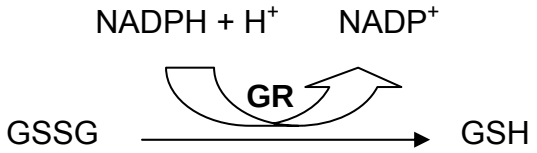


Figura 1: Reação geral envolvendo a glutationa redutase, recuperando a condição reduzida da glutationa que foi exposta ao agente oxidante. Fonte: Pereira (2004).

A glutationa-S-transferate tem, entre várias outras, a mesma função da glutationa peroxidase, ou seja, remover o peróxido de hidrogênio resultante do processo de estresse oxidativo nas células. Em células eucarióticas, localiza-se no citoplasma, no núcleo e na superfície celular.

A GST é uma família variada de genes em plantas, dividida com base na seqüência de identidade em diferentes classes: phi, tau, theta, zeta e lambda. São proteínas solúveis com massas moleculares aproximadas de 50KDa. As GSTs catalisam e transferem a glutationa reduzida (GSH) ao substrato oxidante (DIXON et al., 2002).

As funções de muitas GSTs são pouco compreendidas. Em plantas, os papéis da GST são ainda menos óbvios que em animais. A reação típica da GST envolve a conjugação de substâncias tóxicas pela GSH, que é rapidamente transportado do citosol ao vacúolo, pela ação de transportadores específicos. Estudos mais recentes têm mostrado o envolvimento das GSTs em processos intracelulares de estabilização de flavonóides (DIXON et al., 2002).

Funções adicionais da GST têm sido sugeridas, tais como redução de hidroperóxidos de ácidos graxos e ácidos nucléicos para a prevenção da

degradação destes compostos. Também tem sido evidenciada a atuação da GST na conferência de tolerância ao estresse salino e térmico em linhagens transgênicas de tabaco (ROXAS et al., 1997) e resistência a herbicidas em grama preta. Ao catalisar a desintoxicação por herbicidas, as GSTs também podem prevenir (CUMMIS et al., 1999).

Em tomate, a GST pode suprimir a apoptose, aparentemente pela prevenção de danos oxidativos (KAMPRANIS et al., 2000), atuando também na sinalização celular ao estresse (DIXON et al., 2000) e conferência à oxidação e degradação de aminoácidos (LABROU et al., 2001).

2.4 Interações entre o Al e a membrana plasmática (MP)

As membranas são provavelmente a primeira barreira de defesa da célula contra as mudanças adversas do ambiente. A percentagem das diferentes classes de lipídios e proteínas varia com a organela, com a espécie de planta e com o “status celular”.

Atuam como sensores ambientais desencadeando mudanças internas que levam a respostas metabólicas que podem render à planta resistência a alterações adversas do ambiente.

Sob condições de estresse (biótico ou abiótico) os lipídios da MP são modificados quali e quantitativamente, por alterações na composição, peroxidação, degradação e modificação do grau de insaturação, acarretando, muitas vezes, em alteração na permeabilidade da MP (DEVI; PRASAD, 1999; VIEIRA et al., 1991).

A manutenção da integridade da MP sob condições de estresse é o fator crucial na determinação da resistência das plantas à toxicidade causada por alguns elementos. Essa toxicidade causa lesões na MP, acarretando na perda das funções

normais desta estrutura e da planta como um todo (DEVI; PRASAD, 1999; DEVI et al, 2003).

Shimizu et al. (2006) detectaram o papel das EAO's na membrana plasmática de células vegetais sensíveis a uma determinada toxina. Estas células apresentaram invaginações na membrana e acúmulo de polissacarídeos, assim como a fragmentação da mesma. Nestes fragmentos, houve geração de H_2O_2 que, segundo os autores, desencadeou o processo de peroxidação lipídica.

Pelas suas características de seletividade e permeabilidade, a membrana plasmática é apontada em vários estudos como uma barreira efetiva à entrada de Al no citoplasma. Entretanto, tem-se encontrado que o Al aparentemente entra no simplasto e se acumula nas células das raízes (MINOCHA et al., 2001).

O Al altera a permeabilidade da membrana plasmática por causar alterações na propriedade dos canais iônicos de troca. Também tem sido demonstrado que o Al pode alterar os tipos de lipídios presentes na MP e seu nível de peroxidação (ZHANG et al., 1997; YAMAMOTO et al., 1997; RENGEL, 1996). Entretanto, ainda não está claro se estas modificações podem alterar a absorção de Al pela MP (MINOCHA et al., 2001). Ishikawa e Wagatsuma (1998) reportaram que o contato temporário de espécies sensíveis com o Al altera a permeabilidade da MP de forma irreversível, através da perda da sua rigidez.

Um dos efeitos mais importantes do Al ao nível celular ocorre sobre a estrutura e o funcionamento da membrana plasmática. Os mesmos autores sugerem também que Al liga-se fortemente aos grupos fosfato dos fosfolipídios e outros constituintes da membrana, substituindo o cálcio e assim, interfere na sua fluidez (HAUG; SHI, 1991; LINDBERG; GRIFFITHS, 1993; HORST et al., 1999; PEIXOTO et al., 2001).

Yamaguchi et al. (2005) evidenciaram a localização de transportadores de malato na membrana plasmática de células tolerantes ao Al. Em trigo, o efluxo de malato é altamente relacionado à resistência ao Al e estudos vem elucidando o canal da membrana plasmática permeável ao malato é ativado na presença de Al, como já constatado por Zhang et al. (2001).

Horst et al. (1999) sugerem que o Al causa uma desorganização no citoesqueleto mediada pela sua interação com o lado apoplástico da parede celular – membrana plasmática, acarretando a inibição do crescimento radicular.

Em relação às proteínas da membrana plasmática, poucas têm sido caracterizadas, mesmo para o sistema modelo de *Arabdopsis thaliana*, onde uma média de 50 produtos de genes tem sido identificados numa população estimada de 500 polipeptídeos (MASSON; ROSSIGNOL, 1995). Em adição a este fato, estas proteínas se encaixam em menos de 20 famílias de genes de proteínas integrais, a maioria isoformas de alguns poucos sistemas de transporte (LOGAN et al., 1997).

Quase não há dados disponíveis sobre proteínas periféricas e, não se conhece quase nada a respeito de proteínas com múltiplas localizações nas plantas (BAIZABAL-AGUIRRE; DE LA VARA, 1994; ROBINSON, 1996), incluindo aquelas reversivelmente associadas com a MP após mudanças translacionais (PARK et al., 1997; XING et al., 1997). Isso já demonstra a dificuldade de se identificar novas proteínas potenciais da MP, havendo uma necessidade clara de se desenvolver métodos de identificação destas proteínas e de ligação sistemática dos genes com os seus produtos (SANTONI et al., 1998).

Nos últimos anos tem crescido o interesse e os estudos a respeito da importância biológica e farmacológica das proteínas da membrana, como “portas de entrada” ou “sinais de entrada” da célula a outros compostos e isso tem

incrementado o aprimoramento da técnica de separação de proteínas, sobretudo daquelas com menor solubilidade, pelo uso da eletroforese bidimensional (2-D). Esse aprimoramento vem sendo realizado com o uso de diferentes surfactantes, agentes redutores, fracionamento das amostras, métodos de solubilidade de proteínas, etc. O avanço dentro do método de 2-D é fato notório, embora ainda haja vários problemas a serem solucionados, que são relativos principalmente ao protocolo de corrida dos géis, o qual necessita ser adaptado à amostra a ser estudada (WILKINS et al., 1997; MOLLOY, 2000).

2.5 *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2

A suspensão de células de tabaco cv. BY-2 é largamente usada como um sistema modelo de estudos envolvendo eventos intracelulares em plantas. Exibem características únicas como altas taxas de crescimento e alto padrão de homogeneidade das células e, por isso, são consideradas como modelo para estudos com cultura de células (NAGATA et al., 1992; SAMUELS et al., 1998).

O estudo conduzido com suspensão celular tem ainda a vantagem de que as células não necessitam ser isoladas da raiz, pois, sem dúvida o processo de isolamento de células seria uma barreira significativa para o êxito deste projeto, já que as células da raiz, desejáveis para este estudo, não apresentam características que facilitem seu isolamento das demais, como por exemplo, uma limitação consistente que separe uma célula da outra.

Geelen e Inzé (2001) destacam as vantagens das células BY-2 como um modelo para estudos em biologia celular, comparando suas características com o modelo *Arabdopsis*. As principais propriedades são: o crescimento rápido, o tamanho dos agregados de células, a facilidade de sincronização do ciclo celular e a

homogeneidade da cultura. Estas características também foram destacadas por Shibaoka et al. (1996).

No caso do nosso trabalho, além das facilidades de cultivo, pudemos observar as diferenças na sensibilidade ao Al e ao pH dentro do mesmo genótipo, alterando somente as fases de crescimento da cultura.

O sistema BY-2 também é usado para estudos envolvendo o citoesqueleto, a obtenção de protopalstos (SHIBAOKA et al., 1996; HASEZAWA; KUMAGAI, 2002; HUSSEY et al., 2002), transporte e tráfico de membranas (VITORELLO; HAUG, 1999; WEINGARTNER et al., 2003), diferentes aspectos da divisão celular (HASEZAWA; SYONO, 1983; HOSHINO et al., 2003; COLLINGS et al., 2003).

Além de estudos envolvendo biologia celular, a cultura de tabaco cv. BY-2 está sendo usada para a construção de uma base de dados de proteínas, separadas por eletroforese 2D e identificadas por métodos de espectrometria de massa. Somente no trabalho de Laukens et al. (2004) estão listadas 73 proteínas identificadas por meio das bases da SWISS-PROT e NCBI (SANTONI et al., 1998; 1999).

Entretanto, algumas dificuldades também podem ser apontadas quando se trabalha com um sistema de cultivo celular em suspensão. Por exemplo, a pequena quantidade de material obtida, tanto em massa fresca como seca após um experimento onde se tem intensa manipulação celular. Para se obter grandes quantidades de material, é preciso um grande número de frascos de cultura, o que muitas vezes é problemático por condições de espaço e manipulação. Cuidados constantes devem ser tomados em relação à contaminação na cultura em suspensão. Também as condições de crescimento da cultura devem ser constantemente controladas, assim como a constância do inoculo nas repicagens.

Figura 2: Exemplo de frascos de cultura de células de tabaco cv. BY-2 nas fases (A) log, com 2 dias de idade e (B) estacionária de crescimento, com 7 dias de idade.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo de suspensões celulares de tabaco cv. BY-2

As condições de cultivo das células foram estabelecidas conforme descrito por Nagata et al. (1992) e Vitorello e Haug (1996).

Células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 foram cultivadas em meio de cultura líquido, contendo os sais basais do MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), suplementado com tiamina-HCl (3µM), mio-inositol (0,56mM), KH_2PO_4 (2,72mM), sacarose 3% e 2,4-D (0,1µM) como fonte de auxina. O pH foi ajustado para 5,7-5,8 (KOH 1M) antes da autoclavagem. Foram distribuídos 50mL de meio em erlenmeyers com capacidade para 250mL.

Foram realizados subcultivos das células a cada 7 dias, com inóculo fixo de 2mL (4%) de células na fase estacionária de crescimento.

As suspensões celulares foram cultivadas em incubadora, com agitação orbital de 160rpm, com temperatura de 27ºC e sob condições de escuro.

3.2 Monitoramento do crescimento da cultura

O crescimento da cultura foi monitorado pelo volume de células compactadas após centrifugação a 200*g* por 2min, obtendo-se o índice de células compactadas (ICC%).

As análises envolvendo o monitoramento da cultura foram realizadas como procedimento de rotina para auxiliar na identificação de qualquer problema no crescimento das células.

3.3 Viabilidade celular (VC%)

Amostras de células de 500µL foram coletadas e adicionadas, na relação 1:1 (v/v), a uma solução de Trypan Blue 0,4% (w/v) em H_2O. Após um tempo de reação de 5 min, as células foram lavadas para a retirada do excesso do corante, foram coletadas e mantidas em água. A contagem celular foi realizada em microscópio óptico (YAMAMOTO et al., 1996; KOYAMA et al., 1995; YOKOTA; OJIMA, 1995).

Para esta análise foram considerados os totais de células no campo de visão da lâmina, o total de células não coradas e o total de células onde houve penetração do corante.

3.4 Determinação das condições de exposição celular aos tratamentos

Antes de submeter as células aos tratamentos, foram realizados experimentos com o objetivo de se estabelecer um número de lavagens (anteriores à exposição propriamente dita aos diferentes tratamentos) que não prejudicasse a viabilidade celular, nem a reprodutibilidade dos resultados. Assim, foram testados:

1 O número de lavagens: 2 e 3 lavagens com a solução composta por 10mM MES, 10mM KCl e 2mM $CaCl_2$, pH 4,2;

2 O tempo de exposição: 1 e 2 horas;

3 As concentrações de Ca^{2+} e K^+ nas soluções de lavagem: 0; 5; 10 e 15mM, em todas as combinações possíveis e

4 As diferentes concentrações de sacarose e de manitol nas soluções de lavagens: 0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 e 150mM.

Os resultados obtidos quando utilizamos soluções contendo sacarose e manitol foram interessantes sob o ponto de vista de acúmulo de Al e viabilidade celular. Assim incluímos alguns tratamentos com estes compostos.

3.5 Exposição celular aos tratamentos

Após o estabelecimento das condições mais interessantes para a realização dos experimentos, a solução composta por: 10mM MES, 10mM KCl e 2mM $CaCl_2$ foi definida como solução padrão de tratamento.

As células nas fases de crescimento log e estacionária foram retiradas da cultura, lavadas para retirada do meio de cultura em solução padrão a pH 4,2 e expostas por 2h aos diferentes tratamentos (Tabela 1):

Tabela 1: Tratamentos utilizados durantes os experimentos.

Tratamento	**Descrição**
pH 5,6	Lavagens e tratamento das células em solução padrão, pH 5,6
pH 4,2	Lavagens e tratamento das células em solução padrão, pH 4,2
50µM Al	Lavagens em solução padrão pH 4,2 e exposição a 50µM $AlCl_3$ adicionados à solução padrão
80/40mM sac	Lavagens em sol. padrão acrescida de 80mM de sacarose, pH 4,2 e exposição a 50µM $AlCl_3$ em solução padrão acrescida de 40mM sacarose.
80/0mM sac	Lavagens em solução padrão acrescida de 80mM de sacarose, pH 4,2 e exposição a 50 µM $AlCl_3$ em solução padrão.
80/40mM man	Lavagens em sol. padrão acrescida de 80mM de manitol, pH 4,2 e exposição a 50µM $AlCl_3$ em solução padrão acrescida de 40mM manitol.
80/0mM man	Lavagens em solução padrão acrescida de 80mM de manitol, pH 4,2 e exposição a 50µM $AlCl_3$ em solução padrão.

A absorção de Al pelas células foi paralisada pela adição de citrato 5mM às amostras, depois foram lavadas em solução de EDTA 5mM (pH 5,6) (VITORELLO; HAUG, 1997 e YAMAMOTO et al., 2001). Todos os outros tratamentos que não receberam Al também passaram por este procedimento.

3.6 Cultivo das células e viabilidade celular após a exposição aos tratamentos

Após lavagens para retirada do Al, as células foram transferidas para meio de cultura básico, de onde foram retiradas amostras para avaliação diária do crescimento celular (volume de células compactadas após centrifugação). A viabilidade das células foi avaliada através do uso do corante trypan blue 0,4%, com contagem de células permeabilizadas em microscópio óptico. (YAMAMOTO et al., 1996; KOYAMA et al., 1995; YOKOTA; OJIMA, 1995).

Para evitar problemas com contaminação, todos os passos deste experimento foram realizados em capela de fluxo laminar e todos os materiais e soluções necessários foram autoclavados.

3.7 Experimentos com diferentes concentrações de sacarose e manitol

Os resultados preliminares durante a fase de testes e estabelecimento das metodologias de lavagem e exposição ao Al mostraram resultados interessantes que nos propiciariam boas condições de estudo. Os resultados encontrados poderiam ser conseqüência da influência da sacarose sobre o metabolismo energético da célula (apesar de ser pouco provável, pois o tempo de exposição das células à sacarose é de 2h) ou de outros fatores, envolvendo a membrana plasmática e a própria osmolaridade da solução usada. A literatura aponta que a sacarose tem algum efeito na proteção celular aos danos provocados por tratamentos com Al, assim como cátions como o Ca^{2+} também apresentam, porém não se sabe a razão pela qual isso ocorre.

Para descartar a influência do caráter energético fizemos experimentos semelhantes ao realizado com sacarose, concomitantemente, com concentrações

idênticas de manitol, que não é absorvido pelas células de tabaco e também a quantificação dos níveis de carboidratos solúveis totais.

Testamos o comportamento celular sob um leque de concentrações de 0 a 150 mM de sacarose ou manitol, realizando as lavagens que precedem à exposição aos tratamentos e usando também durante a exposição aos tratamentos.

3.8 Conteúdo de carboidratos solúveis totais

Foi seguida a metodologia de Yemm e Willis (1954). Aproximadamente 6g de massa vegetal fresca foram extraídas em cadinho de porcelana na presença de N_2 líquido. Após a maceração foram adicionados 10mL de etanol 80% em água, o extrato foi homogeneizado e centrifugado por 10 min a 1500*g* para a eliminação de impurezas. As amostras então foram secas em estufa a 40ºC por 48h para a evaporação do etanol e ressuspendidas em 20mL de água milli-q autoclavada.

Antes das leituras das amostras, foi obtida uma curva de calibração com diferentes concentrações de glicose (µg/mL): 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45 e 50. De cada padrão, pipetou-se 1mL que foi adicionado a 5mL do reagente de antrona e as soluções foram agitadas e aquecidas em banho-Maria por 10min a 100ºC.

Após o resfriamento das amostras, em temperatura ambiente, as leituras foram realizadas a 625nm. Pelas leituras da curva analítica de calibração pode-se traçar a equação da reação e estimar a concentração de carboidratos solúveis totais nas amostras, sendo os resultados expressos em µg glicose/g células.

3.9 Quantificação do Al acumulado nas células

3.9.1 Acúmulo de Al por fluorimetria

Após a exposição ao Al, as células foram incubadas na solução padrão acrescida de 100µM morin, a pH5,6 por 20min. O excesso do corante foi retirado com 3 lavagens de 10min cada em solução padrão pH5,6. Ao final das lavagens as células foram ressupendidas na mesma solução das lavagens e foram realizadas diluições apropriadas para a leitura no fluorímetro (VITORELLO; HAUG, 1996).

O complexo Al-morin, apresenta comprimento de onda de excitação de 440nm e de emissão de 510nm (VITORELLO; HAUG, 1997). O fluorímetro usado foi um modelo Turner 10AU (Turner Designs, Sunnyvale, California).

A quantificação do Al acumulado nas células por fluorimetria é relativa. O acúmulo de Al em células com 2 de idade (fase log de crescimento), é considerado máximo e por isso foi considerado como 100% para efeitos comparativos com outros tratamentos.

3.9.2 Quantificação de Al por espectrometria de massa acoplada com fonte de plasma (ICP-MS)

A quantificação do Al acumulado pelas células foi realizada por espectrometria de massa com fonte de plasma (Agilent, ICP-MS 7500 ce).

A tecnologia do ICP-MS foi desenvolvida de acordo com os mesmos princípios da espectrometria de emissão atômica. As amostras são decompostas à elementos neutros sob alta temperatura, na presença de plasma de argônio e analisadas com base em suas relações massa/carga.

O esquema geral de funcionamento do equipamento segue na figura 3:

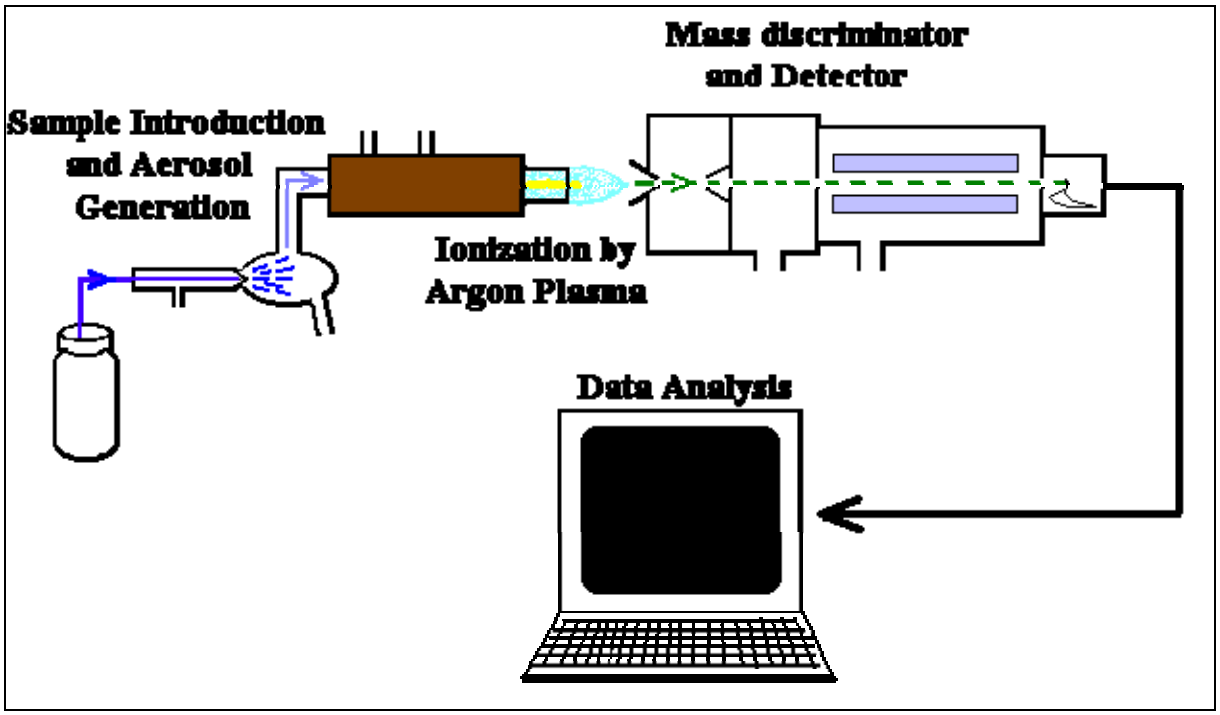


Figura 3: Esquema geral dos processos envolvidos no funcionamento do ICP-MS. Fonte: Ruíz, 2003.

De forma geral, primeiramente a amostra é injetada e há a geração de um aerosol. A seguir, a amostra é ionizana na presença de argônio, seguindo para a discriminação da massa da amostra e finalizando com os dados obtidos pelo detector.

As amostras foram pesadas e acondicionadas em tubos de teflon PFA com tampas de rosca semi-abertos e a elas foi adicionada um volume de 3 mL de HNO_3 8M redestilado. Foram incluídos no processo de digestão 3 brancos de digestão (somente 3mL de 8M HNO_3). A temperatura de digestão foi mantida em 130ºC, para evitar a evaporação rápida da sua fração líquida. O processo de digestão durou, aproximadamente, 72h.

Completado este processo, as amostras foram diluídas em 5 mL de HNO_3 25mM, também destilado e todas as leituras foram realizadas em ICP-MS em duplicata.

O uso de frascos de teflon diminui os riscos de contaminação das amostras com resíduos de Al que possam estar em recipientes de vidro. Frascos semi fechados evitam perdas de HNO_3, podendo-se trabalhar com menores volumes e diminuindo o risco de contaminações.

Foi elaborada uma curva padrão, com concentrações conhecidas de Al (Al Standard, MERCK), tendo os seguintes pontos: 0; 20; 50; 80; 100; 200; 300; 400 e 500ppb Al em HNO_3 25mM redestilado.

3.10 Técnicas de microscopia utilizadas para visualização do Al nas células

3.10.1 Microscopia confocal de varredura a laser

Para a visualização das células por esta técnica, foram usados dois corantes: morin (50µM) e lumogalion (10µM). Depois de expostas aos tratamentos, parte das células foi incubada em solução de morin e parte em lumogalion preparado em tampão acetato (pH5,2).

O tempo de incubação com o lumogalion foi de 1h, sob leve agitação, em banho-Maria a 40°C. Após a coloração, novamente as células foram lavadas para a retirada do excesso do corante.

A visualização foi feita em microscópio confocal de varredura a laser (Axiovert 100, Carl Zeiss). Para o morin, o filtro de excitação foi de 488nm e de emissão a 505-550nm. Para o lumogalion, a excitação foi feita em 488nm e a emissão a 570/20nm. Foram feitos cortes sequenciais (2µm) para permitir a reconstrução da imagem da célula.

3.11 Uso do BHA (Butylated Hydroxyanisole)

O BHA é um análogo sintético da vitamina E, operando na redução das espécies ativas de oxigênio (EAO's) e interrompendo a propagação dos processos de oxidação.

Trata-se de um antioxidante lipofílico, que tem sido usado na prevenção da formação de EAO's pelo impedimento do fluxo de elétrons pela antimicina A na mitocôndria de células de tabaco cultivadas em suspensão (MAXWELL et al., 1999).

O BHA foi adicionado ao ensaio de exposição celular aos tratamentos já descritos na tabela 1. Foram usadas duas concentrações de BHA: 20 e 100μM, em experimentos distintos.

A solução padrão de lavagem que precede o período de exposição aos tratamentos recebeu a suplementação de 20 μM de BHA e a mesma concentração foi usada durante o período de exposição aos diferentes tratamentos. Em outro experimento, o mesmo procedimento foi adotato, porém a concentração de BHA foi de 100μM.

Ao final do período de exposição aos tratamentos, foram coletadas amostras de células para a contagem da viabilidade celular.

Também foram retiradas amostras de células para a análise da peroxidação lipídica.

Foram realizadas as lavagens sequentes segundo o procedimento de exposição aos tratamentos e as células foram colocadas em meio de cultura novo para a avalicação do crescimento celular após a exposição, com analises diárias de crescimento celular (ICC%) e viabilidade celular (VC%) por um período de 96h.

3.12 Avaliações do processo de estresse oxidativo

3.12.1 Peroxidação lipídica

A quantificação foi realizada pelo teste do TBA (ácido 2-tiobarbitúrico), no qual o teor de substâncias reativas ao ácido (TBARS) é quantificado como produtos finais do processo de peroxidação de lipídios (MIHARA et al., 1980 e YAMAMOTO et al., 2001).

Amostras de células de 300 mg (massa vegetal fresca) foram maceradas em cadinho de porcelana contendo 5mL de TCA 0,1%, contendo aproximadamente 20% de PVPP. Após homogeneização, 1,4mL foram transferidos para eppendorf e centrifugados a 10.000*g* por 5min.

A um volume de 500µL do sobrenadante, foram adicionados 2mL de uma solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. Esta mistura foi mantida por 30min em bloco aquecedor a 95°C e imediatamente resfriada em banho de gelo. Para clarificar a amostra e separar os resíduos formados durante o aquecimento, uma nova centrifugação foi feita a 10.000*g* por 10min.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535nm e 600nm. As determinações das concentrações de MDA foram realizadas através do coeficiente de extinção da reação (HODGES, 1999):

$$C = ABS(535-600)/E*b$$

Onde:

E = coeficiente de extinção com valor de 155mM

b = comprimento óptico

Os resultados foram expressos em mmol MDA/g massa fresca ou em mmol MDA/mg massa fresca.

3.12.2 Quantificação de H_2O_2

A quantificação dos níveis de H_2O_2 nas células seguiu a metodologia descrita por Gay et al. (1999) e Hermes-Lima et al. (1995), com algumas modificações.

O método baseia-se na oxidação do Fe^{2+} pelo H_2O_2 a Fe^{3+} em pH ácido, resultando na formação de compostos entre Fe^{3+} e o xylenol orange (XO) (HERMES-LIMA et al.,1995).

Após a exposição das células aos diferentes tratamentos, foi realizada a extração de 300mg de material fresco em metanol a 0°C, na relação 1:5 (w/v) de mg de amostra para µL de metanol. Após a maceração em almofariz, as amostras foram centrifugadas por 10.000*g* por 5min.

Foi retirada uma alíquota de 100µL do sobrenadante, à qual foram adicionados 500µL de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 1mM e 200µL de HSO_4 250mM. A mistura permaneceu em reação por 5min sob condições de escuro.

A seguir, adicionou-se 100µL de xylenol orange 1mM e a mistura foi novamente levada à condição de escuro por 20min.

O H_2O_2 presente nas amostras doa elétrons para o Fe e esse por sua vez liga-se ao xilenol formando um composto roxo. Os complexos (Fe-XO) foram formados durante um tempo de incubação de 30 min a temperatura ambiente.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. Foi realizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de H_2O_2: 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15µM H_2O_2.

3.12.3 Atividades de enzimas antioxidantes

As quantificações foram realizadas por espectrofotometria ou por atividade em gel de poliacrilamida (9%), conforme Nakano e Asada (1981); Cakmak e Horst

(1991), Kraus et al. (1995), Azevedo et al. (1998) e Vitoria et al. (2001). As extrações para as análises enzimáticas foram realizadas de acordo com Azevedo et al. (1998) e a quantificação de proteínas foi realizada conforme Bradford (1976).

3.12.3.1 Superóxido dismutase - SOD (EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi observada através de gel de poliacrilamida 9% não denaturante (PAGE). As condições de corrida foram 15mA por gel. Foi utilizado 5uL do padrão SOD bovina (SIGMA) previamente preparado em cada gel. Para a coloração dos géis, inicialmente foram preparadas 2 soluções estoque:

- Solução A: 0,05M riboflavina em 100mL H_2O deionizada, em frasco escuro.
- Solução B: NBT 0,1mM; EDTA 1mM; TEMED 3%; 70mL tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,8.

A coloração foi realizada em ambiente escuro, icubando-se os géis por 30 min numa solução contendo 15mL da solução A e 35mL da solução B para cada gel.

O gel foi exposto diretamente à luz para a foto oxidação das bandas e a revelação foi paralisada com ácido acético 7%. Antes e depois da incubação o gel foi lavado com água Milli-Q por 3 vezes (5min cada).

A determinação das isoenzimas de SOD foi realizada da seguinte forma*:* foi realizada uma corrida eletroforética em PAGE 9% e ao final da corrida, dividiu-se o gel em 3 partes iguais. A parte que continha o padrão foi revelada conforme o procedimento padrão para SOD.

- Parte 1: o gel foi revelado conforme o procedimento padrão descrito para atividade de SOD;

- Parte 2: foi incubada por 20min, sob agitação leve, em 50mL de solução contendo 100mM tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,8; 2mM KCN e 1,27mM EDTA.
- Parte 3: foi incubada por 20min, sob agitação leve, em 50mL de solução contendo 100mM tampão fostato de potássio pH 7,8; 5mM H_2O_2 e 1,27mM EDTA.

Após este período de incubação, as duas partes do gel (partes 2 e 3) foram lavadas em H_20 deionizada e reveladas para a atividade de SOD, conforme o procedimento descrito acima.

O pré-tratamento das partes do gel em KCN e H_2O_2 antes da revelação permitiu a classificação das isoenzimas de SOD em: Cu/Zn-SOD (resistente a ambos os inibidores), Fe-SOD (resistente ao KCN e inibida por H_2O_2) ou Mn-SOD (inibida por ambos os inibidores).

3.12.3.2 Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)

A uma mistura de reação contendo 1mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 e 2,5μL H_2O_2 30%, foram adicionados 15μL de extrato protéico e a atividade foi determinada pela decomposição do H_2O_2 por 1min, em espectrofotômetro (240nm), a 25°C.

3.12.3.3 Glutationa Redutase - GR (EC 1.6.4.2)

Sua atividade foi determinada via espectrofotômetro (412nm) a 30°C**.** A uma solução de reação (3mL de tampão fosfato de potássio 100mM pH7,5; 1,5mL 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid, NBT); 1mM de glutationa oxidada e 0,1mM NADPH)

foram adicionados 50 μL de extrato. A atividade da GR foi estimada pela redução da glutationa oxidada.

3.12.3.4 Glutationa-S-Transferase - GST (EC 2.5.1.18)

A mistura de reação consistiu em: 900 μL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,5; 25μL CDNB 0,04M; 50μL GSH. Essa mistura foi incubada por 3 min a 30°C e a seguir foram adicionados 25μL de amostra. A atividade foi determinada por espectrofotometria (340nm) por 10 min.

3.12.3.5 Ascorbato peroxidase - APX (EC 1.11.1.11)

A quantificação da atividade da APX foi realizada por método espectrofotométrico, com leituras a 290nm. A mistura de reação consistiu de uma solução contendo 650μL tampão fosfato de potássio 80mM pH 7,0; 100μL ascorbato 5mM; 100μL EDTA 1mM; 100μL H_2O_2 1mM e 50μL de extrato. O branco consistiu da mesma mistura excluindo-se o extrato. As leituras foram realizadas após um período de 1 min de reação em cubetas de quartzo.

A mistura de reação contendo o tampão fosfato, o ascorbato e o EDTA permaneceu em banho-Maria a 30°C durante a realização das análises. O H_2O_2 foi adicionado somente na hora da leitura em espectrofotômetro.

3.13 Análises sobre a membrana plasmática

3.13.1 Isolamento de frações enriquecidas da membrana plasmática

Após a exposição aos diferentes tratamentos, as amostras foram maceradas em cadinho de porcelana na presença de N_2 líquido e do tampão de extração (sacarose 250mM; EDTA 5mM; glicerol 10%; TRIS 100mM; KCl 100mM; DTT 5mM;

PMSF 1mM) adicionado na mesma proporção da amostra (1:1, w/v). O DTT e o PMSF foram adicionados ao tampão na hora do uso, tanto para a extração como para a ressuspensão.

O extrato foi centrifugado a 1500*g* por 10min a 4˚C para a eliminação de impurezas e da parede celular. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrífuga (modelo L7-75, Beckman, Alemanha) e centrifugados por 100.000*g* por 30 min a 4˚C. O pellet foi ressuspendido em 1mL de tampão de ressuspensão (glicerol 10%; TRIS-HCl 100mM pH 7,6; EDTA 5mM; PMSF 1mM; DTT 5mM).

A mistura obtida foi aplicada a um gradiente de sacarose (TRIS-HCl 100mM pH 7,6; EDTA5mM; PMSF 1mM; DTT 5mM; sacarose 45 e 25%) previamente preparado e novamente ultracentrifugada a 100.000*g*, por 1h30min a 4˚C.

Após esta centrifugação obtivemos a separação das frações enriquecidas de proteínas de membrana plasmática que foram coletadas da interface do gradiente (Figura 4).

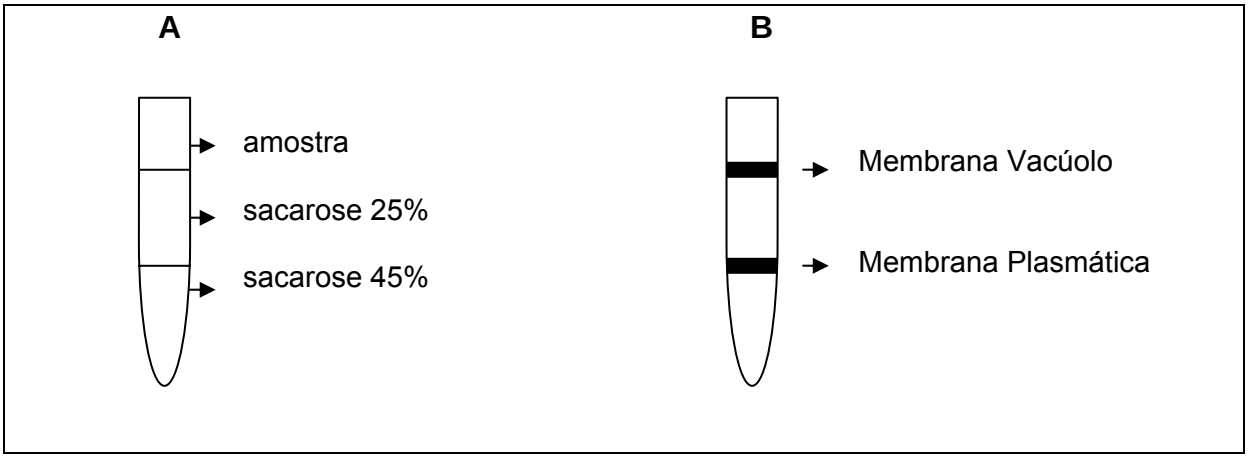


Figura 4: (A) Gradiente de sacarose formado. A amostra fica por sobre a camada de solução de sacarose 25%. As soluções separam-se por densidade; (B) após a ultracentrifugação, pode-se coletar a porção enriquecida de membrana plasmática da interface inferior do tubo.

As proteínas foram precipitadas na presença de acetona e etanol, na relação 3:1:1 (v/v/v) de acetona, etanol e amostra. Esta mistura foi mantida em freezer por 24h. e depois centrifugada por 25 min a 4˚C. O pellet contendo as proteínas precipitadas foi ressuspendido em 25µL de TRIS-HCl 50mM pH7,5 (LEHNER et al., 2003). A quantificação das proteínas foi realizada por Bradford (1976).

3.13.2 Perfil protéico por eletroforese bi-dimensional (2D)

A técnica de eletroforese em duas dimensões (2D), tem alto potencial para o estudo de proteínas. Trata-se de um método de separação de proteínas com alto poder de resolução, onde diversas proteínas podem ser reveladas em um único gel, permitindo também a detecção de proteínas em baixas concentrações (MASSONNEAU et al., 1997; MOLLOY, 2000).

A separação de proteínas ocorre na primeira dimensão, através do seu ponto isoelétrico (gel com gradiente de pH imobilizado: IPG) e na segunda pelo peso molecular das proteínas, conforme metodologias de Santoni et al. (1998; 1999) e Molloy (2000).

3.13.2.1 Focalização Isoelétrica

Nesta primeira etapa, as proteínas foram separadas conforme seu ponto isoelétrico, pelo uso de tiras de gradientes de pH imobilizados (IPG) na faixa de pH 3 a 10 e com 18 cm de comprimento.

As amostras, contendo 75µg de proteínas, foram preparadas na presença de uréia 7M, tiouréia 2M, ASB-14 5%, DTT 70mM, IPG-buffer 0,8%, bromofenol blue 0,5% e água milli-q autoclavada, atingindo-se um volume final de 400µL. A mistura foi centrifugada a 8000*g* por 5min para a retirada da espuma e aplicada ao

sarcófago. A tira foi colocada sobre a solução, evitando-se a formação de bolhas (Figura 5).

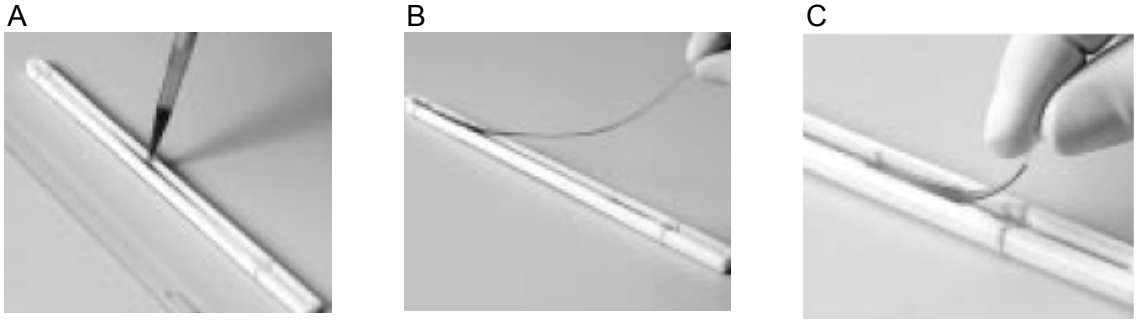


Figura 5: Etapas para a colocação da amostra e da fita no sarcófago. (A) coloca-se a amostra no centro do sarcófago com o auxílio de uma micropipeta; (B) após a retirada da fita protetora do gel, coloca-se a fita sobre a amostra, deslizando-a suavemente para evitar a formação de bolhas, com o gel voltado para cima e observando a polaridade do gel e do sarcófago, geralmente com o auxílio de uma pinça; (C) após o término da colocação da fita e do óleo mineral, tampa-se o sarcófago. Fonte: Amersham Biosciences, 2006.

O sarcófago contendo a fita foi colocado no Ettan™ IPGphor™ II IEF System (Amersham Biosciences) para a aplicação de corrente elétrica que proporciona a migração das proteínas até o seu ponto isoelétrico. Foi aplicada uma programação fixa para todas as amostras, com voltagem final de 60.000V/h (Figura 6).

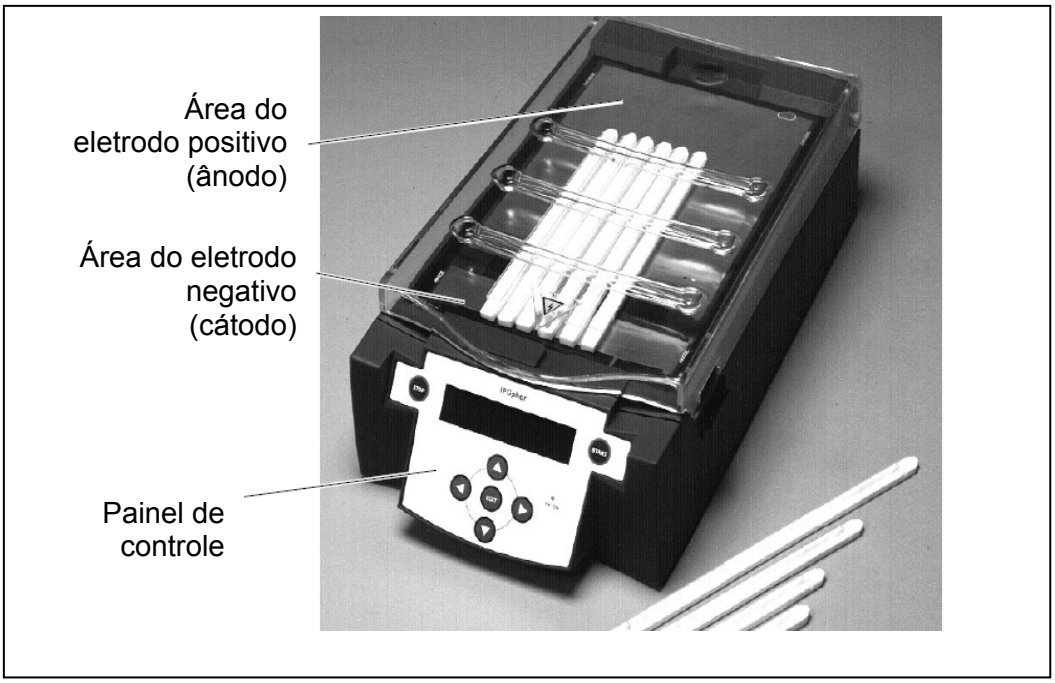


Figura 6: Sarcófagos fechados e colocados no Ettan™ IPGphor™ II IEF System para o processo de focalização isoelétrica, observando-se a posição do sarcófago correspondendo à posição dos eletrodos positivo e negativo, para a passagem da corrente elétrica. A programação do equipamento é realizada no painel de controle, através do binômio tempo e voltagem. Fonte: Amersham Biosciences, 2006.

3.13.2.2 Reidratação e preparo das tiras para a 2ª. dimensão ("equilíbrio das tiras")

Antes da aplicação no gel, as fitas passaram pelo processo de rehidratação. Foi preparado um tampão contendo 50mM TRIS-HCl pH 8,4; 30% de glicerol 50%; 6M uréia e 2% SDS. Após a dissolução dos sais, o tampão foi centrifugado por 10 min a 2000*g* para a retirada da espuma proveniente do SDS. O volume final do tampão foi de 6mL para cada fita.

Separadamente, foram pesados 2% DTT e 2,5% iodoacetamida (IAA). O tampão foi distribuído igualmente entre o DTT e a IAA (3mL/frasco). Foi realizada uma nova centrifugação, por 5min a 2000*g* e a seguir a fita foi incubada primeiramente na solução de DTT, por 12min, sob agitação leve. Após esta

incubação, a fita foi colocada na solução de IAA por 10min também sob agitação leve. Para os processos de incubação, as fitas foram acondicionadas nas canaletas do Immobiline Drystrip Reswwlling Tray (RT, Amersham Biosciences - Ge Healthcare), conforme ilustra a Figura 7:

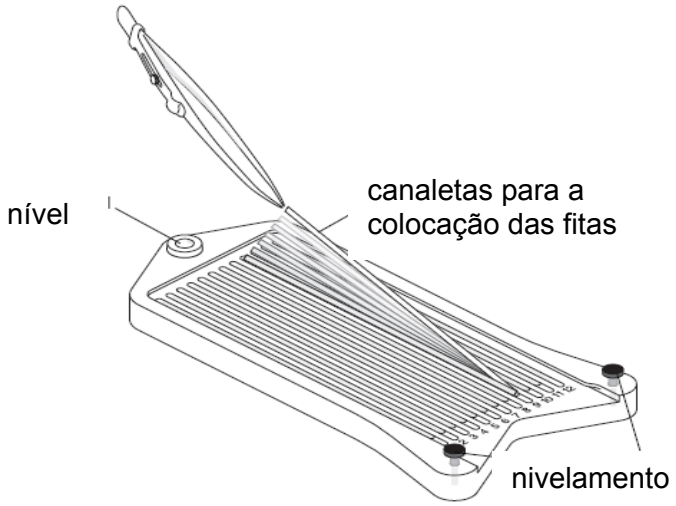


Figura 7: Immobiline Drystrip Reswelling Tray (RT). Após a focalização isoelétrica, as fitas são transferidas para as canaletas do RT para o processo denominado “equilíbrio”, que é o preparo da mesma para a segunda dimensão da eletroforese. Fonte: Amersham Biosciences, 2006

3.13.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O gel para a separação segundo a massa molecular das proteínas foi confeccionado em gradiente de 8 a 18%. Após o processo de polimerização do gel, foi aplicada uma solução de agarose 0,5% quente e colocada a fita para que deslizasse até a superfície de contato com o gel. Foi deixado uma canaleta para a aplicação de 8µL do padrão (Lead Marker, GE Healthcare), previamente preparado (Figura 8).

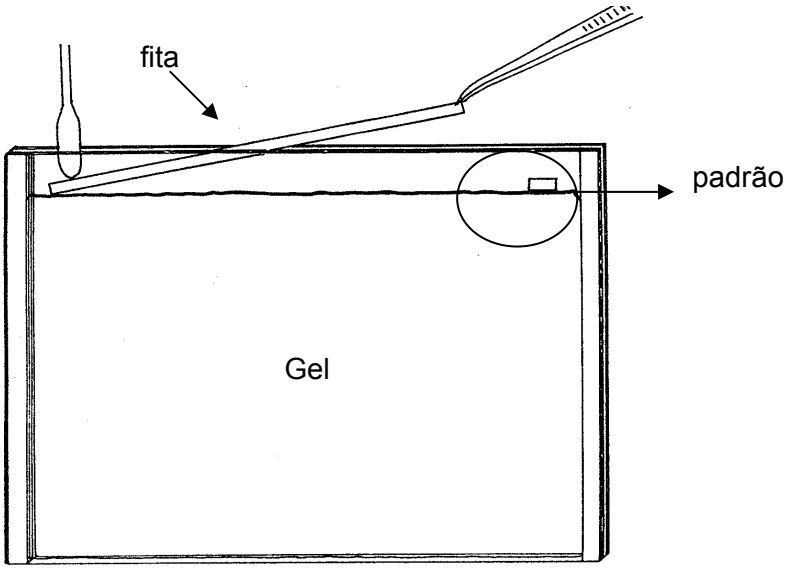


Figura 8: Colocação da fita no gel (SDS-PAGE). Sobre o gel é colocada uma solução de agarose 0,5% quente para que a fita deslize com mais facilidade e fique em contato com a superfície do gel. Também é colocado um espaçador para a colocação do padrão de massas moleculares conhecidas.

Após a colocação da fita e a polimerização da agarose 0,5%, foi retirado o espaçador e colocado o padrão de proteínas. O gel foi inserido no eletrodo para que fosse realizada a corrida eletroforética de separação das proteínas segundo a sua massa molecular.

O tampão de corrida do gel consistiu numa solução contendo TRIS-HCl; glicina e SDS 3% em água milli-q e foi aplicado à cuba de corrida gelado. O detergente SDS foi adicionado no tampão de corrida para carregar todas a proteínas negativamente e estas foram separadas conforme o seu peso molecular (SANTONI et al., 1998).

As condições para a corrida do gel foram 80V, amperagem livre e temperatura de 4±1ºC (a corrida foi realizada em câmara fria). A coloração dos géis seguiu o método do nitrato de prata (ALFENAS et al., 1991).

3.13.2.4 Análise das imagens

Os géis, após o processo de coloração, foram digitalizados em scanner Fluor-S™ Multimager (BIO-RAD) e analisados com o auxílio do software Melanie/Image Master (Amersham Biosciences - GE Healthcare).

3.14 Análise dos dados

Os experimentos foram conduzidos em blocos inteiramente ao acaso, com 3 repetições cada. Para cada tratamento, foi determinada um ou mais controles, conduzidos de maneira semelhante aos demais tratamentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento geral da cultura de células de tabaco cv. BY-2

A Figura 9(A) mostra um exemplo da curva de crescimento da cultura, medida pelo índice de células compactadas (ICC%) e a viabilidade celular da cultura (VC%) durante os 7 dias de subcultivo em condições normais. O crescimento observado foi típico para esta linhagem celular e semelhante ao encontrado por Souza (2004) e Vitorello e Haug (1996; 1999). O crescimento da cultura e a determinação do ICC% estão ilustrados na imagem da Figura 9(B).

A cultura manteve alta viabilidade durante todo o ciclo, apresentando taxas de entre 96 e 98%, obtidas por contagem em microscópio óptico com auxílio de corante (trypan blue 0,4%) (Figura 9A). Este comportamento também é típico e está de acordo com dados encontrados por Vitorello e Haug (1996); Seals e Randall (1997) e Kuthanová et al. (2004).

Notam-se principalmente duas fases distintas de crescimento: a logarítmica (do segundo ao quarto ou quinto dia) e a estacionária (a partir do quinto ou sexto dia). A taxa relativa de crescimento da cultura é maior quando as células se encontram na fase log de crescimento, com valor máximo em torno de 2 dias, diminuindo conforme a cultura atinge a fase estacionária (VITORELLO; HAUG, 1996; SOUZA, 2004). Isso explica-se, em parte, porque durante a fase log de crescimento, o processo predominante é de intensa divisão celular, enquanto que na fase estacionária, as células param de se dividir e atingem sua expansão máxima.

Também há alterações em relação ao tamanho das células durante o ciclo da cultura. El-Shami et al. (2002) constataram que as células são menores durante a fase log (do segundo ao quarto dia de idade, é a fase de intensa divisão celular e de

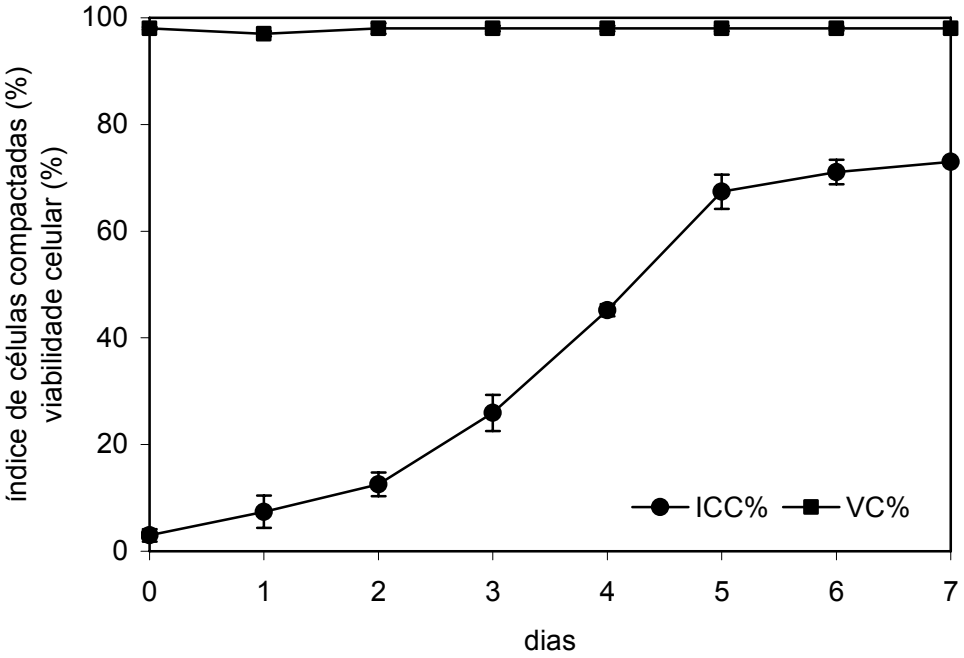
índice mitótico alto), mas aumentam de tamanho conforme a célula chega à fase estacionária (quinto a sétimo dias, é a fase de baixo índice de divisão celular). Durante o início do subcultivo, as células mantém o tamanho maior e alongado da fase estacionária até que ocorra a primeira divisão celular (cerca de 16 a 22 horas, quando passam da fase lag para a log). Os autores também constataram que a massa fresca acompanhou o crescimento da cultura medida pelo índice de células compactadas. Nossos resultados também foram semelhantes, pois a massa fresca aumentou conforme a idade das células e com o índice de compactação celular (ICC%) (dados não mostrados).

O conhecimento e monitoramento destas características da cultura é importante, pois existem diferenças marcantes na sensibilidade das células ao Al entre as diferentes fases de crescimento (log e estacionária). A sensibilidade diferencial ao Al já foi descrita em diversos trabalhos da literatura, tanto em culturas de células quanto em células da raiz (YAMAMOTO et al., 1994; 2001; VITORELLO; HAUG, 1996; SIVAGURU; HORST, 1998; BLANCAFLOR et al., 1998; SOUZA, 2004). Embora os mecanismos não estejam elucidados, estas diferenças estão associadas ao “status” da célula, principalmente com relação ao crescimento e desenvolvimento.

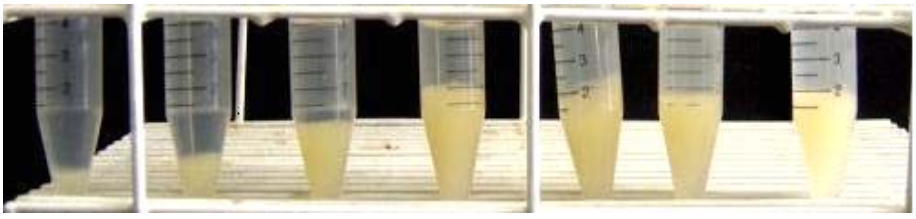
As células mostram-se claramente sensíveis ao Al na fase log de crescimento e resistentes na fase estacionária. O mesmo comportamento pode ser observado quando as células são expostas a soluções de pH 4,2. No trabalho de Souza (2004), as células de tabaco cv. BY-2 exibiram maior capacidade de acumular Al aos 2 dias de idade. Estas células também mostraram maior sensibilidade ao Al e menores níveis de viabilidade celular quando expostas ao metal, quando comparadas a células na fase estacionária de crescimento (aos 7 dias de idade).

Desta maneira, neste trabalho utilizou-se de células com 2 (fase log) e 7 (fase estacionária) dias de idade, correspondentes a células sensíveis e resistentes, respectivamente.

A



B



dias: 1 2 3 4 5 6 7

Figura 9: Desenvolvimento da cultura de células de tabaco BY-2 durante um ciclo de cultivo sob condições normais. (A) Crescimento da cultura medido pelo índice de células compactadas (ICC%) após centrifugação a 200*g* por 2 min e viabilidade celular (VC%), obtida por coloração com Trypan Blue. (B) Ilustração do crescimento da cultura e determinação do ICC% por centrifugação e determinação do volume de células

4.2 Determinação das condições e do tempo de exposição ao Al

Já foi demonstrado previamente (ver item 2.2) que existe uma boa relação entre a sensibilidade celular ao Al e seu acúmulo em suspensões de células. Portanto, neste trabalho, o acúmulo de Al sob condições e tempo definidos foi um dos indicadores utilizados para se avaliar a sensibilidade das células de tabaco cv. BY-2 ao Al e é referido como capacidade de acúmulo de Al. Aqui, o termo capacidade é utilizado no sentido da competência, aptidão ou mesmo da suscetibilidade das células em acumularem Al.

A definição das condições de exposição ao Al é uma questão importante. Levantou-se a curva de acúmulo de Al em função do tempo nas células da fase log de crescimento (2 dias de idade) com o objetivo principal de se verificar a cinética de acúmulo de Al pelas células mais sensíveis (Figura 10). A concentração de Al foi de 50 µM ($AlCl_3$) em solução padrão a pH 4,2 e com amostragem a cada 30 min.

Esta informação trouxe algumas vantagens para a condução dos experimentos. Ao fixar-se o tempo de exposição em 2h a variação entre os resultados foi reduzida, pois o acúmulo de Al alcança um valor máximo, relativamente constante e a viabilidade celular, que tende a cair com o tempo, ainda apresenta valores satisfatórios. De fato, em experimentos onde o tempo de exposição ao Al foi diferente (por exemplo, por 1h), os resultados de acúmulo de Al e viabilidade celular foram de menor repetibilidade. Observando-se a Figura 10, nota-se que após 1h de exposição, o acúmulo de Al ainda apresenta uma tendência ascendente e pequenas variações no tempo de amostragem causaram variações significativas nos dados de acúmulo de Al e viabilidade celular (dados não mostrados).

Outra vantagem foi a otimização do tempo de condução do experimento, pois o procedimento experimental consta de 3 lavagens, 2 horas de exposição e lavagens posteriores. Se o tempo de exposição fosse maior, os dados de viabilidade celular seriam muito baixos, inviabilizando a realização de diversos experimentos. O objetivo foi manter um nível elevado de acúmulo relativo de Al aliado a um nível ainda aceitável de viabilidade celular (VC%).

Para a determinação do Al acumulado nas células, foi utilizado o método de fluorescência do complexo Al-morin, diretamente na suspensão celular. O uso do complexo Al-morin para a detecção do Al presente nas células é um método aceito e usado por diversos autores (VITORELLO; HAUG, 1996; 1997; SAARL; SELTZ, 1983). No entanto, por ser um método fluorimétrico, realizado diretamente em cima das células intactas, é uma medida relativa de quantificação de acúmulo de Al. Uma comparação entre resultados de acúmulo de Al obtidos por este método e obtidos por ICP-MS é apresentada adiante, no item 4.4, e mostra a validade de se empregar a técnica. Este método foi utilizado pois é simples, rápido, de baixo custo e exige uma quantidade de amostra muito pequena. Além disto, permite a visualização da localização do Al na célula ainda intacta. Esta técnica tem sido aplicada como procedimento de rotina em nossos experimentos.

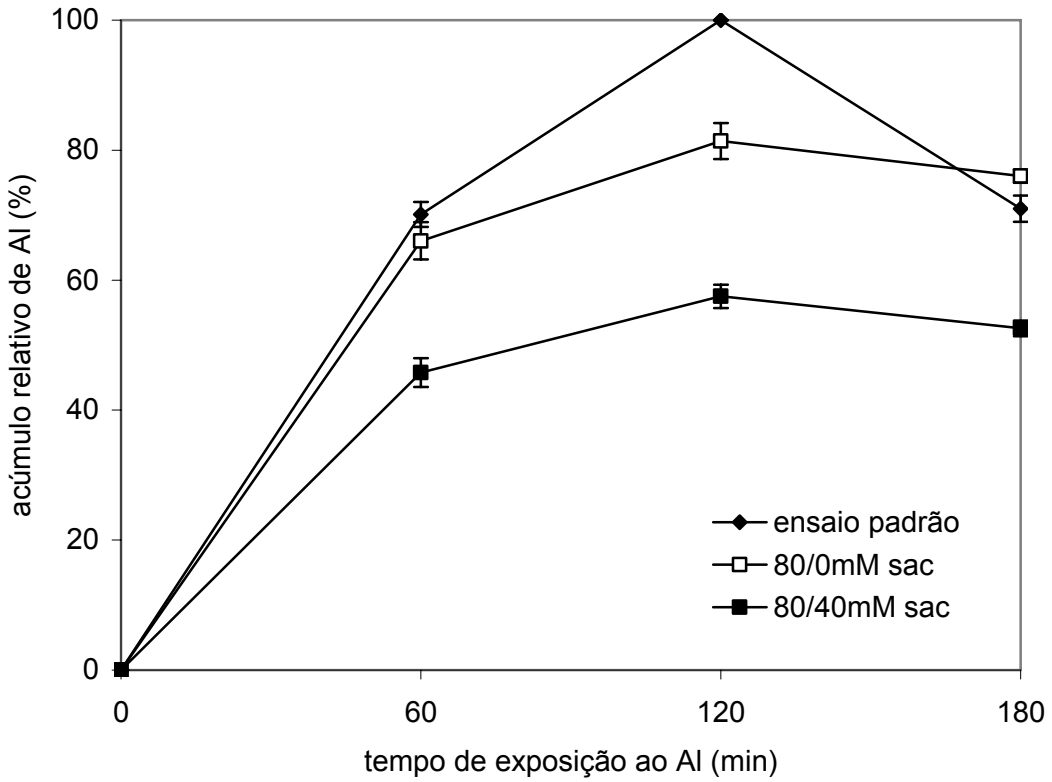
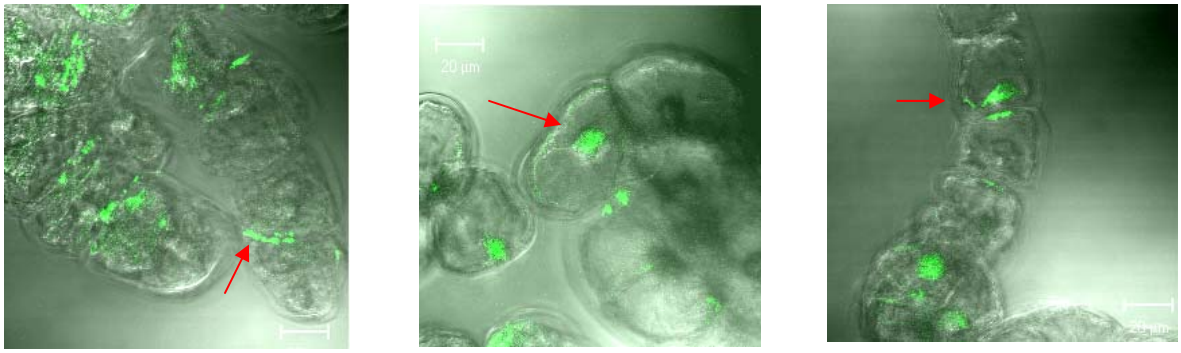


Figura 10: Acúmulo relativo de Al (%) durante 180 min de exposição a 50 µM de Al. No ensaio padrão (♦), as células foram expostas ao Al em solução padrão a pH4,2; no tratamento 80/0mM sac (■), as células foram lavadas em solução padrão pH4,2 acrescida de 80 mM sacarose e expostas ao Al em condições padrão e no tratamento 80/40 mM sac (□), as lavagens foram feitas em solução padrão pH4,2 acrescida de 80 mM sacarose e a exposição ao Al foi feita em solução padrão acrescida de 40 mM sacarose. O acúmulo de Al em células na fase estacionária sob a condição 0/0 foi insignificante (0,9%).

Para ilustrar o acúmulo de Al nas células e os dados da curva de crescimento (Figura 10), estão apresentadas na Figura 11 imagens obtidas em microscópio confocal das células coradas com morin, durante o período de exposição da curva de acúmulo de Al. As imagens ilustram três momentos diferentes: após 30, 60 e 120 min de exposição ao Al.



30 min 60 min 120 min

Figura 11: Microfotografias obtidas por microscopia confocal ilustrando o acúmulo de Al ao longo do tempo em células de tabaco BY-2 da fase log de crescimento. As células foram expostas a 50μM Al por 30, 60 e 120 min e depois coradas com morin. As imagens foram obtidas por fluorescência, deixando-se passar a luz transmitida de baixa intensidade para a visualização da célula. As setas exemplificam a fluorescência do complexo Al-morin.

4.2.1 Tratamentos utilizando-se sacarose e manitol

Na literatura, alguns trabalhos mostram a exposição de células cultivadas ao Al na presença de sacarose. Quando comparados aos resultados obtidos em nosso laboratório, o acúmulo de Al nessas células tem sido menos intenso e mais lento. Além disto, algumas observações preliminares nossas também indicaram um certo efeito protetor da sacarose. Já foi descrito na literatura que tem-se um possível efeito protetor de osmólitos à célula vegetal quando exposta a certas condições de estresse. Efeito semelhante, muitas vezes, também tem sido atribuído ao cálcio.

Portanto, alguns ensaios foram realizados com o intuito de se examinar o efeito da presença da sacarose no acúmulo e na sensibilidade ao Al. A Figura 12 mostra o acúmulo de Al por células na fase log expostas por 2h a 50 μM $AlCl_3$ em função da concentração de sacarose na solução de lavagem e de exposição. Claramente nota-se que a capacidade das células em acumularem Al diminuiu à medida que se aumentou a concentração de sacarose na solução padrão de

tratamento das lavagens e de exposição ao Al e que isto correspondeu a um aumento na viabilidade das células (Figura 12B).

Além da sacarose, optou-se também por testar as mesmas concentrações de manitol para verificar se os efeitos da sacarose seriam por questões osmóticas ou de metabolismo energético. O manitol é pouco absorvido e metabolizado pelas células de tabaco, a não ser por linhagens transgênicas específicas (STOOP et al., 1996). A Figura 13 (A e B) mostra que as células realmente não utilizam o manitol como fonte de carbono no meio de cultura, mostrando baixo índice de crescimento (ICC%) e de viabilidade celular (VC%).

A partir dos dados da Figura 12, deduz-se que o efeito de proteção às células se dá, provavelmente, devido à osmolaridade das soluções empregadas, pois o comportamento das células submetidas às mesmas concentrações de sacarose e manitol foi semelhante. Além disto, na literatura há evidências que os osmólitos exercem papel protetor direto ou indireto sobre a membrana plasmática, protegendo as células de processos de estresse hipo ou hiper-osmótico, pela diminuição da atividade das ATPases e/ou por promover alterações na estrutura física da membrana plasmática (MOECKEL et al., 2002).

Nota-se que o efeito máximo da sacarose e do manitol sobre a viabilidade celular ocorre a uma concentração entre 80 e 100 mM, concentração esta semelhante ao encontrado no meio de cultura (87,4 mM). No entanto, o acúmulo de Al continuou diminuindo nas concentrações acima deste patamar (Figura 12).

Sob as concentrações de osmólitos utilizadas, não se detectou ocorrência de plasmólise celular.

Uma possível explicação para estes aspectos envolvendo flutuações osmóticas é fornecida por observações realizadas em células de crescimento

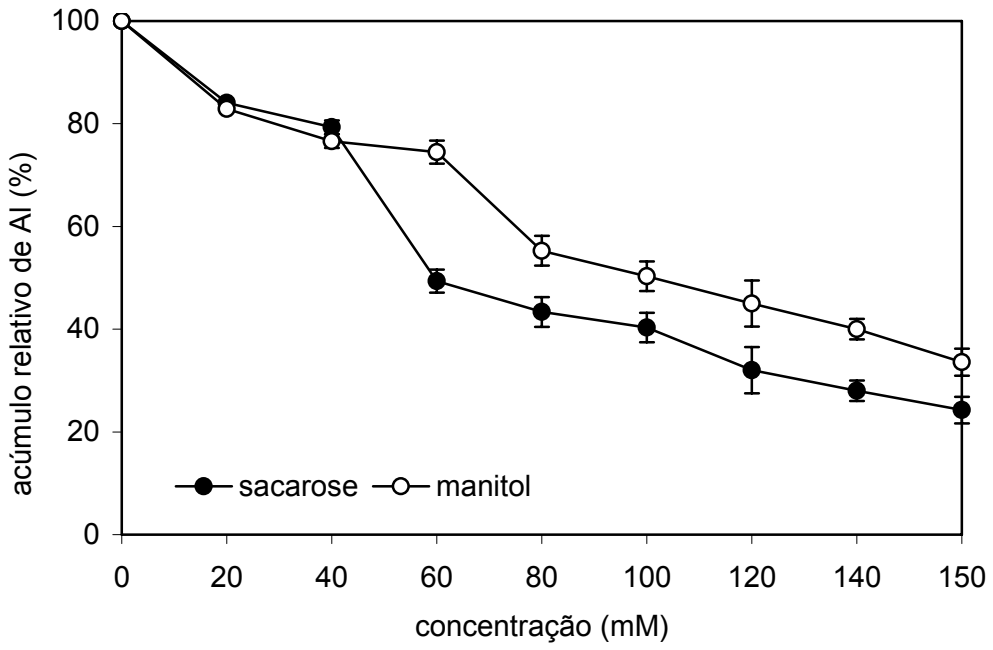
polarizado, especificamente pêlos radiculares. Bibikova et al. (1998) observaram que pêlos radiculares foram bastante sensíveis a pH < 4,5, sendo que o crescimento dos pêlos foi inibido, apresentaram deformações nas suas pontas e uma porcentagem das células supostamente se romperam na ponta. Isto ocorreu apenas em pêlos em crescimento. Vitorello (informação pessoal)[1] observou comportamento semelhante em raízes de *Vigna unguiculata* expostas a pH baixo e Al, mas foi mais acentuado quando as raízes foram expostas a pH baixo e ao Al em soluções hipotônicas. A hipótese é de que processos envolvidos com a expansão celular, tais como, a fusão de membranas ou a síntese e montagem da parede celular, possam ser bastante sensíveis a pH baixo e ao Al. De fato, Llugany et al. (1995); Koyama et al. (1995; 2001) e Schmohl e Horst (2000) sugeriram que o pH baixo e o Al poderiam, respectivamente, causar injúrias às raízes devido a sua interação com pectina. O turgor celular poderia afetar ou agravar os danos causados pelo pH baixo e o Al. Já foi discutido que é provável que valores baixos de pH e Al possam induzir mudanças moleculares no contínuo parede celular – membrana plasmática – citoesqueleto (CW-PM-CSK) (VITORELLO et al., 2005).

Por fim, foram realizados experimentos onde foi variada a exposição à sacarose e ao manitol somente nas lavagens, assim como nas lavagens e na exposição ao Al e ao baixo pH. Após a análise dos resultados, optou-se por utilizar as concentrações de 80 mM nas lavagens e 40 mM na exposição ou somente 80mM nas lavagens, pois foram os tratamentos que mostraram resultados mais interessantes quanto ao acúmulo de Al e a viabilidade celular. Os resultados mostraram níveis intermediários de acúmulo de Al e de viabilidade celular em relação ao ensaio padrão. Outro motivo para a escolha destas concentrações foi o

[1] VITORELLO, V.A. Mensagem recebida por frcapald@cena.usp.br em 20/08/2006.

fato de termos um tratamento com osmólitos durante a exposição e um tratamento com osmólitos somente nas lavagens, para que pudéssemos verificar se o efeito protetor observado era função da presença nas lavagens ou na exposição. Estas condições de exposição ao Al na presença de sacarose ou manitol foram empregadas nos demais experimentos realizados e descritos neste trabalho.

A



B

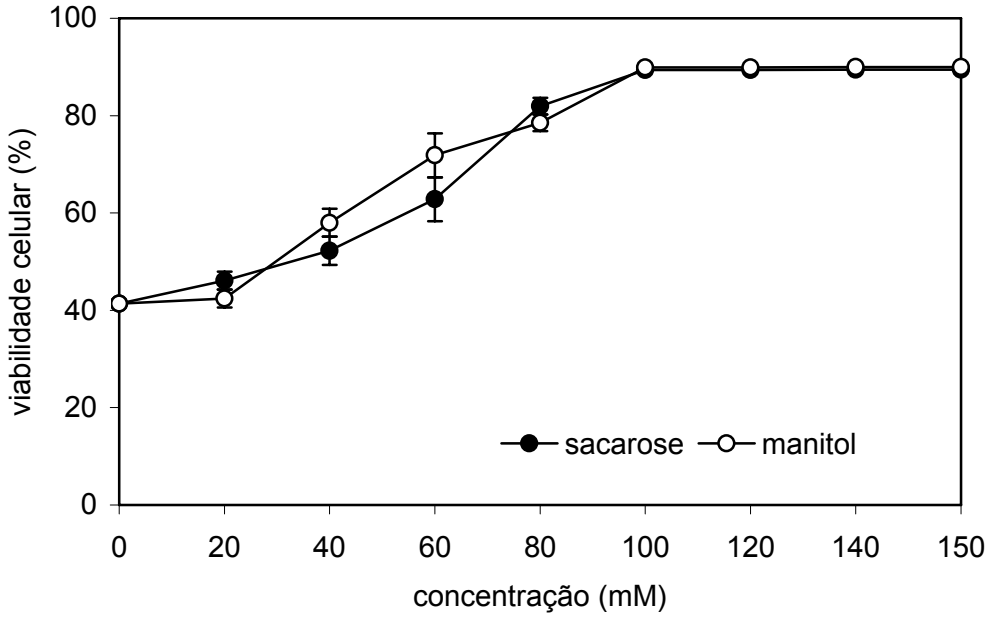
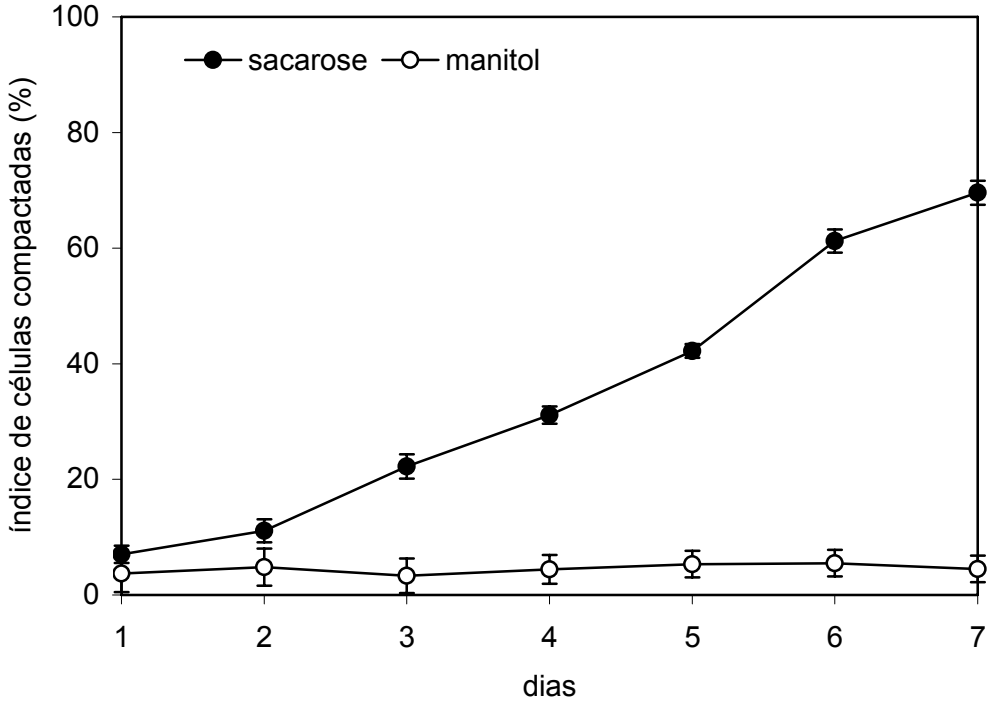


Figura 12: (A) Acúmulo relativo de alumínio (%) medido por fluorimetria pelo complexo Al-morin em células BY-2 na fase log tratadas com diferentes concentrações de sacarose (●) e manitol (○) e (B) Viabilidade celular (VC%) para células da mesma amostra coradas com Trypan blue 0,4%. Contagem por microscopia óptica.

A



B

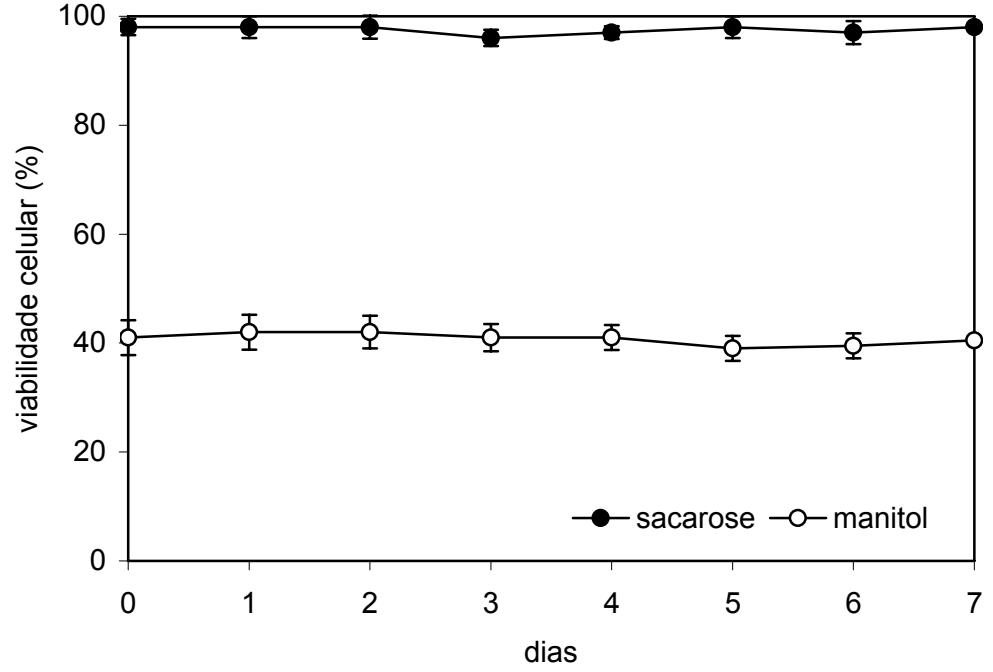


Figura 13: (A) Crescimento celular (%) e (B) viabilidade celular (%), durante um subcultivo, em meios de cultura contendo sacarose (●) ou manitol (○) como fonte de carbono. O inóculo inicial foi de 4% para os dois tratamentos e a concentração de sacarose ou manitol foi de 87,4mM no meio de cultura.

4.3 Diferenças na sensibilidade das células de tabaco cv. BY-2 aos tratamentos

Para um mesmo organismo ou genótipo, diferenças entre células na sensibilidade ao Al já foram descritas em diversos trabalhos (VITORELLO; HAUG, 1996; 1997; 1999; YAMAMOTO et al., 1994; 2001; 2002) independentes das diferenças existentes entre variedades sensíveis e tolerantes (ZHANG; TAYLOR, 1990; VASQUEZ et al., 1999; SILVA et al., 2005)

Em nosso trabalho, estas diferenças foram observadas sob diferentes condições: acidez, presença de Al e presença de Al acrescida de sacarose e manitol.

4.3.1 Diferenças na sensibilidade celular ao Al

A Figura 14 apresenta o acúmulo relativo de Al e a viabilidade celular (VC%) em células na fase log (2 dias). O acúmulo de Al encontrado nas células na fase log (2 dias) expostas a 50 µM $AlCl_3$ por 2h em solução padrão a pH 4,2 foi sempre considerado como referência e tomado com sendo igual a 100%.

Além dos valores de acúmulo relativo de Al, também nos interessava saber se as células continuavam viáveis quando expostas aos diferentes tratamentos, para, por exemplo, conseguirem se recuperar do dano causado (crescimento da cultura após a exposição). Analisamos então, juntamente com o acúmulo relativo de Al (Al%), a viabilidade celular (VC%).

A Figura 14 também ilustra o comportamento das células na fase estacionária quanto ao acúmulo relativo de Al e a viabilidade celular. Estas células mostraram-se resistentes ao Al, mostrando níveis de acúmulo relativo de 0,9% e taxas de viabilidade celular próximas dos 98%. Portanto, estas células não acumulam e não sofrem danos causados pelo Al.

As células na fase log de crescimento acumularam mais Al em comparação às células na fase estacionária e também em comparação aos tratamentos que receberam sacarose. A sensibilidade ao Al fica evidenciada quando observamos os dados de viabilidade celular (VC%), pois a contagem de células identifica a quantidade de células danificadas pela presença do Al.

Neste estudo, confirmou-se que o acúmulo de Al é bom indicador do dano celular gerado pela exposição a este elemento. A Figura 15 apresenta a correlação entre todos os dados de acúmulo de Al com os respectivos dados de viabilidade celular das Figuras 12 e 14. Com exceção de um dos pontos, representando células na fase estacionária, todos os demais foram obtidos de células em fase log (2 dias). Observa-se uma correlação bastante estreita entre o acúmulo de Al e a viabilidade celular resultante.

As células na fase log de crescimento acumularam mais Al em comparação às células na fase estacionária e também em comparação aos tratamentos que receberam sacarose. A sensibilidade ao Al fica evidenciada quando observamos os dados de viabilidade celular (VC%), pois a contagem de células identifica a quantidade de células danificadas pela presença do Al.

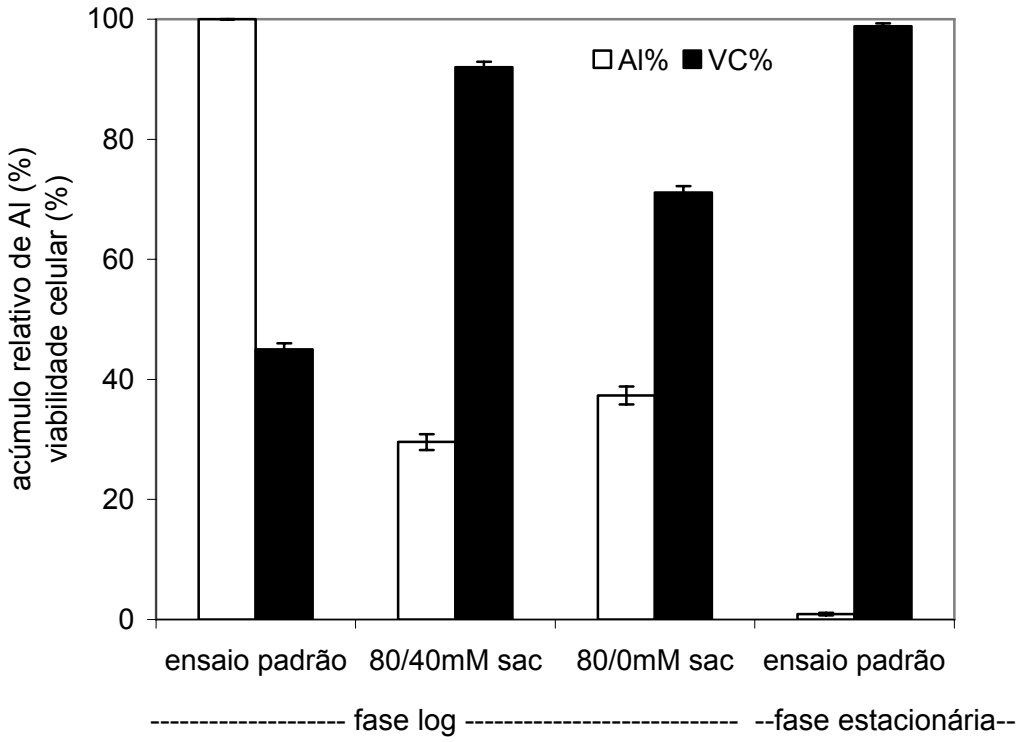


Figura 14: Acúmulo relativo de Al (□) e viabilidade celular (VC%, ■) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log e estacionária de crescimento. Tratamentos: ensaio padrão (as células foram expostas a 50 µM Al em solução padrão pH4,2); 80/40mM sac (a solução padrão foi acrescida de 80mM de sacarose nas lavagens e 40mM de sacarose na exposição, juntamente com o Al) e 80/0mM sac (a solução padrão recebeu 80mM de sacarose nas lavagens e as células foram expostas a 50µM Al).

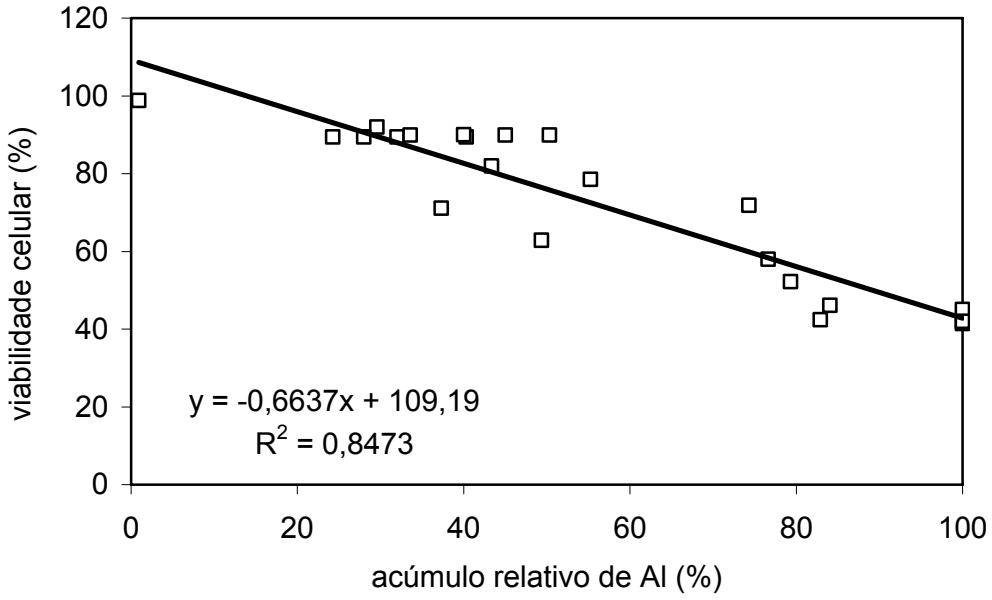


Figura 15: Correlação entre o acúmulo relativo de Al e a viabilidade celular em células de tabaco cv. BY-2. Foram utilizados dados de todos os tratamentos aplicados de células tanto na fase log como na estacionária de crescimento.

Pela curva de acúmulo de Al no tempo (Figura 10) e pelas imagens ilustradas na Figura 11, pode-se observar que o Al acumulou nas células de modo não reversível já após 30 minutos de exposição, confirmando as informações de que o acúmulo de Al é rápido e ocorre tanto com 30 min até muitas horas de exposição em raízes, porém sua localização pode ser diferenciada conforme o tempo de exposição e a concentração de Al (DELHAIZE et al., 1993; LAZOF et al., 1994; VASQUEZ et al., 1999; SILVA et al., 2005).

Após 60 min, pode-se observar que o Al está presente no núcleo celular e nas regiões próximas à membrana-parede celular. O mesmo ocorre após 120 min de exposição. Dados semelhantes, quanto à localização do Al acumulado, foram encontrados por Souza (2004) e Silva et al. (2005).

Silva et al. (2005) examinou a penetração radial do Al em raízes de soja. Usando lumogalion e DAPI, observou que aos 30 min de exposição, uma quantidade

significativa de Al já havia se acumulado nas células meristemáticas e esta quantidade aumentou com o tempo de exposição (até 48h). O Al concentrou-se na interface parede celular/membrana plasmática e no núcleo das células. Utilizando morin e imagens obtidas em microscópio confocal, as células BY-2 na fase log expostas ao Al também mostram este perfil, porém num tempo mais curto de exposição. O Al já se encontra acumulado no núcleo aos 60 min de exposição.

Ao atingir as moléculas presentes no núcleo celular, o Al afeta o índice mitótico (MATSUMOTO, 1991). A presença do Al na membrana nuclear pode interferir em vários processos, afetando todo o ciclo celular (FRANKLIN; CANDE, 1999). Apesar destas relações, muitos outros aspectos da presença do Al no núcleo celular relacionado à inibição da elongação radicular permanecem desconhecidos (SILVA et al., 2005).

4.3.2 Diferenças sensibilidade celular ao baixo pH

Além dos dados de acúmulo de Al, analisamos também a resposta das células quando expostas somente a pH 4,2 (Figura 16), pois o Al somente fica disponível a valores de pH baixo. O pH baixo em si é tóxico às células e a toxicidade ao Al é na realidade um caso de sobreposição de dois fatores de estresse.

Comparando-se as Figuras 14 e 16, nota-se a mesma tendência de resultados nas células tratadas somente com pH 4,2 quando comparadas às células tratadas com Al e com Al e sacarose, porém com valores de viabilidade celular mais elevados, indicando que o Al causa um dano maior às células do que somente a acidez.

A disponibilidade de Al é aumentada sob condições ácidas. Pelos dados encontrados pode-se indicar tanto o pH baixo quanto o Al são prejudiciais às células

sensíveis (fase log) sendo praticamente impossível separar os danos indepentes de cada fator (pH e Al). A adição da sacarose na solução de lavagem e de exposição elevou a viabilidade celular para valores próximos de 60% tanto para células expostas somente ao pH como para células expostas ao Al, diminuindo o acúmulo de Al nestas células em cerca de 70% quando se comparou com o tratamento com 50 µM Al (100% de acúmulo relativo). Quando a adição de sacarose ocorreu somente na solução de lavagem (80/0 mM sac) e a exposição ao Al foi realizada conforme em solução padrão pH 4,2, o acúmulo de Al também foi menor que o tratamento sem sacarose, porém maior que o tratamento que recebeu sacarose também durante a exposição ao Al (80/40 mM sac), ficando num nível intermediário. O mesmo ocorreu com a viabilidade celular na presença do Al e na presença somente do pH baixo, ou seja, a sacarose também exerceu um papel protetor às células na fase log quando aplicadas nas soluções de lavagens e de exposição.

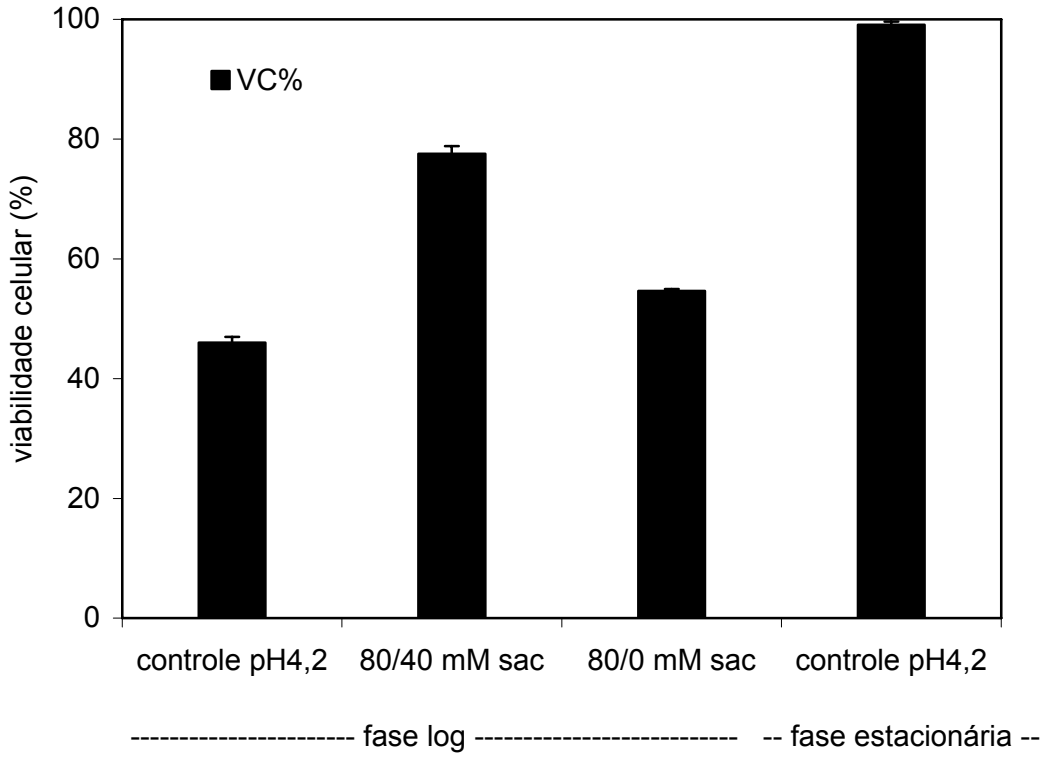


Figura 16: Viabilidade celular (VC%) em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log e estacionária de crescimento (observar as chaves). Tratamentos: controle pH 4,2 (células lavadas e expostas em solução padrão pH 4,2, tanto na fase log como estacionária); 80/40 mM sac (solução de lavagem foi acrescida de 80mM de sacarose e a solução de exposição recebeu 40mM de sacarose); 80/0 mM sac (solução de lavagem recebeu 80mM de sacarose porém as células foram expostas em solução padrão a pH 4,2).

4.3.3. Conteúdo de carboidratos solúveis totais

Examinou-se a concentração de carboidratos solúveis totais nas células com o intuito de verificar se diferenças no metabolismo energético poderiam estar relacionadas aos efeitos da sacarose (que é metabolizada) e manitol (que não é) ou às diferenças entre células das diferentes fases de crescimento quanto à sensibilidade ao Al. Além disto, quis-se examinar se metabolismo energético celular poderia estar alterado na presença de condições de estresse.

A quantificação dos carboidratos solúveis totais seguiu o método de Yemm e Willies (1956) e a curva de calibração de glicose está apresentada na Figura 17.

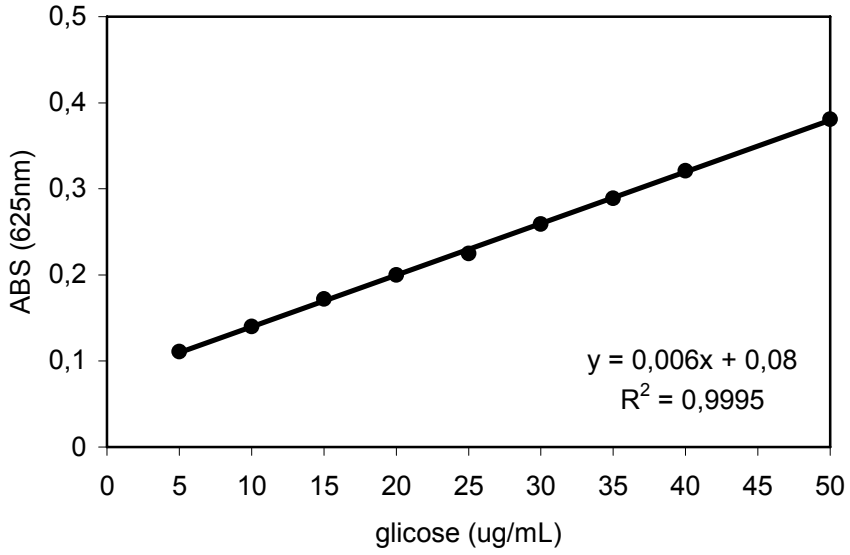


Figura 17: Curva de calibração de glicose (µg/mL) para a quantificação dos carboidratos solúveis totais.

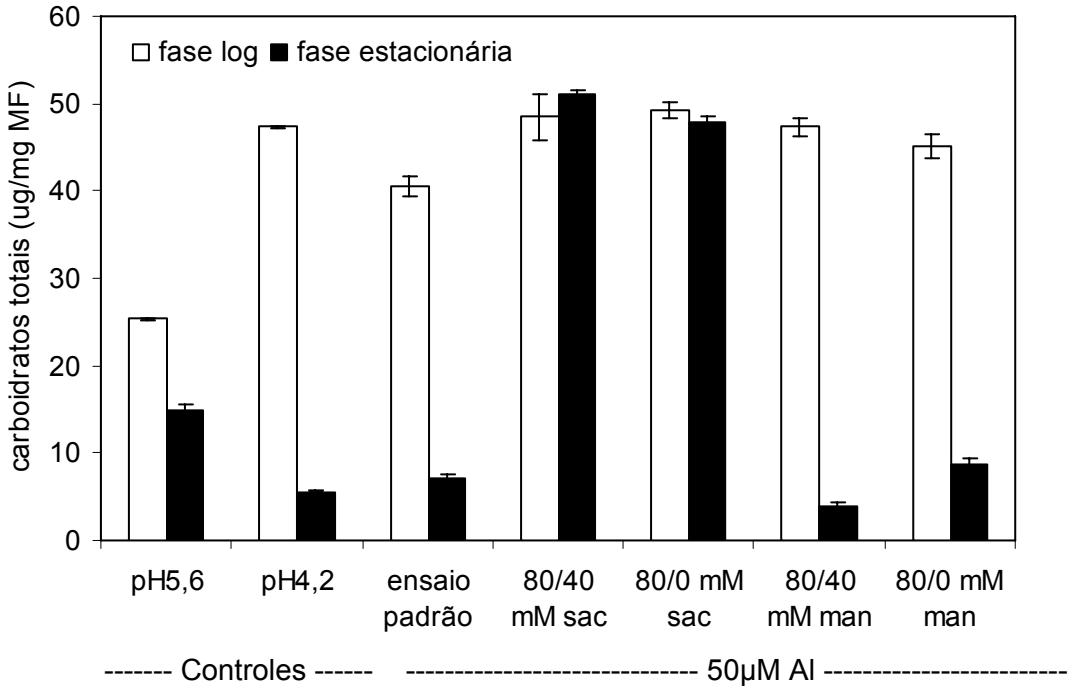


Figura 18: Carboidratos solúveis totais (µg/mg MF) em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (lavagens e exposição a pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol. padrão pH4,2 e exposição na mesma solução + Al); 80/40 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al + 40 mM sacarose ou manitol); 80/0mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição em sol. padrão + Al).

Os resultados da Figura 18 mostram que o conteúdo de carboidratos totais é maior na fase log do que na estacionária, provavelmente porque as células se encontram em pleno processo de divisão celular e com alta concentração de nutrientes e sacarose disponíveis no meio de cultura.

O aumento do teor de carboidratos totais nas células da fase log tratadas com Al ou baixo pH, em relação ao controle (pH5,6), independente da presença ou não de sacarose ou manitol, pode estar vinculado a uma diminuição na capacidade de utilização dos carboidratos no metabolismo destas células estressadas.

As células na fase estacionária apresentaram menores concentrações de carboidratos em relação às células na fase log. Isso pode ser explicado pelo fato de que as células já se encontravam num meio de cultura com baixa concentração nutricional e de sacarose. Quando as células foram expostas aos tratamentos 80/40mM sac e 80/0mM sac, houve aumento do teor de carboidratos solúveis nas células, ao contrário do que ocorreu com as células quando utilizou-se manitol, reforçando a informação de que estas células não usam manitol como fonte de carbono.

Em células na fase estacionária, independente da concentração de carboidratos encontrada, as células mantém-se resistentes ao acúmulo de Al.

4.4 Correlação entre fluorimetria (Al-morin) e espectrometria de massa com fonte de plasma acoplada (ICP-MS)

Conforme mencionado anteriormente, a determinação do Al acumulado nas células foi realizada pelo método de fluorescência do complexo Al-morin, diretamente na suspensão celular. As vantagens deste método foram abordadas no item 4.2 e discutidas na literatura (VITORELLO; HAUG, 1997).

O morin é pouco fluorescente, porém forma compostos altamente fluorescentes com o Al^{3+}, sendo largamente usado como reagente para análises fluorimétricas de Al e de outros metais, assim como para análises espectrofotométricas de metais que não formam complexos fluorescentes (SAARL; SELTZ, 1983). No entanto, por ser um método fluorimétrico, realizado diretamente em cima das células intactas, é uma medida relativa de quantificação de acúmulo de Al.

Para a confirmação dos dados obtidos por fluorimetria, realizou-se a quantificação do Al acumulado nas células por espectrometria de massa com fonte de plasma acoplada (ICP-MS). Foram utilizadas amostras de todos os tratamentos aplicados às células, nas duas fases de crescimento distintas (log e estacionária). Pela correlação entre as duas metodologias, pudemos verificar até que ponto a quantificação de acúmulo de Al por fluorimetria (complexo Al-morin) foi adequada aos nossos experimentos.

A curva de calibração de Al para a subsequente leitura das amostras foi obtida com o padrão de Al Merck (em Tritisol). A Figura 19 mostra os dados de quantificação de Al por ICP-MS obtidos para células nas fases log e estacionária de crescimento, em todos os tratamentos aplicados.

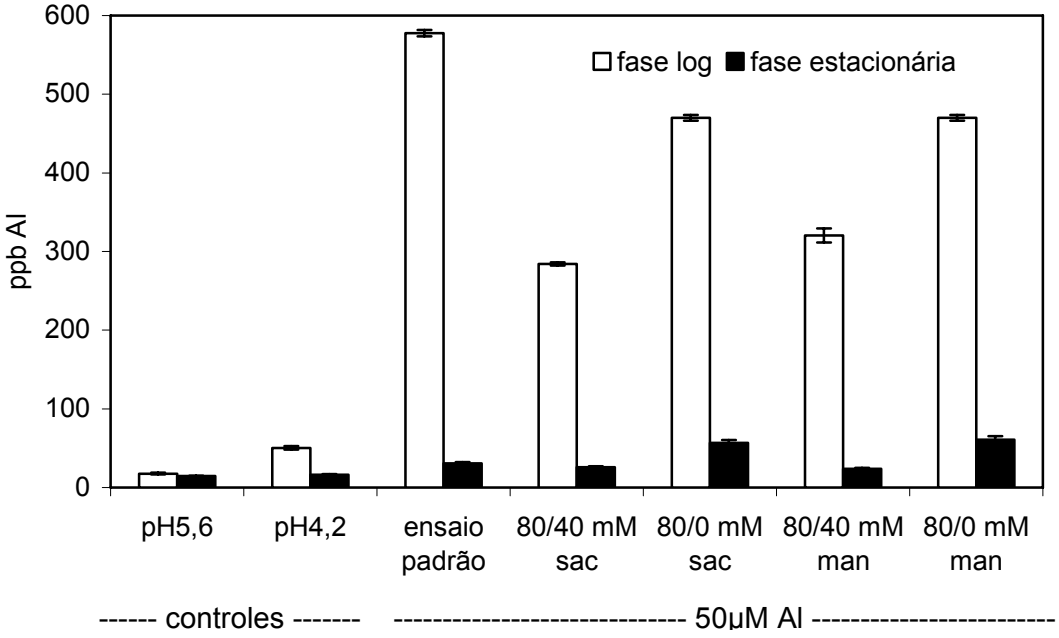


Figura 19: Concentração de Al (ppb) em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■) obtida em ICP-MS. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH 5,6); pH4,2 (idem, a pH 4,2); ensaio padrão (células lavadas em sol. padrão pH 4,2 e expostas a 50 µM Al); 80/40mM (lavagens em solução padrão + 80 mM sacarose ou manitol e expostas a 50 µM Al + 40mM sacarose ou manitol); 80/0mM (lavagens em solução padrão + 80mM sacarose ou manitol e expostas a 50 µM Al).

A correlação entre as duas metodologias utilizadas nos ensaios de acúmulo de Al resultou numa linearidade com R^2 = 0,96 e está apresentada na Figura 20. Portanto, houve uma excelente correspondência entre os dados obtidos pelas duas metodologias de determinação de acúmulo de Al. Podemos considerar válida a metodologia de quantificação do acúmulo relativo de Al (Al%) pelo complexo Al-morin.

Sem dúvida, a quantificação da concentração de Al por ICP-MS é um método extremamente sensível, que proporciona resultados altamente confiáveis. Porém também é um método oneroso e mais demorado (requer digestão das amostras) e que nem sempre pode ser incluído como um procedimento padrão para a

quantificação de Al nos experimentos realizados. Esta é a principal razão pela qual utilizamos o complexo Al-morin para tal quantificação, pois é um método de fácil aplicação, rápido, de baixo custo e que depende de uma tecnologia mais acessível.

Vitorello e Haug (1997) compararam a metodologia de quantificação de acúmulo de Al por fluorimetria (Al-morin) com resultados obtidos com absorção atômica com forno de grafite, encontrando uma similaridade significativa entre os dados, com R^2=0,97.

Iikura et al. (2001) relacionaram o acúmulo de Al em células de tabaco entre as metodologias de fluorescência com lumogalion e quantificação por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP-AES) indicando uma diferença de aproximadamente 13% de Al acumulado entre as duas metodologias, sendo que a fluorimetria apresentou resultados maiores de acúmulo de Al durante 8h de exposição a 1mM Al.

Souza (2004) encontrou uma correlação de R^2=0,86 entre o Al acumulado em células de tabaco BY-2 por fluorimetria (complexo Al-morin) e por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS).

Vitorello e Haug (1996) mostram as vantagens em se utilizar o método de fluorescência do complexo Al-morin para a detecção do Al acumulado em células de tabado BY-2 indicando que o método permite obter resultados de forma rápida, a partir de pouco volume de material vegetal, com preparo simples da amostra e é satisfatóriamente sensível para a detecção de baixas quantidades de Al acumulado.

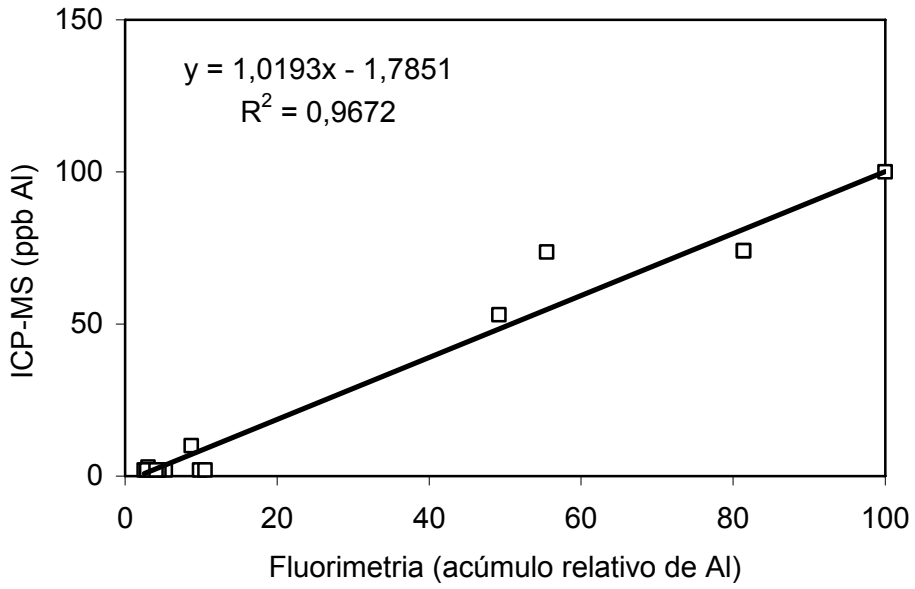


Figura 20: Correlação entre Al acumulado entre as metodologias de fluorimetria pelo complexo Al-morin e por ICP-MS em células de tabaco cv. BY-2, nas fases log e estacionária, com coeficiente de correlação entre as metodologias igual a R^2=0,96.

4.5 Estresse oxidativo decorrente da exposição ao Al e à acidez

4.5.1 Peroxidação lipídica

A Figura 21 mostra que houve peroxidação lipídica significativa nas células da fase log tratadas apenas com pH baixo (pH 4,2) e que a peroxidação quase dobrou quando se expôs estas células ao Al. Estes resultados são similares aos encontrados por Peixoto et al. (1999 e 2001) em linhagens de sorgo.

Nas células log que foram tratadas na presença de sacarose ou manitol, houve uma relação inversamente proporcional entre concentração de sacarose aplicada e peroxidação lipídica.

Ao contrário das células na fase log, as células na fase estacionária não apresentaram peroxidação lipídica significativa em nenhum dos tratamentos

aplicados (valores próximos de zero), sugerindo a ausência de danos à membrana em células tolerantes ao baixo pH e ao Al.

Comparando-se a Figura 21 com as Figuras 14, 16 e 19, nota-se uma boa relação entre a peroxidação de lipídios, acúmulo de Al e viabilidade celular em todos os tratamentos. Quando o acúmulo de Al foi elevado, a peroxidação também foi elevada e a viabilidade foi baixa. Portanto, nestas células, a peroxidação lipídica parece ser um bom indicador da sensibilidade ao Al e à acidez.

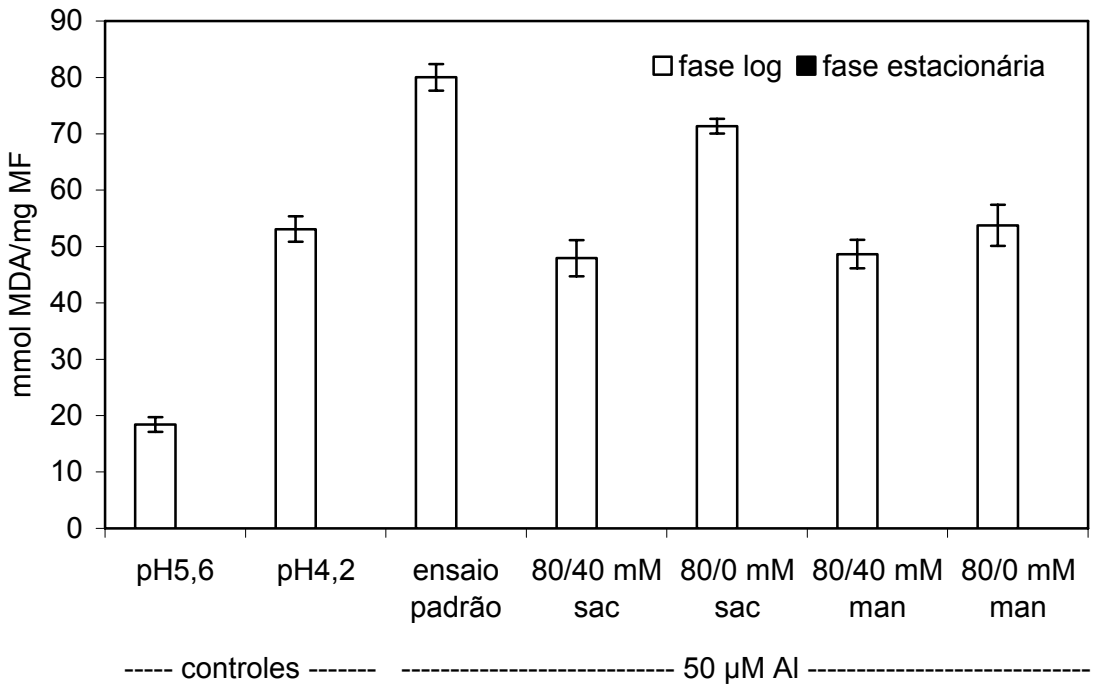


Figura 21: Peroxidação lipídica em células de tabaco cv. BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■), medida pelo teste TBA. Resultados expressos em mmol MDA/mg MF. Os resultados em células na fase estacionária foram próximos de zero, considerados desprezíveis. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2).

4.6.2 Níveis de H_2O_2

Para a determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio, primeiramente estabeleceu-se a curva padrão de calibração, com concentrações de H_2O_2 de 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 µM H_2O_2, medida a 560nm (Figura 22).

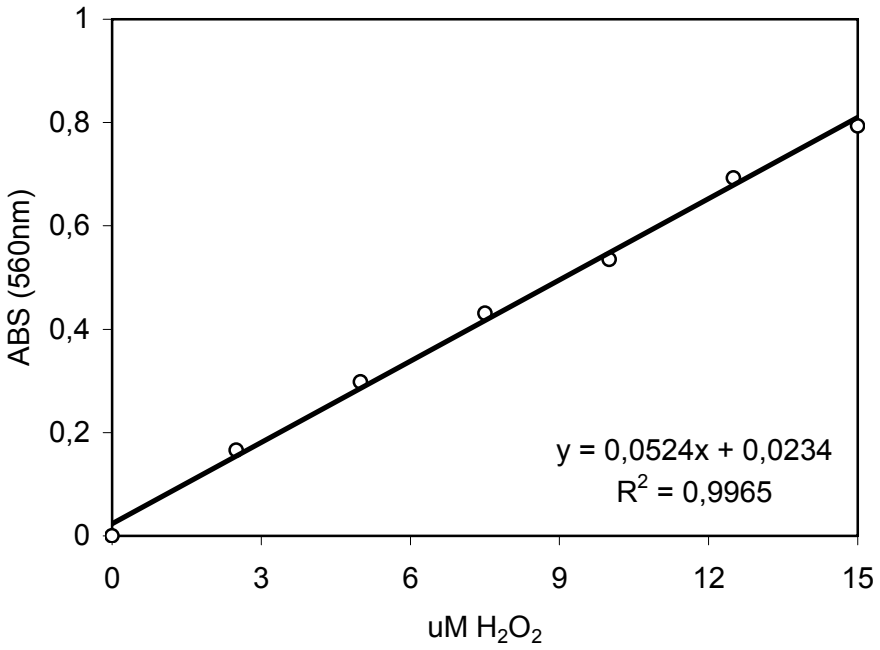


Figura 22: Curva de calibração com concentrações de H_2O_2, medida a 560nm. O coeficiente de correlação para a curva foi de R^2 = 0,9965.

A concentração de H_2O_2 nas células na fase log de crescimento submetidas a pH baixo e Al está apresentada na Figura 23. Em relação às células controles mantidas a pH 5,6, o teor de H_2O_2 aumentou cerca de 3 vezes nas células tratadas apenas com pH4,2 e 5 vezes nas células submetidas ao Al. Somado aos dados de peroxidação lipídica (Figura 21), estes resultados confirmam a ocorrência de estresse oxidativo nas células da fase log de crescimento expostas a pH baixo e Al.

Semelhante ao comportamento da peroxidação lipídica, notou-se que quando se adicionou sacarose ou manitol na solução de exposição ao Al, os níveis de H_2O_2

nas células foram menores. Os efeitos de sacarose e manitol sobre os níveis de H_2O_2 foram semelhantes para as mesmas concentrações utilizadas.

De modo geral, houve uma boa correspondência entre a indução da peroxidação de lipídios e as concentrações de peróxido de hidrogênio quantificadas. No entanto, a presença de sacarose e de manitol no meio de exposição ao Al levou a uma redução proporcionalmente maior nos níveis de H_2O_2 do que na peroxidação de lipídios.

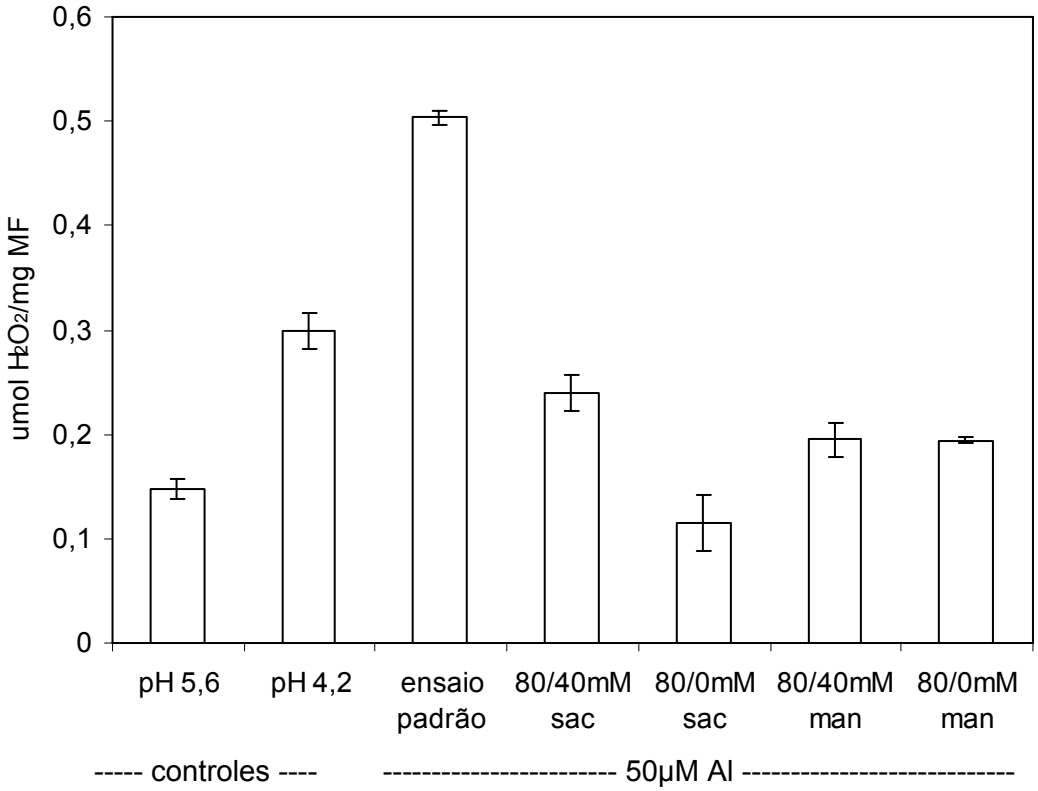


Figura 23: Concentração de H_2O_2 em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2).

Os resultados mostram também que a peroxidação lipídica não ocorreu nos mesmos níveis da geração do peróxido de hidrogênio, pois os níveis do H_20_2 foram menores. Uma possibilidade é o fato de que outras EAO's e radicais livres possam estar sendo gerados e a medição incluiu apenas o peróxido.

A correlação entre os dados dos níveis de H_2O_2 e de peroxidação de lipídios é apresentada na Figura 24. A ausência de uma correlação mais estreita se deve principalmente a dois pontos, um do controle a pH 5,6 e outro do tratamento 80/0 mM sac.

Parece ter havido uma relação mais estreita entre o acúmulo de Al e a viabilidade celular com os níveis peroxidação lipídica do que com o conteúdo de H_2O_2 (Figuras 25 e 26). Assim, podemos indicar que a peroxidação lipídica é um bom indicador da sensibilidade celular ao Al e à acidez, ao passo que os níveis de peróxido de hidrogênio não acompanharam a mesma tendência.

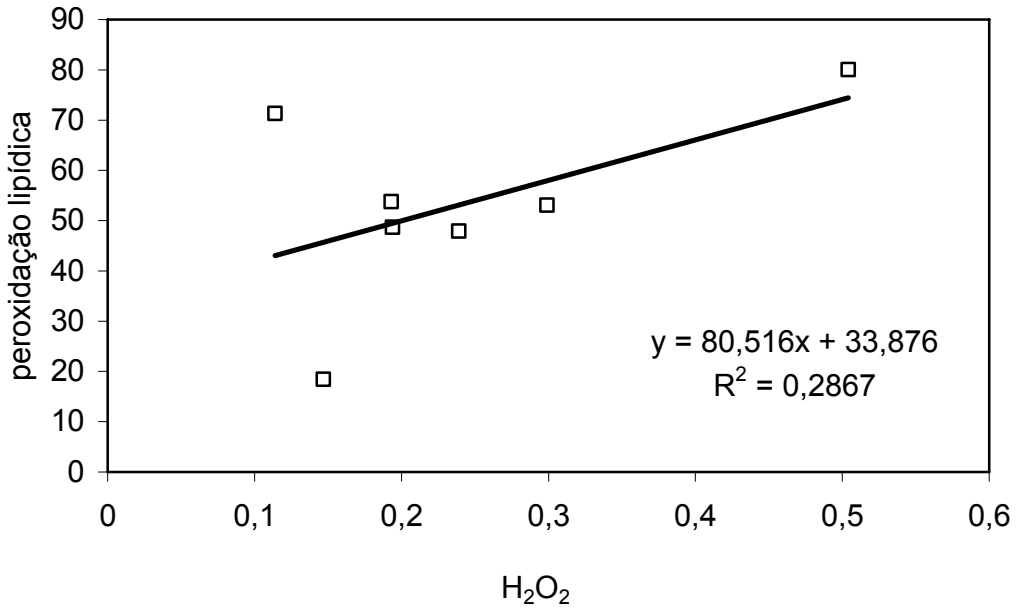


Figura 24: Correlação entre a peroxidação lipídica e o conteúdo de H_2O_2 em células de tabaco cv. BY-2. Foram utilizados dados de todos os tratamentos aplicados em células tanto na fase log como na estacionária para traçar o gráfico.

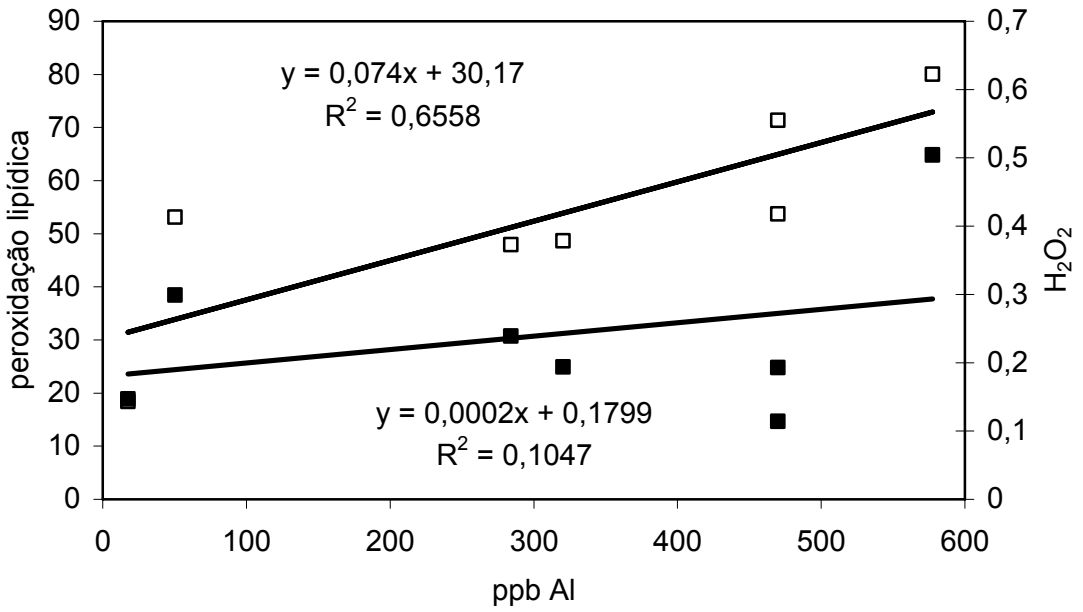


Figura 25: Correlação entre a peroxidação lipídica e o acúmulo de Al medido por ICP-MS (□), com R^2 = 0,6558 e correlação entre o conteúdo de H_2O_2 e o acúmulo de Al medido por ICP-MS (■), com R^2 = 0,1047 em células de tabaco cv. BY-2. Foram considerados os dados de todos os tratamentos aplicados às células tanto na fase log, como na fase estacionária de crescimento.

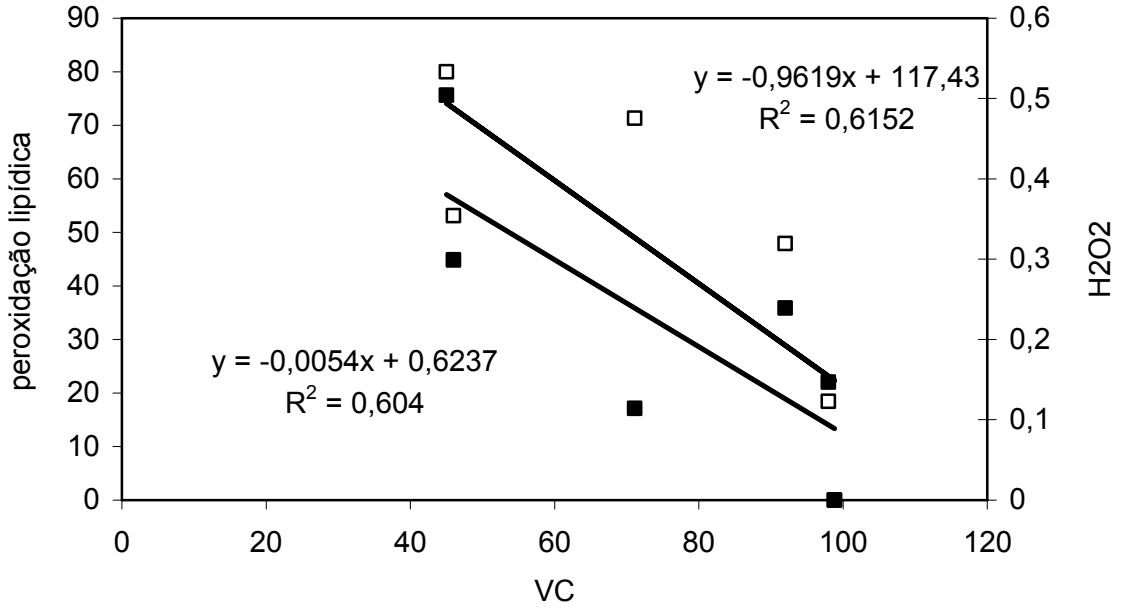


Figura 26: Correlação entre a peroxidação lipídica e a viabilidade celular (■), com R^2 = 0,6152 e correlação entre o conteúdo de H_2O_2 e a viabilidade celular (□), com R^2 = 0,604 em células de tabaco cv. BY-2. Foram considerados os dados de todos os tratamentos aplicados às células tanto na fase log, como na fase estacionária de crescimento.

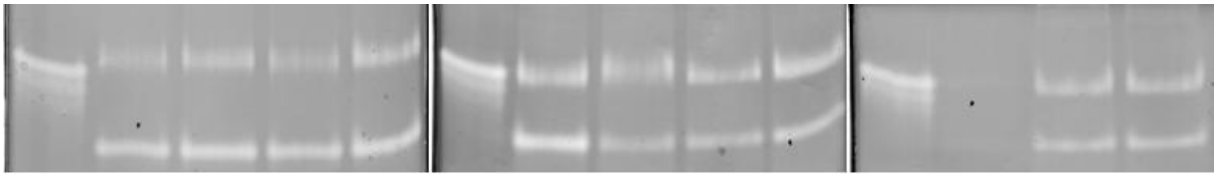
4.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes

4.5.3.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A Figura 27 mostra as bandas de SOD obtidas em gel de poliacrilamida não-denaturante (PAGE) 9%, de acordo com o padrão SOD-bovina (SIGMA) aplicado ao gel e a Figura 28 mostra a identificação das bandas correspondentes às isoenzimas Fe-SOD e Mn-SOD.

Nota-se maior intensidade das bandas referentes à isoforma Fe-SOD (Figura 27, bandas inferiores) para as células na fase log de crescimento. Para as células na fase estacionária, as bandas de Fe-SOD mostraram-se menos intensas, assim como a Mn-SOD (Figura 27, bandas superiores). De modo geral, pode-se considerar que houve maior atividade da SOD nos tratamentos da fase log em relação à fase estacionária, principalmente decorrente da Fe-SOD. Portanto, pode-se inferir que está havendo a conversão dos radicais superóxido em H_2O_2, mediada pela SOD. A comparação dos resultados obtidos com a atividade da SOD fica dificultada em relação às outras enzimas pelo fato da análise ter sido feita em gel.

Apesar de notar-se maior atividade da SOD nas células na fase estacionária, não se tem muita diferença do controle (pH5,6) para os demais tratamentos. Em plântulas de girassol a baixa atividade da SOD na presença de metais pesados favoreceu o acúmulo de radicais superóxido, que contribui para a ocorrência de danos nas membranas celulares (BHATTACHARJEE, 1998).



P 5,6 4,2 Al 80/40sac **P** 80/0sac 5,6 4,2 Al **P** 80/40sac 80/0sac

---------- fase log ---------- ---------- fase estacionária ----------

Figura 27: Bandas de SOD em PAGE 9%. P (padrão SOD-bovina) e tratamentos: pH5,6; pH4,2; 50µM $AlCl_3$; 80/40sac (lavagens com a solução padrão acrescida de 80mM sacarose e exposição ao Al em solução padrão acrescida de 40mM sacarose, pH4,2) e 80/0sac (idem ao tratamento anterior, porém a exposição ao Al foi feita em solução padrão pH4,2). Corridas simultâneas, a 4˚C, 15mA/gel, utilizando-se 60µg de proteínas/amostra.

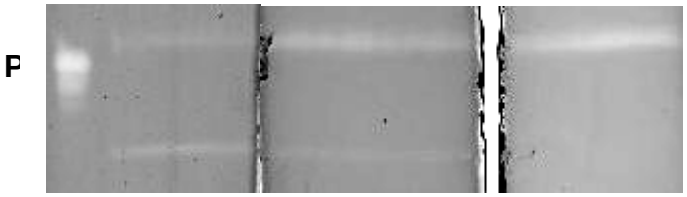


Figura 28: Identificação das diferentes isoenzimas de SOD. Estão presentes a Mn-SOD, resistente aos dois inibidores usados e a Fe-SOD, resistente ao KCN e inibida pelo H_2O_2. O gel foi dividido e tratado em 3 partes separadamente. A primeira parte (controle) foi revelada através do procedimento padrão para SOD. A corrida do gel foi realizada a 4˚C, 15mA/gel por um tempo médio de 3h, em cuba Pharmacia para mini-gel.

4.5.3.2 Catalase (CAT)

Pela ação da catalase, o H_2O_2 é convertido em H_2O e O_2, sem a produção de radicais livres. A Figura 29 mostra os resultados da atividade da catalase nos diferentes tratamentos utilizados.

Nas células na fase log, a atividade da catalase foi próxima nas células tratadas a pH 4,2, com ou sem Al, mas foi cerca de 2,5 vezes maior do que nas células controle (pH5,6). Curiosamente, a atividade da CAT foi maior no tratamento

que recebeu sacarose apenas durante as lavagens anteriores à exposição ao Al (cerca de 3 vezes maior do que o controle a pH 5,6).

Na fase estacionária, as células não apresentaram atividades apreciáveis de catalase em nenhum dos tratamentos.

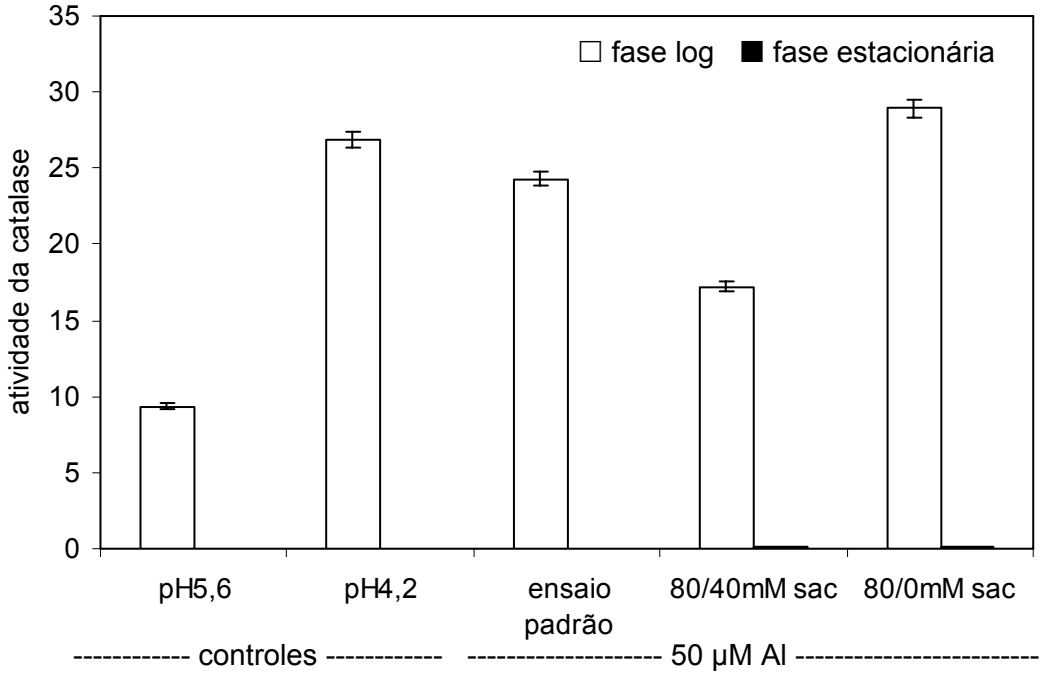


Figura 29: Atividade da catalase em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2).

4.5.3.3 Ascorbato peroxidase (APX)

A Figura 30 mostra os dados de atividade da APX em células na fase log submetidas aos diferentes tratamentos. A atividade da enzima na fase estacionária foi muito baixa, mal sendo visível no gráfico. A APX tem a função de quebrar o H_2O_2 por meio do ascorbato. Assim, a atividade da APX está relacionada ao aumento da

produção de H_2O_2 na célula, assim como ocorre com a CAT e a GST, como modo de proteger as células dos produtos do estresse oxidativo (MIZUNO et al., 1998).

A atividade da APX nas células na fase log tratadas com baixo pH e Al foi, respectivamente, 2,5 e 3 vezes maior do que em relação às células controle (pH5,6). A presença da sacarose resultou em menores atividades desta enzima, consistente com os menores níveis de peroxidação lipídica e de acúmulo de H_2O_2 nas células sensíveis ao Al (fase log). Pelos resultadados de atividade das enzimas antioxidantes, podemos indicar que a CAT e a APX tiveram ação mais direta na desintoxicação celular, pois foram as enzimas com respostas mais altas e com ação direta na quebra do peróxido de hidrogênio.

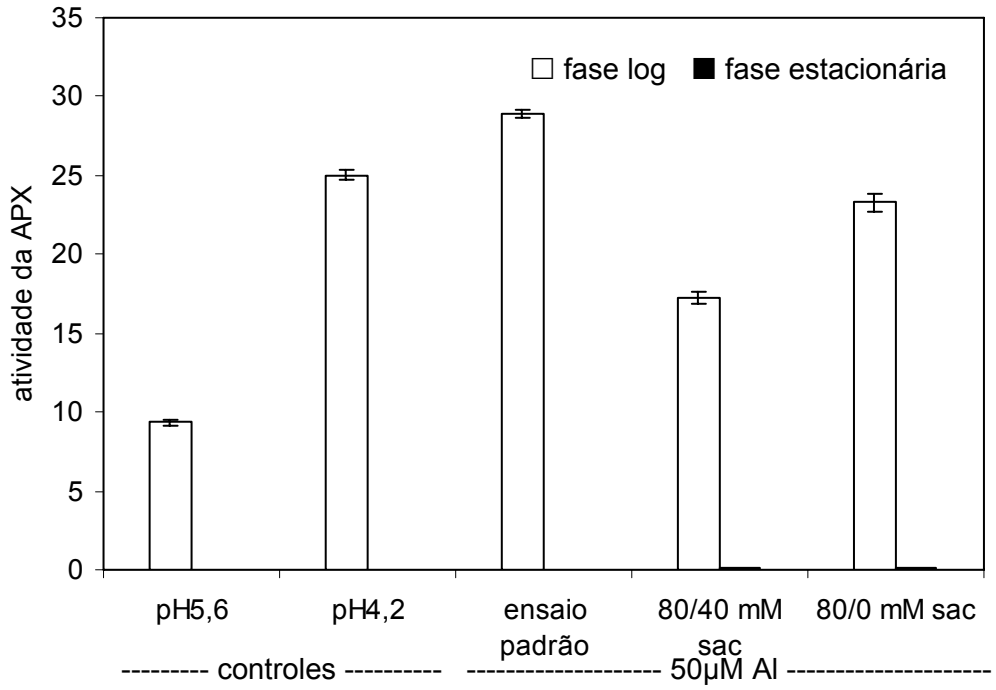


Figura 30: Atividade da APX em células de tabaco BY-2 nas fases log (□) e estacionária (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2).

4.5.3.4 Glutationa-S-transferase (GST)

Na célula, a GST tem funções antioxidantes e não antioxidantes. Uma das funções da GST é de quebrar o peróxido de hidrogênio, além de manter os grupos sulfidril (SH) em seu estado reduzido. Especula-se a relação da GST com a sinalização celular e com a regulação da apoptose, porém não se conhece a fundo o mecanismo de ação da GST nestes casos (DIXON et al., 2002). Esta enzima localiza-se no núcleo, citoplasma e na superfície celular. A atividade da GST está mostrada na Figura 31.

Sob condições de baixo pH a atividade desta enzima foi cerca de 5 vezes maior do que em relação ao tratamento com pH5,6 e na presença de Al o aumento foi de cerca de 7 vezes. Novamente, a atividade diminuiu na presença de sacarose nas lavagens e na exposição ao Al, mas esta diminuição foi mais acentuada do que observado com a CAT e APX, alcançando níveis mais próximos ao controle (pH 5,6).

Curiosamente, constatou-se atividade expressiva da GST em células na fase estacionária nos tratamentos onde a sacarose foi adicionada nas soluções de lavagem e/ou de tratamento (80/40 e 80/0 mM sac), mas atividade insignificante nos demais tratamentos em células na fase estacionária. Foi o único caso em que se encontrou um efeito dos tratamentos sobre a atividade de uma enzima antioxidante nestas células. Porém, o aumento de atividade nestes casos específicos não está associado nem a alterações na peroxidação lipídica nem a níveis de peróxido de hidrogênio e nem ao acúmulo de Al.

As funções da família de enzimas da GST em plantas são variadas. Algumas ainda são desconhecidas e outras pouco estabelecidas (DIXON et al., 2002).

Nos casos dos tratamentos específicos em células na fase estacionária onde detectou-se atividade da GST (80/40 e 80/0 mM sac), os resultados podem estar

mais relacionados a outras funções que a GST desempenha nas células, do que propriamente as funções antioxidantes. Se relacionarmos a atividade da GST ao conteúdo de carboidratos solúveis totais nos mesmos tratamentos (Figura 18), pode-se indicar que provavelmente possa estar havendo algumas alterações na programação celular, pois na fase estacionária, as células encontram-se prontas para o início do processo de divisão celular e conseqüente crescimento da cultura.

A sacarose pode, nestes casos específicos, estar agindo como um estímulo celular, já que foi metabolizada pelas células na fase estacionária (tratamentos 80/40 e 80/0 mM), fazendo aumentar o conteúdo de carboidratos e as reservas energéticas das células.

Se considerarmos que, quando atingem a fase estacionária, as células encontram-se em condições de baixa disponibilidade de nutrientes e fonte de carbono no meio de cultura e que, quando colocadas em meio novo iniciam rapidamente o processo de divisão celular, a hipótese acima parece ser aceitável.

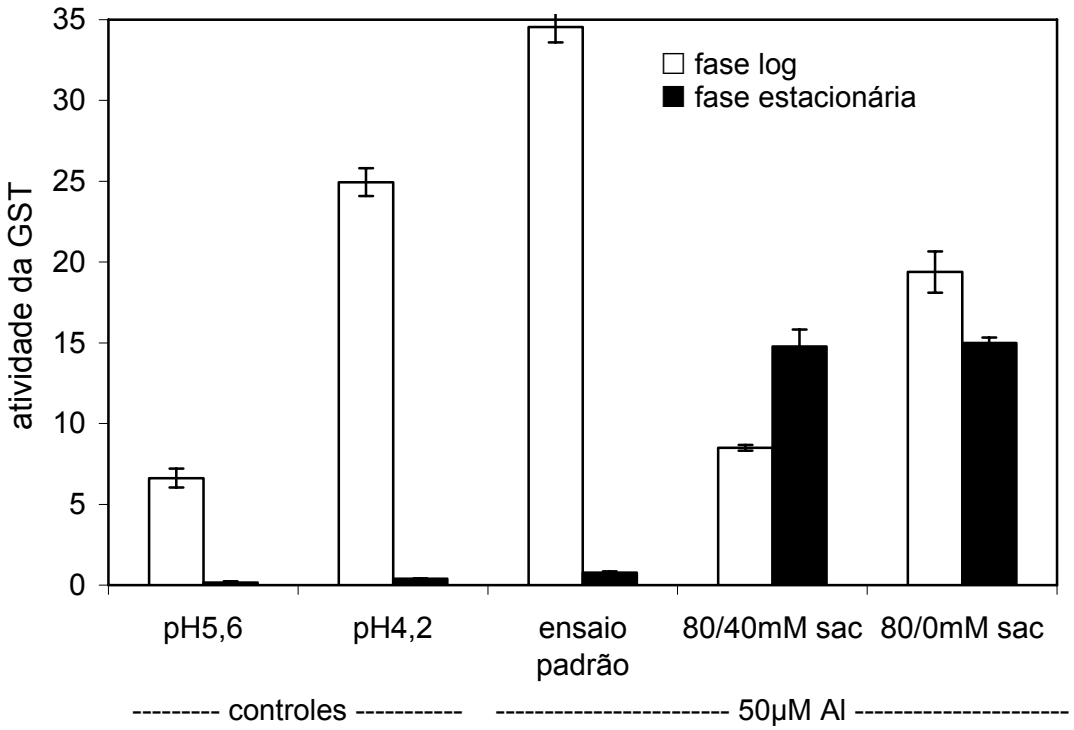


Figura 31: Atividade da glutationa-S-transferase em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2).

4.5.3.5 Glutationa Redutase (GR)

A GR tem a função principal de recuperar a glutationa que foi oxidada nas reações com as EAO's. A atividade da GR em células nas fases log e estacionária pode ser observada na Figura 32.

A glutationa reduzida é um composto antioxidante ativo nas células, principalmente no combate às EAO's (superóxido e peróxido de hidrogênio), agindo pelo ciclo Halliwell-Asada. No entanto, também tem outras funções celulares. A glutationa (GSH) é um dos principais antioxidantes celulares, sendo o componente tiol mais abundante nas plantas (LEA et al., 1998).

Com exceção dos tratamentos com pH 4,2 e Al, a atividade desta enzima foi relativamente constante e parecida entre células da fase log e da fase estacionária, indicando que talvez a atividade detectada não esteja relacionada, de forma direta, com o processo de estresse oxidativo. A relação indireta pode ser explicada pela principal função da GR, que é retornar a glutationa oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH).

As células na fase estacionária não acumulam Al e exibem atividade da GR semelhante aos demais tratamentos em células na fase log (exceto para baixo pH e Al). Isso é mais um indício de que a atividade da GR pode estar envolvida com a recuperação dos níveis de glutationa oxidada que normalmente ocorrem nas células, já que a geração de EAO's é um processo constante nas células, porém em equilíbrio. Nos tratamentos com pH 4,2 e Al em células na fase log, os níveis de oxidação da glutationa foram maiores, por isso a atividade da GR também foi maior.

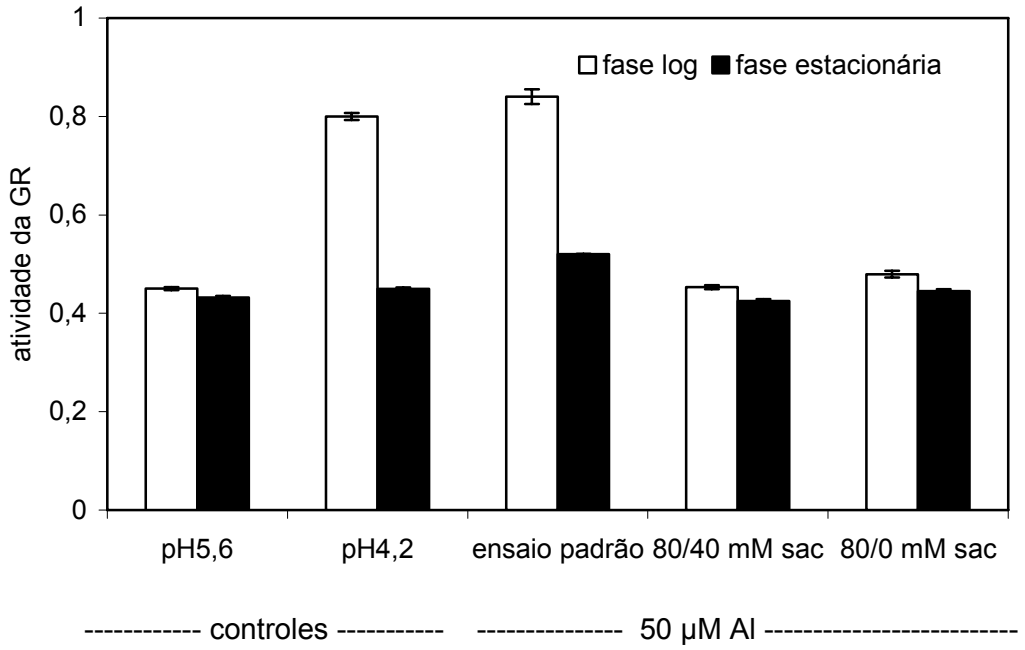


Figura 32: Atividade da Glutationa redutase (GR) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log (□) e estacionária de crescimento (■). Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2).

4.6 Uso do antioxidante BHA (Butylated Hydroxyanisole)

O BHA é um antioxidante lipofílico considerado eficiente que é incorporado nos lipídios das membranas, protegendo-as contra a peroxidação (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999).

O Al interage fortemente com os componentes dos lipídios da membrana plasmática, sobretudo com os fosfolipídios conforme a sua carga (AKESON et al., 1989). Partindo deste princípio, utilizamos o BHA para tentar eliminar ou reduzir os níveis de peroxidação lipídica nos tratamentos que receberam Al ou somente pH

baixo. Foram utilizadas duas concentrações distintas de BHA, uma considerada baixa (20μM) e outra considerada alta (100 μM).

A Figura 33 mostra os resultados da peroxidação lipídica em células de tabaco na fase log tratadas com diferentes conceitrações de BHA durante as lavagens e a exposição ao Al (2h) em comparação ao controle.

Conforme os resultados mostrados na Figura 33, a peroxidação lipídica foi influenciada pela presença do BHA nas soluções de lavagens e durante o período de exposição aos tratamentos, conferindo tolerância celular quanto à peroxidação lipídica da membrana.

A menor concentração de BHA usada nas lavagens e na exposição ao Al (20μM) já se mostrou eficiente para reduzir a peroxidação lipídica a níveis insignificantes em relação ao controle (sem BHA) em todos os tratamentos aplicados, sendo que a mesma tendência de resultados foi conseguida quando se usou a maior concentração de BHA (100 μM).

É interessante observar que no tratamento de exposição padrão ao Al, a redução do nível de peroxidação lipídica foi mais do que 10 vezes em relação ao controle quando foi usado o BHA (independente das concentrações).

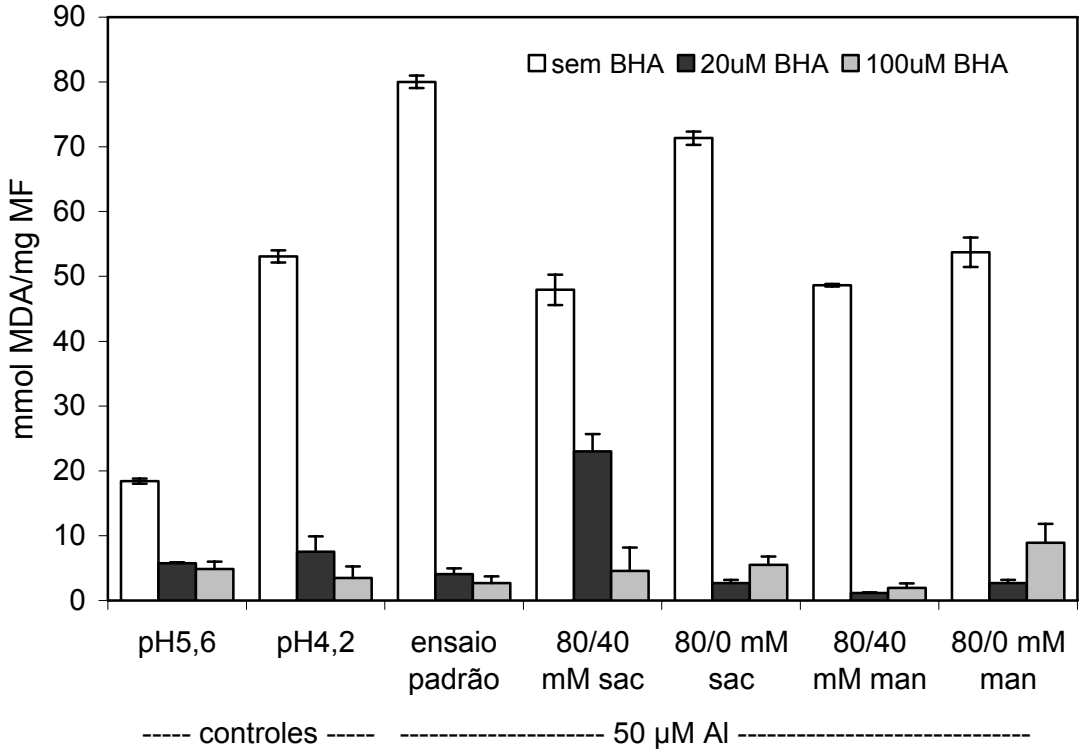


Figura 33: Peroxidação lipídica medida pelo teste TBA em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento, sob condições de acúmulo de Al padrão, com o uso de 20 µM BHA e com 100 µM BHA tanto nas lavagens precedentes à exprosição, como durante as 2h de exposição ao Al. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose ou manitol); 80/0 mM (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose ou manitol e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2).

Apesar da diminuição nos níveis de peroxidação lipídica, a viabilidade não foi recuperada em células que receberam os distintos tratamentos. Os valores de viabilidade celular (VC%) permaneceram semelhantes aos valores das células que não foram tratadas com o antioxidante BHA (Figura 30).

Os resultados estão de acordo com Yamamoto et al. (2001), que usaram 20µM de BHA durante o tratamento de raízes de ervilhas com 10µM Al por 24h. Os autores também obtiveram resultados de redução da peroxidação lipídica,

observada tanto pelo teste de TBA como também por análise histoquímica. Porém, o uso do antioxidante não afetou o acúmulo de Al nas raízes ou mesmo a perda da integridade da membrana plasmática celular.

A presença do Al juntamente com o BHA não preveniu a inibição da elongação radicular (YAMAMOTO et al., 2001). Em nossos resultados, o BHA também não inibiu a perda da viabilidade celular nos tratamentos que receberam Al ou somente mantidos sob condição de acidez (pH 4,2) (Figura 34).

Yamamoto et al. (2001) sugerem que o acúmulo de Al, a perda da integridade da membrana plasmática e a inibição da elongação radicular não são eventos diretamente derivados da peroxidação lipídica.

Foi relatado que o acúmulo de Al causou disfunções na mitocôndria, que incluiram a formação das ROS, inibição da respiração e queda no nível de ATP. Sendo assim, a produção de ROS pareceu ser o ponto crítico para a inibição do alongamento radicular e da divisão celular e não a peroxidação lipídica (YAMAMOTO et al., 2003).

A oxidação de proteínas também pode ser um fator de disfunção celular, gerando produtos como aldeídos e carbonilos. Assim, uma possibilidade é de que o BHA protege os lipídios da peroxidação, mas não as proteínas e a geração de ROS na célula. Por isso a viabilidade celular não foi mantida em altos níveis e a cultura não recuperou o crescimento e a viabilidade celular no período que seguiu a exposição ao Al e ao baixo pH.

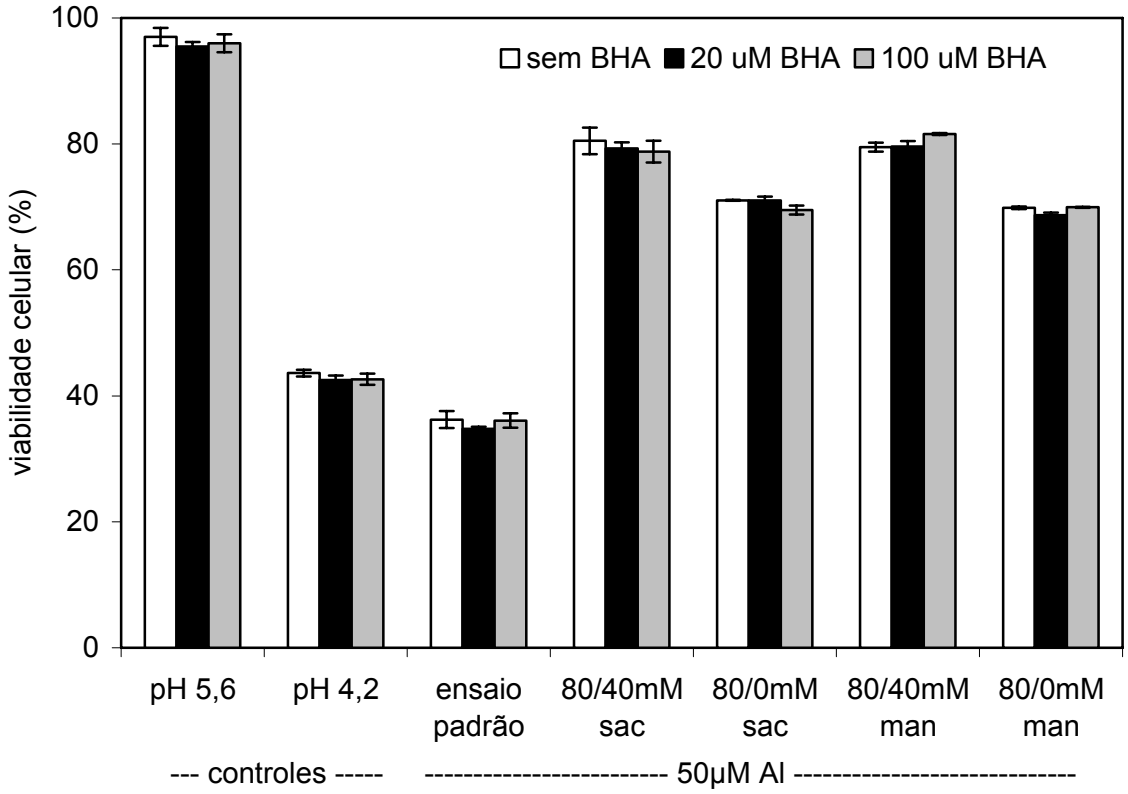
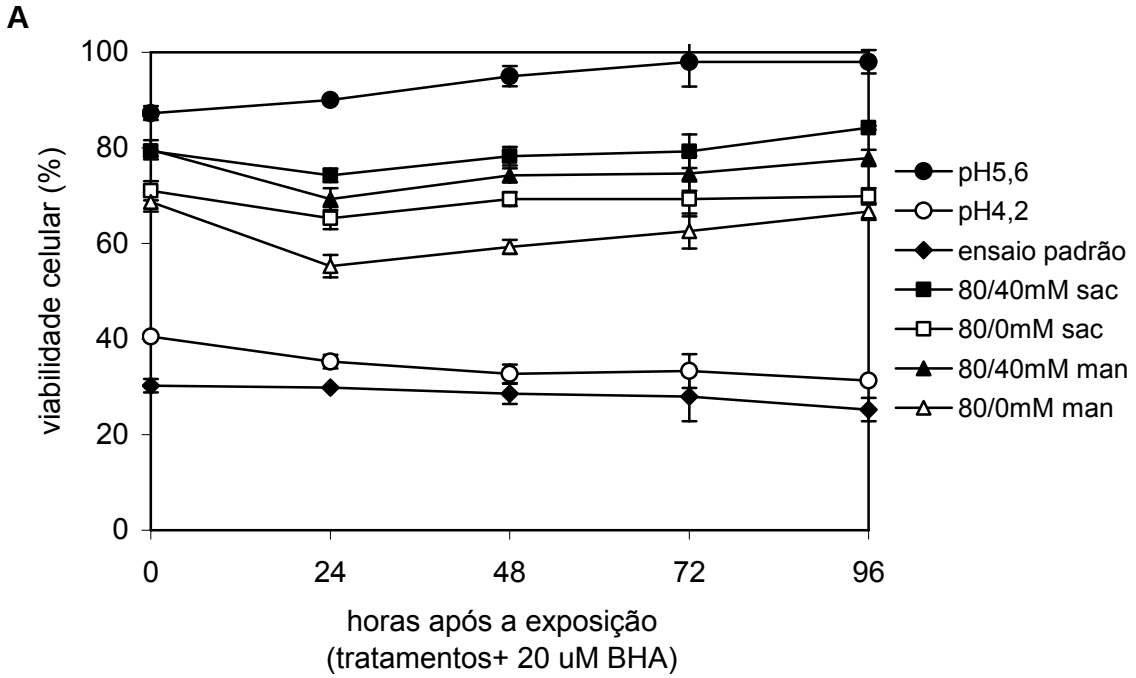


Figura 34: Viabilidade celular (VC%) em células de tabaco cv. BY-2 na fase log de crescimento. O tratamento sem BHA é o experimento padrão de exposição ao Al; o tratamento 20µM BHA recebeu esta concentração do antioxidante nas soluções de lavagens e durante a exposição; idem para o tratamento 100 µM BHA. Controles: pH5,6 (lavagens e exposição a pH5,6); pH4,2 (idem, porém pH4,2); ensaio padrão (lavagens em sol padrão pH4,2 e exposição ao Al em sol. padrão), 80/40 mM sac (lavagens em sol. padrão pH4,2 + 80mM de sacarose e exposição ao Al em sol. padrão + 40mM sacarose); 80/0 mM sac (lavagens em sol. padrão + 80mM sacarose e exposição ao Al em sol. padrão pH4,2).

5.6.1 Crescimento e viabilidade celular após a exposição aos tratamentos e com o uso do BHA

Foi avaliado também o possível papel do BHA na recuperação da viabilidade celular da cultura (VC%) e do crescimento celular (ICC%) durante 96h para as duas concentrações de BHA usadas (20 e 100µM). Os resultados estão mostrados nas Figuras 35 e 36.



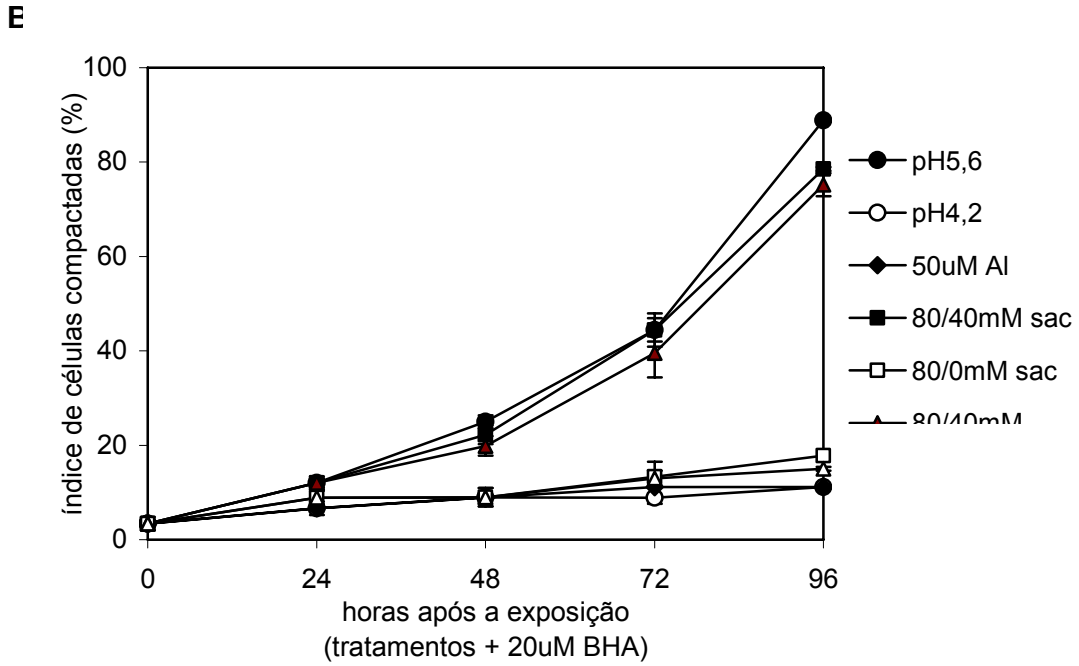


Figura 35: (A) Viabilidade celular (VC%) e (B) crescimento celular (ICC%) da cultura de células BY-2 submetida aos diferentes tratamentos na presença de 20µM BHA. O ICC foi medido a cada ao final das 2h de exposição e a cada 24h até 96h após a realização do experimento. A medição deu-se por centrifugação da suspensão celular a 200*g* por 2min

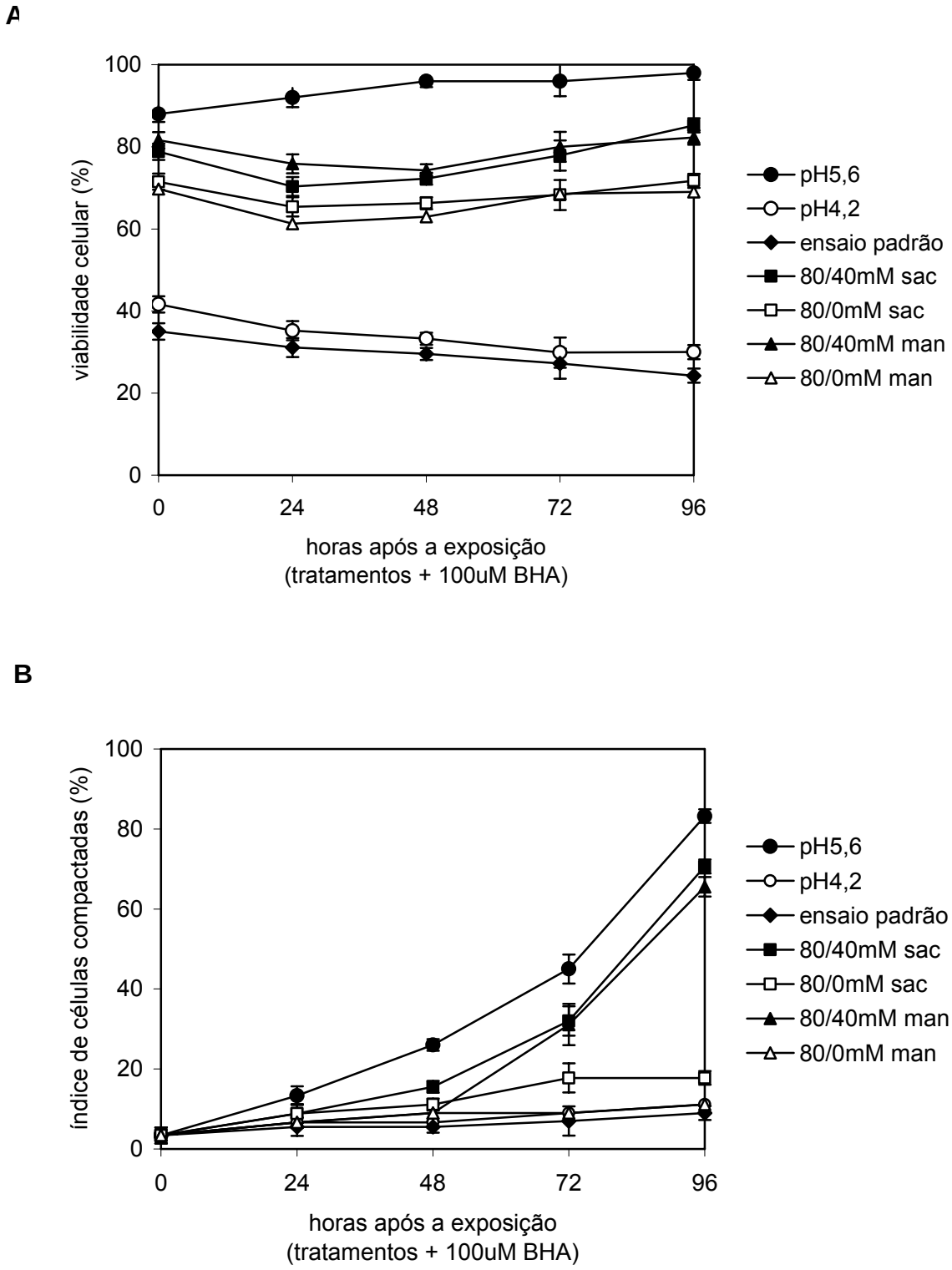


Figura 36: (A) Viabilidade celular (VC%) e (B) crescimento celular (ICC%) da cultura de células de tabaco cv. BY-2 na fase log submetidas aos diferentes tratamentos na presença de 100µM BHA após a exposição. O índice de compactação celular foi medido a cada ao final das 2h de exposição aos tratamentos e a cada 24h até 96h após a realização do experimento. A medição deu-se por centrifugação da suspensão celular a 200*g* por 2min.

Comparando os resultados de viabilidade e crescimento obtidos após a exposição com e sem o uso de BHA (Figuras 35 e 36), não é possível detectar um possível efeito do antioxidante sob estas propriedades. Os resultados com BHA (independente da concentração usada) são semelhantes com os resultados obtidos quando não se usa o antioxidante no tratamento das células.

Apesar do papel na diminuição da peroxidação lipídica das células expostas ao Al e à acidez, o BHA não tem papel sobre a manutenção da viabilidade celular durante a exposição. Isso sugere que talvez a viabilidade das células seja afetada por fatores além da peroxidação dos lipídios das membranas.

A cultura manteve-se viável e com alta taxa de crescimento no tratamento a pH 5,6, indicando que a manipulação celular durante o período de realização dos experimentos não causou danos às amostras coletadas. Nos tratamentos que receberam osmólitos nas lavagens e na exposição também houve recuperação tanto da viabilidade como do crescimento. Os tratamentos que receberam osmólitos somente durante as lavagens mantiveram níveis satisfatórios de viabilidade, porém não recuperaram o crescimento em altas taxas. As células tratadas com baixo pH e Al não conseguiram recuperar nem a viabilidade celular e nem as taxas de crescimento, permanecendo praticamente com taxas de VC% entre 35 e 40% até as 96h de análise e com ICC% abaixo de 20% no mesmo período (Figuras 35 e 36).

4.7 Análises sobre a membrana plasmática

4.7.1 Perfil Protéico de frações enriquecidas com Membrana Plasmática

O estudo envolvendo proteínas da membrana plasmática foi realizado com caráter exploratório, buscando diferenças de expressão que pudessem estar relacionadas com a ocorrência da sensibilidade e da resistência aos tratamentos

aplicados, de acordo com a fase de crescimento da cultura. Entretanto, seria de valiosa importância que pudéssemos ter seqüenciado alguns dos spots,identificados como sendo de interesse para que tivéssemos indicações mais seguras dos eventos que poderiam estar ocorrendo e das proteínas expressas, de acordo com cada tratamento.

As frações enriquecidas de membrana plasmática foram submetidas ao processo de eletroforese bi-dimensional, sendo obtidos, no mínimo, 3 géis por tratamento, para a confirmação do perfil protéico. Os géis foram analisados com uso do software Melanie/Image Master (Amersham-GE).

Na Figura 37 estão apresentados os géis das proteínas de membrana plasmática provenientes de células na fase log e estacionária obtidas sob condições padrões de crescimento a pH 5,6. Nos dois géis, a maioria dos spots foi encontrado na área correspondente a PI ácido, porém observam-se spots presentes em toda a área do gel.

Foram identificados 89 spots no gel correspondente à fase estacionária. As massas moleculares variam entre 12 e 218Kda e os PI entre 3 e 9. Porém, nota-se a presença da maioria dos spots na região de massa molecular entre 130 e 170Kda e de PI entre 3 e 6.

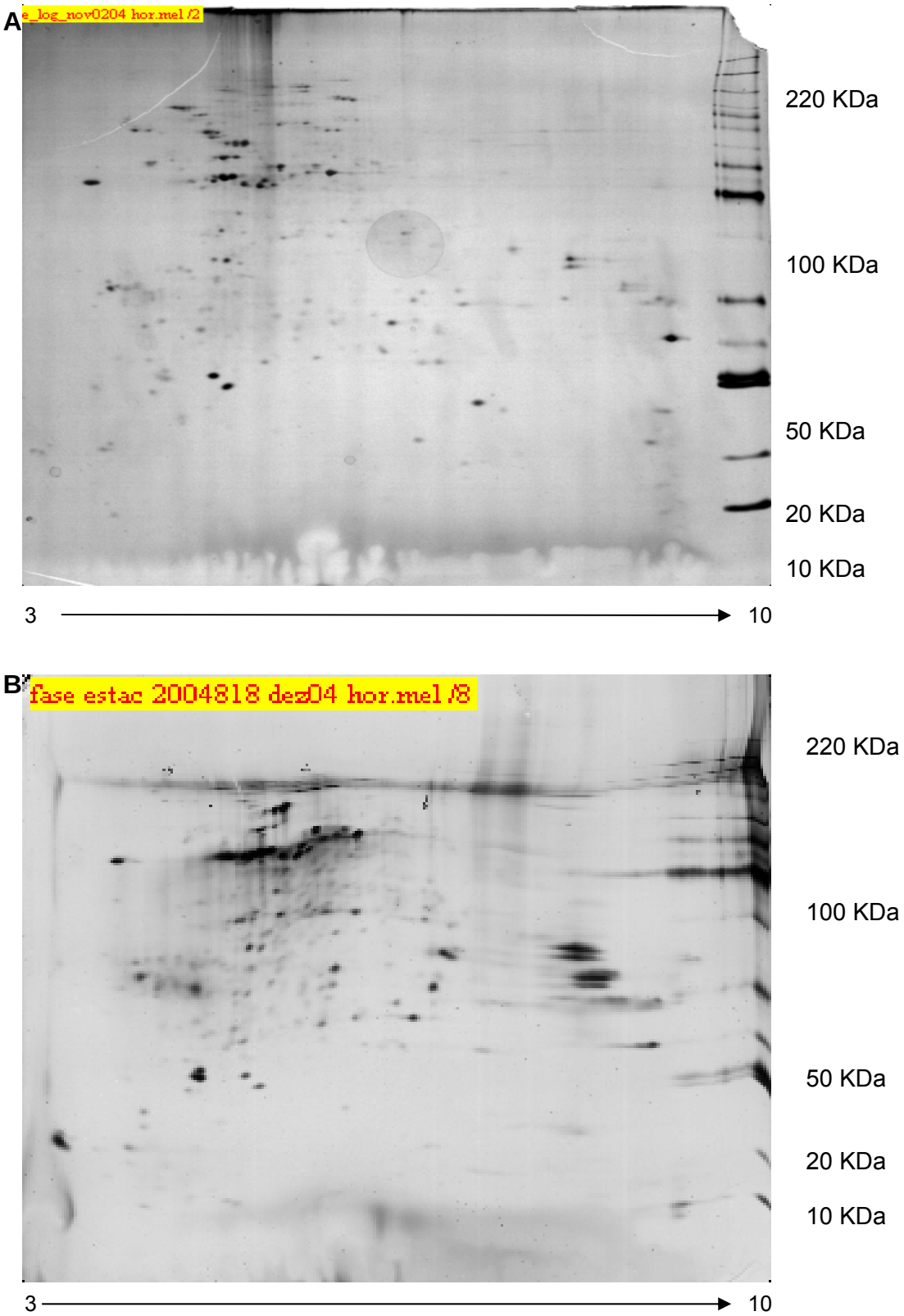


Figura 37: Perfil protéico das células tratadas sob condições de pH 5,6. Os géis correspondem a (A) fase log e (B) fase estacionária de crescimento. As proteínas foram separadas na 1ª. Dimensão com o uso de fitas de pH imobilizado na faixa de 3 a 10 e na 2ª. Dimensão por SDS-PAGE gradiente 8-16%. Foram usadas 75µg proteína em cada gel

Os resultados dos perfis protéicos de células tratadas com Al estão ilustrados na Figura 38, para as células na fase log (A) e estacionária (B).

Os géis que mostram o perfil de proteínas de células submetidas ao Al mostram também proteínas com pH ácido e de alto peso molecular, porém encontramos diferenças em suas expressões quando comparadas ao controle (pH 5,6) e quando se comparam os perfis de células na fase log e estacionária, expostas ao Al. No gel referente à fase log (Figura 38A) observa-se um perfil mais distribuido de spots em todo o gel, podendo ser identificados 161 spots, sendo que a maioria apresentou massa molecular acima de 150Kda e PI entre 4 e 7. Analisando todo o gel (Figura 38A) puderam ser identificados spots com massa molecular desde 17 até 180 e com PI entre 3,53 a 7,9.

Comparando-se os géis da fase estacionária do controle e com Al vemos que a intensidade dos spots aumentou quando se aplicou Al às células. No caso dos tratamentos com Al e de acordo com a literatura, além da expressão diferencial causada pelo estresse, pode estar ocorrendo agregação de proteínas, resultado da oxidação das mesmas, ou fragmentação de partes de proteínas, liberando peptídios.

As diferenças de sensibilidade ao Al entre células da fase log e estacionária de crescimento são decorrentes de diferenças intrínsicas destas células que existiam originalmente, antes de se aplicar os tratamentos de pH baixo e Al. Suspeita-se que as diferenças relevantes para a sensibilidade ao Al estejam localizadas no contínuo parede celular – membrana plasmática – citoesqueleto (Vitorello et al., 2005). Portanto, o objetivo de se comparar o perfil protéico da membrana plasmática de células crescidas em condições normais (Figura 37) foi de tentar encontrar estas possíveis diferenças.

Por outro lado, a exposição ao pH baixo e Al também certamente gera uma resposta da célula, que pode ser diferente dependendo do tipo celular em questão. Portanto, a análise do perfil protéico apresentado na Figura 38 tem como objetivo identificar as protéinas induzidas pelo tratamento ao Al.

Embora os resultados sejam, por enquanto, ainda exploratórios e incompletos, são bastante importantes por diversas questões.

Primeiramente, é possível concluir que há diferenças importantes para serem exploradas, tanto no perfil protéico pré-existente nas células log e estacionária (Figura 37), quanto no perfil induzido pelo Al (Figura 38). Curiosamente, esperava-se encontrar as maiores diferenças entre células da fase log e estacionária, independente da exposição ao Al. No entanto, observou-se que as maiores diferenças foram induzidas pelo Al (Figura 38). O estudo das proteínas de membrana induzidas ou reprimidas pelo Al é inédito na literatura.

Outra questão importante é que há um esforço sendo realizado no sentido de se levantar o proteoma destas células de tabaco BY-2 (SANTONI et al., 1998; 1999), por se constituirem em modelo celular vegetal tão importante. No entanto, até o momento, não há informações sobre o proteoma da membrana plasmática. Aliás, de modo geral, há poucas informações sobre o proteoma da membrana plasmática, principalmente em plantas. Não se pode deixar de enfatizar a grande dificuldade técnica e o desafio que é tentar obter o proteoma de membranas.

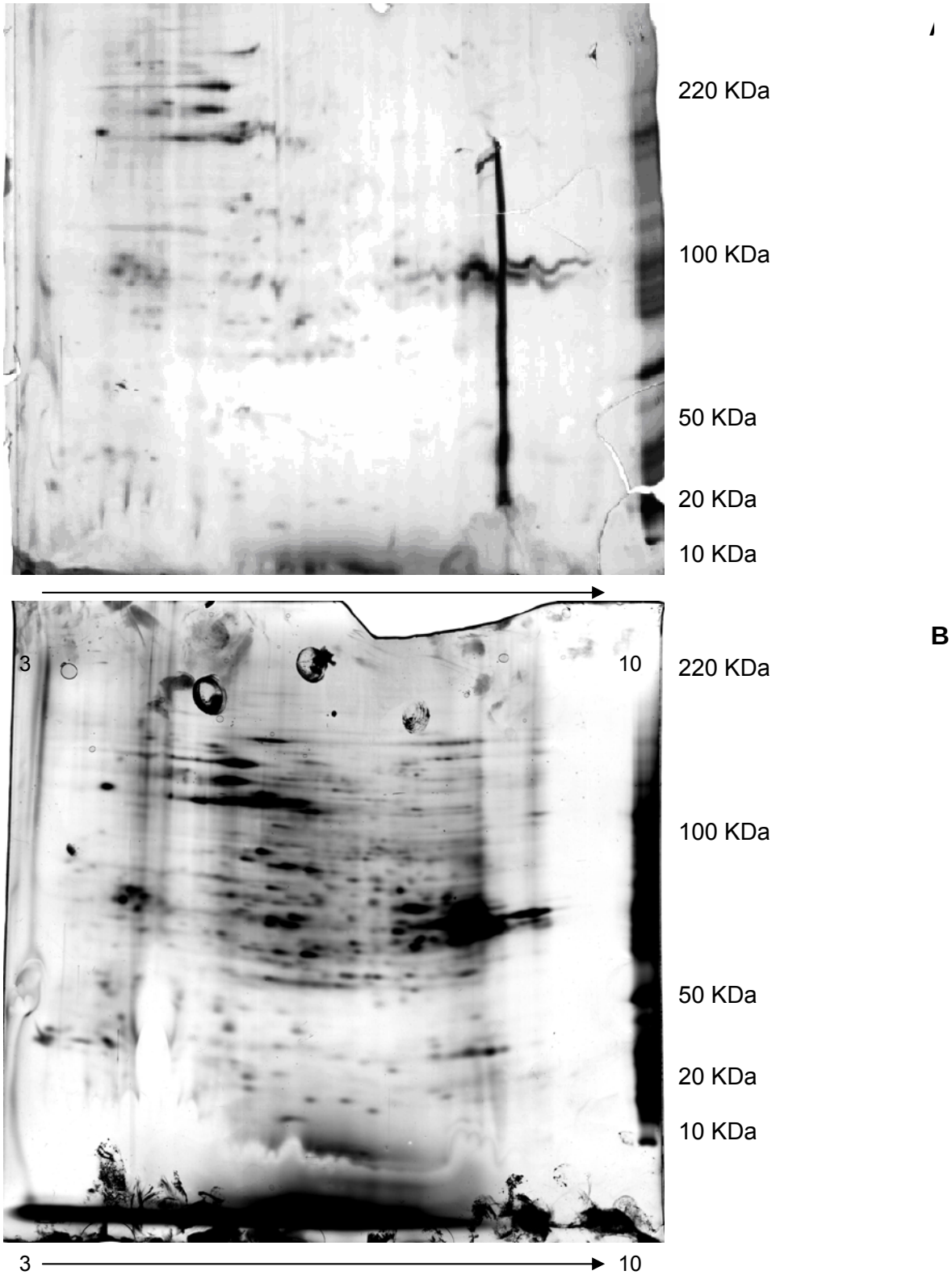


Figura 38: Perfil protéico das células tratadas com Al. Géis: (A) fase log e (B) fase estacionária. As proteínas foram separadas por IEF pH 3 a 10 e SDS-PAGE 8-16%. Foram usadas 75 µg proteína em cada gel.

4.8 Sensibilidade diferencial ao Al e estresse oxidativo

Yamamoto et al. (2003) verificaram que o Al interage com células em divisão e expansão, mas não com células quiescentes em raízes de plantas. Traçando um paralelo com os dados de acúmulo de Al nas diferentes fases de crescimento analisadas, podemos verificar que as células BY-2 na fase log de crescimento (intensa divisão celular) acumulam Al, exibem baixa viabilidade celular, apresentam atos índices de peroxidação lipídica e de H_2O_2 quando comparadas ao controle (pH 5,6). Pelo fato de haver a geração de espécies ativas de oxigênio e de radicais livres, ocorre a ativação das enzimas antioxidantes, como resposta de defesa celular.

Sob condições somente de acidez (células tratadas com pH 4,2) os mesmos efeitos danosos são observados, porém em menor escala, mostrando que a condição ácida é prejudicial ao desenvolvimento celular, porém, ocorre o agravamento destas condição na presença do Al.

Correlações entre acúmulo de Al e viabilidade celular em todos os tratamentos realizados e nas duas fases de crescimento indicam que existe uma relação direta entre os dois eventos. Em células sensíveis, o acúmulo de Al parece estar diretamente relacionado à produção de H_2O_2, indução de peroxidação lipídica e a consequente queda na viabilidade celular.

As células na fase estacionária mostraram-se insensíveis à presença do Al e à condição de acidez. O acúmulo de Al foi insignificante, a manutenção da vicbilidade celular foi alta, e os resultados de peroxidação lipídica e quantificação de H_2O_2 foram próximos de zero. Isso fez com que o sistema antioxidante celular não fosse ativado, pela ausência do desbalanço na produção de íons superóxido e radicais livres, que desencadeia o processo de estresse oxidativo nas células.

O incremento na atividade da SOD nas células da fase log em relação à fase estacionária sugere um aumento no conteúdo de radicais superóxido, pois a SOD transforma estes radicais em H_2O_2. Esse aumento foi mais significativo nos tratamentos onde se observou baixa viabilidade celular, tanto pela condição de baixo pH como de presença do Al, indicando perda da integridade da membrana plasmática. O aumento das concentrações de H_2O_2 fez com que as enzimas antioxidantes aumentassem sua atividade, sendo que a CAT, APX e GST atuam diretamente na quebra do peróxido de hidrogênio e a GR atua na recuperação da glutationa que foi oxidada na presença das EAO's, como modo de defesa celular aos agentes oxidantes. Por causa desta função específica, a atividade da GR foi praticamente a mesma em todos os tratamentos tanto da fase log como da estacionária, com exceção da exposição de células na fase log ao baixo pH e ao Al. Como a geração de EAO's em baixos níveis é contínua na célula, a GR tem que recuperar a glutationa oxidada constantemente.

A literatura aponta que o aumento da atividade da SOD é um modo de sinalização do processo de estresse oxidativo, pois a enzima é a primeira linha de defesa da célula contra as EAO's (SIMONOVICOVÁ et al., 2004). Outros autores como Yamamoto et al. (2003) indicam que a geração das EAO's é o primeiro sinal do processo de estresse oxidativo e não a peroxidação lipídica. O fato é que os processos e reações são dinâmicas e acontecem em forma de cascata, muitas vezes em concomitância de tempo, portanto, fica difícil confirmar qual é o primeiro processo ou o primeiro sinal da célula em resposta ao estresse oxidativo. O que pode-se verificar é que a célula ativa o sistema enzimático e o ciclo ascorbato-glutationa na tentativa de eliminar as EAO's e, com isso, restabelecer seu equilíbrio.

Apesar das células na fase log de crescimento apresentarem altas taxas de atividade de enzimas antioxidantes, a ação do sistema antioxidante não foi suficiente para desintoxicar as células na fase log dos radicais formados e da peroxidação lipídica resultantes dos danos causados pelo Al e pela condição de baixo pH. Não se encontrou nenhuma evidência de que as menores concentrações de H_2O_2 e de peroxidação de lipídeos das células da fase estacionária estivessem relacionadas ao sistema antioxidante.

Os danos causados pelo Al e pela condição ácida (pH 4,2) não causaram a morte das células em sua totalidade, mas o dano na vialibilidade celular das células na fase log foi irrecuperável, conforme os resultados de crescimento e vialbilidade celular após a exposição ao Al, quando se compara com os dados das células controle (pH 5,6). Nestas células o crescimento foi normal e a viabilidade manteve-se acima dos 90% durante as 96h de análise após a exposição aos tratamentos.

4.9 Interação entre Al, osmólitos e membrana plasmática

Por razões que podem estar relacionadas à alterações na composição e estrutura da membrana plasmática, as células na fase estacionária não acumulam Al e o seu sistema antioxidante não foi ativado.

As condições de estresse são inúmeras, tanto bióticas como abióticas e elas podem comprometer a atividade das biomoléculas. A ampla utilização de osmólitos tornou-se uma estratégia frquentemente observada nos organismos vivos para assegurar a sua sobrevivência sob condições adversas (RHODES, 1987; SOMERO, 1986).

O acúmulo de Al e, consequentemente os danos causados pelo estresse oxidativo são menos acentuados em células sensíveis tratadas com osmólitos

(sacarose e manitol). A presença destas substâncias altera a osmolaridade da solução de tratamento e exposição celular, podendo fazer com que a célula esteja num meio hipertônico, com isso, perde água para o meio.

Os osmólitos podem desencadear o processo de ajuste osmótivo entre as células e o meio externo, fazendo com que os canais de troca funcionem em menor intensidade e perdendo água para o meio externo.

Em microrganismos, sabe-se que dissacarídeos como a sacarose e a trealose mantém a integridade celular sob situações de estresse. Quando são absorvidos pelas células, encontram-se em ambos os lados da membrana plasmática e também em contato com proteínas internas e citosólicas. Esse contato confere às células uma tolerância maior à seca ou à variação de temperatura, por exemplo. Os solutos agem na manutenção e no abaixamento da temperatura da transição de fases da membrana plasmática e ajudam a manter a estrutura das proteínas (LESLIE et al., 1995).

Os osmólitos orgânicos são usados em células animais e vegetais para a adaptação aos estresses hiper e hipo-osmóticos (MOECKEL et al., 2002).

Os osmólitos permitem que as proteínas mantenham sua atividade biológica pois atuam como estabilizadores de suas estruturas sem influenciar sua função celular (BOWLUS; SOMERO, 1979; YANCEY, 1988).

Tian e Russell (1999) estudaram o efeito de quatro açúcares exógenos em suspensões celulares de tabaco: sacarose, glicose, manitol e sorbitol. Quando estes compostos foram adicionados ao meio de cultura ou à soluções de tratamento de células, a osmolaridade do meio decresceu durante um subcultivo. A osmolaridade dos meios que continham glicose e sacarose decresceu mais rapidamente e o

aumento de peso fresco das culturas foi 10 vezes maior que o peso das células cultivadas em manitol ou sorbitol (não absorvidos pelas células de tabaco).

A osmolaridade do meio de cultura varia conforme os componentes vão sendo metabolizados e pode interferir no crescimento da cultura, na obtenção de células gaméticas e zigotos (TIAN; RUSSEL, 1999).

A manutenção das concentrações dos solutos intracelulares e do volume celular é um pré-requisito para o funcionamento otimizado da célula. Alterações na osmolaridade do meio extracelular são seguidas, normalmente, por alterações nas concentrações dos solutos intracelulares e do volume celular, juntamente com o fluxo de água e íons da membrana celular (MACKNIGHT, 1988).

As células podem responder à flutuação osmótica através de alterações em seu volume, que ocorre por meio da ativação dos sistemas de transporte da membrana, pelo influxo e efluxo de solutos orgânicos e inorgânicos (MOECKEL et al., 2002).

A atividade de algumas ATPases de eritrócitos aumentou conforme se aumentou a osmolaridade da solução, partindo-se de zero, até 20 μM de sorbitol. Em soluções com 50 até 250 μM de sorbitol a atividade decresceu, chegando próxima a zero na concentração máxima de sorbitol usada (MOECKEL et al., 2002).

Quanto ao efeito protetor das células de eritrócitos pelos osmólitos, Moeckel et al. (2002) relataram que que os solutos orgânicos, como o sorbitol promoveram a proteção celular conforme a concentração usada no tratamento das células e também que afetam a atividade das bombas de Na^+/K^+, coforme a concentração usada. Os autores sugerem também um papel indireto dos osmólitos na proteção celular, alterando a estrutura física da membrana e, com isso, promovendo condições menos favoráveis à operação das bombas, o que pode resultar num

decréscimo da atividade das ATPases. Fica evidenciado o papel dos osmólitos na regulação funcional das ATPases das membranas celulares, nos processos osmo-adaptativos e na prevenção de danos sob condições de estresse hipo e hiperosmótico. Porém o mecanismo pelo qual os osmólitos autam ainda não está totalmente claro.

Em protoplastos de ervilha, o uso de sacarose e rafinose foi benéfico à tolerância contra a dissecação e o benefício não ocorreu apenas pelo efeito osmótico, mas também porque a presença dos osmólitos protegeu a semipermeabilidade da membrana (HALPERIN; KOSTER, 2006). As membranas são particularmente vulneráveis aos estresses físicos e considerados o sítio primário de danos em células sensíveis (BRYANT et al., 2001).

Não se sabe, com certeza, qual é o papel da sacarose, do manitol ou de íons como o Ca^{2+} na amenização dos efeitos do estresse, mas trabalhos apontam que estes elementos podem estar relacionados a um enrijecimento da membrana plasmática e/ou a um aumento da osmolaridade das soluções utilizadas, o que dificultaria a ação dos agentes causadores de estresse (WANG; STUTTE, 1992; STOOP; PHARR, 1993; POMPER; BREEN., 1997; SHEN et al, 1999; TIAN; RUSSEL, 1999; GIBSON, 2000).

Pode-se indicar claramente que a presença de sacarose e manitol nas soluções de lavagens e tratamento em células na fase log amenizou os efeitos da acidez e do Al, diminuindo o acúmulo e mantendo níveis intermediários de viabilidade celular. As células na fase log tratadas com osmólitos e expostas ao Al e ao pH4,2 conseguiram recuperar o crescimento e a viabilidade da cultura em 96h, ao passo que as células tratadas com baixo pH e Al sem osmólitos não conseguiu tal recuperação. Houve influência também na peroxidação lipídica, na concentração de

H_2O_2 e a atividade das enzimas antioxidantes foi amenizada na presença dos osmólitos. Os resultados foram semelhantes tanto para sacarose quanto para manitol, evidenciando que o papel dos osmólitos provavelmente não incide sobre o metabolismo energético das células, já que o manitol não é metabolizado pelas células BY-2.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados e discutidos, podemos concluir que:

As células na fase log são sensíveis tanto à condição de acidez, como à exposição ao Al. As células na fase estacionária resistem à condição de acidez e a presença do Al nas soluções de tratamento, mantendo altos níveis de viabilidade celular e níveis insignificantes de acúmulo de Al.

Nestas células, a viabilidade celular se correlacionou bem com o acúmulo de Al, sendo inversamente proporcional a este. O acúmulo de Al foi, portanto, um bom indicador da sensibilidade das células ao Al.

Nas células sensíveis (fase log), os danos celulares causados pela acidez e pelo Al após 2 h de exposição foram irreversíveis pois as células não conseguiram recuperar o crescimento e a viabilidade celular mesmo quando incubadas em meio de cultura novo sem Al por um período de até 96h.

O uso de sacarose e manitol nas soluções de lavagens e de tratamento reduziu o acúmulo de Al e aumentou a viabilidade celular nas células da fase log (sensíveis ao Al). Estes efeitos foram suficiente para que a cultura se recuperasse quando recolocada em meio de cultura novo e sem Al por 96h.

Não se sabe ao certo qual o papel destes compostos sobre a célula, mas o mais provável é que seja um efeito osmótico e possivelmente relacionado ao turgor celular.

Em relação ao estresse oxidativo, foi possível relacionar a sua ocorrência com a sensibilidade celular ao Al. Quando as células na fase log de crescimento foram expostas ao Al houve peroxidação lipídica na membrana plasmática e aumento nos

níveis de H_2O_2. Nestas células, a peroxidação de lipídios foi um bom indicador da sensibilidade das células ao Al.

Nas células da fase log, houve ativação do sistema enzimático antioxidante. Entretanto, a ativação destas enzimas não impediu a ocorrência do estresse oxidativo. As diferenças de estresse oxidativo decorrentes da exposição a acidez e ao Al entre células da fase log e estacionária não estão relacionados ao sistema antioxidante. As causas devem estar em diferenças na susceptibilidade intrínseca das células ao estresse oxidativo. O uso de osmólitos diminuiu os níveis de ocorrência de estresse oxidativo. indicando uma possível proteção à membrana plasmática, mesmo que indireta.

As células BY-2 na fase estacionária de crescimento mostraram-se resistentes à presença do Al e à condição de acidez, não havendo acúmulo significativo de Al e nem a presença de peroxidação lipídica. Os níveis de H_2O_2 e de atividade das enzimas antioxidantes foi baixo, ou quase nulo em alguns casos, mostrando que o sistema antioxidante celular não precisou ser ativado, pela ausência de Al nas células e pela ausência de peroxidação lipídica.

O sistema antioxidante não está relacionada às diferenças na sensibilidade ao Al entre células da fase log e fase estacionária.

As atividades da CAT e da APX foram indicativas de que o sistema antioxidante foi ativado diretamente para a quebra do peróxido de hidrogênio, a SOD reduziu os radicais superóxido (mas gerou H_2O_2), embora as diferenças na atividade enzimática detectadas em gel PAGE não fossem muito expressivas. Identificou-se duas isoenzimas: Fe-SOD e Mn-SOD.

Curiosamente detectou-se atividade da GST em tratamentos específicos aplicados em células na fase estacionária: 80/40 e 80/0 mM sac. Também houve

metabolização de sacarose nestes tratamentos, evidenciada pelo conteúdo de carboidratos solúveis totais. É possível que possa estar havendo alterações na programação celular, pois na fase estacionária, as células encontram-se totalmente expandidas, na espera para o início da divisão celular.

O uso do BHA, como um antioxidante lipofílico aplicado às soluções de tratamento e exposição das células na fase log de crescimento mostrou que a peroxidação lipídica foi diminuída, porém a viabilidade celular manteve-se baixa após a exposição aos tratamentos com Al e baixo pH e o mesmo ocorreu com o crescimento subseqüente à exposição ao Al e à acidez, exibindo a mesma tendência dos resultados sem BHA e mostrando que a cultura não se recuperou mesmo com o uso de um antioxidante externo.

Isso indica que a peroxidação lipídica não é o primeiro evento a ocorrer dentro do processo de estresse oxidativo, como já relataram Yamamoto et al. (2001 e 2002). Uma possível alternativa para a manutenção de baixa viabilidade celular mesmo com uso do BHA seria um efeito danoso sobre as proteínas da membrana, pois o BHA protege apenas os lipídios. Estudos envolvendo a oxidação protéica seriam adequados para um maior entendimento dos danos causados às células e do efeito do BHA sobre elas.

Apesar disso, a peroxidação lipídica parece ser um bom indicador da sensibilidade diferencial das células ao Al e à acidez. Melhores correlações foram encontradas entre peroxidação e acúmulo de Al do que peroxidação e concentração de H_2O_2, para todos os tratamentos.

Houve expressão diferencial de spots entre os diferentes tratamentos para as frações enriquecidas de membrana plasmática, reforçando a importância do estudo das proteínas. Nota-se que quando se expôs as células à presença de Al, o número

de spots aumentou assim como a expressão de alguns que apareceram nos géis denominados controle (pH5,6), para células nas duas fases de crescimento analisadas. Os tratamentos com Al foram os que mais mostraram alterações na expressão de spots.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, S.J.; RENGEL, Z.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H^+-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. **New Phytologist**, 162: 71-79, 2004.

AHN, S.J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; et al. Aluminum inhibits the H^+-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. **Plant Physiology,** 126: 1381-1390, 2001.

AKESON, M.A.; MUNNS, D.N.; BURAU, R.G. Adsorption of Al31 to phosphatidylcholine vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, 986: 33–40, 1989.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L., Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression. IN: DE KOK, L.J.; STULEN, I. (Ed.) **Responses of plant metabolism to air pollution and global change**. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p.233-240, 1998.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany,** 53: 1331-1341, 2002.

ASADA, K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. IN: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (eds). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants.** Boca Raton: CRC Press, p.77-104, 1994.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum,** 104: 280-292, 1998.

BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; DE LA VARA, L.E.G. Characterization of the protein kinase activity in beet root plasma membranes. **Physiologia Plantarum,** 91:147-154, 1994.

BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. **Biologia Plantarum,** 40: 131-135, 1998.

BIBIKOVA, T.N.; JACOB, T.; DAHSE, I.; GILROY, S. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, 125: 2925-2934, 1998.

BLANCAFLOR, E.B.; JONES, D.L.; GILROY, S. Alteration in cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiology,** 118: 159-172, 1998.

BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide disputases in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences,** 13: 199-218, 1994.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide-dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** 43: 83-116, 1992.

BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **Journal of Experimental Zoology,** 208:137–151, 1979.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry,** 71: 248-254, 1976.

BRYANT, G.; KOSTER, K.L.; WOLFE, J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. **Seed Science Research,** 11: 17-25, 2001.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of Al on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max* L.). **Physiologia Plantarum,** 834: 463-468, 1991.

CAMARGO, C.E.O.; FILHO, A.W.P.F.; FREITAS, J.G. Avaliação de genótipos de centeio, triticale, trigo comum e trigo duro quanto à tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Scientia Agrícola,** 55: 227-232, 1998.

CARE, D.A. The effect of aluminum concentration on root hairs in white clover (*Trifolium repens* L.). **Plant and Soil,** 171: 159-162, 1995.

CIAMPOVORÁ, M. Diverse responses of root cell structure to aluminum stress. **Plant and Soil,** 226:113-116, 2000.

COLLINGS, D.A.; HARPER, J.D.I.; VAUGHN, K.C. The association of peroxisomes with the developing cell plate in dividing onion root cells depends on actin microfilaments and myosin. **Planta,** 218: 204-216, 2003.

COOKE, D.T.; BURDEN, R.S. Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPase. **Physiologia Plantarum,** 78: 153-159, 1990.

CUMMIS, I.; COLE, D.J.; EDWARDS, R. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. **Plant Journal,** 18: 285-292, 1999.

CUSTÓDIO, C.C.; BOMFIM, D.C.; SATURNINO, S.M.; MACHADO NETO, N.B. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Scientia Agricola,** 59: 145-153, 2002

DAVIES, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals.I. General aspects. **The Journal of Biological Chemistry,** 262: 9895-9901, 1987.

DE LA FUENTE, J.M.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J.L.; HERRERA ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate syntesis. **Science,** 276:1566-1568, 1997.

DE LA FUENTE; ESTRELLA, M.H. Advances in the undestanding of Al toxicity and the development of Al-tolerant transgenic plants. **Advances in Agronomy,** 66: 103-120, 1999.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Al resistance in the Arabdopsis mutant alr-104 in caused by an Al-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology,** 117: 19-27, 1998.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C.D.; BENNET, R.J.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology,** 103: 685-693, 1993,

DELHAIZE, E.; HEBB, D.M.; RYAN, P.R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology,** 125:2059-2067, 2001.

DEVI, S.R.; PRASAD, M.N.V. **Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants.** IN: Prasad, M.N.V.; Hagemeyer, J. (ed.). Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems. Germany: Springer-Verlag, **cap.5**, p.99-116, 1999.

DEVI, S.R.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. **Journal of Inorganic Biochemistry,** 97: 59-68, 2003.

DIXON, D.P.; COLE, D.J.; EDWARDS, R. Characterization of a zeta class glutathione transferase from *Arabdopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. **Archives in Biochemistry and Biophysics,** 384: 407-412, 2000.

DIXON, D.P.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology,** 3: 1-10, 2002.

DONCHEVA, S.; AMENÓS, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany,** 56: 1213-1220, 2005.

EL-SHAMI, M.; EL-KAFAFI, S.; FALCONET, D.; LERBS-MACHE, S. Cell cycle-dependent modulation of *FtsZ* expression in synchronized tobacco BY-2 cells. **Molecular Genetics and Genomics,** 267: 254-261, 2002.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; EZAKI, Y.; et al. Expression of Al-induced genes in transgenic Arabdopsis plants can ameliorate Al stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology,** 122: 657-665, 2000.

EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; KAWAMURA, M.; MATSUMOTO, H. Different Mechanisms of Four Aluminum (Al)-Resistant Transgenes for Al Toxicity in Arabidopsis. **Plant Physiology,** 127: 918-927, 2001.

EZAKI, B.; SASAKI, K.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, S. Functions of two genes in aluminum stress resistance: repression of oxidative damage by the *AtBCB* gene and promotion of efflux of Al ions by the *NtGDI1* gene. **Journal of Experimental Botany,** 56(420): 2661-2671, 2005.

EZAKI, B.; TSUGITA, S.; MATSUMOTO, H. Expression of a moderatley anionic peroxidase is induced by Al treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidade isozymes in Al ion stress. **Physiologia Plantarum,** 96: 21-28, 1996.

EZAKI, B.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Cloning and sequencing of the DNA induced by Al treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum,** 93:11-18, 1995.

FOY, C.D. Physiological effects of H, Al and Mn toxicities in acid soil. IN: ADAMS, F. **Soil acidity and liming**. 2a. ed. Madison: American Society of Agronomy, p.57-97, 1984.

FRANKLIN, A.E.; CANDE, W.Z. Nuclear organization and chromosome segregation. **Plant Cell,** 11: 523-534, 1999.

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry,** v. 273, p.149–155, 1999.

GE HEALTHCARE - AMERSHAM BIOSCIENCES - **Proteome analysis**. Disponível em: <www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/lsn_online>. Acesso em maio de 2006.

GEELEN, D.N.V.; INZE D.G. A bright future for the bright yellow-2 cell culture: Celebrating plant diversity. **Plant Physiology,** 127: 1375-1379, 2001.

GIBSON, S.J. Plant sugar response pathways. Part of a complex regulatory web. **Plant Physiology** 124: 1532-1539, 2000.

GREENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. IN: SOMERVILLE, C.R.; MEYEROWITZ, E.M. (eds.). **The Arabidopsis Book.** Rockville: American Society of Plant Biologists, 2002. Disponível em: http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/. Acesso em maio de 2006.

GUTTERIDGE, J.M.C.; QUINLAN, G.J.; CLARK, I.; et al. Aluminum salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. **Biochimica et Biophysica Acta,** 835: 441-447, 1985.

GYSEL, A.V.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. A negatively light-regulated gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a protein showing high similarity to blue copper-binding proteins. **Gene,** 136: 79-85, 1993.

HAGAR, H.; UEDA, N.; SHAH, S.V. Role of reactive oxygen metabolities in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells. **American Journal of Physiology,** 271: 209-215, 1996.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Journal of Clinical Nutrition,** 57: 715-725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3a. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALPERIN, S.J.; KOSTER, K.L. Sugar effects on membrane damage during desiccation of pea embryo protoplasts. **Journal of Experimental Botany,** 57: 2303-2311, 2006.

HAMILTON, C.A.; GOOD, A.G.; TAYLOR, G.J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. **Plant Physiology,** 125: 2068-2077, 2001.

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

HASEZAWA, S.; SYONO, K. Hormonal control of elongation of tobacco cells derived from protoplasts. **Plant and Cell Physiology,** 124: 127-132, 1983.

HAUG, A. Molecular aspects of aluminum toxicity. **Critical Reviews of Plant Science,** 1: 345-373, 1984.

HAUG, A., SHI, B. Biochemical basis of aluminum tolerance in plants development. **Plant and Soil Science**, 45: 839-850, 1991.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 19: 271–280, 1995.

HOREMANS, N.; FOYER, C.H.; ASARD, H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. **Trends in Plant Science,** 5:263-267, 2000.

HORST, W.J. The role of apoplast in aluminum toxicity and resistance of higher plants: a review. **Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde,** 158: 419-428, 1995.

HORST, W.J.; SCHMOHL, N.; KOLLMEIER, M.; et al. Does aluminum affect root growth of maize through interactions with the cell wall–plasma membrane–cytoskeleton continuum? **Plant and Soil,** 215: 163-174, 1999.

HOSHINO, H.; YONEDA, A.; KUMAGAI, F.; HASEZAWA, S. Roles of actin-depleted zone and preprophase band in determining the division site of higher-plant cells, a tobacco BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. **Protoplasma**, 222: 157-165, 2003.

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

IKURA, H.; TANOI, K.; NAKANISHI, T. M. Al behavior in tobacco cells by NAA and staining method. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry,** 249: 499-502, 2001.

ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T. Plasma membrane Permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. **Plant Cell and Physiology,** 39: 516-525, 1998.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. **Febs Letters,** 400: 51-57, 1997.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V.; GILROY, S. Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. **Plant Physiology,** 116: 81-89, 1998.

JONES, D.L.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L.V. Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in *Limnobium stoloniferum* I. Inhibition of tip growth by Al. **Planta,** 197: 672-680, 1995.

KAMPRANIS, S.C.; DAMIANOVA, R.; ATALLAH, M.; TOBY, G.; KONDI, G.; TSICHLIS, P.N.; MARKIS, A.M. A novel plant glutathione-S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. **Journal of Biological Chemistry,** 275: 29207-29216, 2000.

KANEKO, M.; YOSHIMURA, E.; NISHIZAWA, N.K.; MORI, S. Time course study of aluminum-induced callose fromarion in barley roots as observed by digital microscopy and low-vaccum scanning electron microscopy. **Soil Science and Plant Nutrition,** 45:701-712, 1999.

KARLIK, S.J.; CHONG, A.A.; EICHHORN, G.L.; et al. Reversible toroidal compaction of DNA by aluminum. **Neuro Toxicology,** 10:167-176, 1989.

KATO, N.; ESAKA, M. Canges in ascorbate oxidase gene expresión and ascorbate levels in cell división and cell elongation in tobacco cells. **Physiologia Plantarum,** 105: 321-329, 1999.

KERR, D.N.S. WARD, M.K.; ELLIS, H.A.; et al. **Aluminum intoxication in renal disease**. IN: Aluminum in biology and medicine. New York: John Wiley & Sons, p.123-134, 1992.

KINRAIDE, T.B. Al enhancement of plant growth in acid rooting media: a case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. **Physiologia Plantarum,** 88: 619-625, 1993.

KINRAIDE, T.B.; YERMIYAHU, U.; RYTWO, G. Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes. **Plant Physiology,** 118: 505-512, 1998.

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

KOCHIAN, L.V., HOEKENGA, O.A.; PINEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of Al tolerance and phosphorus efficiency. **Annual Review of Plant Biology**. 55: 459-493, 2004.

KOPPENOL, W.H. The Haber-Weiss cycle 70 years later. **Redox Report**, 6: 229-234, 2001.

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

KOYAMA. H.; TODA, T.; YOKOTA, S.; DAWAIR, Z.; HARA, T. Effects of aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabdopsis thaliana* Strain Landsberg in hydroponic cultures. **Plant and Cell Physiology,** 36: 201-205, 1995.

KRAUS, T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol induces tolerance on wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology** 145: 570-576, 1995.

KUTHANOVÁ, A.; GEMPERLOVÁ, L.; ZELENKOVÁ, S.; EDER, J.; MACHÁCKOVÁ, I.; OPATRNY, Z.; CVIKROVÁ, M. Cytological changes and alterations in polyamine

contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology and Biochemistry,** 42: 149-156, 2004.

LABROU, N.E.; MELO, L.V.; CLONIS, Y.D. Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione-S-transferase. **Biochemical Journal,** 358: 101-110, 2001.

LAUKENS, K.; DECKERS, P.; ESMANS, E.; VAN ONCKELEN, H.; WITTERS, E. Construction of a two-dimensional gel electrophoresis protein database for *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 cell suspension culture. **Proteomics,** 4: 720-727, 2004.

LAZOF, D.B.; GOLDSMITH, J.B.; RUFTY, T.W.; LINTON, R.W. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips: a micro analytical study using secondary ion mass spectroscopy. **Plant Physiology,** 106: 1107-1114, 1994.

LEA, P.J.; WELLBURN, F.A.M.; WELLBURN, A.R.; CREISSEN, G.P; MULLINEAUX, P.M. Use of transgenic plants in the assessment of responses to atmospheric pollutants. IN: DE KOK, L.J.; STULEN, I. (eds.) **Responses of plant metabolism to air pollution and global change.** Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p.241-250, 1998.

LEHNER, I; BORLAK, J. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. **Electrophoresis**, 24:1795-1808,2003.

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology,** 61: 3592-3597, 1995.

LINDBERG, S.; GRIFFITHS, G. Aluminum effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membrane in sugarbeet roots. **Journal of Experimental Botany,** 44: 1543-1550, 1993.

LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Monitoring of aluminum-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminum and proton toxicity. **Physiologia Plantarum,** 93: 265-271, 1995.

LOGAN, H.; BASSET, M.; VERY, A.A.; et al. Plasma membrane transport systems in higher plants: from black boxes to molecular physiology. **Physiolgia Plantarum,** 100:1-15, 1997.

MA, J.F.; ZHENG, S.J.; MATSUMOTO, H.; HIRADATE, S. Detoxifying aluminum with buckwheat. **Nature,** 390: 569-570, 2001.

MACKNIGHT, A.D. Principles of cell volume regulation. **Renal Physiolgy and Biochemistry,** 11: 114–141, 1988

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response to algal cells. **Journal of Plant Physiology,** 157: 183-193, 2000.

MASSON, F.; ROSIGNOL, M. Basic plasticity of protein expression in tobacco leaf plasma membrane. **The Plant Journal,** 8:77-85, 1995.

MASSONNEAU, A.; CATHLA, N.; GRIGNON, C.; et al. Effect of sulphate deficiency on the plasma membrane polypeptide composition of *Brassica napus.* **Journal of Experimental Botany,** 48: 93-100, 1997.

MASSOT, N.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; et al. Callose production as indicator of aluminum toxicity in bean cultivars. **Journal of Plant Nutrition,** 22: 1-10, 1999.

MATSUMOTO, H. Biochemical mechanism of the toxicity of aluminum and the sequestration of aluminum in plant cells. IN: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C.; MURRMANN, R.P.(eds). **Plant-Soil interactions at low pH.** Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.825-838, 1991.

MATSUMOTO, H. Cell biology of Al tolerance and toxicity in higher plants. **International Review of Cytology,** 200: 1-46, 2000.

MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B. Recent advances in the physiological and molecular mechanism of Al toxicity and tolerance in higher plants. IN: HEMANTARANJAN, A. (ed.). **Advances in Plant Physiology,** v.5, India: Scientific Publishers, p.29-74, 2003.

MAXWELL, D. P.; WANG, P.; McINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academic Science of USA,** 96: 8271–8276, 1999.

McDONALD-STEPHENS; J.L.; TAYLOR, G.J. Kinetics of Al uptake by cell suspensions of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Plant Physiology,** 145: 327-334, 1995.

McLACHLAN, D.R.; FRASER, P.E.; DALTON, A.J. Aluminum and the pathogenesis of Alzeimer's disease: a summary of evidence. IN: **Aluminum in biology and medicine**. New York: John Wiley & Sons, p.87-108, 1992

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA, K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl_4 intoxication and vitamin E deficiency. **Biochemistry and Medicine,** 23: 302-311, 1980.

MINOCHA, R.; McQUATTIE, C.; FAGERBERG, W.; et al. Effects of Al in red spruce (*Picea rubens*) cell culture: cell grosth and viability, mitochondrial activity, ultrastructure and potential sites of intracellular Al accumulation. **Physiologia Plantarum,** 113:486-498, 2001.

MIYASAKA, S.C.; BUTA, J.G.; HOWELL, R.K.; FOY, C.D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology,** 96: 737-743, 2001.

MIZUNO, M.; KAMEI, M.; TSUCHIDA, H. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peoxide generated in potato tubers during low-temperature storage. **Biochemistry and Molecular Biology International,** 44: 717-726, 1998.

MOECKEL, G.W.; SHADMAN, R.; FOGEL, J.M.; SARDZADEH, S.M.H. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocyte membrane ATPases. **Life Sciences,** 71: 2413-2424, 2002.

MOLLOY, M.P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. **Analytical Biochemistry,** 280:1-10, 2000.

MOON; D.H.; OTOBONI, L.M.M.; SOUZA, A.P.; et al. Somaclonal-variation-induced Al-sensitive mutant from an aluminum-inbred tolerant line. **Plant Cell Reports,** 16: 686-691, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum,** 15: 473-497, 1962

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

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology,** v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NOCTOR; G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** 49: 249-279, 1998.

OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany,** 54: 291-301, 2003.

PACIFICI, R.E.; DAVIES, K.J.A. Protein degradation as an index of oxidative stress. **Methods in Enzymology,** 186: 485-502, 1990.

PAN, J.; ZHU, M.; CHEN, W. Aluminum-induced cell death in root tip cells of barley. **Environmental and Experimental Botany,** 46:71-79, 2001.

PANDEY, S.; CEBALLOS, H.; MAGNAVACA, R.; et al. Genetics of tolerance to soil acidity in tropical maize. **Crop Science**, 34: 1511-1514, 1994.

PARENTONI, S.N.; ALVES, V.M.C.; MILACH, S.K.; et al. **Melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos.** IN: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.de; et al. Rec. Genéticos e Melhoramento–Plantas. Rondonópolis: Fund.MT, **cap.25,** p.783-852, 2001.

PARK, J.M.; KANG, S.G.; PIH, T. et al. A dymamin-like protein, ADL1, is present in membranes as a high molecular mass complex in *A. thaliana.* **Plant Physiology,** 115:763-771, 1997.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; et al. Al effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,** 11: 137-143, 1999.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; et al. Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition,** 24: 1061-1070, 2001.

PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize. **Planta,** 196: 788-795, 1995.

PEREIRA, G.J.G. **Analise de enzimas antioxidantes em resposta a estresse por Cd e estudo de filogenia em plântulas de *Crotalaria***. Campinas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. (Tese), 67p., 2004.

PINEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology** 129:1194-1206, 2002.

PINEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; MANSLANK, H.S.; ALVES, V.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. **Plant Physiology,** 137: 231-241, 2005.

POMPER, K. W.; BREEN, P. J. Expansion and osmotic adjustment of strawberry fruit during water stress. **Journal of American Society of Horticultural Science,** 122: 183-189, 1997.

POTIKHA, T.S.; COLLINS, C.C.; JOHNSON, D.I.; et al. The involvement of H_2O_2 in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. **Plant Physiology,** 119: 849-858, 1999

POTTERS, G.; GARA, L. de; ASARD, H.; HOREMANS, N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? **Plant Physiology and Biochemistry,** 40: 537-548, 2002.

PRASAD. T.K. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. **Plant Physiology**, 114: 1369-1376, 1995.

REINHECKEL, T.; NOACK, H.; LORENZ, S.; WISWEDEL, I.; AUGUSTIN, W. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. **Free Radical Research,** 29: 297-305, 1998.

RENGEL, Z. Transley review no. 89 – Uptake of aluminum by plant cells. **New Phytologist,** 121: 499-513, 1996.

RENGEL, Z.; ZHANG, W.H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum-toxicity syndrome. **New Phytologist,** 159: 295-314, 2003.

RHODES, D. Metabolic responses to stress. IN: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. **The Biochemistry of plants**. New York: Academic Press, p.201-241, 1987.

RICHARDS, K.D.; SCHOTT, E.J.; SHARMA, Y.K.; DAVIS, K.R.; GARDNER, R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabdopsis thaliana*. **Plant Physiology,** 116: 409-418, 1998.

ROBINSON, D.G. Pyrophosphatase is not (only) a vacuolar mark. **Trends in Plant Science,** 1: 330, 1996.

RODRIGUÉZ, C.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; MARTÍN, V.; REITER, R.J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pinealpple Research,** 36: 1-9, 2004.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; PALMA, J.M.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. **Plant Cell and Environment,** 25: 677-686, 2002.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminum toxicity in plants: a review. **Agronomie,** 21: 3-21, 2001.

ROXAS, V.P.; SMITH, R.K.; ALLEN, E.R.; ALLEN, R.D. Overexpression of glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. **Natural Biotechnology,** 15: 988-991, 1997.

RUIZ, R.F. **La técnicas de Plasma-masas (ICP-MS).** Disponível em: <http://www.uam.es/personal_pas/txrf/icpms.html>. Acesso em fevereiro de 2006.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterization of Al-tolerant efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta,** 196: 103-110, 1995.

RYYPPO, A.; VAPAAVOURI, E.M.; RIKALA, R.; et al. Fatty acid composition of microsomal phospholipids and H^+-ATPase activity in the roots of scot pine seedlings grown at different root temperatures during flushing. **Journal of Experimental Botany,** 45: 1533-1539, 1994.

SAARL; L. A.; SELTZ, W. R. Immobilized morin as fluorescence sensor for determination of aluminum (III). **Analytical Chemistry,** 55: 667-670, 1983.

SAMUELS, A. L.; MEEHL, J.; STAEHELIN, L.A. Opmitizing conditions for tobacco BY-2 cell cycle synchronization. **Protoplasma,** 202: 232-236, 1998.

SANDALIO, L.M.; DEL RIO, L.A. Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*: functional implications in cellular metabolism. **Journal of Plant Physiology,** 127: 395-409, 1987.

SANO, T.; HIGAKI, T.; HANDA, K.; KADOTA, Y.; KUCHITSU, K.; HASEZAWA, S.; HOFFMANN, A.; ENDTER, J.; ZIMMMERMANN, U.; HEDRICH, R.; ROITSCH, T. Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stress. **FEBS Letters,** 580: 597-602, 2006.

SANTONI, V.; DOUMAS, P.; ROUQUIÉ D.; MANSION, M.; BOUTRY, M.; DEGAND, H.; DUPREE, P.; PACKMAN, L.; SHERRIER, J.; PRIME, T.; et al. Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the membrane. **The Plant Journal**, 16: 633-641, 1998.

SANTONI, V.; DOUMAS, P.; ROUQUIÉ, D.; MANSION, M.; RABILLOUD, T.; ROSSIGNOL, M. Large scale characterization of plant plasma membrane proteins. **Biochimie**, 81: 655-661, 1999.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S.J.; RYAN, P.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal,** 37: 645-653, 2004.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology,** 101: 7-12, 1993.

SCHMOHL, N.; HORST, W.J. Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. **Plant Cell and Environment,** 23: 735-742, 2000.

SEALS, D.F.; RANDALL, S.K.A vacuole-associated annexin protein, VCaB42, correlates with the expansion of tobacco cells. **Plant Physiology,** 115: 753-761, 1997.

SHEN, B.; HOHMANN, S.; JENSEN, R.G.; BOHNERT, H.J. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. **Plant Physiology,** 121: 45-52, 1999.

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

SHIMIZU, N.; HOSOGI, N.; JIANG, G.H.S.; INOUE, K.; PARK, P. Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response to AK-toxin I from *Alternaria alternate* Japanese pear pathotype. **Journal of Genetic Plant Pathology,** 72: 6-15, 2006.

SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; MOXLEY, D.F.; CARTER, T.E.; ALLEN, N.S.; RUFFY, T.W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection

using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology,** 123: 543-552, 2005.

SIMONOVICOVÁ, M.; TAMÁS, L.; MISTRÍK, I. Effect of aluminum on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. **Biologia Plantarum,** 48: 261-266, 2004.

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

SIVAGURU, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Differential impacts of aluminum on microtubule organization depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. **Physiolgia Plantarum,** 107:110-119, 1999.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion on Plant Biology,** 3: 229-235, 2000.

SOARES NETTO, L.E. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology,** 24: 93-104, 2001.

SOMERO, G.N. Protons, osmolytes and fitness of internal milieu for protein function. **American Journal of Physiology,** 251: 197-213, 1986.

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

STOOP, J.M.H.; PHARR, D.M. Effect of different carbon sources in relative growth rate, internal carbohydrates and mannitol 1-oxidoreductase activity in celery suspension culture. **Plant Physiology,** 103: 1001-1008, 1993.

STOOP, J.M.H.; WILLIAMSON J.D.; PHARR D.M. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. **Trends in Plant Science,** v.1, n.5, p.139-144, 1996.

SUGIMOTO, M.; SAKAMOTO, W. Putative phospholipid hydroperoxide gluthatione peroxidase gene from *Arabdopsis thaliana* induced by oxidative stress. **Genes and Genetic System,** 72: 311-316, 1997.

TAKAHASHI, Y.; NAGATA, T. *parB*: an auxin-regulated gene encoding glutathione-S-transferase. **Proceedings of the National Academy of Science,** 89: 56-59, 1992.

TAMÁS, L.; SIMONOVICOVÁ, J.; HUTTOVÁ, I.M. Changes in the composition of cell wall proteins in barley roots during germination and growth in aluminum presence. **Plant, Soil and Environment,** 49: 327-331, 2003.

TAYLOR, G.J. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminum resistance. **Plant and Soil,** 171: 89-103, 1995.

TIAN, H.Q.; RUSSELL, S.D. Culture-induced changes in osmolality of tobacco cell suspensions using four exogenous sugars. **Plant Cell, Tissue and Organ Cullture,** 55: 9-13, 1999.

UEXKULL, H.R.V.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil,** 171: 1-15, 1995.

VASQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiology,** 119: 435-444, 1999.

VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**., 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1991, 359p

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Pnysiology,** 17(1): 129-143, 2005.

VITORELLO, V.A.; HAUG, A. An aluminum-morin fluorescence assay for the visualization and determination of aluminum in cultured cells of *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2. **Plant Science,** 122: 35-42, 1997.

VITORELLO, V.A.; HAUG, A. Capacity for aluminum uptake and Al-induced abnormalities of the cell surface depends on brefeldin Al-sensitive membrane traffic in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2) cells. **Plant Cell Reports,** 18(9): 733-736, 1999.

VITORELLO, V.A.; HAUG, A. Short-term Al uptake by tobacco cells: growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. **Physiologia Plantarum,** 97: 536-544, 1996.

VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry,** 57: 701-710, 2001.

WANG, Z.; STUTTE, G.W. The role of carbohydrates in active osmotic adjustment in apple under water stress. **Journal of American Society of Horticultural Science,** 117(5): 816-823, 1992.

WEINGARTNER, M.; PELAYO, H.R.; BINAROVA, P.; ZWERGER, K.; MELIKANT, B. A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. **Journal of Cell Science,** 116: 487-498, 2003.

WENZL, P.; PATINO, G.M.; CHAVES, A.L.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. The high level of aluminum in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiology,** 125: 1473-1484, 2001.

WILKINS, M.R.; WILLIAMS, K.L.; APPEL, R.D.; HOCHSTRASSER, D.F. **Proteome research: New frontiers in functional genomics**. Berlin: Springer-Verlag, 1997, 243p.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBAERTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W**.** Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defense in C3 plants**. EMBO Journal**, 16: 4806-4816, 1997.

WISSEMEIER, A.H.; KLOTZ, F.; HORST, W.J. Aluminum induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max* L.). **Journal of Plant Physiology,** 129: 487-492, 1987.

XING, T.; HIGGINS, V.J.; BLUMWALD, E. Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. **Plant Cell,** 9: 249-259, 1997.

YAMAGUCHI, M.; SASAKI, T.; SIVAGURU, M.; YAMAMOTO, Y.; OSAWA, H.; AHN, S.J. Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter(ALMT1). **Plant and Cell Physiology,** 46: 812-816, 2005.

YAMAMOTO, Y.; HACHIYA, H.; MATSUMOTO, H. Oxidative damage to membranes by a combination of Al and iron in suspension cultured tobacco cells. **Plant and Cell Physiology,** 38: 1333-1339, 1997.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S.R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Al toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, 128: 63-72, 2002.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by Al, but not the primary cause of elongation inhibition in pea rots. **Plant Physiology,** 125: 199-208, 2001.

YAMAMOTO, Y.; MASAMOTO, K.; RIKIISHI, S.; HACHIYA, A.; YAMAGUCHI, Y.; MATSUMOTO, H. Al tolerance acquired during phosphate starvation in cultured tobacco cells. **Plant Physiology,** 112: 217-227, 1996.

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

YANCEY, P.H. Osmotic effectors in kidneys of xeric and mesic rodents: corticomedullary distributions and changes with water availability. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology,** 158-369-380, 1988.

YANG, J.L.; ZHENG, S.J.; HE, Y.F.; MATSUMOTO, H. Aluminum resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. **Journal of Experimental Botany,** 56(414): 1197-1203, 2005.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal,** 57: 508-515, 1954.

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

ZHANG, G.; TAYLOR, G.J. Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestjvum* L. **Plant Physiology,** 94: 577-584, 1990.

ZHANG, P.; LIU, B.; KANG, S.W.; SEO, M.S.; RHEE, S.G.; OBEID, L.M. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. **Journal of Biological Chemistry,** 272: 30615-30619, 1997.

ZHANG, W.H.; RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. **Plant Physiology,** 125: 1459-1472, 2001.

APÊNDICE 1

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology,** 17: 129-143, 2005.

Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants

Victor Alexandre Vitorello[1*], Flávia Regina Capaldi[1] and Vanderlei Antonio Stefanuto[1]

[1]Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), Cx. Postal 96, 13400-970 - Piracicaba (SP), Brasil. [*]Corresponding author: victor@cena.usp.br
Received:

Aluminum toxicity is a major soil constraint to food and biomass production throughout the world. Considerable advances in the understanding of the mechanism of resistance involving exudation of organic acids have been made in recent years. However, despite intense research efforts, there are many aspects of Al toxicity that remain unclear. This article reviews the features of the chemistry of Al relevant to its toxicity followed by an examination of the mechanisms of toxicity and resistance. Emphasis, however, is given to the mechanisms of Al toxicity, since resistance has been covered recently by several reviews. Some topics which are specifically discussed in this review are: a) The possible role of cellular effects of low pH in Al toxicity, which has been largely ignored and needs to be addressed; b) The relevance of non-genotypic (cell-to-cell) variations in sensitivity to Al; c) Evidence indicating that although Al may well exert its toxic effects in the cell wall, it is highly unlikely that Al does so in a non-specific manner by mere exchangeable binding; and d) The hypothesis that the primary target of Al toxicity resides in the cell wall–plasma membrane–cytoskeleton (CW-PM-CSK) continuum has the potential to integrate and conciliate much of the apparently conflicting results in this field.
Key words: Al uptake and localization, cell wall, cytoskeleton, differential sensitivity to Al, low pH, acidity, plasma membrane.

Avanços recentes na toxicidade e resistência ao alumínio em plantas superiores: A toxicidade por Al é o principal fator limitante à produção de alimentos e biomassa no mundo. Avanços consideráveis no entendimento dos mecanismos de resistência ao Al pela exsudação de ácidos orgânicos foram obtidos nos últimos anos. No entanto, apesar da extensa literatura, muitos aspectos da toxicidade por Al permanecem obscuros. Este artigo revisa suas principais características químicas, relevantes para a manifestação de sua toxicidade, seguida por um exame dos mecanismos de toxicidade e resistência. No entanto, ênfase é dada aos mecanismos de toxicidade, já que os mecanismos de resistência já foram assunto de revisões recentes. Alguns tópicos especificamente discutidos nesta revisão são os seguintes: a) O possível papel dos efeitos celulares de pH baixo sobre a toxicidade pelo Al, o qual tem sido praticamente ignorado e que necessita ser examinado; b) A relevância de variações não genotípicas na sensibilidade ao Al; c) Evidências indicando que, apesar do Al poder exercer efeito tóxico na parede celular, é pouco provável que isso ocorra por meio de interações inespecíficas e meramente adsortivas, e d) A hipótese de que o alvo primário do Al reside no contínuo parede celular-membrana plasmática-citoesqueleto apresenta o potencial de poder integrar e conciliar grande parte dos resultados, aparentemente conflitantes, que existem nessa área.
Palavras-chave: acúmulo e localização de Al, baixo pH, acidez, citoesqueleto, membrana plasmática, parede celular, sensibilidade diferencial ao Al.

INTRODUCTION

Aluminum toxicity is the most widespread form of metal toxicity to plants and its occurrence is rivaled only by salinity. Because of its pH-dependent solubility, Al toxicity occurs only at soil pH values below 5.5 and is most severe in soils with low base saturation, poor in Ca and Mg. It is estimated that 40 % of the arable soils of the world are acidic and therefore present Al toxicity hazards (Von Uexküll and

Mutert, 1995). Even more revealing is the fact that most of these areas are located in developing countries in South America, central Africa and Southeast Asia (Wood et al., 2000), where food production can be critical. In Brazil alone, over 500 million hectares are covered by acidic soils, comprising roughly two-thirds of its total territory - the largest area of acidic soils within a single country. Soil acidity is a natural occurrence in tropical and subtropical areas, but in temperate zones, it is an increasing problem and is largely the result of acid rain in the industrial regions of the USA, Canada and Europe.

Amelioration of acid soils is complicated by the difficulty in liming subsoil layers and areas covered by perennial crops or forests, and in developing countries access to capital and machinery is frequently a further complication. The ultimate consequence is a relatively shallow root system vulnerable to drought (Foy et al., 1978). In the case of nitrogen-fixing plants, soil acidity is even more problematic since their symbiotic bacteria are also sensitive to Al and acidity (Hungria and Vargas, 2000).

Because of its unmistakable importance, understanding the mechanisms of Al toxicity and the mechanisms and genes conferring Al resistance are highly desirable and have been the focus of intense research over the past several decades. Considerable progress has been made in understanding some mechanisms and genes of Al resistance but the causes of Al toxicity are still poorly understood (Kochian et al., 2004).

Numerous hypotheses for the mechanism of Al toxicity have been advanced in the literature (Kochian, 1995; Richards et al., 1998; Barcelo and Poschenrieder, 2002). The cellular components and processes which have been proposed to be affected by Al are wide ranging and some of the most important include: cell nuclei, mitosis and cell division (Matsumoto, 2000; Silva et al., 2000), composition, physical properties and structure of the plasma membrane (Zhao et al., 1987; Wagatsuma et al., 1995; Zhang et al., 1997; Ishikawa and Wagatsuma, 1998), uptake of Ca^{2+} and other ions (Ryan and Kochian, 1993; Liu and Luan, 2001), phosphoinositide-mediated signal transduction and cytoplasmic calcium homeostasis (Haug et al., 1994; Jones and Kochian, 1995; Rengel and Zhang, 2003), oxidative stress (Boscolo et al., 2003; Yamamoto et al., 2003) cytoskeletal dynamics (Blancaflor et al., 1998; Sivaguru et al., 1999) and the cell wall - plasma membrane - cytoskeleton (CW-PM-CSK) continuum (Horst et al., 1999).

Although this review will cover general aspects related to Al toxicity and resistance, it is our intent to focus especially on the mechanisms of toxicity and to point out some aspects which have been largely ignored in this field. In particular we emphasize the possible role of cellular effects of low pH in Al toxicity, the importance of examining non-genotypic variations in sensitivity to Al and discuss evidence supporting the possibility that Al interacts with components of the CW-PM-CSK continuum. The mechanisms of Al resistance have been the focus of several recent reviews and are referred for a more detailed account (Ma and Furukawa, 2003; Samac and Tesfaye, 2003; Kochian et al., 2004).

CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF Al RELEVANT TO TOXICITY

Aluminum is the most abundant metal and the third most common element in the earth's crust. Mineral soils contain large amounts of Al, most of which is locked in aluminosilicates or Al oxides of the clay fraction and does not pose a toxicity hazard. Upon soil acidification, a fraction of this Al becomes soluble and potentially toxic to plants. Thus, acidic mineral soils are practically synonymous with Al toxicity.

Aluminum has a high ionic charge and small ionic radius, resulting in the second largest charge-to-radius ratio (z/r = 5.9). Because of this, Al strongly polarizes the water molecules in its hydration shell. Aluminum is coordinated by six water molecules in an octahedral configuration. The high degree of polarization of the O-H bond can result, depending on the pH of the medium, in the dissociation of one or more protons:

$$Al(H_2O)_6^{3+} - Al(H_2O)_5(OH)^{2+} + H^+$$

Aluminum therefore undergoes a well-known pH-dependent hydrolysis series (Orvig, 1993). For simplification, these forms of Al are represented without designating the associated water molecules, as in Al^{3+} or $Al(OH)_n^{3-n}$.

The neutral Al hydroxide species, $Al(OH)_3^0$, is the predominant form of Al at neutral and slightly acidic pH values. Thus, Al is largely insoluble under these conditions. At pH values above 7.5, $Al(OH)^{4-}$ is formed and Al is soluble again. Under conditions with a high Al/OH^- ratio, polynuclear species can form from $Al(OH)^{2+}$, of which the "Al_{13}" tridecameric polycation is probably the most important (Parker and Bertsch, 1992). In addition, hydrolysis and solubility of Al can be greatly affected by chelation. A more detailed treatment of the chemistry and speciation of Al in soils can be found in Hiradate (2004).

The general principles of the chemistry of Al relevant to its biological interactions have been established for some time, nonetheless, the complexity of its speciation along with

severe methodological limitations in its study (e.g. lack of an adequate radioisotope and limited resolution and sensitivity of X-ray microanalytical techniques) have contributed to make this a challenging field.

Despite its ubiquitous nature, Al is not known to be used by any organism. Some possible reasons for this were outlined by Williams (1999). With the exception of those cations that can undergo changes in valence, such as Fe and Co, biological systems are apparently incapable of effectively handling free trivalent cations. The two factors that apparently determine this are the small size of these cations, which places obvious limitations upon the stereochemistry of complexation and the slow ligand exchange rates of these metals (Williams, 1999).

The chemical species of Al that are toxic are presumably Al^{3+} and the mononuclear hydroxides, $Al(OH)^{2+}$ and $Al(OH)_2^{+}$ (Kinraide, 1991). Although few studies have been performed, high toxicity has also been attributed to the "Al_{13}" tridecameric polycation.

Aluminum is a highly reactive cation with a high ratio of ionic to covalent character and is thus classified as a class *a* or hard (i.e. non-polarizable) cation according to the classification scheme of Nieboer and Richardson (1980). Accordingly, Al binds preferentially to hard negative donor groups. Fluoride, the most electronegative of the anions, is the preferred inorganic monodentate ligand. However, since it is not incorporated into multidentate ligands, it is oxygen containing moieties of multidentate molecules which bind Al most intensely (Orvig, 1993). The most important ones are carboxyl (-COOH), hydroxyl (-OH), carbonyl (-CO) and phosphate (-PO_3) groups. Amines are usually important binders of Al only when part of multidentate ligands such as nitrilotriacetic acid (NTA) and ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA) (Martin, 1992), while sulfhydryl groups do not bind Al strongly even when part of a chelate ring (Toth et al., 1984). This is a major reason why phytochelatins and metallothioneins are apparently of little importance for Al toxicity.

The size of cations, rather than charge, is the most important factor in metal ion substitution (Martin, 1988; Williams, 2002). Of the biological elements, the Al ion (r = 0.054 nm) is closest in size to Mg^{2+} (r = 0.072 nm) and Fe^{3+} (r = 0.065 nm). Aluminum can bind to nucleoside triphosphates with an association constant 10^7 times that of Mg^{2+}. Due to its small size, steric hindrance is also an important factor in determining the selectivity of Al binding. Therefore, Al is relatively more competitive in the formation of complexes with small ligands.

A final property of importance to binding is the fact that Al has a slow rate of exchange in and out of its coordination sphere (Orvig, 1993). Ligand exchange rates for Al are of the order of 1.3 s^{-1}, 10^5-fold slower than for Mg^{2+} (Martin, 1992).

After having examined the binding properties of Al, it is crucial to examine the relative concentrations of cations and ligands in biological systems and how this may determine the fate of Al. At pH 7.3, the free ion concentration of Al is limited to about 10^{-10} M, whereas typical free concentrations of Mg, Ca and Fe in a plant cytoplasm are around 10^{-3}, 10^{-7}, and 10^{-17} M, respectively (adapted from Williams, 2002). Therefore, in the cytoplasm, binding of Al to ligands can become limited due to competition with other cations. However, it is important to realize that pH is critical in determining the competitiveness of Al for ligands when compared to other cations such as Mg and Ca, which do not alter their solubility with pH.

BIOLOGY AND MECHANISMS OF ALUMINUM TOXICITY

General effects and symptoms of Al toxicity in plants

The most prominent symptom of Al toxicity is inhibition of root growth, which can usually be detected within 30 min to 2 hrs, even at micromolar concentrations of Al (Barcelo and Poschenrieder, 2002). However, the mechanisms of this inhibition are not well understood. Aluminum-injured roots become stubby and frequently acquire a brownish coloration. Fine branching and root hairs are reduced and the root system often takes on a "corraloid" appearance. In the root apex, cracks can easily be observed in the epidermis. Uneven and radial expansion of cells of the cortex cause root thickening and mechanical stress on the epidermis (Ciamporova, 2002).

Cells which have been reported to be affected by Al are the root cap, meristem, elongating cells, root hairs and branch initials (Foy et al., 1978; Rengel, 1996). Root tips are the most Al-sensitive region, as has been demonstrated by exposing only certain regions of the root to Al (Ryan et al., 1993). In a more detailed examination, the distal region of the transition zone (DTZ) was shown to be the most Al-sensitive root apical region (Sivaguru and Horst, 1998). Inhibition of root growth is considered to be primarily the result of inhibited cell elongation, at least in early stages of toxicity, while reduced cell division can obviously affect growth in later stages (Kochian, 1995; Barcelo and Poschenrieder, 2002; Ciamporova, 2002).

Although symptoms of Al toxicity are also manifested in the shoots, these are usually regarded as a consequence of injuries to the root system. The most common responses in shoots to Al toxicity are cellular and ultrastructural modifications in leaves, reduced stomatal opening, decreased photosynthetic activity, chlorosis and foliar necrosis. Long-term exposure to Al and inhibition of root growth generally lead to nutrient deficiencies, mainly of P, K, Ca and Mg (Haug and Vitorello, 1996). The ultimate consequence is reduced plant biomass. With the exception of Al-accumulating plants (e.g. tea plants and hydrangea) (Jansen et al., 2002; Watanabe and Osaki, 2002), little Al is transported into the shoot.

Major factors affecting severity of Al toxicity to roots are the concentrations of Ca^{2+} and other cations in the external solution, the ionic strength of solutions, temperature, the presence of chelators, cell type and plant genotype (Foy et al., 1978; Kinraide and Parker, 1987).

Interactions with low pH – a case of superimposed stresses

The solubility of Al is appreciable only at pH values below 5.5. Thus, toxicity to plants occurs only at these low pH values, with the possible exception of the toxicity of $Al(OH)_3^{4-}$ at higher pH values (Kinraide, 1990). Despite this, and in contrast to the large amount of literature on Al toxicity, very little attention has been given to H^+ toxicity, even though the latter is well known to be directly detrimental to root growth (Kidd and Proctor, 2001; Koyama et al., 2001). As in Al toxicity, H^+ toxicity is most severe in solutions of low ionic strength and low cation concentrations, and increasing the concentration of Ca^{2+} and other cations in the external solution reduces or even abolishes the detrimental effects of acidity (Marschner, 1991). An evaluation of these low-pH effects is necessary for greater understanding and correct interpretation in studies of Al toxicity, but this is rarely undertaken (Lazof and Holland, 1999; Samac and Tesfaye, 2003).

At the cellular level, low pH has detrimental and distinct effects on the plasma membrane, notably enhanced permeability (Zsoldos and Erdei, 1981; Yan et al., 1992; Koyama et al., 2001). These membrane effects are in part responsible for altered patterns of nutrient accumulation at low pH (Marschner, 1991). Although K^+ permeates the plasma membrane more readily at low pH, enhancement of efflux is greater, resulting in reduced net uptake (Zsoldos and Erdei, 1981). Low pH-induced membrane permeability can be alleviated by Ca^{2+} and other cations (Marschner, 1991; Kinraide, 1998). Several studies have indicated that Al-induced stimulation of root growth results from amelioration of proton toxicity and consequent reduction in membrane permeability (Kinraide, 1993; Llugany et al., 1995).

Aluminum toxicity is usually evaluated by comparing elongation of roots exposed to Al at a low pH to controls without Al but at the same low pH. There are potential problems in this approach, both for screening of Al-resistant plants and in Al toxicity studies (Lazof and Holland, 1999; Samac and Tesfaye, 2003). As pointed out by Lazof and Holland (1999), Al-resistance may be underestimated in plants sensitive to H^+, since they may show little further inhibition to Al, or it may be overestimated in plants showing Al growth-enhancement due to alleviation of H^+ toxicity. Obviously, the outcome of results and evaluations depends on several factors such as pH, the activity of Al and the sensitivity of the biological specimen. Limited evidence suggests that plants can be adapted to H^+ or Al independently (Lazof and Holland, 1999; Kidd and Proctor, 2001), but more studies are clearly needed.

Nevertheless, there are several reasons, based both on experimental evidence and theoretical considerations, which suggest that an interaction between Al toxicity and the effects of low pH is likely. Taking this a step further, certain biological effects of high H^+ concentrations may actually play a role in the establishment of Al toxicity.

First, low pH clearly affects the structure of plasma membranes. As already mentioned, one of the most common observations is increased membrane permeability, as assessed by increased solute leakage (e.g. Koyama et al., 2001). This may have profound consequences for Al toxicity, particularly regarding access to possible target sites, including the plasma membrane itself. Alterations in the structure of the plasma membrane appear to be an important factor in determining the sensitivity and uptake of Al by roots and cells (Sasaki et al., 1994; Wagatsuma et al., 1995; Vitorello and Haug, 1996; Ishikawa and Wagatsuma, 1998; Ishikawa et al., 2001; Ofei-Manu et al., 2001). In some of these studies, however, it is not clear whether these alterations were brought about by low pH or Al. In two of these studies, increased permeability of the plasma membrane was shown to be caused by low pH.

Low pH may also induce changes in the conformation of key molecules in the CW – PM - CSK continuum and which could be crucial in determining toxicity of Al. This would be somewhat analogous to a current view of Alzheimer's disease, where aberrant forms of proteins appear on the exterior surface of cells where they should not be (Williams, 1999).

A correlation between H^+ and Al tolerance was observed by Ofei-Manu et al. (2001) and a correlation between membrane permeability (K^+ efflux) and Al uptake has been observed in wheat (Sasaki et al., 1994; Souza, 1999).

Second, extracellular acidity increases the permeability of the plasma membrane to H^+ (Yan et al., 1998) and can lower intracellular pH (Plieth et al., 1999; Moseyko and Feldman, 2001). It is conceivable and perhaps even probable that these pH changes are greater in the cortical cytoplasm. In turn, lowering of intracellular pH can dramatically increase the concentrations of Al relative to other cations, thereby increasing its competiveness for cellular ligands. The structure and the binding constants of cellular ligands may also be affected.

Third, there are several commonalities between Al and H+ toxicity. Both are influenced by the ionic strength of the solution and both are alleviated by increasing concentration of cations, in the following order $M^{3+} > M^{2+} > M^+$ (Kinraide, 1993), although this may be a general property of cation toxicity. More importantly, the regions of the root which are sensitive to H^+ and Al are similar (Koyama et al., 1995, 2001) and in tobacco cell suspensions the log phase of growth is sensitive to both Al and low pH while the stationary phase is not (Vitorello and Haug, 1996). In both Al and H+ toxicities, there is a relationship between cellular growth rates and toxicity (Vitorello and Haug, 1996; Koyama et al., 2001). Finally, in both cases boron can alleviate toxicity and pectin appears to play a role in the detrimental effects of both ions (Schmohl and Horst, 2000; Koyama et al., 2001).

Al uptake and localization in plants and cells

This is an important topic since it is generally accepted and there is considerable evidence, both in roots and cell suspensions, that Al uptake is necessary for the manifestation of toxicity (Yamamoto et al., 1994; Kochian, 1995; Horst et al., 1999; Matsumoto, 2000), although apparent exceptions have been reported (Larsen et al., 1996). Therefore, localization of Al may provide information on mechanisms of toxicity.

Uptake and distribution of Al at the whole plant and root level: In most plant species, especially Al-sensitive and crop species, Al uptake is limited mainly to the root system, where it accumulates predominantly in the epidermis and in the outer cortex (Wagatsuma et al., 1987; Delhaize et al., 1993; Matsumoto et al., 1996). The endodermis possibly acts as a barrier and transport to the shoot and leaves is generally small.

However, there are many plant species that accumulate Al to a considerable extent in the shoot (Jansen et al., 2002; Watanabe and Osaki, 2002). Such plants, frequently called hyperaccumulators, are mainly woody plants from tropical or subtropical regions, such as some species native to the savannah (cerrado) region of central Brazil (Haridasan et al., 1986; Haridasan and Dearaujo, 1988). Classic examples of hyperaccumulators are the tea plant (*Camellia sinensis*), hydrangea and members of the Rubiaceae family. Unfortunately, there is not much information in the literature as to mechanisms, cellular localization and chemical forms of the Al which accumulates in these plants. In one investigation on the chemical form of Al in tea leaves, most Al was chelated to the catechin group of polyphenols, and to a lesser extent to phenolic and organic acids and as Al-F complexes (Nagata et al., 1992). In hydrangea leaves, Al was found as a complex with citrate (Ma et al., 1997) and in the hyperaccumulator *Melastoma malabathricum* it was bound to oxalate (Watanabe et al., 1998). Even less is known about the Al species formed after absorption from the soil but there is evidence that Al may be transported as Al-F species (Nagata et al., 1993).

Subcellular localization of Al: Whether Al accumulates and manifests its toxicity within the plant cell or externally, in the apoplast, has been a major topic of interest and controversy because of its implication to models of Al toxicity (Delhaize and Ryan, 1995; Kochian, 1995; Haug and Vitorello, 1996). In recent years, however, this debate seems to have subsided, perhaps because more attention has turned to the topic of Al resistance.

Aluminum has been found in the nucleus, presumably bound to DNA (Matsumoto et al., 1976), while it has been reported by others to be localized solely or predominantly in the cell wall (Marienfeld and Stelzer, 1993; Ownby, 1993; Marienfeld et al., 1995). This ambiguity is possibly in part due to differing experimental conditions, some of which may have been inadvertently flawed (Kochian, 1995). Earlier reports employed long periods of exposure to Al, which raises questions as to the integrity of the cells, and/or high concentrations of Al, which in turn raises questions as to precipitation of Al in the cell wall.

Major limitations to resolve these issues of subcellular localization have been largely methodological. Reasons for this are the complex chemistry of Al and interactions with the cell wall, the lack of a suitable Al radioisotope (Rengel, 1996) and the limited sensitivity and resolution of microanalytical

techniques, viz. X-ray microanalysis (Lazof et al., 1994). The latter is relatively poor because of the interactions of the radiation with the specimen layer and distortions in the cell samples during preparation. Finally, the effectiveness of chelator (citrate or EDTA) washes in removing Al from the cell wall has been a point of discussion (Rengel, 1996).

Attempts to circumvent these limitations and to address the problem of Al uptake and its cellular site of accumulation have been based on various strategies. One approach, based on the kinetics of short-term Al uptake, attempted to distinguish cell wall Al from uptake across the plasma membrane based on the biphasic behavior of Al uptake (Pettersson and Bergman, 1989; Zhang and Taylor, 1989; Zhang and Taylor, 1990). The rapid, initial, non-linear phase of uptake was interpreted as being accumulation of exchangeable Al in the cell wall, and could be desorbed with citrate (Zhang and Taylor, 1990). The slower, second phase of uptake was linear and interpreted to be uptake across the plasma membrane (Pettersson and Bergman, 1989) or metabolism-dependent accumulation in the cell wall (Zhang and Taylor, 1990).

A second approach has employed a relatively new and sophisticated microanalytical technique, secondary-ion mass spectrometry, to detect Al in root tips exposed to Al. This method was estimated to have a spatial resolution of about 2 μm, which is perhaps one order of magnitude better than X-ray microanalysis (Lazof et al., 1994).

A third approach has made use of dyes which present enhanced fluorescence upon binding to Al, such as morin (Vitorello and Haug, 1997) and lumogallion (Silva et al., 2000). This approach probably offers the best resolution to date for localization of Al, it is amenable to confocal microscopy, it is simple to perform and little specimen preparation is required or even in vivo observations in the case of morin are possible (Vitorello and Haug, 1996). The major disadvantage of this approach may be the fact that it depends on complex formation with Al and thus competition with other ligands may affect results. Despite this, in the case of morin, good correlations between fluorescence signals and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) have been encountered (Vitorello and Haug, 1997).

Finally, a fourth approach has employed the giant alga *Chara corallina*. In these cells, separation of cell wall and symplasm can be surgically performed and therefore uptake across the plasma membrane can be assessed (Taylor et al., 2000).

In general, the various studies have made the case that Al can indeed enter the cytoplasm. However, whether this leads to toxicity is not clear, especially in view of recent studies showing a good relationship between Al binding to pectin and inhibition of cell elongation (Schmohl and Horst, 2000). As discussed below, an intermediate scenario may be more likely, where Al accumulates and binds to components of the CW-PM-CSK continuum.

It is clear that Al can indeed accumulate in the nucleus (Silva et al., 2000), even at low Al concentrations and short exposure periods. However, it must be shown that this occurs in cells before loss of viability or in which the intracellular pH has not decreased (see above section on interaction with low pH).

In the case of the hypothesis of binding to the cell wall, the mere electrostatic binding of Al to the cell wall is unlikely to be a significant mechanism of toxicity. First, several studies show a relationship between non-exchangeable Al in the cell and toxicity (e.g. Archambault et al., 1997), and it is this form of cell-associated Al which is considered in most studies of Al uptake since a chelator wash is usually performed at the end of the Al-exposure period. If Al is prevented from accumulating in cells by different chelators, it should be possible to remove Al which is complexed to the surface by washes with the same chelators. Second, several studies and observations show that Al does not accumulate in isolated cell walls in a non-exchangeable manner (Zheng et al., 2004). Indeed, Al is not observed to accumulate in the cell walls of plasmolyzed cells (Vitorello and Haug, 1996). An associated protoplasm is necessary for this to occur. Work by Zhang and Taylor (1991) is a very good example of the latter. In other words, cell-mediated (i.e. protoplasm-mediated) processes must occur for Al to accumulate in a non-exchangeable manner, including Al in the cell wall. This could be, for example, the synthesis of new cell wall material, where Al might become occluded from exchange processes.

Third, there are a number of studies and evidence indicating a role of the plasma membrane in Al uptake. Increased permeability of the plasma membrane at low pH has been correlated with Al uptake (Ishikawa et al., 2001; Ofei-Manu et al., 2001) and decreased cell turgor decreases Al uptake (Vitorello and Haug, 1996). Metabolic inhibitors, such as 2,4-dinitrophenol (DNP) or m-chlorocarbonylcyanie-phenyl hydrazone (CCCP), increase Al uptake (Wagatsuma, 1983; Zhang and Taylor, 1991; Rincon and Gonzales, 1992). This was initially proposed to be due to an energy-dependent exclusion mechanism but it could also be due to increased membrane permeability (Taylor et al., 2000).

Non-genotypic variations in cellular sensitivity to Al

An important but overlooked and underexplored realization is that cells of a same individual, organ or tissue differ in their sensitivity to Al depending on their developmental or cellular state. This is true for both plant and mammalian cells. In several cases, differences in sensitivity can be quite large even without obvious cellular changes. Thus, there are important non-genotypic factors which determine sensitivity to Al.

In plants, this has been known for some time, since symptoms are manifested mostly in root tips, however only recently has this been more appreciated and actually demonstrated experimentally (Ryan et al., 1993). Such examinations have been furthered and an important study is that of Sivaguru and Horst (1998) which established the distal part of the transition zone (DTZ) as the most Al-sensitive region of the root. Thus, sensitivity of cells to Al changes as cells transit through the root tip. Transversal differences in sensitivity probably exist likewise, the epidermis being the most sensitive (Ciamporova, 2000; Ciamporova, 2002) but this has not yet been clearly established, especially since apparent differences may be due to differences in proximity to the external Al-containing solution. Root hairs and neighboring epidermal cells also show distinct differences in sensitivity to Al (Jones et al., 1995).

Differences in the effects of Al on cells within roots were reviewed by Ciamporova (2002). In this review, Al uptake was found to differ between cell types and was largely responsible for the different effects of Al on these cells. Epidermal and cortical cells were mostly shorter and wider than the cells in control roots and within the root cortex, individual cells or a few cells of a file had severely damaged cytoplasm, in contrast to almost undisturbed cytoplasm of adjacent cells (Ciamporova, 2000). Root hairs are generally very sensitive to Al, but the degree of severity depends greatly on its physiological activity (Care, 1995; Jones et al., 1998). Root hairs which had completed their elongation were less sensitive to Al (Sattelmacher et al., 1993).

More recently, differences in Al sensitivity between tap and basal roots of common bean seedlings (Shen et al., 2004) and seminal and crown roots of rice nursery seedlings (Nagasaka et al., 2003) were examined. These differences were suggested to be due to exudation of organic acids, but this has not been demonstrated. It should be noted that differences in sensitivity to Al along the root axis cannot be explained by differences in exudation of organic acids, since exudation is most intense in the root apex, the most Al-sensitive region of the root (Delhaize et al., 1993; Pellet et al., 1995; Mariano and Keltjens, 2003), or at least not enough to justify the large differences in sensitivity between the tip and the rest of the root. Therefore, exudation of organic acids may explain differences in Al resistance between genotypes, but probably not between cell types of the same root.

The importance of these observations is that such cell status-dependent changes in Al sensitivity offer new opportunities to examine the mechanisms of Al toxicity and resistance, and may represent a new or a shift in paradigm for Al toxicity research. So far, this approach seems to have been largely underexplored. Obviously, examining these differences may be somewhat difficult considering the complexity and heterogeneous nature of these tissues (both longitudinally and transversally), in which sensitive and resistant cells may be mixed among each other. The feasibility of this approach will depend either on advances in techniques for the study of single (or few) cells or on the use of alternative experimental systems.

Differences in sensitivity to Al can also be found in plant cell cultures and may offer such an alternative system to the root. Tobacco cells in the log-phase of growth are Al-sensitive but cells in the stationary phase are not (Yamamoto et al., 1994; Vitorello and Haug, 1996; Sivaguru et al., 1999). It is also possible to alter Al sensitivity by manipulating plant cells. Cultured cells in the log phase of growth acquire Al resistance when submitted to phosphorus starvation (Yamamoto et al., 1996) or when inorganic salts are removed from the growth medium (Vitorello and Haug, 1999). Sensitivity to Al was also found to be modulated by manipulating the pectin content and pectin methylesterase activity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum* cell cultures (Schmohl and Horst, 2000; Schmohl et al., 2000). Differences in sensitivity can also be found between mammalian cells. Undifferentiated and differentiated human neuroblastoma cells showed marked difference in Al sensitivity (Verstraeten et al., 2002).

Several reports have now established a general relationship between cellular growth and expansion and sensitivity to Al (Vitorello and Haug, 1996; Sivaguru et al., 1999) or present data that are suggestive of this (Chang et al., 1999; Vazquez et al., 1999). It is interesting to note that some of the cell types mentioned above as being sensitive to Al have high relative growth rates. Ivanov (1997) reported that cells of the DTZ have the highest relative growth rates along the root axis. Likewise, root hairs are among the fastest elongating plant cells. It is also interesting to note that localized changes

in apoplastic and cytoplasmic pH, which can be decisive for Al toxicity, are frequently observed and associated with cellular growth process, such as root hair development in *Arabidopsis thaliana* (Bibikova and Gilroy, 2002).

The relationship to cell growth and Al-sensitivity makes sense in light of some current views of the mechanisms of Al toxicity, as discussed below, but also brings about important implications for the interpretation of results in this field, particularly evaluation of Al resistance.

Primary mechanisms of Al toxicity

The search for the primary target(s) of Al injury and thus a complete understanding of the mechanisms of Al toxicity is an important area in Al toxicity studies, but this aspect still remains elusive. Many hypotheses have been advanced, but they all need to be supported by more convincing evidence. Part of the problem may be that it is possible or even likely that Al may have more than one primary target. It is difficult to adequately cover all possible mechanisms in a single review. Nonetheless, hypotheses on the mechanisms of Al toxicity can be roughly divided into those affecting phosphate and/or nucleotide metabolism, cell wall structure and function, membrane structure and function, membrane transporters, cytoskeletal dynamics, signal transduction and oxidative stress.

Aluminum is capable of binding tightly to DNA, presumably to its phosphate backbone, or alternatively to associated histones (Matsumoto, 1991) and this led to one of the earlier hypotheses of toxicity, that cell division was impaired because of interactions of Al with nuclear DNA. Aluminum also has a high binding affinity to free nucleotide triphosphates and a model for Al toxicity based on its binding to ATP in the cytoplasm was proposed (Pettersson and Bergman, 1989).

Aluminum has also been shown to alter the structure of the plasma membrane (Zhao et al., 1987) and has pronounced effects on ion fluxes across the membrane, particularly Ca^{2+} uptake (Liu and Luan, 2001). Aluminum was also shown to affect membrane physical properties in Neuroblastoma cells (Verstraeten et al., 2002).

Aluminum toxicity has frequently been linked to Ca^{2+} (Rengel, 1992; Rengel and Zhang, 2003) either because of Al-induced perturbations in cellular Ca^{2+} metabolism or because of Ca^{2+} amelioration of Al toxicity (Kinraide and Parker, 1987). Several investigations found Al-induced alterations in the structure of calmodulin, the chief mediator of intracelular Ca^{2+} signaling and initiated considerable research on the role of calmodulin in Al toxicity (Haug and Vitorello, 1996). More recently, phosphoinositide-mediated signal transduction, a pathway which also involves Ca^{2+} as an intracellular messenger, has been investigated as a primary site of Al toxicity in mammalian (Haug et al., 1994) and plant cells (Jones and Kochian, 1995; Jones et al., 1995). In both cases Al treatment presumably inhibited the activity of phospholipase C or possibly the action of the trimeric G-protein.

Considerable evidence has emerged in the literature in recent years, both in plants and animals, that Al promotes oxidative stress in cells, although perhaps certain conditions are required for this to occur. In plants, evidence for this includes the promotion of lipid peroxidation (Cakmak and Horst, 1991; Yamamoto et al., 2001), the expression of oxidative stress genes (Richards et al., 1998; Milla et al., 2002) and the amelioration of Al toxicity in plants transformed with oxidative stress genes (Ezaki et al., 2000).

However, whether Al-induced oxidative stress is a primary or secondary effect is still a matter of debate and continued investigation. Although lipid peroxidation has been frequently observed (Ono et al., 1995; Peixoto et al., 2001) and is an early symptom, Yamamoto et al. (2001) argued that it was not a primary cause of Al toxicity.

Although oxidative stress is well known to be induced by heavy metals, the pro-oxidant activity of Al, a non-redox-active metal, is intriguing. The mechanisms of this pro-oxidant activity have been reviewed by Zatta (2002) and Exley (2004). Since Al cannot induce oxidative stress directly, it must do so by its influence on the substrates of oxidation, such as membrane lipids, on other pro-oxidants, such as iron, or on the oxidant itself, such as the superoxide radical anion (Exley, 2004). It is not yet known which of these mechanisms operate in cells.

In the plant literature, Al-induced oxidative stress has been most commonly attributed to alterations in membrane structure by Al, which would then favor radical chain reactions mediated by Fe ion (Yamamoto et al., 2002). This is not surprising, given that Al is known to affect membrane structure and the presence of iron has been shown to increase membrane peroxidation induced by Al (Ono et al., 1995; Yamamoto et al., 1997). The effects of Al on the antioxidant system of the cell cannot be dismissed, and such studies are emerging in the literature (Devi et al., 2003; Guo et al., 2004), however, it must be kept in mind that activation of the cellular antioxidant system is a general stress response and may not be specific to Al toxicity.

One of the most interesting hypotheses is that the primary site of Al toxicity resides in the CW-PM-CSK continuum (Horst et al., 1999). This hypothesis is attractive because it is perhaps the only one with the potential to integrate and conciliate much of the apparently diverse and conflicting information which has accumulated on Al toxicity. Some of the reasons which favor this hypothesis are listed:

a) The current view is that the cell wall, plasma membrane and cytoskeleton are interconnected, in a manner which must still be fully elucidated, and that perturbations in one component may have profound effects on another. This may possibly accommodate the fact that there is very good evidence that Al interacts with the cell wall (Schmohl and Horst, 2000) the plasma membrane (Ishikawa and Wagatsuma, 1998) and cytoskeleton (Blancaflor et al., 1998; Sivaguru et al., 1999);

b) This hypothesis can conciliate the localization of Al at the periphery of the cell (Vitorello and Haug, 1996) with the involvement of the plasma membrane and requirement of a protoplast for the non-exchangeable uptake of Al;

c) It may also be capable of explaining the general relationship between growth rates and sensitivity to Al and also why certain cell types are more sensitive to Al, such as cells of the DTZ and root hairs.

However, the exact nature of this target is not known. Nonetheless, it would be expected to be a component that is interconnected with other components of the continuum. Unfortunately, our knowledge of this system is still poor but its components and workings are quickly emerging (Baluska et al., 2003). There are probably plenty of potential targets for Al in this system. It is at least curious that the expression of a cell wall-associated receptor kinase (WAK) was reported to be induced by Al (Sivaguru et al., 2003).

Cellular responses to Al toxicity and Al-induced genes

How do plant cells respond to Al exposure? Responses at the cellular level are wide-ranging. In principle, the more immediate the response, the more likely that it is related to the primary mechanism of toxicity or to a mechanism of resistance, thus the interest in understanding cellular responses to Al toxicity. However, the distinction between the effects of toxicity and the cellular response triggered by toxicity are not always clear. To illustrate, are changes in levels of free intracellular calcium a result of toxicity or are they the beginning of a cellular response?

One well-known Al-induced cell response is the synthesis of callose which is frequently used as an indicator for Al-induced stress (Horst et al., 1997). But it is not generally considered very specific nor do all cells synthesize this compound in response to Al.

Changes in gene expression can be, in general, regarded as a cellular response rather than an effect, although in principle that may not actually be the case. Information on Al-induced gene expression may allow the understanding of mechanisms of toxicity and resistance. Among the first studies to examine Al-induced genes are those of Gardner (Snowden and Gardner, 1993).

Al induces the synthesis of several proteins (Basu et al., 1994) and also the expression of several genes (Snowden and Gardner, 1993; Snowden et al., 1995). Some of these proteins have been identified and include phenylalanine ammonia-lyase, metallothionein-like proteins, proteinase inhibitors and asparagine synthetases (Snowden et al., 1995). Thus, in general, the proteins synthesized and the genes expressed in response to Al appear to be general stress- or wound-response proteins and genes (Sugimoto et al., 2004). But there are also other genes which may be induced by Al and which are promising for resistance, particularly transporters for organic acids (Sasaki et al., 2004).

Perhaps the most comprehensive analysis of Al-induced gene expression was performed by Milla et al. (2002) which expanded considerably on the 45 genes previously identified and reported to be regulated by Al. This work confirms many aspects of earlier studies, such the involvement of oxidative stress genes (Richards et al., 1998) but also confirms more recent aspects. Of particular importance is the discovery of the effect of Al on genes involved with cell division and elongation genes, oxidative stress and iron metabolism.

ALUMINUM RESISTANCE

It has been known for a long time that many plant species, including crop plants, show wide variability with respect to their resistance to Al, and this has been exploited to obtain Al-resistant varieties. The understanding of the mechanisms and genetics of Al resistance has advanced considerably over the last decade and traditional screening and breeding programs have resulted in considerable success over the years. Because of the large areas of acid soils and the importance of this constraint in Brazil, the collection of acid-soil resistant Brazilian plant varieties are among some of the best in the world.

One problem, however, is how to evaluate Al resistance. The most widely used methods use relative root growth in Al at low pH compared to growth in low pH alone. However,

as discussed above there are several problems associated with this approach (Lazof and Holland, 1999). Aluminum resistance studies should take the detrimental effect of acidity into consideration and appropriate controls designed. Screening methods for identifying Al-resistant plants and their inherent limitations were reviewed by Samac and Tesfaye (2003). They raise the point that slower growing plants tend to be selected as Al-resistant (DallAgnol et al., 1996), which is consistent with the previously mentioned link between cellular sensitivity to Al and rate of growth.

These observations raise questions as to the correlation between adaptation to soils with high levels of Al and screening for Al resistance in nutrient solutions. Thus, knowledge on the mechanisms of Al toxicity is also important because it can contribute to the development of more accurate screening procedures via improved criteria for the determination of resistance and also for the development of Al-resistant plants.

Genetics and inheritance of Al resistance

The inheritance and genetics of Al resistance has been examined mostly in cereals of the Triticeae. From these studies it was found that in some species, such as in wheat or rye, that Al resistance is determined by one or a few genes (Berzonsky, 1992), whereas in other species such as rice or maize it is multigenic and quantitative (Kochian et al., 2004). However, there is an increasing awareness that Al resistance is more likely a multigenic trait.

Until recently, no Al-resistance gene had been cloned. However, Sasaki et al. (2004) cloned a gene with properties of an Al-induced channel and subsequently transformed barley and obtained high levels of resistance (Delhaize et al., 2004). This may be the first Al resistance gene to have been cloned.

Cellular mechanisms of Al resistance

The mechanisms for resistance, like those for toxicity, are not entirely known, but at least one mechanism, the secretion of organic acids, is now reasonably well established and understood (Kochian et al., 2004). Good evidence for this mechanism initially came from three independent groups that demonstrated that malate-secretion is enhanced in Al-resistant cultivars compared to Al-sensitive ones (Delhaize et al., 1993; Basu et al., 1994; Pellet et al., 1995).

Several studies have attempted to overexpress either citrate synthase or malate dehydrogenase, with the intended purpose of increasing organic acid exudation (de la Fuente et al., 1997; Koyama et al., 2000; Tesfaye et al., 2001; Anoop et al., 2003), or general stress genes (Ezaki et al., 2000; Basu et al., 2001). However, the increases in Al resistance have been modest or results have not been reproducible (Delhaize et al., 2001). The latter is not entirely surprising given that it would not be expected that a single enzyme should change the levels of highly regulated metabolites such as organic acids. From this, it follows that if Al resistance is indeed determined by organic acid exudation then it is not surprising that multiple genes are involved.

More recently, barley plants transformed with a gene (*ALMT1*) encoding a putative malate transporter were found to be more resistant to Al (Delhaize et al., 2004). This perhaps makes more sense, given that this could increase exudation without necessarily changing cytoplasmic metabolite concentrations.

However, the results presented above must be contrasted with the fact that transformation of plants with several different general stress genes can also confer Al resistance to these plants, some of which have no obvious relation to any mechanism of Al resistance (Pellet et al., 1996; Pellet et al., 1997; Ezaki et al., 2000; Tesfaye et al., 2001; Ezaki et al., 2004). One fact that must be looked at carefully is the relation between rate of cell growth and Al toxicity and the fact that most if not all of these genes could be expected to affect cell growth rates since organic acids are important in metabolism

Despite the large number of studies in support of an organic acid mechanism of resistance, this issue is probably far from over. There are several observations that do not fit the model. The most important is that several Al-sensitive plants have high levels of organic acid secretion (Kochian et al., 2004). Rice plants also did not show increased Al resistance, despite increased organic acid efflux (Sasaki et al., 2004). How good is the correlation between organic acid exudation and resistance to Al? How well has it been quantified? These are important questions which have been discussed by Mariano and Keltjens (2003). There is of course, the case in which there are Al-resistant plants which do not show enhanced organic acid exudation, such as Signal grass (*Brachiaria decumbens*) for example (Wenzl et al., 2001). Similar results have also been found in some soybean cultivars (Nian et al., 2004). Therefore, there is clearly evidence for the existence of other resistance mechanisms also.

Unfortunately, the mechanisms of Al resistance in species native to acid soils are much less studied. Such species are

commonly divided into Al excluders and accumulators. The accumulation of Al, and thus, internal mechanisms of resistance have received more attention (Watanabe and Osaki, 2002). Exclusion mechanisms of plants native to acid-soil regions are largely unknown, although CIAT is undertaking an effort to examine this in *Brachiaria* species (Ishitani et al., 2004).

REFERENCES

Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L, Taylor GJ (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. Plant Physiol. 132:2205-2217.

Archambault DJ, Zhang GC, Taylor GJ (1997) Spatial variation in the kinetics of aluminium (Al) uptake in roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) exhibiting differential resistance to Al. Evidence for metabolism-dependent exclusion of Al. J. Plant Physiol. 151:668-674.

Baluska F, Samaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D (2003) Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. Plant Physiol. 133: 482-491.

Barcelo J, Poschenrieder C (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. Environ. Exp. Bot. 48:75-92.

Basu U, Basu A, Taylor GJ (1994) Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress. Plant Physiol. 106:151-158.

Basu U, Godbold D, Taylor GJ (1994) Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. J. Plant Physiol. 144:747-753.

Basu U, Good AG, Taylor GJ (2001) Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. Plant Cell Environ. 24:1269-1278.

Berzonsky WA (1992) The genomic inheritance of aluminum tolerance in Atlas-66 wheat. Genome 35:689-693.

Bibikova T, Gilroy S (2002) Root hair development. J. Plant Growth Regul. 21:383-415.

Blancaflor EB, Jones DL, Gilroy S (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. Plant Physiol. 118:159-172.

Boscolo PRS, Menossi M, Jorge RA (2003) Aluminum-induced oxidative stress in maize. Phytochemistry. 62:181-189.

Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminum on lipidperoxidation, superoxidedismutase, catalase, and peroxidase-activities in root-tips of soybean (*Glycine max*). Physiol. Plant. 83:463-468.

Care DA (1995) The effect of aluminum concentration on root hairs in white clover (*Trifolium repens* L.). Plant Soil 171:159-162.

Chang YC, Yamamoto Y, Matsumoto H (1999) Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron. Plant Cell Environ. 22:1009-1017.

Ciamporova M (2000) Diverse responses of root cell structure to aluminium stress. Plant Soil 226:113-116.

Ciamporova M (2002) Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. Biol. Plant. 45:161-171.

DallAgnol M, Bouton JH, Parrott WA (1996) Screening methods to develop alfalfa germplasms tolerant of acid, aluminum toxic soils. Crop Sci. 36:64-70.

de la Fuente JM, RamirezRodriguez V, CabreraPonce JL, HerreraEstrella L (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. Science 276: 1566-1568.

Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC, Randall PJ (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). 1. Uptake and distribution of aluminum in root apices. Plant Physiol. 103:685-693.

Delhaize E, Hebb DM, Ryan PR (2001) Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. Plant Physiol. 125:2059-2067.

Delhaize E, Ryan PR (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. Plant Physiol. 107:315-321.

Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:15249-54.

Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). 2. Aluminum-stimulated excretion of malic-acid from root apices. Plant Physiol. 103:695-702.

Devi SR, Yamamoto Y, Matsumoto H (2003) An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. J. Inorg. Biochem. 97:59-68.

Exley C (2004) The pro-oxidant activity of aluminum. Free Radic. Biol. Med. 36:380-387.

Ezaki B, Gardner RC, Ezaki Y, Matsumoto H (2000) Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. Plant Physiol. 122:657-665.

Ezaki B, Suzuki M, Motoda H, Kawamura M, Nakashima S, Matsumoto H (2004) Mechanism of gene expression of Arabidopsis glutathione S-transferase, AtGST1, and AtGST11 in response to aluminum stress. Plant Physiol. 134:1672-1682.

Foy CD, Chaney RL, White MC (1978) The physiology of metal toxicity in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 29:511-566.

Guo TR, Zhang GP, Zhou MX, Wu FB, Chen JX (2004) Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. Plant Soil 258:241-248.

Haridasan M, Dearaujo GM (1988) Aluminium-accumulating species in two forest communities in the cerrado region of central Brazil. For. Ecol. Manage. 24:15-26.

Haridasan M, Paviani TI, Schiavini I (1986) Localization of aluminum in the leaves of some aluminum-accumulating species. Plant Soil 94:435-437.

Haug A, Shi B, Vitorello V (1994) Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. Arch. Toxicol. 68:1-7.

Haug A, Vitorello V (1996) Aluminium coordination to calmodulin: Thermodynamic and kinetic aspects. Coord. Chem. Rev. 149:113-124.

Hiradate S (2004) Speciation of aluminum in soil environments. Soil Sci. Plant Nutr. 50:303-314.

Horst WJ, Puschel AK, Schmohl N (1997) Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. Plant Soil 192:23-30.

Horst WJ, Schmohl N, Kollmeier M, Baluska F, Sivaguru M (1999) Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall - plasma membrane - cytoskeleton continuum? Plant Soil 215:163-174.

Hungria M, Vargas MAT (2000) Environmental factors affecting N-2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Res. 65:151-164.

Ishikawa S, Wagatsuma T (1998) Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. Plant Cell Physiol. 39:516-525.

Ishikawa S, Wagatsuma T, Takano T, Tawaraya K, Oomata K (2001) The plasma membrane intactness of root-tip cells is a primary factor for Al-tolerance in cultivars of five species. Soil Sci. Plant Nutr. 47:489-501.

Ishitani M, Rao I, Wenzl P, Beebe S, Tohme J (2004) Integration of genomics approach with traditional breeding towards improving abiotic stress adaptation: drought and aluminum toxicity as case studies. Field Crops Res. 90:35-45.

Ivanov VB (1997) Relationship between cell proliferation and transition to elongation in plant roots. Int. J. Dev. Biol. 41:907-915.

Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E (2002) Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: A review of its phylogenetic significance. Bot. Rev. 68:235-269.

Jones DL, Kochian LV (1995) Aluminum Inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots - a role in aluminum toxicity. Plant Cell 7: 1913-1922.

Jones DL, Shaff JE, Kochian LV (1995) Effect of aluminum on calcium homeostasis and IP_3 mediated signal-transduction in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Physiol. 108:41-41.

Jones DL, Shaff JE, Kochian LV (1995) Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in limnobium-stoloniferum.1. Inhibition of tip growth by aluminum. Planta 197:672-680.

Jones DL, Gilroy S, Larsen PB, Howell SH, Kochian LV (1998) Effect of aluminum on cytoplasmic Ca^{2+} homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* (L.). Planta 206:378-387.

Kidd PS, Proctor J (2001) Why plants grow poorly on very acid soils: are ecologists missing the obvious? J. Exp. Bot. 52:791-799.

Kinraide TB (1990) Assessing the rhizotoxicity of the aluminate ion, $Al(OH)_4$. Plant Physiol. 93:1620-1625.

Kinraide TB (1991) Identity of the rhizotoxic aluminum species. Plant Soil 134:167-178.

Kinraide TB (1993) Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media - a case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. Physiol. Plant. 88:619-625.

Kinraide TB (1998) Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities. Plant Physiol. 118:513-520.

Kinraide TB, Parker DR (1987) Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat. Plant Physiol. 83:546-551.

Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 46:237-260.

Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. Annu. Rev. Plant Biol. 55:459-493.

Koyama H, Kawamura A, Kihara T, Hara T, Takita E, Shibata D (2000) Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. Plant Cell Physiol. 41:1030-1037.

Koyama H, Toda T, Hara T (2001) Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. J. Exp. Bot. 52:361-368.

Koyama H, Toda T, Yokota S, Dawair Z, Hara T (1995) Effects of aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain landsberg in hydroponic culture. Plant Cell Physiol. 36:201-205.

Larsen PB, Tai CY, Kochian LV, Howell SH (1996) Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. Plant Physiol. 110:743-751.

Lazof DB, Goldsmith JG, Rufty TW, Linton RW (1994) Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips - A microanalytical study using secondary-ion mass-spectrometry. Plant Physiol. 106:1107-1114.

Lazof DB, Holland MJ (1999) Evaluation of the aluminium-induced root growth inhibition in isolation from low pH effects in *Glycine max*, *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris*. Aust. J. Plant Physiol. 26:147-157.

Liu K, Luan S (2001) Internal aluminum block of plant inward K^+ channels. Plant Cell 13:1453-1465.

Llugany M, Poschenrieder C, Barcelo J (1995) Monitoring of aluminum-induced inhibition of root elongation in 4 maize cultivars differing in tolerance to aluminum and proton toxicity. Physiol. Plant. 93:265-271.

Ma JF, Furukawa J (2003) Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. J. Inorg. Biochem. 97:46-51.

Ma JF, Hiradate S, Nomoto K, Iwashita T, Matsumoto H (1997) Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea - Identification of Al form in the leaves. Plant Physiol. 113:1033-1039.

Mariano ED, Keltjens WG (2003) Evaluating the role of root citrate exudation as a mechanism of aluminium resistance in maize genotypes. Plant Soil 256:469-479.

Marienfeld S, Lehmann H, Stelzer R (1995) Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. Plant Soil 171:167-173.

Marienfeld S, Stelzer R (1993) X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. J. Plant Physiol. 141: 569-573.

Marschner H (1991) Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. Plant Soil 134:1-20.

Martin RB (1988) Bioinorganic chemistry of aluminum. In: Sigel H, Sigel A. (eds), Metal ions in biological systems: Aluminum and its role in biology, vol. 24, pp.2-57. Marcel Dekker, New York.

Martin, RB (1992) Aluminium speciation in biology. In: Chadwick DJ, Whelan J (eds), Aluminium in biology and medicine, pp.5-25. John Wiley & Sons, New York.

Matsumoto H, Hirasawa E, Torikai H, Takahashi E (1976) Localization of absorbed aluminum in pea root and its binding to nucleic acids. Plant Cell Physiol. 17:127-137.

Matsumoto H, Senoo Y, Kasai M, Maeshima M (1996) Response of the plant root to aluminum stress: Analysis of the inhibition of the root elongation and changes in membrane function. J. Plant Res. 109:99-105.

Milla MA, Butler E, Huete AR, Wilson CF, Anderson O, Gustafson JP (2002) Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. Plant Physiol. 130:1706-1716.

Moseyko N, Feldman LJ (2001) Expression of pH-sensitive green fluorescent protein in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Environ. 24:557-563.

Nagasaka S, Teraoka T, Matsumoto S, Mori S, Yoshimura E (2003) Difference in Al sensitivity between seminal and crown roots of rice nursery seedlings. Soil Sci. Plant Nutr. 49:897-902.

Nagata T, Hayatsu M, Kosuge N (1992) Identification of aluminum forms in tea leaves by Al-27 NMR. Phytochemistry 31:1215-1218.

Nagata T, Hayatsu M, Kosuge N (1993) Aluminum kinetics in the tea plant using Al-27 and F-19 NMR. Phytochemistry 32:771-775.

Nian H, Yang ZM, Huang H, Yan XL, Matsumoto H (2004) Citrate secretion induced by aluminum stress may not be a key mechanism responsible for differential aluminum tolerance of some soybean genotypes. J. Plant Nutr. 27: 2047-2066.

Nieboer E, Richardson DHS (1980) The replacement of the non-descript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. 1:3-26.

Ofei-Manu P, Wagatsuma T, Ishikawa S, Tawaraya K (2001) The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. Soil Sci. Plant Nutr. 47: 359-375.

Ono K, Yamamoto Y, Hachiya A, Matsumoto H (1995) Synergistic inhibition of growth by aluminum and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture. Plant Cell Physiol. 36:115-125.

Orvig, C (1993) The aqueous coordination chemistry of aluminum. In: Robinson GH (ed), Coordination chemistry of aluminum, pp.85-121. VCH Publishers, New York, NY.

Ownby JD (1993) Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminum-treated wheat roots. Physiol. Plant. 87: 371-380.

Parker DR, Bertsch PM (1992) Formation of the Al-13 tridecameric polycation under diverse synthesis conditions. Environ. Sci. Technol. 26:914-921.

Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'Anna R, Mosquim PR, Moreira MA (2001) Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. J. Plant Nutr. 24:1061-1070.

Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). Planta 196:788-795.

Pellet DM, Papernik LA, Jones DL, Darrah PR, Grunes DL, Kochian LV (1997) Involvement of multiple aluminium exclusion mechanisms in aluminium tolerance in wheat. Plant Soil 192:63-68.

Pellet DM, Papernik LA, Kochian LV (1996) Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat - Roles of root apical phosphate and malate exudation. Plant Physiol. 112: 591-597.

Pettersson A, Bergman B (1989) Effects of aluminum on ATP pools and utilization in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* - a model for the *in vivo* toxicity. Physiol. Plant. 76:527-534.

Plieth C, Sattelmacher B, Hansen UP, Knight MR (1999) Low-pH-mediated elevations in cytosolic calcium are inhibited by aluminium: A potential mechanism for aluminium toxicity. Plant J. 18:643-650.

Rengel Z (1992) Role of calcium in aluminum toxicity. New Phytol. 121:499-513.

Rengel Z (1996) Tansley review no 89 - Uptake of aluminium by plant cells. New Phytol. 134:389-406.

Rengel Z, Zhang WH (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. New Phytol. 159:295-314.

Richards KD, Schott EJ, Sharma YK, Davis KR, Gardner RC (1998) Aluminum induces oxidative stress genes in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. 116:409-418.

Rincon M, Gonzales RA (1992) Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Plant Physiol. 99: 1021-1028.

Ryan PR, Ditomaso JM, Kochian LV (1993) Aluminum toxicity in roots - an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. J. Exp. Bot. 44:437-446.

Ryan PR, Kochian LV (1993) Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. Plant Physiol. 102:975-982.

Samac DA, Tesfaye M (2003) Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils - a review. Plant Cell Tissue Organ Cult. 75:189-207.

Sasaki M, Kasai M, Yamamoto Y, Matsumoto H (1994) Comparison of the early response to aluminum stress between tolerant and sensitive wheat cultivars: Root growth, aluminum content and efflux of K+. J. Plant Nutr. 17:1275-1288.

Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. Plant J. 37:645-653.

Sattelmacher B, Heinecke I, Muhling KH (1993) Influence of minerals on cytoplasmic streaming in root hairs of intact wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Plant Soil 156: 107-110.

Schmohl N, Horst WJ (2000) Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. Plant Cell Environ. 23:735-742.

Schmohl N, Pilling J, Fisahn J, Horst WJ (2000) Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. Physiol. Plant. 109:419-427.

Shen H, Yan XL, Cai KZ, Matsumoto H (2004) Differential Al resistance and citrate secretion in the tap and basal roots of common bean seedlings. Physiol. Plant. 121:595-603.

Silva IR, Smyth TJ, Moxley DF, Carter TE, Allen NS, Rufty TW (2000) Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. Plant Physiol. 123: 543-552.

Sivaguru M, Baluska F, Volkmann D, Felle HH, Horst WJ (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. Plant Physiol. 119:1073-1082.

Sivaguru M, Ezaki B, He ZH, Tong HY, Osawa H, Baluska F, Volkmann D, Matsumoto H (2003) Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. Plant Physiol. 132: 2256-2266.

Sivaguru M, Horst WJ (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum- sensitive apical root zone of maize. Plant Physiol. 116:155-163.

Sivaguru M, Yamamoto Y, Matsumoto H (1999) Differential impacts of aluminium on microtubule organisation depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. Physiol. Plant. 107:110-119.

Snowden KC, Gardner RC (1993) Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. Plant Physiol. 103:855-861.

Snowden KC, Richards KD, Gardner RC (1995) Aluminum-induced genes - induction by toxic metals, low- calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. Plant Physiol. 107:341-348.

Sugimoto M, Saiki Y, Zhang DM, Kawai F (2004) Cloning and characterization of preferentially expressed genes in an aluminum-tolerant mutant derived from *Penicillium chrysogenum* IF04626. FEMS Microbiol. Lett. 230:137-142.

Taylor GJ, McDonald-Stephens JL, Hunter DB, Bertsch PM, Elmore D, Rengel Z, Reid RJ (2000) Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. Plant Physiol. 123:987-996.

Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA (2001) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. Plant Physiol 127:1836-44.

Toth, I, Zekany, L, Brucher, E. 1984 Equilibrium study of the systems of Al(III), Ga(III), and In(III) with mercaptacetate, 3-mercaptopropionate and 2-mercaptobenzoate. Polyhedron 7:871-877.

Vazquez MD, Poschenrieder C, Corrales I, Barcelo J (1999) Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. Plant Physiol. 119:435-444.

Verstraeten SV, Erlejman AG, Zago MP, Oteiza PI (2002) Aluminum affects membrane physical properties in human neuroblastoma (IMR-32) cells both before and after differentiation. Arch. Biochem. Biophys. 399:167-173.

Vitorello VA, Haug A (1996) Short-term aluminium uptake by tobacco cells: Growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. Physiol. Plant. 97:536-544.

Vitorello VA, Haug A (1997) An aluminum-morin fluorescence assay for the visualization and determination of aluminum in cultured cells of *Nicotiana tabacum* L. cv BY-2. Plant Sci. 122:35-42.

Vitorello VA, Haug A (1999) Capacity for aluminium uptake depends on brefeldin A-sensitive membrane traffic in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2) cells. Plant Cell Rep. 18:733-736.

Von Uexküll HR, Mutert E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. Plant Soil 171:1-15.

Wagatsuma T (1983) Effect of non-metabolic conditions on the uptake of aluminum by plant roots. Soil Sci. Plant Nutr. 29:323-333.

Wagatsuma T, Ishikawa S, Obata H, Tawaraya K, Katohda S (1995) Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminum toxicity in roots. Plant Soil 171:105-112.

Wagatsuma T, Kaneko M, Hayasaka Y (1987) Characteristics of upward translocation of aluminum in plants. Soil Sci. Plant Nutr. 30:345-358.

Watanabe T, Osaki M (2002) Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: A review. Commun. Soil Sci. Plant. Anal. 33: 1247-1260.

Watanabe T, Osaki M, Yoshihara T, Tadano T (1998) Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. Plant Soil 201:165-173.

Wenzl P, Patino GM, Chaves AL, Mayer JE, Rao IM (2001) The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. Plant Physiol. 125: 1473-1484.

Williams RJP (1999) What is wrong with aluminium? The J.D. Birchall memorial lecture. J. Inorg. Biochem. 76:81-88.

Williams RJP (2002) Recent aspects of aluminium chemistry and biology: a survey. Coord. Chem. Rev. 228:93-96.

Yamamoto Y, Hachiya A, Matsumoto H (1997) Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. Plant Cell Physiol. 38:1333-1339.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. Plant Physiol. 128:63-72.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H (2003) Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. Plant Soil 255:239-243.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. Plant Physiol. 125:199-208.

Yamamoto Y, Masamoto K, Rikiishi S, Hachiya A, Yamaguchi Y, Matsumoto H (1996) Aluminum tolerance acquired during phosphate starvation in cultured tobacco cells. Plant Physiol. 112:217-227.

Yamamoto Y, Rikiishi S, Chang YC, Ono K, Kasai M, Matsumoto H (1994) Quantitative estimation of aluminum toxicity in cultured tobacco cells - correlation between aluminum uptake and growth inhibition. Plant Cell Physiol. 35: 575-583.

Yan F, Feuerle R, Schaffer S, Fortmeier H, Schubert S (1998) Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. Plant Physiol. 117:311-319.

Yan F, Schubert S, Mengel K (1992) Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root-growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia Faba* L.). Plant Physiol. 99:415-421.

Zatta P, Kiss T, Suwalsky M, Berthon G (2002) Aluminium(III) as a promoter of cellular oxidation. Coord. Chem. Rev. 228:271-284.

Zhang GC, Slaski JJ, Archambault DJ, Taylor GJ (1997) Alteration of plasma membrane lipids in aluminum resistant and aluminum sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. Physiol. Plant. 99:302-308.

Zhang GC, Taylor GJ (1989) Kinetics of aluminum uptake by excised roots of aluminum tolerant and aluminum sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. Plant Physiol. 91: 1094-1099.

Zhang GC, Taylor GJ (1990) Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L. - Identity of the linear-phase of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars. Plant Physiol. 94:577-584.

Zhang GC, Taylor GJ (1991) Effects of biological inhibitors on kinetics of aluminum uptake by excised roots and purified cell-wall material of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. J. Plant Physiol. 138:533-539.

Zhao X-J, Sucoff E, Stadelmann EJ (1987) Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. Plant Physiol. 83:159-162.

Zheng SJ, Lin XY, Yang JL, Liu Q, Tang CX (2004) The kinetics of aluminum adsorption and desorption by root cell walls of an aluminum resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar. Plant Soil 261:85-90.

Zsoldos F, Erdei L (1981) Membrane and ion-transport properties in cereals under acidic and alkaline stress .1. Effects of pH on potassium uptake and growth of rice and wheat. Physiol. Plant. 53:468-470.