UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LUIZA DORIGAN DE MATOS FURLANETTO

CARACTERIZAÇÃO DE PARÂMETROS MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS DE Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze COM DIFERENTES POTENCIAIS EMBRIOGÊNIOS E EFEITOS DO ESTRESSE POR VARIAÇÃO DE TEMPERATURA



ANA LUIZA DORIGAN DE MATOS FURLANETTO

CARACTERIZAÇÃO DE PARÂMETROS MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS DE Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze COM DIFERENTES POTENCIAIS EMBRIOGÊNIOS E EFEITOS DO ESTRESSE POR VARIAÇÃO DE TEMPERATURA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Silvia Maria Suter Correia Cadena

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Glaucia Regina Martinez

Supervisores no Exterior: Ian Max Møller e Tinna Ventrup Stevnsner - Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University

CURITIBA 2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas. Biblioteca de Ciências Biológicas. (Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Furlanetto, Ana Luiza Dorigan de Matos Caracterização de parâmetros mitocondriais em células de Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze com diferentes potenciais embriogênicos e efeitos do estresse por variação de temperatura. / Ana Luiza Dorigan de Matos Furlanetto. - Curitiba, 2018. 103 p.: il. ; 30cm. Orientadora: Silvia Maria Suter Correia Cadena Coorientadora: Glaucia Regina Martinez Supervisores no Exterior: Ian Max Møller e Tinna Ventrup Stevnsner -Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica. 1. Bioenergética. 2. Gimnosperma. 3. DNA. 4. Estresse oxidativo. Título. II. Cadena, Silvia Maria Suter Correia. III. Martinez, Glaucia Regina. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica. CDD (20. ed.) 574.19121



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ClÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de ANA LUIZA DORIGAN DE MATOS FURLANETTO intitulada: Caracterização de parâmetros mitocondriais em células de Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze com diferentes potenciais embriogênicos e efeitos do estresse por variação de temperatura, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua <u>OMATCACUS</u> no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Maio de 2018.

Silvia a Jalia Suter Correia Cadena Presidente da Banca Examinadora

LIA DONATTI Avaliador Externo

Melille hocho

MARIA ELIANE MERLIN ROCHA Avaliador Interno

ANDRÉ LUIS WENDT DOS SANTOS Avaliador Externo

uture a JULIANA BELLO BARON MAURER Avaliador Interno

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Primeiramente dedico esse trabalho à minha Avó, Encarnação Julia Matos, pelo exemplo de mulher, de força feminina, de Mãe e Avó que ela foi e sempre será.

Por fim, diante dos cortes no orçamento de mais de 50 %, das verbas destinadas às Universidades Federais e Estaduais em 2017/2018, que somam cerca de 477 milhões de reais, também dedico este trabalho à Ciência Brasileira, a todos os meus Professores e colegas de área, em uma tentativa pessoal de reconhecimento e superação do descaso que o Governo Brasileiro impõe a todos nós Cientistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família, em especial meus Pais, Célia e Waldney, por não pouparem esforços para que esta conquista se tornasse realidade. Aos meus irmãos João e Felipe e ao meu namorado Gabriel, pelo apoio e por sempre acreditarem e mim. Especialmente ao Gabriel, pela compreensão, amor e carinho, mesmo durante os períodos em que não era possível estarmos geograficamente próximos.

Agradeço também a todos os 'Mestres' do Laboratório de Oxidações, em especial à Professora Dr.^a Silvia M. S. C. Cadena, um exemplo de pesquisadora e professora que levarei para a vida. Obrigada por me ensinar o caminho da ciência sempre com muito carinho e dedicação. À Professora Dr.^a Glaucia Regina Martinez pela co-orientação, disponibilidade para esclarecer dúvidas, fazer correções e contribuir para o trabalho. À Prof. Maria Eliane Merlin Rocha, pelas avaliações, pelas conversas e conselhos. A todos os amigos do laboratório de Oxidações, aos que já se foram e aos que chegaram, obrigada pela grande amizade e pelos bate-papos na salinha do café, no RU, que sempre melhoram o humor nos dias difíceis.

Gostaria de agradecer também a Prof. Eny I.S. Floh e ao Dr. André Luis W. dos Santos, do Laboratório de Biologia Celular de Plantas, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da USP por doarem as culturas SE1 e SE6 e, assim, permitirem que parte dessa tese fosse realizada nas dependências do Laboratório de Oxidações Biológicas da UFPR.

Parte desse trabalho só foi possível também pelo apoio e aceite dos professores do Departamento de Biologia Molecular e Genética da Universidade de Aarhus – Dinamarca, Professora Dr.^a Tinna Stevnsner e Professor Dr.^o Ian Max Møller. Obrigada por terem acreditado em mim e me acolhido no laboratório 'TVS'. Por fim, queria agradecer também a todos os técnicos e alunos do laboratório TVS de Aarhus, que com paciência se dispuseram a me ensinar metodologias da Biologia Molecular. Todos, sempre dispostos a uma boa conversa na hora do almoço, ou a compartilharem momentos divertidos e até algumas cervejas nas horas vagas. Essa experiência foi inesquecível, onde fui apresentada não só à encantadora cultura Dinamarquesa, mas a outras como a Espanhola, Lituanesa, Polonesa, Argentina e muitas outras...

It doesn't matter if you love him, or capital H-I-M Just put your paws up 'Cause you were born this way, baby

...

My mama told me when I was young We are all born superstars

She rolled my hair and put my lipstick on In the glass of her boudoir

'There's nothing wrong with loving who you are' She said, 'cause he made you perfect, babe'

'So hold your head up girl and you'll go far Listen to me when I say'

I'm beautiful in my way 'cause god makes no mistakes I'm on the right track baby I was born this way

Don't hide yourself in regret Just love yourself and you're set I'm on the right track baby I was born this way

Ooo there ain't no other way Baby, I was born this way Baby, I was born this way Ooo there ain't no other way Baby, I was born I'm on the right track, baby I was born this way

Don't be a drag - just be a queen Don't be a drag - just be a queen Don't be a drag - just be a queen Don't be!

Compositor: Lady Gaga Album: Born this way Music: Born this Way

. . .

Hey girl hey girl We can make it easy if we lift each other Hey girl hey girl We don't need to keep on one-in up another

Compositor: Germanotta, Ronson e Welch Album: Joanne Music: Hey girl (feat Florence Welch)

RESUMO

A exploração da Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze levou essa espécie a ser classificada como criticamente em perigo de extinção. Esse quadro é agravado pelas variações climáticas, como o aquecimento global, e pela ineficiência dos métodos tradicionais de conservação e propagação da espécie. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar, em culturas embriogênicas de A. angustifólia, os efeitos da variação da temperatura sobre funções ligadas a provisão de energia, ao estresse oxidativo e a mecanismos de reparo do DNA. Ainda, foram caracterizadas algumas funções mitocondriais de células embriogênicas de A. angustifolia responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) a fatores de maturação. A exposição ao frio (4°C, por 24h e 48h), não alterou a viabilidade e morfologia das culturas embriogênicas, mas foi capaz de aumentar os níveis de H_2O_2 (35%), para ambos os tempos, e promover uma elevação de 14% e 23% da lipoperoxidação, em 24h e 48h de exposição, respectivamente. As defesas enzimáticas antioxidantes foram alteradas, sendo negativamente moduladas as enzimas catalase, peroxidase e NAD(P)H desidrogenases mitocondriais externas e, positivamente, as enzimas pertencentes ao ciclo ascorbato-glutationa (APX e DHAR). Ocorreu também um aumento da massa mitocondrial em 173% e 136% para 24h e 48h, respectivamente. De forma semelhante, a exposição ao calor levou a um quadro de estresse oxidativo. O pré-tratamento em temperaturas de 30°C-37°C, causou uma redução de 40% na viabilidade celular e, discreta redução na atividade das enzimas de reparo do DNA celular do sistema BER (~15% para a AP endonuclease). Já para as enzimas de reparo mitocondriais, a dU glicosilase foi a mais sensível a inativação, sendo a AP endonuclease a mais estável. A partir destes resultados é possível concluir que temperaturas extremas, tanto baixas (4°C), como altas (30-37°C), induzem ao estresse oxidativo em Araucária, sugerindo sua vulnerabilidade às variações climáticas e contribuindo assim para a compreensão das vias envolvidas na superação desse tipo de estresse, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de métodos eficazes de micro propagação in vitro. Além disso, as atividades do sistema BER em resposta ao estresse térmico são mostradas pela primeira vez para esta gimnosperma. Os ensaios com as linhagens responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) a fatores de maturação, no estado de proliferação, evidenciaram maior densidade (~50%), porém, menor volume mitocondrial (~28%) para a linhagem SE6, que também apresentou um aumento na velocidade respiratória (~50%, estado 3). Os níveis de espécies reativas de oxigênio total e NAD(P)H total foram reduzidos em relação a SE1. Para a linhagem SE6, a atividade das enzimas antioxidantes foi maior. Curiosamente as NAD(P)H internas foram ativadas por cálcio exclusivamente em SE1. Estes resultados evidenciam diferencas importantes entre as duas linhagens em relação às funções mitocondriais e a atividade do sistema enzimático antioxidante, que podem estar envolvidas na responsividade destas células aos fatores de maturação e, consequentemente, em sua capacidade de proliferação.

Palavras-chaves: Bioenergética mitocondrial. Gimnosperma. Reparo de DNA. Estresse abiótico

ABSTRACT

A. angustifolia is currently classified as a critically endangered species by the IUCN (International Union for Conservation of Nature) red list of threatened species. This threat is worsen by the gradual increasing in the global temperature and by the inefficiency of methods for conservation and propagation. Thus, the aim of this study was to evaluate, in embryogenic cultures of A. angustifolia, the effects of temperature variation on functions related to energy provision, oxidative stress and mechanisms of DNA repair. Furthermore, some mitochondrial functions of embryogenic cells of A. angustifolia that are responsive (SE1) and nonresponsive (SE6) towards maturation factors were characterized. Cold stress (4°C, 24h and 48h) did not change the viability and cell morphology; however, it was able to increase H_2O_2 levels (35%) for both conditions and to promote an enhancement of lipoperoxidation by 14% and 23% for 24 h and 48h of exposure, respectively. Antioxidant enzymes catalase, peroxidase and mitochondrial NAD(P)H external dehydrogenases were negatively modulated, while enzymes of ascorbate-glutathione cycle (APX and DHAR) were positively modulated. There was also an increase in mitochondrial mass by 173% and 136% after 24h and 48h, respectively. Similarly, the exposure to heat induced oxidative stress. Treatment with temperatures of 30-37°C reduced cells viability by ~40% and promoted a slight decrease of the activity of cellular DNA repair enzymes of BER system (~ 15% for cellular AP endonuclease). For mitochondrial repair enzymes, dU glycosylase was the most sensitive to inactivation by temperature and AP endonuclease the most stable. These results show that both extreme temperatures, low (4°C) and high (30-37°C), induce oxidative stress in Araucaria, pointing to its vulnerability to climatic changes. They also evidenced certain pathways involved in the overcoming of this type of stress and contribute for the development of effective methods for in vitro micropropagation. In addition, the activities of BER system in response to heat stress are shown for the first time for this gymnosperm. The assays with responsive (SE1) and non-responsive (SE6) embryogenic cultures, in the proliferative phase, evidenced higher mitochondrial density (~50%) but lower mitochondrial volume (~28%) for SE6 in comparison to SE1. A higher respiratory rate for state 3 (~50%) was also observed for SE6 cells. However, the levels of total reactive oxygen species and total NAD(P)H (~30%) were reduced in relation to SE1. The activity of antioxidant enzymes was increased in SE1 embryogenic cultures. Interestingly, internal NAD(P)H dehydrogenases were activated by calcium only in this cell line. These results evidence significant differences between SE1 and SE6 embryogenic cultures regarding mitochondrial functions and activity of antioxidant enzymes, which may be involved in the responsiveness of these cultures to the maturation treatments and, consequently, in their proliferative capacity.

Key words: Mitochondrial Bioenergetics. Gymnosperm. DNA repair. Abiotic stress.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPAIS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS	.23
FIGURA 2. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS	
EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia EM CULTURA	.47
FIGURA 3. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA VIABILIDADE DE CULTURAS	
EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia	.48
FIGURA 4. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NOS NÍVEIS DE H2O2 DE CULTURA	S
EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia	.49
FIGURA 5. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NOS NÍVEIS PERÓXIDOS LIPÍDICO	S
DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifólia	. 50
FIGURA 6. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA RAZÃO AA / DHA DE CULTURA	AS
EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia	. 53
FIGURA 7. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA MASSA MITOCONDRIAL NAS	
CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia	. 54
FIGURA 8. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA ATIVIDADE DAS NAD(P)H	
DESIDROGENASES ALTERNATIVAS (NDs) de culturas	
EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia	. 56
FIGURA 9. VIABILIDADE DE CULTURA DE A. angustifolia EXPOSTAS AO ESTRES	SE
PELO CALOR	. 60
FIGURA 10. EFEITOS DO ESTRESS PELO CALOR SOBRE A RESPIRAÇÃO DE	
CULTURAS DE A. angustifolia	.61
FIGURA 11. EFEITO DO ESTRESSE pelo CALOR NA ATIVIDADE DE AP	
ENDONUCLEASES IN VITRO EM EXTRATOS DE CULTURA DE A.	
angustifolia	.63
FIGURA 12. CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE IN	
VITRO DE ENZIMAS DA VIA BER EM MITOCONDRIAIS ISOLADAS	S
DE CULTURA DE A. angustifolia	.67
FIGURA 13. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE IN VITRO DE ENZIMAS	1
DA VIA DE REPARAÇÃO DE EXCISÃO BASE (BER) EM	
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE CULTURA DE A. angustifolia	.68
FIGURA 14. MORFOLOGIA DAS LINHAGENS DE A. angustifolia RESPONSIVA (SE1	l)
E NÃO RESPONSIVA (SE1) A FATORES DE MATURAÇÃO	.70

FIGURA 15. MASSA MITOCONDRIAL DE CULTURAS DE A. angustifolia
RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE
MATURAÇÃO76
FIGURA 16. MICROSCOPIA ELETRONICA DE MITOCONDRIAS DE CULTURAS DE
A. angustifolia RESPONSIVA (SE1) E NÃO RESPONSIVA (SE6) A
FATORES DE MATURAÇÃO77
FIGURA 17. RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL DE CULTURAS DE A. angustifolia
RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE
MATURAÇÃO78
FIGURA 18. NÍVEIS DE ATP DE CULTURAS DE A. angustifolia RESPONSIVA (SE1) E
NÃO RESPONSIVA (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO80
FIGURA 19. NÍVEIS DE NAD(P)H DAS CULTURAS DE A. angustifolia RESPONSIVAS
(SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO80
FIGURA 20. RESPIRAÇÃO VIA CITOCROMO C OXIDASE (COX) E OXIDASE
ALTERNATIVA (AOX) DE CULTURAS DE A. angustifolia
RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE
MATURAÇÃO82
FIGURA 21. ATIVIDADE DE PROTEÍNAS DESACOPLADORAS (UCP) DE CULTURAS
DE A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A
FATORES DE MATURAÇÃO85
FIGURA 22. ATIVIDADE DE NAD(P)H DESIDROGENASES ALTERNATIVAS (NDs)
DE CULTURAS DE A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO
RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS	
ANTIOXIDANTES DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE A.	
angustifolia	.51
TABELA 2. OLIGONUCLEOTIDEOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE REPARO DE	
DNA	. 62
TABELA 3. ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE CULTURAS DE A.	
angustifolia RESPONSIVA (SE1) E NÃO RESPONSIVA (SE6) A	
FATORES DE MATURAÇÃO	.71
TABELA 4. RESPIRAÇÃO CULTURAS EMBRIOGÊNICAS A. angustifolia	
RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE	
MATURAÇÃO	.74

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenóxiacético
ABA	ácido abscísico
AG	ácido graxo
AL	ácido linoleico
AOX	oxidase alternativa
APX	ascorbato peroxidase
AsA	ascorbato
BAP	6-benzilaminopurina
BSA	albumina do soro bovino
CAT	catalase
CR	controle respiratório
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DCF	diclorofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de diclorofluoresceína
DHA	deidroascorbato
DHAR	dehidroascorbato redutase
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP's	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGTA	ácido etileno glico-bis(β-amino éter) N, N, N', N'-tetracétco
ES	embriogênese somática
FCCP	carbonil cianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FDA	diacetato de fluoresceina
GPX	glutationa peroxidase
GR	glutationa redutase
GSH	glutationa reduzida
GSSG	glutationa oxidada
HEPES	[N-(2 hidroxietil) piperazina N'-(2 ácido etanosulfônico)]
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza

M + G	Malato +glutamato
MDA	malondialdeído
MDHAR	Monodehidroascorbato redutase
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NDs	NADH desidrogenase alternativas
PBS	solução salina tamponada
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEM	massa pró-embrionária
PI	iodeto de propídio
PRX	peroxirredoxina
PVDF	fluoreto de polivinilideno
PVPP	polivinilpirrolidona
RNS	espécies reativas de nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio
SDS	dodecil sulfato de sódio
SHAM	ácido salicilhidroxâmico
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TRIS	tris (hidrometil) amino metano
UA	unidades arbitrárias (fluorescência)
UCPs	proteína desacopladora mitocondrial
UV	luz ultra violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Araucaria angustifolia E EMBRIOGÊNISE SOMÁTICA	18
2.2	CONTROLE DOS NÍVEIS DE ROS E RNS EM PLANTAS	22
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
4	EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL	30
5	MATERIAIS E METODOS	31
5.1	CULTURAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia	31
5.2	MORFOLOGIA	32
5.3	VIABILIDADE CELULAR	32
5.4	CONDIÇÕES DE ESTRESSE INDUZIDO POR TEMPERATURA	33
5.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO CELULAR PARA DETERMINAÇÃO DA	
ATIVII	DADE DO SISTEMA DE EXCISÃO DE BASE (BER)	34
5.6	RESPIRAÇÃO CELULAR	34
5.7	ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS	34
5.8	RESPIRAÇÃO EM MITOCONDRIAS ISOLADAS – ATIVIDADE DAS ND	S
ALTER	RNATIVAS, AOX E UCP	35
5.9	NÍVEIS DE ATP E NAD(P)H CELULARES	36
5.10	NÍVEIS DE H2O2 CELULAR	37
5.11	LIPOPEROXIDAÇÃO CELULAR	38
5.12	NÍVEIS DE ASCORBATO/ DEHIDROASCORBATO (AA/DHA)	38
5.13	ENZIMAS ANTIOXIDANTES	38
5.13.1	Ensaio da Ascorbato Peroxidase (APX)	39
5.13.2	Ensaio da Dehidroascorbato redutase (DHR)	39
5.13.3	Ensaio da Monodehidroascorbato redutase (MDHAR)	39
5.13.4	Ensaio da Glutationa Redutase (GR)	40
5.13.5	Ensaio da Catalase (CAT)	40
5.13.6	Ensaio da Superóxido dismutase (SOD)	40
5.13.7	Ensaio da Peroxidase Total (POX)	40
5.14	MASSA MITOCONDRIAL	41

5.15	ANÁLISE DA ULTRA-ESTRUTURA CELULAR POR MICROSCOPIA	
ELETF	RÔNICA	41
5.16	OLIGONUCLEOTIDEOS	42
5.17	ATIVIDADE DO SISTEMA BER EM EXTRATO TOTAL DE CÉLULA	43
5.18	ATIVIDADE DO SISTEMA BER EM MITOCÔNDRIAS	43
5.19	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	45
5.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1	EFEITOS DO ESTRESSE PELO FRIO EM LINHAGENS DE Araucaria	
angust	<i>ifolia</i> NÃO CARACTERIZADAS QUANTO RESPONSIVIDADE A FATORES I	DE
MATU	JRAÇÃO (AA)	46
6.1.1	Efeitos do estresse pelo frio na morfologia e viabilidade das células de A .	
angust	ifolia	46
6.1.2	Efeitos do estresse pelo frio nos níveis de H2O2 e peroxidação lipídica	48
6.1.3	Efeito do estresse pelo frio nas defesas antioxidantes	50
6.1.4	Efeito do estresse pelo frio na massa mitocondrial e atividade das NDs externas.	53
6.1.5	Conclusão	57
6.2	EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR EM CULTURA EMBRIOGÊNICA D	E
Arauca	aria angustifolia (AA) NÃO CARACTERIZADAS QUANTO RESPONSIVIDAD	ΕA
FATO	RES DE MATURAÇÃO (AA)	58
6.2.1	Efeito do estresse pelo calor na viabilidade e respiração de células de A.	
angust	ifolia	58
6.2.2	Efeito do estresse pelo calor na atividade de enzimas de reparo do DNA em extra	ito
celular	·	61
6.2.3	Efeito do estresse pelo calor na atividade de enzimas de reparo do DNA em	
mitocô	ndrias isoladas	63
6.2.4	Conclusão	68
6.3	CARACTERIZAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE	
LINHA	AGENS DE A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6)	А
FATO	RES DE MATURAÇÃO	70
6.3.1	Morfologia das linhagens SE1 e SE6	70
6.3.2	Sistema antioxidante enzimático	70
6.3.3	Respiração Celular	73
6.3.4	Massa e Respiração Mitocondrial	75

6.3.5	Níveis de ATP e NADP(H)	79
6.3.6	Atividades da AOX, UCP e NDs alternativas	81
6.3.7	Conclusão	
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	
REFE	RÊNCIAS	91
APÊN	DICE 1 – ARTIGO SUBMETIDO: COLD STRESS PAPER	103
APÊN	DICE 2 – ARTIGO SUBMETIDO: HEAT STRESS AND DNA RE	PAIR PAPER

1 INTRODUÇÃO

A exploração dos recursos madeireiros e o desmatamento da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze 1898, levou essa espécie a ser classificada como criticamente em perigo de extinção pela União internacional de conservação da natureza (IUCN), (THOMAS, 2013). Somando-se a esse quadro, o aquecimento global prevê a incidência de eventos de temperatura extrema, que por si só são potencialmente prejudiciais para a flora do nosso planeta (IPCC, 2014), mas especialmente danosos para as espécies já ameaçadas, como *Araucaria angustifolia*.

Diante disso, o desenvolvimento de estratégias de conservação e recuperação das populações remanescentes de *A. angustifolia* são de grande importância para o bioma Mata Atlântica. A ineficiência dos métodos convencionais de propagação, o caráter recalcitrante das suas sementes, que compromete sua capacidade de germinação após o armazenamento, somado as características fenológicas dessa espécie dificultam sua conservação. Atualmente, a técnica de embriogênese somática vêm sendo usada como uma ferramenta biotecnológica importante, capaz de facilitar a propagação massal clonal de espécies arbóreas, e a conservação *ex situ* de espécies ameaçadas de extinção. Nesta técnica, não há necessidade de acompanhar as condições climáticas externas já que o material vegetal é mantido em condições controladas de temperatura e luminosidade, evitando assim as adversidades que podem ser impostas por condições ambientais como o frio e calor extremos. Levando a uma maior eficiência do transplante *ex vitro* e, assim, facilitando a manutenção das florestas em risco de extinção (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2011).

No entanto, para que a embriogênese somática seja possível para a *Araucaria angustifolia* é necessário que se conheçam os aspectos fisiológicos e bioquímicos destas células em cultura. Desta forma, a fim de contribuir para este conhecimento e fornecer subsídios para estudos e desenvolvimento de métodos de propagação in vitro mais eficazes, o presente estudo utilizou três abordagens: na primeira e segunda abordagens, considerando as variações climáticas, foram utilizadas células embriogênicas de *A. angustifolia (Aa) não caracterizadas quanto a responsividade a indutores de maturação,* submetidas ao estresse por altas e baixas temperaturas e avaliados diferentes parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e superação dessas condições. O estudo desses parâmetros é importante pois sabe-se que a morfogênese in vitro envolve sinalização por

espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Na terceira abordagem, foram avaliadas as funções mitocondriais ligadas à provisão de energia de células de *A. angustifolia responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) a condições de maturação*, com o objetivo de estabelecer uma possível correlação entre bioenergética mitocondrial e o potencial embriogênico das culturas in vitro. Os resultados obtidos fornecerão subsídios para estabelecer métodos eficazes de propagação in vitro desta espécie, contribuindo assim para sua preservação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Araucaria angustifolia E EMBRIOGÊNISE SOMÁTICA

A Mata Atlântica constitui um dos principais biomas do Brasil e contribui para a grande biodiversidade do nosso país. Dentro deste bioma se encontra a Floresta Ombrófila Mista, também conhecida como Floresta de Araucária, muito explorada no século XX e, por isso, atualmente se encontra em estado crítico de conservação, restando apenas 1-2% da sua área original. O Pinheiro do Paraná [Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze 1898] é um dos principais componentes da floresta de Araucária. A exploração das suas sementes para o consumo humano, da sua madeira e, principalmente, o desmatamento dessa espécie a fim de fornecer área para o plantio de outras culturas, como Pinus e Eucalyptus, levou a inclusão da Araucaria angustifolia na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção, sendo classificada como criticamente em perigo de extinção pela União internacional de conservação da natureza (IUCN) (THOMAS, 2013). Somando-se a isso, a característica recalcitrante das sementes de Araucária afeta negativamente sua capacidade de germinar após o armazenamento e a sua fenologia irregular, compromete ainda mais sua conservação e propagação natural. Ainda neste contexto, as mudanças climáticas têm agravado a ameaça que sofre o bioma Mata Atlântica, bem como toda a flora do nosso planeta (Intergovernmental Panel on Climate Change - (IPCC, 2014). Diante da ineficiência dos métodos naturais e convencionais de propagação dessa espécie, a busca de novas estratégias é essencial (Klimaszewska et al., 2011).

Nesse sentido, uma ferramenta biotecnológica que tem se mostrado bastante promissora e está sendo amplamente estudada atualmente é a técnica de embriogênese somática (ES). Neste procedimento, um célula somática ou um grupo de células vegetativas são as precursoras do embrião somático, num processo análogo ao da embriogênese zigótica. Aspectos fisiológicos e bioquímicos podem ser investigados nesse tipo culturas e vêm sendo utilizados para a propagação de diferentes espécies vegetais, algumas de interesse comercial, como *Picea glauca, Pinus radiata*, e *Torreya taxifolivem* (AQUEA *et al.*, 2008; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2011; NAZARI *et al.*, 2012). Além disso, este modelo experimental tem sido utilizado para investigar os efeitos da exposição a diferentes condições de estresse sobre células e organelas, também em diferentes espécies vegetais (SILVEIRA *et al.*, 2006; VALENTE *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012).

A literatura descreve diferentes fatores que podem afetar a indução e manutenção das culturas embriogênicas, como a origem do explante e os componentes do meio de cultura (STEINER *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2008). São também importantes os fatores abióticos, como as variações de temperatura, salinidade e exposição à luz ultravioleta (UV), que podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LIN *et al.*, 2006; SHOHAEL *et al.*, 2006), que por sua vez, atuam como sinalizadores para diferenciação celular.

Para *A. angustifolia,* as condições e os fatores que interferem nos primeiros estágios da ES são bem estabelecidos. Sabe-se que a taxa de multiplicação e diferenciação celular in vitro são influenciadas pela presença do ácido abscísico (ABA), agentes osmóticos, carvão ativado, poliaminas e fontes de carbono (ASTARITA; GUERRA, 2000; STEINER *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). No entanto, não são conhecidos todos os fatores que afetam a ES nestas células, principalmente nos estágios mais avançados do processo (VIEIRA *et al.*, 2012; JO *et al.*, 2014).

Estudos mostram que ROS, bem como as espécies reativas de nitrogênio (RNS), ao promover a ativação MAPKs, modulam indiretamente diferentes processos fisiológicos em plantas (AHMAD *et al.*, 2008), entre estes a ES. A sinalização por óxido nítrico (NO[•]) e ROS tem sido associada à embriogênese induzida pelo estresse em cevada, *Hordeum vulgare* L. cv. Igri (RODRIGUEZ-SERRANO *et al.*, 2012), e milho, *Zea mays* (HUANG *et al.*, 2014). Ainda neste contexto, Correa-Aragude, N. *et al.* (2006) demonstraram que o óxido nítrico (NO[•]) é importante na via de indução de genes relacionados ao crescimento radicular. Aumentos dos níveis de NO[•] foram relacionados à diferenciação e divisão de células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* proliferadas in vitro (VIEIRA *et al.*, 2012). Os autores sugeriram que modificações no estado redox celular seriam uma estratégia para o desenvolvimento mais eficiente dessas culturas. No entanto, níveis elevados de ROS podem danificar biomoléculas, como DNA, proteínas e lipídios. A lipoperoxidação resultante da reação de ROS com lipídios de membrana é considerado o principal desencadeador da morte celular programada (GILL; TUTEJA, 2010).

O processo de embriogênese somática é complexo em termos fisiológicos e moleculares. Nesse contexto, é amplamente aceito que o processo de maturação envolve a ativação da via glicolítica, intermediada pela sinalização por ABA e quinases, como a Quinase não fermentadora de sacarose 1 (SnRK1). Porém, pouco é relatado a respeito de vias que ocorrem na mitocôndria, como o ciclo dos ácidos tricarboxilicos (TCA), ou o metabolismo energético mitocondrial (WANG *et al.*, 2018).

Para a Araucária, estudos recentes de proteômica e de expressão gênica indicam que o metabolismo de carboidratos é importante para o processo de embriogênese zigótica e somática (NAVARRO *et al.*, 2017). Quanto ao metabolismo mitocondrial, ainda não existem relatos. Em relação a expressão proteica, Jo e colaboradores (2014), utilizando linhagens celulares de *Araucaria angustifolia* responsiva (SE1) e não responsiva (SE6) a fatores de maturação, como ABA e agentes osmóticos, identificaram por eletroforese 2D, um padrão diferente de proteínas mitocondriais entre as linhagens, a subunidade beta da ATPase na linhagem SE1 e subunidade F da NADH desidrogenasse (complexo I) na linhagem SE6, sugerindo que a modulação mitocondrial é importante para o desenvolvimento dessas culturas. Os autores mostraram ainda que apenas na linhagem SE1 os níveis de etileno e ROS encontravam-se elevados.

Diferentes estudos mostram modificações na expressão gênica, incluindo genes relacionados a provisão de energia e de resposta ao estresse, durante a embriogênese (LIN *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2014). Frederico *et al.*, (2009) demonstraram em culturas de cenoura, *Daucus carota*, que a expressão da oxidase alternativa (AOX) está relacionada a formação do embrião, sugerindo que a proteína poderia ser utilizada como marcador de indução embriogênica. Os autores verificaram a expressão do gene da AOX DcAOX2a foi alta durante quase todo o processo de embriogênese, sendo que nas primeiras horas da aclimatação, com o meio indutor da embriogênese somática (depletado em auxina presente no meio), a expressão da DcAOX2a aumentou 2,5 vezes, enquanto a da DcAOX1a diminuiu cerca de 1,5 vezes. Esse perfil foi observado no 5º e 10º dia de formação do embrião. Os autores ainda reforçaram a importância dessa expressão durante a embriogênese, ao demonstrar que a presença de SHAM, um inibidor da AOX, no meio de cultura, resultou na taxa diminuída de crescimento e incapacidade de desenvolvimento

da cultura. Assim, a embriogênese somática pode ser considerada como uma resposta morfogênica induzida por estresse, ou seja, uma modificação na atividade das enzimas mitocondriais exclusivas de plantas modularia a programação celular, como o processo de diferenciação durante a embriogênese (ARNHOLDT-SCHMITT *et al.*, 2006; ZAVATTIERI *et al.*, 2010).

Ainda neste contexto, Wang et al (2018) descreveram que em embriões de milho, (*Zea mays* L. cv. Nongda) cultivados entre dois a setenta dias as mitocôndrias apresentaram-se altamente ativas durante os primeiros estágios do desenvolvimento, possivelmente para suprir a demanda energética requerida nesse estágio. Por outro lado, no estado tardio da maturação essa organela tornou-se quiescente. No entanto, nesse período, as proteínas relacionadas a proteção antioxidante aumentaram, como as proteínas de choque térmico (HSPs), AOX e NDs. Os autores sugerem que ação antioxidante enzimática limita os níveis de ROS e, por isso, é importante para a formação do embrião sadio nos estágios mais tardios da maturação (WANG *et al.*, 2018).

Outro ponto importante é que a mitocôndria é um dos principais locais produtores de ATP em tecidos não fotossintéticos, como nos embriões somáticos. Isso é possível, pois, nessas condições essa organela é capaz de receber equivalentes redutores provenientes de reações catalisadas por diferentes desidrogenases (DH) localizadas não só na matrix mitocondrial (prolina DH e lactato DH), como também na superfície externa da membrana interna, sendo essas últimas pertencentes, por exemplo, a via glicolítica e a via de síntese do ascorbato (HAVELUND *et al.*, 2013). Neste contexto, sabe-se que 7 enzimas pertencentes a via glicolítica estariam associadas a membrana mitocondrial, sendo a hexoquinase e gliceraldeido-3-P-desidrogenase as que apresentaram maior porcentagem de ancoramento na membrana mitocondrial externa, favorecendo o fornecimento de piruvato diretamente para a organela (GIEGE *et al.*, 2003), levando a intersecção de diferentes vias metabólicas para o suprimento da cadeia transportadora de elétrons.

O processo de embriogênese celular requer níveis elevados de ATP e NAD(P)H, por isso a geração de ATP mitocondrial é importante para a embriogênese (PETRUSSA *et al.*, 2009). Neste sentido, Petrussa *et al.*, (2009) observaram em *Abies alba* que durante o estágio de maturação os níveis celulares de ATP, glucose-6-fosfato e NAD(P)H encontravam-se aumentados em relação ao estágio de proliferação. Ainda, durante a maturação os autores observaram um aumento das atividades da AOX, NADH desidrogenases externas e desacoplamento mediado por ácidos graxos, indicando a ativação dos sistemas antioxidantes mitocondriais. Estes efeitos resultaram na redução do inchamento mitocondrial e na liberação de citocromo *c* e, consequentemente, em níveis reduzidos de morte celular. Ao contrário, durante a proliferação, os autores observaram uma maior liberação de citocromo *c* e inchamento mitocondrial, o que indicaria que a morte celular observada neste estágio seria mediada pela abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP). Esta hipótese foi reforçada pela maior atividade do canal K^+_{ATP} , associada ao inchamento mitocondrial e, consequentemente, a liberação de citocromo *c*. Com base nestes resultados, os autores sugerem que no processo de embriogênese ocorrem dois eventos de morte celular programada, sendo o mais pronunciado o observado durante a proliferação, que teria a função de auxiliar no desenvolvimento da massa pró-embrionária, eliminando algumas células da chamada massa pró embrionária (PEM) e, assim, facilitando a formação do embrião. Já a morte celular programada, durante o processo de maturação, seria importante para a eliminação das células suspensoras (FILONOVA *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2014).

2.2 CONTROLE DOS NÍVEIS DE ROS E RNS EM PLANTAS

Em linhas gerais, as células vegetais possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para controlar os níveis de ROS. A defesa enzimática envolve uma variedade de peroxidases (POX). Em Arabdopsis, por exemplo, foram identificadas mais de sete isoformas de POX, que participam diferencialmente em processos fisiológicos como autodefesa, catabolismo de auxina, lignificação, como também na resposta e/ou tolerância ao estresse (HIRAGA *et al.*, 2001). Ainda em relação ao estresse, são também importantes as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutationa peroxidase (GPX), glutationa redutase (GR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR) e desidroascorbate redutase (DHAR).

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido $(O_2^{\bullet-})$ a H₂O₂. Esse peróxido formado pode ser eliminado pela ação da catalase (CAT) que reduz o H₂O₂ a H₂O e ¹/₂O₂ ou pelo ciclo ascorbato - glutationa.

O ciclo ascorbato-glutationa (FIGURA 1), que compreende as enzimas APX, GR, DHAR e MDHAR, desempenha um importante papel na defesa das plantas contra o estresse abiótico ou biótico (MOLLER *et al.*, 2007). Neste ciclo, o H₂O₂ gerado durante o estresse oxidativo é reduzido pela APX usando AsA como doador de elétrons. Então, o ascorbato oxidado (monodehidroascorbato - MDHA) pode ser regenerado a AsA na

reação catalisada pela MDHAR, em uma única etapa de reação ou, pela DHAR, que usa deidroascorbato (DHA), um produto de dismutação de MDHA. Finalmente, a glutationa reduzida (GSH) que participa da reação catalisada pela DHAR é regenerada pela GR. Desta forma, sabe-se que uma concentração suficiente de ascorbato reduzido e GSH é essencial para a remoção de ROS em células de plantas (APEL; HIRT, 2004).



FIGURA 1. PRINCIPAIS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS

```
FONTE: O autor (2018)
```

NOTA: Atividade enzimática da SOD e CAT e sua interação com o ciclo Ascorbato-Glutationa (setas pretas). Enzimas antioxidantes: SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, APx: ascorbato peroxidase, MDHAR: monodehidroascorbato redutase, DHAR: dehidroascorbato redutase: GR: glutationa redutase.

Mecanismos não enzimáticos, incluindo o ascorbato (AsA), glutationa (GSH), tocoferóis, flavonóides, alcalóides e carotenoides, também são importantes na resposta a condições de estresse biótico ou abiótico (APEL; HIRT, 2004; AHMAD *et al.*, 2008).

Além dos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, as plantas tem em suas mitocôndrias proteínas diferenciais na cadeia transportadora de elétrons, capazes de manter e modular significativamente o balanço oxidativo e, devido a isto, essas organelas são consideradas como centros de controle deste processo (PASTORE *et al.*, 2007; RASMUSSON *et al.*, 2009). Estas proteínas são: as NAD(P)H desidrogenases alternativas externas e internas (NDs), a oxidase alternativa (AOX) e a proteína desacopladora de planta (UCP) (MOLLER, 2001; PASTORE *et al.*, 2007). Estas proteínas já foram caracterizadas em mitocôndrias de células embriogênicas de *A. angustif*olia (MARIANO *et al.*, 2008; VALENTE *et al.*, 2012). Nestes estudos,

demonstrou-se que em condições de estresse pelo frio (4°C durante 24 h e 48 h), a atividade e a expressão da UCP aumentaram, enquanto que a atividade da AOX foi discretamente estimulada. Segundo os autores, estes resultados sugerem que a UCP está envolvida no controle dos níveis de ROS, possivelmente geradas em resposta a condição de estresse (VALENTE *et al.*, 2012).

As NAD(P)H desidrogenases alternativas, também denominadas NDs do tipo II, são insensíveis à rotenona, não bombeadoras de prótons e doam seus elétrons diretamente à ubiquinona (UQ) (MOLLER, 2001; LOGAN, 2007). Rasmusson *et al.*, (2009) descrevem seis diferentes NAD(P)H desidrogenases em plantas, sendo quatro externas e duas internas, possibilitando assim a oxidação de NAD(P)H citosólico e mitocondrial, respectivamente. Em *Arabidopsis thaliana*, as NDs foram agrupadas em três famílias: NDA com 2 membros, NDB com 4 membros e NDC com 1 membro. Sendo as NDA1 e NDA2: NADH internas, NDB1: NADPH externa, NDB2, NDB3, NDB4: NADH externas e NDC1: NADPH interna. Os genes do tipo NDB possuem motivos em sua sequência de DNA que indicam fortemente a existência de uma região de ligação ao cálcio (LOGAN, 2007; RASMUSSON *et al.*, 2008).

As NAD(P)H desidrogenases externas atuam cooperativamente com a AOX, evitando a formação de ROS, ao prevenir flutuações nos níveis de redução da ubiquinona (UQ) (RASMUSSON *et al.*, 2009). HO *et al.* (2007) mostraram que os genes codificantes da NDB4 (uma das variantes de NAD(P)H externa) e AtAOX1c (AOX1), respectivamente, são coexpressos durante o desenvolvimento de cultura vegetal transformada de *A. thaliana*. Os autores destacam que estas duas enzimas cooperam no sentido de reduzir a produção de ROS e disponibilizar mais energia para a divisão celular.

A Oxidase Alternativa (AOX), é uma proteína de 34 kDa localizada na superfície interna da membrana mitocondrial interna (PINHEIRO *et al.*, 2004). Possibilita a oxidação do ubiquinol com a transferência de elétrons diretamente para o oxigênio reduzindo-o a água, sem o bombeamento de prótons. Essa enzima é insensível ao cianeto, antimicina A ou mixotiazol, mas é inibida por agentes complexantes de ferro, os ácidos hidroxâmicos como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o ácido benzohidroxâmico (BHAM) e o tiocianato de potássio. Ácidos orgânicos monocarboxilicos como o piruvato, hidroxipiruvato e glicoxilato e, dicarboxilicos, como α -cetoglutarato, oxaloacetato, Lmalato e succinato são estimuladores da AOX (MILLAR *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que ROS promovem a ativação da transcrição e/ou tradução da AOX (MINAGAWA *et al.*, 1992; MCINTOSH *et al.*, 1998). Neste contexto, existem

evidências de que esta proteína tenha um papel protetor contra os estresses biótico e abiótico, por manter baixos os níveis de ROS (PASTORE *et al.*, 2007). UMBACH *et al.* (2005) demonstraram que uma menor expressão da AOX leva a uma maior produção de ROS e modificações na transcrição de grupos de genes relacionados aos intermediários de vias metabólicas envolvendo carboidratos. Os autores concluíram que alterações na atividade da AOX comprometem o funcionamento de vias metabólicas responsáveis pelo fornecimento de equivalentes redutores para a cadeira transportadora de elétrons.

A proteína desacopladora de plantas (UCP) é uma proteína integral de membrana (VERCESI *et al.*, 2006), primeiramente isolada de tubérculo de batata (VERCESI *et al.*, 1995), que facilita a reentrada de prótons na matriz mitocondrial, levando ao colapso do gradiente eletroquímico de prótons. A UCP é inibida por ATP, GDP e GTP, e ativada por ácidos graxos de cadeia longa como o ácido láurico, mirístico, linoléico, oleico e palmítico (PASTORE *et al.*, 2000).

Estudos mostram que as proteínas AOX e UCP possuem funções fisiológicas similares, pois ambas são dissipadoras de energia (VERCESI et al., 1995; CALEGARIO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004; PASTORE et al., 2007) e atuam de forma a prevenir o aumento dos níveis de ROS (PINHEIRO et al., 2004). Apesar disso, são reguladas de modo inverso pelos ácidos graxos livres. A UCP de planta é ativada pelo aumento da concentração de ácidos graxos, enquanto que a AOX é inibida, sugerindo que estas proteínas não podem apresentar atividade máxima simultaneamente (SLUSE et al., 1998; CALEGARIO et al., 2003). Sweetlove et al., (2002), demostraram em mitocôndrias de Arabidopsis submetidas ao tratamento com H₂O₂ por 16 h, o aumento nos níveis de lipoperoxidação e diminuição da respiração, quando utilizados como substratos oxidáveis NADH e malato mais piruvato. No entanto, quando o citocromo c foi usado como doador de elétrons, a respiração não foi afetada em comparação ao grupo controle (ausência de H2O2). Os autores sugeriram que o estresse pelo H2O2 promoveria uma inibição das NADH desidrogenases externas e internas. Ainda demonstraram que o estresse promoveu a diminuição na expressão de importantes enzimas mitocondriais, como de subunidades do complexo I e da ATPase. Ainda nesse contexto, Svensson e colaboradores (2002) demonstraram que a transcrição de isoformas das NADH interna e externa (nda1 e ndb1) são negativamente moduladas enquanto que a transcrição da AOX não sofre alterações em resposta ao estresse pelo frio, 5 °C por 5 dias.

Em situações em que a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes mencionados acima é superada pela alta produção de ROS ou RNS, se instala uma condição denominada de estresse oxidativo, caracterizada pelo acúmulo de diferentes espécies reativas, como: radicais superóxido (O2 \cdot), radicais hidroxíla (\cdot OH), oxigênio singlete ($^{1}O_{2}$) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Como mencionado, variações de temperatura, exposição à luz UV e salinidade, entre outros fatores de estresse, podem induzir ao estresse oxidativo (LIN *et al.*, 2006; SHOHAEL *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2010) causando danos a biomoléculas, entre estas ao DNA. Assim, é essencial que investigue-se as possíveis vias de reparo do DNA nas células embriogênicas de *A. angustifolia* expostas a condições de estresse, como altas temperaturas.

ESTRESSE OXIDATIVO E REPARO GENÉTICO

Em contraste aos mamíferos, os danos oxidativos são aparentemente superados nos vegetais (LANNER; CONNOR, 2001), mesmo quando expostos a estresses bióticos e abióticos, como variações de temperatura, exposição a luz UV e salinidade (GILL; TUTEJA, 2010). Possivelmente esta superação ocorra graças aos mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos dos vegetais, incluindo o mitocondrial representado pela PUMP, AOX e NAD(P)H desidrogenases alternativas (PASTORE *et al.*, 2007; RASMUSSON *et al.*, 2009). No entanto, além desses mecanismos de controle da produção de ROS é possível que os vegetais possuam um sistema de reparo genético mais eficiente.

Uma diferença importante entre os animais e os vegetais é a quantidade de genomas em uma célula vegetal, que possui três, o mitocondrial, o plastidial e o nuclear. Em relação ao tamanho, o mtDNA dos animais tem apenas 16 kb, enquanto que o de vegetais possui de 200 a 11000kb, sendo que 80 a 90% não tem função conhecida. Outra grande diferença é que os níveis de mutação gênica no mtDNA vegetal são extremamente baixos quando comparados aos de mamíferos (KUBO; NEWTON, 2008).

O DNA mitocondrial é particularmente exposto as ROS devido à ausência das histonas, o que pode gerar um grande número de lesões, como bases oxidadas (incluindo 8-oxoguanina), sítios abásicos e rupturas simples ou dupla fitas. Se esse dano não for reparado, pode levar a mutações e consequente a morte celular (GREDILLA *et al.*, 2010).

Nas mitocôndrias de mamíferos, grande parte do reparo é feito pela via de reparo de excisão base (via BER) (GREDILLA *et al.*, 2010). Esta via começa com o reconhecimento e remoção da base inadequada ou danificada por glicosilases de DNA específicas que clivam a ligação N-glicosídica. O sitio abásico resultante é então processado pela endonuclease específicas (AP), criando uma quebra no esqueleto do

DNA (fosfato desoxirribose). A DNA polimerase então substitui o nucleotídeo faltante e a lacuna é finalmente selada por uma ligase de DNA (JEPPESEN *et al.*, 2011).

Os estudos da atividade de sistemas de reparo do DNA são inexistentes para as gimnospermas, (KIMURA *et al.*, 2002; BALESTRAZZI *et al.*, 2011; JOLDYBAYEVA *et al.*, 2014). Algumas enzimas do sistema BER, como glicosilases e AP endonucleases foram identificadas em mitocôndrias (BOESCH *et al.*, 2009) e cloroplastos (GUTMAN; NIYOGI, 2009). Um estudo recente mostrou que a via BER está presente em mitocôndrias isoladas de tubérculo de batata [(FERRANDO *et al.*, 2017) - submetido para publicação].

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Considerando as variações climáticas as quais tem sido submetida a *A*. *angustifolia*, a falta de conhecimento sobre os mecanismos de reparo genético desta espécie e, o fato de estar em risco de extinção, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da variação da temperatura sobre funções ligadas a provisão de energia, ao estresse oxidativo e a mecanismos de reparo genético, em culturas embriogênicas de *A*. *angustifolia*. Ainda, tomando-se em conta a necessidade do estabelecimento de métodos eficientes de propagação in vitro desta espécie, este estudo também teve como objetivo caracterizar funções mitocondriais de culturas embriogênicas de *A*. *angustifolia* responsivas e não responsivas a fatores de maturação. Para atingir estes objetivos foram adotadas três abordagens:

Em culturas de células de *A. angustifolia* (Aa) não caracterizadas quanto à resposta a indução por fatores de maturação, mas cujos efeitos do estresse por baixas temperaturas foram parcialmente descritos (Valente et al., 2012; Furlanetto 2014), avaliar os mecanismos envolvidos na aparente resistência das células vegetais a condições de estresse oxidativo, induzido por baixas temperaturas (4°C);

Em culturas de células de *A. angustifolia* (Aa) não caracterizadas quanto à resposta a indução por fatores de maturação, determinar os efeitos causados pela exposição a altas temperaturas (condições de cultivo até 42°C), ao avaliar parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e os mecanismos de reparo genético, estes últimos ainda não estabelecidos em Gimnospermas. A escolha dessa condição experimental justificou-se pela previsão de aquecimento global para os próximos anos;

Em modelo experimental de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) a fatores de maturação, estabelecer uma possível relação entre as funções mitocondriais e o potencial embriogênico.

Foram objetivos específicos deste estudo:

- Em relação à abordagem nº 1:

Em células ou mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia (Aa)* submetidas ou não ao estresse pelo frio (4°C por 24h e 48h), avaliar:

Viabilidade e morfologia celulares;

Os níveis de ROS e a lipoperoxidação;

A razão ascorbato/dehidroascorbato;

A atividade das enzimas antioxidantes celulares: SOD, CAT; POX; APx; GR; DHR e MDHAR;

A atividade das NAD(P)H desidrogenases alternativas (NDs) mitocondriais; A densidade mitocondrial.

- Em relação à abordagem nº 2:

Em células ou mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia (Aa)* submetidas ou não ao estresse pelo calor (30°C por 24h 48h, 37°C por 6h, 40°C 2h e 42°C 2h), avaliar:

A viabilidade e respiração celulares;

A atividade de enzimas de reparo do DNA celular e mitocondrial (mtDNA)

Os estudos de reparo genético fizeram parte do projeto *Plant mitochondria as a model for human ageing (PlantMan)*, coordenado pelo Prof[®]. Dr. Ian Max Moller e pela Prof^a, Tinna V. Stevnsner, desenvolvido no Department of Molecular Biology and Genetics Science and Technlogy - Aarhus University. (Doutorado sanduíche).

- Em relação à abordagem nº 3:

Em mitocôndrias isoladas de culturas de células embriogênicas de *A*. *angustifólia* responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) a fatores de maturação, avaliar:

A respiração celular;

A atividade das enzimas mitocondriais NDs alternativas, AOX e PUMP;

A densidade e ultraestrutura mitocondrial;

Os níveis de ATP e NAD(P)H;

A atividade das enzimas antioxidantes celulares: SOD, CAT; POX; APx; GR; DHR e MDHAR.

4 EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL



5 MATERIAIS E METODOS

5.1 CULTURAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia

As culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia* responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) a condições de maturação foram gentilmente cedidas pela Prof.^a Dr.^a Eny I. S. Floh do Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL) do Departamento de Botânica do IBUSP (JO *et al.*, 2014). Estas células foram utilizadas para a determinação de parâmetros relacionados às funções mitocondriais. Para seu cultivo utilizou-se meio básico MSG (BECWAR *et al.*, 1988), suplementado com l-glutamina 1.46 g/L, mio-inositol 0,1 g.L⁻¹, sacarose 30 g.L⁻¹ e 3 g.L⁻¹ Gelrite® (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH antes de ser autoclavado (121°C, 1 atm), por 20 minutos. A solução de L-glutamina foi filtrada através de uma membrana esterilizante PES de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro e adicionadas ao meio de cultura autoclavado e morno. As culturas embriogênicas foram repicadas a cada 20 dias e mantidas no escuro em temperatura de 25 ± 1°C em incubadora (FANEM – 502, culture incubator).

As culturas embriogênicas de *A. angustifolia* IFSC (Aa), gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Miguel Guerra do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal -UFSC, foram utilizadas para avaliar os efeitos do estresse pelo frio, calor e no estudo de mecanismos de reparo genético. As células foram cultivadas e mantidas de acordo com Santos e colaboradores (2002), utilizando em meio de cultura básico BM (GUPTA; PULLMAN, 1991). O meio básico BM foi suplementado com: mio–inositol 55 mmol.L⁻¹, ácido nicotínico 8 nmol.L⁻¹, piridoxina–HCl 5 nmol.L⁻¹, glicina 50 nmol.L⁻¹, tiamina–HCl 6 nmol.L⁻¹, Lglutamina 6,8 mmol.L⁻¹, 2,4-D 2 µmol.L⁻¹, BAP 0,5 µmol.L⁻¹, cinetina 0,5 µmol.L⁻¹, sacarose a 3% (m/v), caseína hidrolisada a 0,5% (m/v) e Phytagel (Sigma[®]) a 2% (m/v) (SANTOS *et al.*, 2002). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com KOH antes de ser autoclavado a 121°C (1 atm), por 20 minutos. As soluções de vitaminas, L-glutamina e de hidrolisado de caseína foram filtradas através de uma membrana esterilizante PVDF de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro e adicionadas ao meio de cultura autoclavado e morno. As culturas embriogênicas foram repicadas a cada 20 dias e mantidas no escuro em temperatura de 25 ± 1°C em incubadora (FANEM – 502, culture incubator).

Para os ensaios, as células (SE1, SE6 e Aa) foram utilizadas entre 13º e o 15º dia de cultura.

5.2 MORFOLOGIA

A avaliação da morfologia das culturas foi realizada pela dupla coloração com carmin acético (1%) (m/v) e azul de Evans (0,5%) (m/v). As células de suspensor são alongadas e altamente vacuoladas e permeáveis ao corante azul de Evans, já as células embrionárias são isodiamétricas, pequenas, com citoplasma denso e reativas ao carmim acético (GUPTA; HOLMSTROM, 2005; VALENTE *et al.*, 2012). A reação positiva ao carmim acético está associada com a capacidade de desenvolvimento celular.

Para a coloração e montagem das lâminas, uma pequena quantidade de massa celular da periferia do calo foi incubada por três minutos com uma gota de azul de Evans (0,1%) (m/v). Decorrido o tempo de incubação, a massa celular foi lavada com PBS pH 7,2 (0,5 ml) e foi adicionada uma gota de carmim acético (2%) (m/v), seguindo-se nova incubação por três min e lavagem com PBS, pH 7,2, para a retirada do excesso de corante. As células em PBS, pH 7,2, foram então transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e tiveram a morfologia analisada em microscópico Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss).

5.3 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada por dois métodos: MTT e coloração com PI e FDA. Nestes ensaios foram utilizados como controles positivos de morte celular suspensões de células submetidas a três ciclos de fervura (100 ° C) e congelamento (-195°C, utilizando nitrogênio líquido). Como controle de viabilidade (100% de células viáveis), foram considerados os resultados das células em condições ideais de cultivo ($25^{\circ}C \pm 1$).

O método do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) baseia-se na capacidade de desidrogenases de células viáveis de reduzirem o sal de tetrazólio a formazan (CASTRO-CONCHA *et al.*, 2006). Neste ensaio 330 mg (peso fresco) de células foram incubadas com tampão PBS (pH 7,2) na presença de MTT em concentração final de 1,25 mmol.L⁻¹, durante oito horas no escuro, a 25 °C. Os sais de formazan formados foram extraídos por incubação por 30 min a 60°C, sob agitação, em 1,5 mL de SDS a 1% (m/v) em 50% de metanol. Após centrifugação a 9000 x g durante cinco minutos, a absorbância do sobrenadante foi medida em 570 nm em leitor de microplaca (modelo Epoch da Biotek). Os resultados foram expressos como % de viabilidade em relação ao controle (100% de células viáveis).

A viabilidade celular utilizando a dupla marcação com iodeto de propídio (PI) e diacetato de fluoreceina (FDA) foi determinada através da análise em microscópio de fluorescência. O PI é um intercalante de DNA e só é internalizado em células com alterações na permeabilidade da membrana celular, sendo utilizado como marcador de morte, já o FDA é um composto apolar que permeabiliza as membranas intactas e quando hidrolisado por esterases celulares se torna fluorescente, sendo retido nas células metabolicamente viáveis (CHAVES *et al.*, 2002; VALENTE *et al.*, 2012). Nesse ensaio, as células (controle e estresse) foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2) e incubadas para a dupla marcação com PI (5 µg.mL⁻¹) e FDA (2.5 µg.mL⁻¹) por 15 min a 25 °C. Após 3 lavagens sucessivas com PBS (pH 7,2), as células foram imediatamente analisadas em microscópio em campo claro, e em fase de contraste fluorescente em microscópio Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss). A fluorescência do FDA e PI foi analisada em filtro de excitação violeta e verde, respectivamente. O resultado foi expresso na razão intensidade de fluorescência FDA/PI, sendo que o maior valor para esta razão corresponde ao maior número de células viáveis.

5.4 CONDIÇÕES DE ESTRESSE INDUZIDO POR TEMPERATURA

Para o estresse por baixas temperaturas as culturas foram mantidas por 24h ou 48h a temperatura de $4 \pm 1^{\circ}$ C em geladeira, na ausência da luz. As células do grupo controle foram mantidas a $25 \pm 1^{\circ}$ C em incubadora, na ausência de luz, ou seja, nas mesmas condições de cultivo.

Para o estresse por altas temperaturas as placas das culturas permaneceram a 30°C por 24h; 30°C por 48h, 37°C por 6h, 40°C por 2h e 42°C por 2h, na ausência da luz, em incubadora. As células do grupo controle foram mantidas nas condições de cultivo ($25 \pm 1^{\circ}$ C em incubadora, na ausência de luz)

Para o estresse em mitocôndrias, as organelas isoladas das células controles $(25 \pm 1^{\circ}C)$ foram mantidas por 30 min as temperaturas de 20, 25, 30, 37, e 40°C, e imediatamente utilizadas para os ensaios de atividade de reparo tipo BER.

Para a indução dos estresses não foram utilizadas rampa de temperatura, assim as amostras foram incubadas diretamente nas temperaturas indicadas, sem o aumento ou diminuição gradual de temperatura de incubação.

5.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO CELULAR PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA DE EXCISÃO DE BASE (BER)

Para os ensaios de reparo de DNA em sistema celular foram utilizados extratos obtidos a partir de 1 g (peso fresco) das células estressadas e do controle, rompidas com pistilo e graal em nitrogênio líquido. Em seguida adicionou-se um mL do tampão de extração constituído de: tampão fosfato 0.1 mmol.L⁻¹ (pH 7), DTT 2 mmol.L⁻¹, glicerol 10% e EDTA 1 mmol.L⁻¹. Essa solução foi filtrada em quatro camadas de gaze e centrifugada a 14000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado com fonte de proteínas solúveis (S). O pellet formado foi ressuspendido e procedeu-se a nova centrifugação a 1x g por cinco min a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado como fonte de enzimas ligadas a membrana (M). Os extratos celulares de *A. angustifalia* assim obtidos foram armazenados em criotubos a – 80 °C para análises posteriores.

5.6 RESPIRAÇÃO CELULAR

A respiração em células de *A. angustifolia* foi avaliada como descrito por VALENTE *et al.* (2012). O consumo de oxigênio foi determinado em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) sob agitação de 500 rpm em câmara fechada termostatizada, a temperatura de 28°C. As células (75 mg de peso fresco) foram ressuspensas em 1 mL de solução (denominada meio de reação) contendo: HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, sacarose 0,25 mmol.L⁻¹, KCl 2 mmol.L⁻¹ e 0,2 % BSA livre de ácidos graxos. Em seguida, as células foram homogeneizadas em tubo homogenizador Van Potter-Elvehjem em banho de gelo. Para o ensaio, o meio de reação foi suplementado com 10 mM malato e glutamato, 0,5 μ mol.L⁻¹ FCCP, 4 mmol.L⁻¹ SHAM, 0.5 μ M antimicina A, quando indicado.

5.7 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

Mitocôndrias foram isoladas de \pm 45 g (peso fresco) de culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, através de centrifugação diferencial (MARIANO *et al.*, 2004). As células foram transferidas para um béquer contendo 200 mL de meio de extração a 4°C, contendo sacarose 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,6), EGTA 2 mmol.L⁻¹, cisteína 3 mmol.L⁻¹ e BSA 0,2 g% (m/v). Os calos foram parcialmente fragmentados com o auxílio de tesoura e em seguida, o tecido foi homogeneizado utilizando-se o homogeneizador

van Potter-Elvehjem (10 vezes com o pistilo frouxo e 10 vezes com o pistilo apertado). As células foram então rompidas em homogeneizador Turratec através de um pulso na velocidade máxima, a 4°C. Esse homogenato de células foi filtrado através de tecido gabardine e o pH ajustado para 7,2 com NaOH. A seguir, o homogenato foi centrifugado (centrífuga Hitachi modelo himac CR-21E) por 10 min a 1.000 x g e o sobrenadante centrifugado por dez min a 15.000 x g. Os precipitados resultantes foram ressuspensos com o auxílio de um pincel em meio de isolamento (sacarose 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹ pH 7,2, EGTA 0,25 mmol.L⁻¹, BSA 0,2 g% (m/v)) e transferidos para um único tubo, seguindo-se centrifugação a 1.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 x g por 10 minutos, e o precipitado, contendo a fração mitocondrial foi ressuspenso em aproximadamente 1 mL de meio de isolamento. A purificação da fração mitocondrial foi então realizada em gradiente descontínuo de Percoll[®], como descrito por Jackson e colaboradores (1979) e Millar e colaboradores (2001). A fração bruta de mitocôndrias, aproximadamente 1 mL, foi depositado cuidadosamente sobre o gradiente de Percoll[®] de 13,5%, 21% e 45% (v/v) em meio de isolamento contendo sacarose 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), EGTA 0,25 mmol.L⁻¹, BSA 0,2 g% (m/v). O extrato de mitocôndrias foi centrifugado em ultracentrifuga (marca Hitachi, modelo himac CP-90ß) a 40.000 x g por 45 minutos. Após centrifugação a fração contendo as mitocôndrias purificadas, presentes entre as concentrações de 21% e 45%, foi coletada solubilizada em 35 mL de meio de isolamento e, para remoção do Percoll, foi realizada centrifugação a 15.000 x g por 15 minutos. O sedimento obtido, contendo as mitocôndrias purificadas, foi ressuspenso em pequeno volume de meio de isolamento.

5.8 RESPIRAÇÃO EM MITOCONDRIAS ISOLADAS – ATIVIDADE DAS NDS ALTERNATIVAS, AOX E UCP

A respiração em mitocôndrias isoladas foi monitorada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). A reação, em volume final de 2,0 mL, ocorreu sob agitação constante em câmara fechada termostatizada, a 28°C. As condições experimentais foram as descritas por Valente e colaboradores (2012). Os valores de controle respiratório (CR), razão entre as velocidades respiratórias no estado 3 (presença de ADP) e estado 4 (ausência de ADP, devido a síntese de ATP), foi utilizado como determinante da qualidade da preparação (CHANCE; WILLIAMS, 1955). Apenas preparações mitocondriais com controle respiratório acima de 2,5 foram utilizadas.
O meio de reação padrão nestes ensaios foi constituído de sacarose 250 mmol.L⁻¹, KCl 2 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), e proteína mitocondrial em quantidade adequada para cada experimento. Para a determinação do CR, o meio de reação foi suplementado com BSA 0,2 g% (m/v), 0,25 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial, MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹, Pi 2 mmol.L⁻¹, malato de sódio 10 mmol.L⁻¹, glutamato de sódio 10 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹.

Para determinar a atividade da UCP, o meio de reação padrão, em volume final de 2 mL, foi suplementado com 0,125 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial, oligomicina 2,5 μ g.mL⁻¹, atractilosídeo 20 μ mol.L⁻¹, propranolol 300 μ mol.L⁻¹, SHAM 3 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹. Quando indicado, foram adicionados: malato de sódio 10 mmol.L⁻¹, glutamato de sódio 10 mmol.L⁻¹, ácido linoléico 12 μ mol.L⁻¹, BSA 0,1 g% (m/v), ATP 1 mmol.L⁻¹ e FCCP 1 μ mol.L⁻¹ (VALENTE *et al.*, 2012).

A atividade da AOX foi determinada segundo Mariano e colaboradores (2005) em meio de reação padrão suplementado com BSA 0,5 g% (m/v), 0,125 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial, oligomicina 2,5 μ g.mL⁻¹, DTT 1 mmol.L⁻¹, atractilosídeo 20 μ mol.L⁻¹, propranolol 300 μ mol.L⁻¹, piruvato 0,1 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹, 0,25 mg de proteína mitocondrial. Quando indicado, foram adicionados glutamato de sódio 10 mmol.L⁻¹, malato de sódio 10 mmol.L⁻¹, KCN 1 mmol.L⁻¹ e SHAM 1 mmol.L⁻¹.

Para a determinação da atividade das NDs, o meio de reação padrão foi suplementado com BSA 0,5 g% (m/v), 0,125 mg.mL⁻¹ de proteína mitocondrial, FCCP 1 μ mol.L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹, rotenona 10 μ g.mL⁻¹. Quando indicado foi adicionado NADH 1 mmol.L⁻¹, NADPH 1 mmol.L⁻¹, glutamato de sódio e malato de sódio 1 mmol.L⁻¹, Ca²⁺ 1 mmol.L⁻¹, KCN 1 mmol.L⁻¹ e SHAM 1 mmol.L⁻¹ (SVENSSON *et al.*, 2002).

As velocidades respiratórias foram expressas, como fluxo de oxigênio em nmol de oxigênio por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, considerando-se que a solubilidade do oxigênio na água a 28°C e 1 atmosfera é de 250 µmol por litro (ESTABROOK, 1967).

5.9 NÍVEIS DE ATP E NAD(P)H CELULARES

Para esta determinação, as células (0,5 g - peso fresco) foram homogeneizadas com pistilo e graal em nitrogênio líquido, seguindo-se a adição de 1 mL do tampão de extração contendo, 50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl (pH 7,8) e 0.05% (v/v) Triton X-100 e fervura por 2 min.

Após centrifugação 20000 x g por 15 min o sobrenadante foi armazenado a – 80 °C para posterior análises.

Os níveis de ATP foram determinados através do Kit comercial Sigma (Adenosine 5'triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit Catalog number: FLAA), através do acompanhamento da luminescência gerada pela luciferase ao consumir ATP e Luciferina (PETRUSSA *et al.*, 2009). O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, adicionando-se 0,1 mL (0,5 g/mL⁻¹), da solução de amostra extraída, seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante. A luminescência foi determinada em leitor de microplaca Epoch Biotek[®] e a concentração de ATP foi calculada a partir de curva de padrão (0,1 – 200 μ M.L⁻¹ de ATP).

Os níveis de NAD(P)H foram determinados indiretamente através do monitoramento da atividade da glicerol-3-fosfato-desidrogenase e da glutamato desidrogenase para o NADH e o NADPH, respectivamente (PETRUSSA *et al.*, 2009). Alíquotas das amostras (50 µl) foram utilizadas na reação que ocorreu a 25 °C, em meio de reação contendo Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,5), diidroxiacetona-fosfato 20 mmol.L⁻¹, 2-ácido oxoglutarato 0,1 mol.L⁻¹ e NH4Cl 0,2 mol.L⁻¹ e volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de glicerol-3-fosfato desidrogenasse 0,2 IU.mL⁻¹ e glutamato desidrogenasse 0,9 IU.mL⁻¹, respectivamente. A absorbância a 340 nm foi determinada em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450 UV/VIS. As concentrações de NAD(P)H foram calculadas a partir de uma curva de calibração (0-16 μ M.L⁻¹ de NADH).

5.10 NÍVEIS DE H₂O₂ CELULAR

Os níveis de H₂O₂ foram quantificados pelo kit comercial Amplex® Red hydrogen peroxide/peroxidase assay kit (Molecular Probes®), seguindo-se as instruções do fabricante. Para a preparação das amostras 100 mg de células, peso fresco, foram homogeneizadas com pistilo e graal em nitrogênio líquido, adicionando-se em seguida 1 mL do tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹ (pH 6,5). Essa solução foi centrifugada 10.000 x g por 10 min a 4 °C e 50 µl do sobrenadante foram incubados com 50 µl da sonda Amplex® Red e 0,2 U.mL⁻¹ de peroxidase. A fluorescência foi monitorada por 30 min a 25 °C, usando 571 nm e 585 nm de excitação e emissão, respectivamente (WU *et al.*, 2012). As concentrações de H₂O₂ foram calculadas a partir de uma curva de calibração de 0-10 µmol.L⁻¹ de H₂O₂.

5.11 LIPOPEROXIDAÇÃO CELULAR

Os peróxidos lipídicos foram quantificados através do método de TBARs que consiste na reação do malondialdeído (MDA), produto da lipoperoxidação, com o ácido tiobarbitúrico (HODGES *et al.*, 1999). As células (1g) foram homogeneizadas com pistilo e graal em nitrogênio líquido e em seguida foi adicionado 1 mL ácido tricloroacético (TBA) 0,5%. O homogeneizado foi centrifugado a 19000 x g por 20 min a 4 °C, coletando-se 0,5 ml do sobrenadante ao qual foi adicionado 2,5 ml de TCA 20% e TBA 0,5%. A solução resultante foi submetida à fervura por 30 min, resfriada em banho de gelo e centrifugada a 10.000 x g por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 532 nm e 600 nm (A₆₀₀ representa a absorbância não específica que foi subtraída dos valores A₅₃₂ que correspondem ao complexo TBA/MDA). O valores de lipoperoxidação foram determinados a partir do ε ₅₃₂ = 155 mM⁻¹ cm⁻¹ do aduto TBA/MDA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

5.12 NÍVEIS DE ASCORBATO/ DEHIDROASCORBATO (AA/DHA)

Para estes ensaios as células (0,15 g de peso fresco) foram incialmente homogeneizadas com pistilo e graal em nitrogênio líquido. Em seguida adicionou-se 1 mL de solução de TCA a 6%, seguindo-se centrifugação a 13.000 x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi então utilizado para determinar a concentração do ânion ascorbato reduzido (AA), como descrito anteriormente (GILLESPIE; AINSWORTH, 2007). O método baseia-se na redução de Fe⁺³ por AA e na subsequente complexação do Fe²⁺ com α - α 'bipiridil (absorbância em 525 nm), que indiretamente corresponde à concentração de AA. Para a medida do AA total (AA mais DHA), adicionou-se ditiotreitol (DTT) à amostra para reduzir DHA para AA. A concentração de DHA foi obtida a partir da subtração de AA reduzido (amostra sem tratamento com DTT) de AsA total (amostra tratada com DTT). Uma curva padrão (0,15 - 10 mmol.L⁻¹) foi utilizada para calcular a concentração de AA a 525 nm.

5.13 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

As células embriogênicas de *A. angustifolia* foram armazenadas a -80 ° C até a análise (LYNCH *et al.*, 2011). As células (0,5 g de peso fresco) foram maceradas em nitrogênio líquido e misturadas com 1 mL de tampão de extração específico para cada enzima. Esta solução foi filtrada em gaze e depois centrifugada a 22 000 g durante 20 min a 4 °C. Quando necessário, o sobrenadante foi novamente centrifugado para se obter uma solução límpida (SHOHAEL *et al.*,

2006). A solução resultante continha proteínas solúveis e foi utilizada como fonte de enzima (GIAVALISCO *et al.*, 2003; LAING; CHRISTELLER, 2004). O tampão de extração usado para medir as atividades de APX, DHAR e MDHAR consistiu de: tampão de fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ (pH 7.0), de AsA 5 mmol.L⁻¹, glicerol 10% e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mmol.L⁻¹(SHOHAEL *et al.*, 2006). Antes da medição das atividades de GR e CAT, as enzimas foram extraídas com tampão contendo fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) e EDTA 1 mmol.L⁻¹ (SHOHAEL *et al.*, 2006). Para determinar a atividade SOD as células foram homogeneizadas com o meio de extração contendo tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,8), EDTA 0,1 mmol.L⁻¹, polivinilpirrolidona (PVPP) a 1% (p / v) e Triton X-100 a 0,5% (v / v).

5.13.1 Ensaio da Ascorbato Peroxidase (APX)

A atividade de APX (EC 1.11.1.11) foi determinada em meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,0), ácido L-ascórbico 0,25 mmol.L⁻¹ e H₂O₂ 5 mmol.L⁻¹. A diminuição da absorbância foi monitorada a 290 nm durante 5 min e a atividade foi calculada usando o coeficiente de extinção de AsA ($\varepsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (MURSHED *et al.*, 2008). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (100%).

5.13.2 Ensaio da Dehidroascorbato redutase (DHR)

A atividade de DHAR (EC 1.8.5.1) foi medida pelo aumento da absorbância a 290 nm, o que corresponde à redução do desidroascorbato num meio de reação contendo tampão HEPES 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,0), EDTA 0,1 mmol.L⁻¹, GSH 2,5 mmol.L⁻¹ e DHA 0,2 mmol.L⁻¹. A reação foi monitorada durante cinco min e a atividade da DHAR foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (MURSHED *et al.*, 2008). Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (100%).

5.13.3 Ensaio da Monodehidroascorbato redutase (MDHAR)

A atividade da MDHAR (EC 1.6.5.4) foi determinada em meio de reação contendo tampão HEPES 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,6), AsA 2,5 mmol.L⁻¹, NADH 0,25 mmol.L⁻¹ e ascorbato oxidase 0,4 U / poço. A reação foi monitorada a 340 nm durante cinco min pela diminuição da absorbância correspondente à oxidação de NADH e calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH (6,22 mM⁻¹ cm⁻¹) (MURSHED *et al.*, 2008). Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (100%).

5.13.4 Ensaio da Glutationa Redutase (GR)

A atividade da GR (EC 1.6.4.2) foi medida em microplaca a 25°C, em volume final de 0,2 mL, em meio de reação contendo tampão HEPES 50 mM.L⁻¹ (pH 8.0), EDTA 0,5 mmol.L⁻¹, NADPH 0,25 mmol.L⁻¹ e glutationa oxidada 0,5 mmol.L⁻¹ (GSSG). A absorbância a 340 nm foi monitorada durante 5 min e a atividade foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH (6,22 mM⁻¹ cm⁻¹) (MURSHED *et al.*, 2008). Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (100%).

5.13.5 Ensaio da Catalase (CAT)

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada pelo acompanhamento da decomposição de H_2O_2 a 240 nm, utilizando um tampão de reação contendo fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ (pH 7), EDTA 100 mmol.L⁻¹ e H_2O_2 10 mmol.L⁻¹ em volume final de 3 mL a 20 ° C. O coeficiente de extinção de H_2O_2 (0,394 mM⁻¹ cm⁻¹) utilizado para calcular a atividade do CAT (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (100%).

5.13.6 Ensaio da Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi medida a 30 °C em 3 mL de meio de reação, composto por tampão de carbonato de sódio/bicarbonato 50 mmol.L⁻¹ (pH 9,8), EDTA 0,1 mmol.L⁻¹ e epinefrina 0,6 mmol.L⁻¹. A formação do adrenocromo foi monitorada a 475 nm durante três min. A atividade de SOD foi expressa em unidades, em que uma unidade corresponde a 50% de inibição da oxidação da epinefrina (VERMA; DUBEY, 2003).

5.13.7 Ensaio da Peroxidase Total (POX)

Para medir a atividade total da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7), foi utilizado o kit Amplex Red de peróxido de hidrogênio peróxido/peroxidase (Molecular Probes®) seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras foram preparadas a partir de 8 mg, peso fresco, de células homogeneizadas em nitrogênio líquido em 1 mL de tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹ (pH 6,5). Esta solução foi centrifugada (10 000 g durante 10 min) a 4 °C (WU *et al.*, 2012) e 50 µl do sobrenadante foram incubadas com 50 µl do tampão de reação Amplex® Red contendo concentrações finais 50 µmol.L⁻¹ Amplex®Red e 1 mmol.L⁻¹ H₂O₂. A fluorescência foi monitorada durante 30 min a 25 °C, utilizando 571 nm e 585 nm como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, e normalizadas usando uma curva padrão (LIU *et al.*, 2010).

5.14 MASSA MITOCONDRIAL

A massa mitocondrial foi estimada a partir de imagens obtidas por Microscopia Confocal, usando MitoTracker® Green FM e Hoechst 33258 como marcadores para mitocôndrias e núcleos, respectivamente, seguindo-se as instruções do fabricante (MEADOWS; POTRYKUS, 1981). MitoTracker® Green FM torna-se fluorescente no ambiente lipídico das membranas mitocondriais, onde reage com grupos tiol de resíduos de cisteína de proteínas para formar um conjugado estável tioéter, que é retido na organela. Portanto, esta sonda é usada para localização mitocondrial e detecção da densidade/massa mitocondrial (PRESLEY *et al.*, 2003).

Nestes ensaios as células (0,2 g de peso fresco) foram incubadas com a sonda nuclear (Hoechst 33258) a concentração final de 10 µg/mL na presença de Triton X-100 0,3%, durante 20 min. Após a lavagem com PBS (pH 7,2), as células foram incubadas com a sonda mitocondrial (MitoTracker® Green FM 500 nM) durante 30 min. Todas as amostras foram fotografadas, sem fixação, em microscópio de fluorescência (microscópio Nikon A1 com lentes objetivas 20X (abertura numérica de 0,75) ou 40X (abertura do numérica de 1,15) para Hoechst (emissão 450 nm e excitação 405 nm) e para MitoTracker® (emissão 525 nm e excitação 488 nm). As imagens foram analisadas usando o software NIS-Elements Viewer (Nikon) para a quantificação do sinal de fluorescência. Os dados foram coletados delimitando-se a área celular no campo de luz, seguindo-se a medição de ambos os sinais de fluorescência. A intensidade de fluorescência foi expressa como fluorescência relativa correspondente apenas à área celular e não à área total do campo. A fluorescência verde (MitoTracker®) foi normalizada com base na fluorescência azul (nuclear). Três campos foram analisados em três lâminas a partir de três experimentos independentes.

5.15 ANÁLISE DA ULTRA-ESTRUTURA CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A análise ultra estrutural das linhagens SE1 e SE6 de *A. angustifolia* (15 dias de cultura), foram realizadas em parceria com a Prof.^a Dr.^a Lucélia Donatti do Departamento de Biologia Celular da UFPR. As amostras (0,1 g) das culturas foram fixadas por imersão em

tampão Karnowiski (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 mM.L⁻ ¹, pH 7,2 a 4°C). As peças foram então lavadas em tampão cacodilato 0,1 mM.L⁻¹, pH 7,2 a 4°C. Em seguida o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0.1 mmol.L⁻¹, pH 7.2, durante 1 h. Para a contrastação em blocos foi utilizado acetato de uranila 2% durante duas horas, seguindo-se desidratação em série alcoólica crescente e posterior desidratação com acetona. A impregnação e inclusão foram realizadas em resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrótomo Sorval Porter Blum MT-2, com utilização de navalhas de vidro e de diamante. Os cortes ultrafinos foram, por fim, contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (2,7 % nitrato de chumbo / 2,8 % citrato de sódio) (REYNOLDS, 1963). As imagens do material foram capturadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Para a análise quantitativa as imagens foram avaliadas no programa ImageJ, a partir de doze imagens para cada grupo, contendo pelo menos uma mitocôndria por imagem. As análises foram realizadas delimitando-se a área mitocondrial de todas as mitocôndrias enquadradas. Para calcular a média do volume mitocondrial, a área individual de cada mitocôndria foi delimitada e calculada a média. A densidade mitocondrial foi determinada através da divisão do número de mitocôndrias pela área de tecido de cada micrografia e, subsequentemente, foi feita a média desse valor. Para a determinação da eletrodensidade foi calculado o RawIntDen (soma de pixels), individualmente de cada área mitocondrial, sendo este valor expresso como média.

5.16 OLIGONUCLEOTIDEOS

Todos os oligonucleotideos foram adquiridos da DNA Technology (Aarhus, Dinamarca). Para a marcação radioativa dos oligonucleotídeos na extremidade 5' através da incorporação de ³²P foi utilizada polinucleotideo quinase T4 (PNK) e γ -[³²P] ATP (Perkin-Elmer). O ensaio continha 100 µg de oligonucleotideo (Tabela 1), 20 unidades de T4 PNK (Fermentas), tampão PNK *forward* A (Fermentas) e 333 µCiy-32P-ATP. Essa solução foi incubada durante 90 min a 37 °C e em seguida a reação, (20 µl - volume final), foi interrompida pela adição de 2 µl de EDTA 0,5 M. A solução foi então aplicada em coluna G50 Microspin (GE Healthcare, Amersham) para remover do γ -[³²P] ATP não incorporado. A complexação da fita do oligonucleótido marcado na extremidade 5' com a cadeia complementar correspondente foi realizada por aquecimento a 90 ° C, seguido por arrefecimento gradual até à temperatura

ambiente. Os oligonucleotideos foram armazenados a -20 °C até o momento dos ensaios (GREDILLA et al., 2012).

5.17 ATIVIDADE DO SISTEMA BER EM EXTRATO TOTAL DE CÉLULA

A atividade do sistema BER em extrato total de células foi monitorada pela atividade da AP endonuclease em duas frações do extrato total, a fração denominada S contendo enzimas solúveis, e a fração M contendo enzimas associadas à membrana. A atividade da AP endonuclease foi determinada in vitro por um ensaio de incisão segundo, GREDILLA et al. (2012), com algumas modificações. Primeiramente os extratos celulares foram permeabilizados, com solução contendo Triton X-100 (0,05%) e 0,3 mol.L⁻¹ KCl. Na sequência, a reação foi realizada em meio contendo 20 mmol.L⁻¹ HEPES (pH 7,6), 1 mmol.L⁻¹ de EDTA, 75 mmol.L⁻¹ de KCl, 10 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ 3% (v/v) de glicerol, 5 mmol.L⁻¹ de DTT, 36 fmol de oligonucleótidos duplex marcados com extremidade ³²P contendo um tetrahidrofurano (THF, análogo de local abásico) e 0,4, 0,8 ou 1,5 µg de proteína em um sistema de reação com volume final de 20 µl. Após 30 min a 25 ° C a reação foi interrompida pela adição de SDS 0,4% e proteinase K 0,2 µg/µl (concentrações finais). Em seguida, as amostras foram incubadas a 90 ° C durante 5 min com corante para corrida constituído de: formamida 80 mM.L⁻¹, EDTA 10 mM.L⁻¹, xilenocianol FF 1 mg.mL⁻¹ e azul de bromofenol 1 mg.mL⁻¹, e aplicadas imediatamente em gel de poliacrilamida desnaturante 20% para a corrida de eletroforese por 1h30min a 15 W. O DNA marcado radioativamente foi visualizado usando o programa Personal Molecular ImagerTM e quantificado pelo software Quantity One (Bio-Rad). As atividades das enzimas foram expressas em porcentagem de formação de produto.

5.18 ATIVIDADE DO SISTEMA BER EM MITOCÔNDRIAS

Para determinar a atividade do sistema BER nas mitocôndrias de células de Araucária foram avaliadas as atividades de três enzimas desta via: dU-glicosilase, NEIL glicosilase e AP endonuclease.

Incialmente, as concentrações ótimas de MgCl₂ e proteína para cada ensaio enzimático a 25 °C foram padronizadas. Os ensaios dos efeitos da temperatura foram realizados de duas maneiras. Na primeira, a temperatura da reação variou entre 20 a 40 °C. Já na segunda, foi realizada uma pré-incubação durante 30 min de 20-40 ° C e o ensaio foi realizado a 25 °C. A atividade das enzimas da via BER foi determinada in vitro por ensaios de incisão como descrito por GREDILLA *et al.* (2012), com algumas modificações. A reação foi realizada em tampão de reação específico para cada enzima, contendo 36 fmol de oligonucleotídeo com dano específico, sendo esses oligonucleotídeos marcados na extremidade 5' com ³²P. A reação foi conduzida em mitocôndrias permeabilizadas com 0,05% de Triton X-100 e KCl 0,3 mol.L⁻¹, em diferentes temperaturas, 20-40 °C durante 30-90 minutos, como indicado. A reação foi interrompida pela adição de SDS 0,4% e proteinase K 0,2 µg/µl (concentrações finais). Em seguida, as amostras foram incubadas a 90 ° C, durante 5 min com corante para corrida constituído de: formamida 80 mmol.L⁻¹, EDTA 10 mmol.L⁻¹, xilenocianol FF 1 mg.mL⁻¹ e azul de bromofenol 1 mg.mL⁻¹, e aplicadas imediatamente em gel de poliacrilamida (20%) desnaturante para a corrida da eletroforese por 1h30 a 15 W. O DNA marcado radioativamente foi visualizado usando o programa Personal Molecular ImagerTM e quantificado usando o software Quantity One (Bio-Rad). As atividades das enzimas foram expressas em porcentagem de formação de produto.

A atividade mitocondrial da AP endonuclease in vitro foi medida em tampão de reação contendo HEPES 20 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 75 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 2,5 mmol.L⁻¹, glicerol a 3%, DTT 5 mmol.L⁻¹, oligonucleotídeos duplex marcados com ³²P na extremidade 5' contendo um tetrahidrofurano (THF, análogo do local abásico) na presença de 0,2-2 μg de proteína. A reação foi monitorada de 20-40 °C, durante 30 min.

A atividade mitocondrial da dU glicosilase in vitro foi determinada em tampão de reação contendo HEPES 20 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 75 mmol.L⁻¹, MgCl₂ a 20 mmol.L⁻¹, glicerol a 3%, DTT 5 mmol.L⁻¹, oligonucleotídeos duplex marcados com ³²P na extremidade 5'contendo dU (deoxi uracilo) na presença de 0,4-5 µg de proteína. A reação foi monitorada nas temperaturas de 20-40 ° C, durante 30 min.

A atividade da NEIL glicosilase foi medida em tampão de reação contendo HEPES 40 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 100 mmol.L⁻¹, MgCl₂ a 2 a 8 mmol.L⁻¹, glicerol a 5%, DTT 2 mmol.L⁻¹, duplex marcados com ³²P na extremidade 5' contendo 5- OHdU (5-OH-citosina) numa estrutura de bolhas na presença de 2-24 µg de proteína. Para evitar a clivagem inespecífica do substrato, adicionaram-se 2 mmol.L⁻¹ de dNTPs. A reação foi realizada a 20-40 °C, durante 90 min.

5.19 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford usando curva padrão de albumina (BRADFORD, 1976).

5.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados, apresentados com média \pm desvio padrão da média de pelo menos três experimentos independentes em triplicata (n = 9), foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ou Teste t para comparação das médias. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram valores de p \leq 0,05.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EFEITOS DO ESTRESSE PELO FRIO EM LINHAGENS DE Araucaria angustifolia NÃO CARACTERIZADAS QUANTO RESPONSIVIDADE A FATORES DE MATURAÇÃO (AA)

6.1.1 Efeitos do estresse pelo frio na morfologia e viabilidade das células de A. angustifolia

As análises microscópicas de células de *A. angustifolia* foram realizadas através de dupla coloração com azul de Evans e carmim acético. Como se observa na FIGURA 2, as culturas apresentam dois tipos celulares, conforme descrito por SILVEIRA *et al.* (2006); VALENTE *et al.* (2012). As células embrionárias possuem núcleos grandes e citoplasmas densos, sendo reativas ao carmin acético, corando-se em vermelho. Este corante reage com glicoproteínas, cromatina e DNA. As células suspensoras são alongadas, vacuoladas e permeáveis ao corante azul de Evans (FIGURA 2a e b). As culturas são organizadas em agregados conhecidos como PEM (massa pró-embrionária), em que as células embrionárias ficam no centro e as células suspensoras ao redor (SILVEIRA *et al.*, 2006). As análises morfológicas mostram que PEM foi preservada após a exposição a condições de estresse pelo frio a 4 ± 1 °C (FIGURA 2 c - e).

Para garantir que as células de *A. angustifolia* mantem-se metabolicamente viáveis após os tratamentos por baixas temperaturas, a viabilidade destas células foi avaliada pelo método do MTT. O MTT é reduzido a formazan por desidrogenases, apenas em células viáveis (CASTRO-CONCHA *et al.*, 2006). Como controles foram utilizadas células mantidas em condições ideais de cultivo, 25 ± 1 ° C, no escuro, consideradas como 100% viáveis. Células rompidas por três ciclos de fervura foram consideradas como controle de células inviáveis (~ 20% viabilidade). Os resultados apresentados na FIGURA 3 não evidenciam qualquer efeito do estresse pelo frio, nos tempos de 24 h e 48 h, nestas células.

FIGURA 2. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia EM CULTURA



FONTE: O autor (2018)

NOTA: Imagem microscópica das células controle de *A. angustifolia* (15 dias de cultura - 25 ± 1 °C) coradas com Azul de Evans e Carmin acético. São identificados dois tipos celulares: **a.** células embrionárias, que são isodiamétricas, pequenas com citoplasma denso e reativas ao carmim acético e, em **b.** as células suspensoras, que são alongadas, altamente vacuoladas e permeáveis ao corante azul de Evans. **c.** PEMs de células do grupo controle (25 ± 1 °C). **d.** PEMs de células submetidas a 24 h de estresse pelo frio (4 ± 1 °C). **e** PEMs de células expostas a 48 h de estresse pelo frio (4 ± 1 °C). [PEMs = massas proembriogênicas; ec = células embrionárias; sc = células suspensoras; v = vacúolo]. As imagens representam três experimentos independentes.

A ausência de efeitos do estresse pelo frio na morfologia e na viabilidade das culturas embriogênicas de A. angustifolia demonstram que esta condição não promove danos celulares significativos. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de VALENTE et al. (2012) e asseguram que as células não sofreram alterações significativas em seu perfil metabólico durante o tempo em que foram mantidas em cultivo, pelo menos no que diz respeito a atividade das desidrogenases celulares . No entanto, Valente e colaboradores (2012) demostraram que o estresse pelo frio (4°C por 24h e 48 h), nas mesmas condições do presente estudo, induz a respostas relacionadas ao estresse oxidativo, em mitocôndrias isoladas destas células. Os autores destacaram a ativação da UCP em $\sim 45\%$ em ambos os tempos de exposição e, maior expressão desta proteína em \sim 40 % e 150 % para 24h e 48h, respectivamente. No entanto, não foram observadas alterações na atividade ou expressão da AOX (VALENTE et al., 2012).

Sabe-se que a modulação da atividade das enzimas mitocondriais UCP, AOX e NDs é importante para a superação de condições de estresse, particularmente o oxidativo, pois permitem a manutenção dos transportadores de elétrons da cadeia respiratória em níveis de redução adequados, evitando, assim, o acúmulo de ROS (RASMUSSON et al., 2008).

Visando avançar na compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta antioxidante, neste estudo foram avaliados alguns parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em células de A. angustifolia expostas às mesmas condições de estresse (4 ° C \pm 1 ° C durante 24 h e 48 h). Os resultados são apresentados a seguir.

FIGURA 3. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA VIABILIDADE DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia



FONTE: O autor (2018)

NOTA: A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT, como descrito no item 5.3 da seção de Material e Métodos. Controle, células em condições de cultivo $(25 \pm 1 \circ C)$; controle de morte, células submetidas a três ciclos de congelamento e fervura; estresse de 24 h e 48 h, células incubadas a $4 \pm 1 \circ C$. Os resultados, expressos como porcentagem do controle, são apresentados como média \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. 100% correspondente a $0,289 \pm 0,1$ de absorbância. *** P < 0,0001 vs. controle.

6.1.2 Efeitos do estresse pelo frio nos níveis de H₂O₂ e peroxidação lipídica

Na FIGURA 4 observa-se que os níveis de H_2O_2 aumentaram em ~35% nas culturas de *A. angustifolia* submetidas ao estresse pelo frio (4 ± 1 ° C), nos tempos de 24h e 48 h, em comparação com as células controle (25 ± 1 ° C). Neste contexto, Valente (2012) demonstrou um aumento dos níveis de ROS total (~ 17%) em mitocôndrias isoladas destas células submetidas às mesmas condições de estresse, porém, somente para o tempo de 24h. No entanto, este aumento não foi capaz de resultar em aumento significativo da lipoperoxidação nestas organelas. Também no presente estudo, visando determinar possíveis danos causados pelo aumento dos níveis de H₂O₂, ensaios de lipoperoxidação foram realizados. Ao contrário do demonstrado por Valente (2012) em mitocôndrias isoladas, no sistema celular houve aumento da lipoperoxidação, pelo método TBARS, em ~ 14% e ~ 23% após 24 h e 48 h de estresse frio, respectivamente (FIGURA 5). Este resultado está de acordo com o aumento dos níveis de H₂O₂ nas mesmas condições (FIGURA 4).

FIGURA 4. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NOS NÍVEIS DE H₂O₂ DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*



FONTE: O autor (2018)

NOTA: Os níveis de H_2O_2 foram determinados através do kit comercial Amplex® Red hydrogen peroxide/peroxidase assay kit (Molecular Probes®) como descrito no item 5.10 da seção de Material e Métodos. Controle, células em condições de cultivo ($25 \pm 1 \circ C$); estresse de 24 h e 48 h, as células incubadas a $4 \pm 1 \circ C$. Os resultados, expressos como porcentagem do controle, são apresentados como como média \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes em triplicata e foram calculados a partir de uma curva de calibração de peróxido ($0 - 10 \mu M$). 100% correspondente a $0,3284 \pm 0,2 \mu M H_2O_2$ /mg de peso fresco de células. ** P < 0,001 versus controle

Sabe-se que fatores abióticos, como variações na temperatura, salinidade e exposição à luz UV, podem aumentar os níveis de ROS nas células vegetais (SHOHAEL *et al.*, 2006), resultando em danos ao DNA, proteínas e lipídios. Embora o aumento dos níveis de ROS esteja relacionado à indução de morte celular, estudos demonstraram que essas espécies também estão envolvidas em vias de sinalização importantes em processos fisiológicos (MOLLER *et al.*, 2007; THEOCHARIS *et al.*, 2012). Nesse contexto, VIEIRA *et al.* (2012) demonstraram que a suplementação do meio de cultura de células embriogênica de *A. angustifolia* com GSH (5 mM), levou a liberação de cerca de 66% mais NO[•], via decomposição do S-nitrosoglutationa. Esse processo favoreceu o desenvolvimento mais eficiente do embrião polar, em relação a cultura não suplementadas com GSH, indicando o papel NO[•] para a sinalização do processo de diferenciação e divisão nessas culturas.

FIGURA 5. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NOS NÍVEIS PERÓXIDOS LIPÍDICOS DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifólia



FONTE: O autor (2018)

NOTA: Os níveis de peróxidos lipídicos foram quantificados através do método de TBARS, como descrito no item 5.11 da seção de Material e Métodos. Controle, células em condições de cultivo (25 ± 1 ° C; estresse de 24 h e 48 h, células incubadas a 4 ± 1 ° C. Os resultados expressos como porcentagem do controle, estão expressos como média \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. 100% correspondente a 3,25 \pm 0,46 nmol mL⁻¹ g⁻¹ de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. ** P <0,001 ou *** P <0,0001 vs. Controle.

O presente estudo evidência que o estresse pelo frio (24 h e 48 h) promoveu o aumento dos níveis de ROS e da lipoperoxidação em células embriogênicas de *A. angustifolia,* efeitos descritos também por outros autores. SHOHAEL *et al.* (2006) descreveram um aumento da peroxidação lipídica e níveis de H₂O₂ em embriões somáticos de *Eleutherococcus senticosus,* cultivados em diferentes condições de radiação luminosa, em comparação com embriões cultivados no escuro (controle). Resultados semelhantes também foram relatados para *Cicer arietinum* L. (genótipo kaka) de três semanas, submetidos ao estresse pelo frio (-10 ° C por 10 min) (NAZARI *et al.* (2012), bem como em genótipos de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), em diferentes estágios de desenvolvimento, expostos ao estresse por desidratação (PATEL; HEMANTARANJAN, 2012). Os resultados do presente estudo são semelhantes a esses relatos da literatura e têm sua relevância reforçada considerando que pouco se sabe sobre o estresse oxidativo em condições de exposição a baixas temperaturas em gimnospermas.

6.1.3 Efeito do estresse pelo frio nas defesas antioxidantes

Embora o estresse pelo frio tenha aumentado os níveis de H_2O_2 e a peroxidação lipídica, esta condição não foi suficiente para reduzir a viabilidade celular ou promover alterações morfológicas em *A. angustifolia*. Esses resultados sugerem que os mecanismos de

eliminação de ROS podem estar mais ativos nessas células, evitando grandes danos, como a morte celular. Nas células vegetais, a produção de ROS e sua eliminação podem ocorrer em diferentes compartimentos celulares, incluindo as mitocôndrias (MOLLER *et al.*, 2007). Em geral, dois mecanismos são empregados para evitar o acúmulo de ROS: (i) enzimático, que inclui POX, PRX, APX, GR, MDHAR, SOD, CAT, DHAR e, (ii) não enzimático, que inclui o ascorbato, GSH, tocoferóis, flavonóides, alcalóides e carotenóides (MOLLER, 2001; APEL; HIRT, 2004; BHATT; TRIPATHI, 2011; DIETZ, 2011). Neste estudo, buscou-se avaliar esses mecanismos, que podem funcionar de forma sinérgica (GUO *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2011).

Com relação ao sistema enzimático antioxidante, observa-se na TABELA 1 que não houve alteração na atividade da SOD, enquanto a atividade da CAT foi reduzida em ~ 22% após 48 h de exposição ao frio. Esta condição também promoveu a redução da atividade das peroxidases totais (POX) em ~ 70% e ~ 36%, após a exposição por 24 h e 48 h, respectivamente. A redução da atividade destas enzimas poderia justificar o aumento dos níveis de H₂O₂ e a peroxidação lipídica (FIGURA 4 e FIGURA 5). No entanto, as atividades da APX e DHAR aumentaram em ~ 108% e ~ 65%, respectivamente (TABELA 1). A atividade de MDHAR foi alterada apenas em 24 h de estresse, aumentando em ~ 273%, enquanto a atividade de GR permaneceu inalterada. (TABELA 1).

Em mitocôndrias isoladas destas células, o estresse de 24 h promoveu o aumento da atividade da catalase em 32%, enquanto que em 48 h resultou na redução de ~ 57%. O estresse pelo frio (24 h e 48 h) também causou a redução da atividade da GR (~ 15%), enquanto que as atividades de SOD e APX permaneceram inalteradas nestas organelas [(VALENTE, 2012); APÊNDICE 1)

Enzimas	Controle	24 h Estresse	48 h Estresse
CAT	100 ± 4	89 ± 7	$75 \pm 5*$
SOD	100 ± 2	96 + 4	108 ± 5
APX	100 ± 4	122 ± 6	$212 \pm 13^{***}$
MDHAR	100 ± 4	$373\pm38^{\ast\ast\ast}$	93 ± 4
DHAR	100 ± 6	115 ± 10	$165 \pm 27*$
GR	100 ± 2	89 ± 7	98 ± 6
POX	100 ± 1	$27 \pm 2.3**$	$60 \pm 5.4^{**}$
* <i>P</i> < 0.05 v	s. controle, ** $P < 0.001$	vs. controle, or *** $P < 0.00$	01 vs. controle

TABELA 1. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia.*

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito no item 5.13 da seção de Material e Métodos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão de pelo menos quatro experimentos independentes em triplicata e expressos como porcentagem do controle. CAT, 100% corresponde a 2,2 \pm 0,2 U

de catalase; SOD, 100% corresponde a $19 \pm 2,3$ U de SOD (uma unidade de SOD foi calculada como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% de oxidação de epinefrina nas condições experimentais). APX, 100% corresponde a $0,31 \pm 0,06$ µmol de ascorbato oxidado min⁻¹ • mg⁻¹ de proteína. MDHAR, 100% corresponde a $30 \pm 1,5$ nmol de NADH oxidado min⁻¹ • mg⁻¹ de proteína. DHAR, 100% corresponde a $37 \pm 9,6$ nmol de ascorbato min⁻¹ • mg⁻¹ de proteína; POX, 100% corresponde a $157,97 \pm 4$ µU de POX mL⁻¹ • mg⁻¹ de proteína.

Como parâmetro para avaliação do sistema não enzimático antioxidante, neste estudo foi determinada a razão AA/DHA, que foi reduzida em ~ 25% em ambas as condições de estresse (24 h e 48 h). Esses resultados reforçam que uma condição pró-oxidativa foi estabelecida nessas células em decorrência da exposição a baixas temperaturas (FIGURA 6).

Os resultados apresentados até aqui mostram uma modulação diferencial das defesas antioxidantes em mitocôndrias e células, dependente do tempo de exposição ao estresse pelo frio. Nas mitocôndrias, esta modulação foi evidente para a catalase, que foi estimulada em 24h e fortemente inibida após 48 h de estresse. Em células, após o estresse durante 24 h, a diminuição da atividade das POX parece ser a principal causa do aumento dos níveis de H2O2, enquanto que, após 48 h, a inibição da catalase também contribui para isso. O ciclo glutationaascorbato também é significativamente e diferencialmente modulado pelo estresse pelo frio. A modulação positiva ocorre para a MDHR (~273%) após 24 h de estresse e, é substituída pelo aumento da atividade de APX e DHR após 48 h. É importante notar que esta modulação diferencial resultou nos mesmos níveis de H2O2 e peroxidação lipídica, bem como da relação AA / DHA. Esta sinergia entre as defesas antioxidantes também foi mostrada por GUO et al. (2006) em culturas de células de Chorispora bungeana em suspensão, incubadas por 15 dias a -8 ° C. Em comparação com as células controle (crescidas a 25 °C), as células estressadas (crescidas a -8 °C) não tiveram sua viabilidade reduzida, apesar do aumento dos níveis de MDA, que atingiu seu pico no primeiro dia, porém, após 15 dias de estresse retornou aos níveis do controle. Os autores também observaram um aumento na atividade POX durante os primeiros dias de estresse que, segundo estes, foi compensatório para a redução da atividade da CAT durante o mesmo período. APX, DHAR e GR, que são enzimas chave no ciclo glutationaascorbato, foram significativamente ativadas durante os 15 dias de estresse. Assim, os autores sugeriram que este sinergismo entre as enzimas antioxidantes contribui para a proteção das membranas celulares.

FIGURA 6. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA RAZÃO AA / DHA DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia



FONTE: O autor (2018)

NOTA: A determinação da razão AA / DHA foi realizada como descrito no item 5.12 da seção de Material e Métodos. Controle, células em condições de cultivo ($25 \pm 1 \circ C$); estresse de 24 h e 48 h, células incubadas a 4 \pm 1 ° C. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes em triplicata. Os valores da razão AsA/DHA foram calculados a partir da concentração de AA e em nmol de / g de peso fresco de células ** P < 0,001 vs. controle.

LIU *et al.* (2011) mostraram um aumento nos níveis de H_2O_2 e peroxidação lipídica em células de *Chorispora bungeana* submetidas ao estresse pelo frio a 0 ° C ou 4 ° C, por 72 h. Nessas células, a atividade da CAT diminuiu em relação às células controle, incubadas a 25 ° C. Além disso, a diminuição da atividade da CAT foi acompanhada por um aumento das atividades de APX e GR, bem como dos níveis de AA, o que indica que o ciclo da glutationa foi estimulado para compensar a diminuição da atividade da CAT. Da mesma forma, no presente estudo, o aumento das atividades de MDHAR e DHAR após 24 h e 48 h de estresse em células de Araucária sugere o aumento da atividade do ciclo do ascorbato-glutationa, possivelmente na tentativa de superar as condições de estresse. Além disso, os diferentes perfis entre 24 h e 48 h de exposição ao estresse sugerem uma aclimatação a esta condição (SHOHAEL *et al.*, 2006).

6.1.4 Efeito do estresse pelo frio na massa mitocondrial e atividade das NDs externas

Considerando o papel crucial das mitocôndrias para o fornecimento de energia celular, bem como na geração de ROS, foram realizados ensaios com o corante FM MitoTracker® Green para avaliar possíveis alterações da massa mitocondrial em resposta ao estresse pelo frio nas células de araucária. A FIGURA 7 mostra que o estresse pelo frio durante 24 h e 48 h aumentou significativamente a massa mitocondrial em \sim 136% e \sim 173% em comparação com o controle, no entanto, não houve diferença entre os tratamentos.

O aumento da densidade mitocondrial observada após ambos os períodos de estresse pode ser devido à aclimatação destas células à condição de estresse pelo frio. Neste contexto, Amstrong *et al.*, (2006) demonstraram o aumento do volume e da respiração mitocondrial em células epidérmicas de folhas de *Arabdopsis thaliana*, desenvolvidas a 5° C durante cinco dias, associando estes efeitos à aclimatação da planta (ARMSTRONG *et al.*, 2006). Os autores ainda sugerem que mudanças na massa e ultraestrutura mitocondrial podem ser decisivas para o restabelecimento da respiração e evidenciaram a heterogeneidade da resposta mitocondrial ao estresse frio nas folhas de *A. thaliana*.

FIGURA 7. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA MASSA MITOCONDRIAL NAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE A. angustifolia



FONTE: O autor (2018)

NOTA: A massa mitocondrial foi determinada a partir de imagens obtidas por microscopia Confocal, usando MitoTracker® Green FM e Hoechst 33258 como sondas para mitocôndrias e núcleos, respectivamente. Parte superior – o gráfico representa a intensidade de fluorescência (intensidade de pixels). Os dados foram analisados pelo software NIS-Elements Viewer (Nikon) e normalizados com base na fluorescência nuclear. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. * P < 0,05 vs. controle; ** P <0,001 versus controle.

Nas microscopias representativas observam-se mitocôndrias em verde (MitoTracker® Green FM) e núcleos em azul (Hoechst 33258). **a**. Células em condições de cultivo ($25 \pm 1 \circ C$); **b**. estresse por 24 h a $4 \pm 1 \circ C$; c. e estresse por 48 h a $4 \pm 1 \circ C$.

Também se sabe que o estímulo da biogênese mitocondrial está relacionado à adaptação ao estresse, fornecendo componentes mitocondriais, como proteínas de baixa abundância, dificilmente detectadas pelas metodologias de proteômica, ou pertencentes a vias metabólicas comumente descritas como não mitocondriais, que contribuem para a transdução de sinais ou mesmo para o reparo recombinante do DNA mitocondrial (MØLLER, 2016). Um número aumentado de mitocôndrias também foi demonstrado em células de tabaco transgênicas que super-expressam AtUCP1 (BARRETO *et al.*, 2014). De acordo com esses autores, o aumento da expressão de AtUCP1 e a biogênese das mitocôndrias aparentemente estão relacionados à melhor resistência das células da planta em condições de estresse, como baixo pH e temperatura e estresse oxidativo, uma vez que, na linha celular mutante, os níveis de ROS foram menores quando comparados com células de tipo selvagem (BARRETO *et al.*, 2014). De fato, o aumento da massa mitocondrial aqui observado está de acordo com os resultados de Valente *et al.*, (2012) que demonstraram a maior expressão e atividade da UCP, em mitocôndrias de células de araucária submetidas as mesmas condições de estresse pelo frio (VALENTE *et al.*, 2012).

Entre as proteínas adicionais presentes nas mitocôndrias vegetais, que são capazes de regular o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, estão as NAD(P)H desidrogenases alternativas (NDs) que participam da fosforilação oxidativa e também contribuem para a manutenção do equilíbrio oxidativo nestas células (MOLLER, 2001). Neste estudo avaliou-se o efeito do estresse pelo frio na atividade destas enzimas, que são insensíveis à rotenona e catalisam a transferência de elétrons diretamente para ubiquinona, sem a atividade de bombas de prótons (RASMUSSON *et al.*, 2008). Nas mitocôndrias intactas, o estresse pelo frio promoveu uma diminuição da atividade das NDs externas (FIGURA 8). O estresse de 24h diminuiu em ~ 28% e ~ 52% a atividade da NADH e NADPH desidrogenases, respectivamente. A atividade de ambas as enzimas foi diminuída em ~ 66% após 48 h de estresse pelo frio.

No presente estudo, contrariamente ao aumento da massa mitocondrial, a atividade das NAD(P)H desidrogenases alternativas externas diminuiu. SVENSSON *et al.* (2002) obtiveram resultados semelhantes para as NDs desidrogenases. Os autores demonstraram que a transcrição e atividade de nda1 e ndb1, que corresponde a NADH desidrogenase interna e NADPH desidrogenase externa, respectivamente, é modulada negativamente pela exposição ao frio (5 ° C durante seis dias) em folhas de batata, sendo este efeito mais significativo para nda1. Por outro lado, STUPNIKOVA *et al.* (2006) mostraram em ervilha, *Pisum sativum*, que a adição de succinato ou malato-glutamato não pode sustentar a fosforilação oxidativa a -3,5° C e que, nesta

condição extrema, a oxidação externa do NADH seria a responsável por proporcionaria, em maior escala, os elétrons para a cadeia respiratória.

FIGURA 8. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA ATIVIDADE DAS NAD(P)H DESIDROGENASES ALTERNATIVAS (NDs) de culturas EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*



FONTE: O autor (2018)

NOTA: A respiração foi monitorada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) em meio de reação padrão suplementado adequadamente para determinação das NDs, como descrito no item 5.8 da seção de Materiais e Métodos. Foram adicionados NADH 2 mmol.L⁻¹ (NADHex) ou NADPH (NADPHex), glutamato de sódio e malato de sódio 2 mmol.L⁻¹, Ca²⁺ 1 mmol.L⁻¹, KCN 1 mmol.L⁻¹ e SHAM 1 mmol.L⁻¹. NADHex, NADH desidrogenases externas; NADPHex, NADPH desidrogenases externas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes em triplicata. * P < 0,05 ou *** P <0,0001 vs. controle.

A diminuição da atividade das NAD(P)H desidrogenase externas observadas no presente estudo (FIGURA 8) também pode estar relacionada ao aumento dos níveis de H₂O₂ nas mesmas condições (FIGURA 4). Nesse sentido, SWEETLOVE *et al.* (2002), utilizando mitocôndrias de culturas de células de Arabidopsis submetidas ao tratamento com H₂O₂ durante 16 h, descreveram uma diminuição no consumo de O₂ quando o NADH, malato ou piruvato foram utilizados como substratos; no entanto, quando o citocromo c foi utilizado como doador de elétrons, a velocidade da cadeia respiratória não foi afetada em comparação com as células controle (ausência de H₂O₂). Por isso, os autores sugeriram que o estresse induzido por H₂O₂ promoveu a inibição das NADH desidrogenases externas e internas. Assim, no presente estudo não podemos descartar esta hipótese, uma vez que os níveis de H₂O₂ também foram aumentados em resposta ao estresse pelo frio (FIGURA 4).

Embora os resultados desse estudo demonstrem que o estresse pelo frio promove a redução da atividade das NAD(P)H desidrogenases alternativas externas, por outro lado, também evidenciam um aumento na massa mitocondrial, o que está de acordo com Valente e

colaboradores (2012) que demonstraram o aumento da expressão e atividade das UCP nestas células, sob as mesmas condições (VALENTE *et al.*, 2012). Assim, pode-se sugerir que as mitocôndrias têm importante papel na superação desta condição de estresse, possivelmente por manter níveis sub-letais de ROS.

6.1.5 Conclusão

A partir dos resultados é possível concluir que a exposição ao frio é capaz de induzir uma condição de estresse oxidativo em células embriogênicas de *A. angustifolia.* Esta condição é decorrente da redução da atividade da catalase, peroxidases e das NAD(P)H desidrogenases externas. Em resposta, há uma modulação positiva das enzimas do ciclo glutationa-ascorbato e um aumento da massa mitocondrial. Esses resultados contribuem para a compreensão das vias envolvidas na superação do estresse nesta gimnosperma e são importantes para o desenvolvimento de métodos de conservação desta espécie, como a micropropagação in vitro, uma vez que este processo é dependente da sinalização por ROS e por RNS.

6.2 EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR EM CULTURA EMBRIOGÊNICA DE Araucaria angustifolia (Aa) NÃO CARACTERIZADAS QUANTO RESPONSIVIDADE A FATORES DE MATURAÇÃO (AA)

6.2.1 Efeito do estresse pelo calor na viabilidade e respiração de células de A. angustifolia

A previsão de aquecimento global nos próximos anos, bem como seus efeitos negativos no desenvolvimento de árvores (TESKEY *et al.*, 2015) e espécies agrícolas (BITA; GERATS, 2013), são bem conhecidos. Diferentes danos fisiológicos têm sido associados a esta condição, que afeta as estruturas dos vegetais, como folhas, frutos e hastes, como também seu metabolismo (TESKEY *et al.*, 2015). Em plantas superiores, a temperatura ideal de crescimento varia entres as espécies e, condições adversas, resultam em adaptações morfológicas, fisiológicas e metabólicas (GUY, 1999; STUPNIKOVA *et al.*, 2006; BITA; GERATS, 2013).

Sabe-se que durante o crescimento vegetal, altas temperaturas podem levar a alterações significativas nos cloroplastos e mitocôndrias. Os danos nessas organelas estão relacionados principalmente a alterações nas membranas, já que a sua integridade é essencial para a fotossíntese e respiração (BITA; GERATS, 2013). Song et al (2014) demostraram que a exposição de plantas de papoula (Papulus euphratica) a temperaturas de 42°C, por mais de 12 h, resultou em altos níveis de H₂O₂, redução do transporte de elétrons associada a danos nos sistemas fotossintéticos e ativação da via do glicolato (SONG et al., 2014). No que diz respeito às funções mitocondriais, estudos com couve-flor (Brassica oleracea), expostas a temperaturas de 40 °C, por 4 h durante 10 dias consecutivos, evidenciaram diminuição da eficiência da fosforilação oxidativa (OXPHOX), aumento da expressão e atividade da oxidase alternativa (AOX) e redução da atividade do NADH desidrogenase interna alternativa (RUREK et al., 2015). Stupnikova et al. (2006) mostraram em experimentos in vitro que em mitocôndrias isoladas de epicótipos de Pisum sativum cultivadas a 20 °C, as velocidades respiratórias e o acoplamento eram menores em 40 ° C quando comparados a temperaturas entre 10 - 30 ° C.Com o objetivo de mimetizar possíveis estresses por temperatura aos quais essa espécie é exposta na natureza, optou-se pelas seguintes condições de estresse térmico: 30 ° C durante 24 h e 48 h e 37 ° C durante 6h. Considerando as previsões de aquecimento global, também foi incluída a exposição a 40 ° C durante 2 h e 42 ° C durante 2 h.

Neste estudo, a utilização de um sistema in vitro, ou seja, das culturas embriogênicas, apresenta vantagens como a indução controlada do estresse, a obtenção de resultados mais precisos e reprodutíveis que podem fornecer subsídios para estudos posteriores ex vitro.

Para avaliar os efeitos da exposição a altas temperaturas, nas células da Araucária, foram realizados ensaios de viabilidade celular, utilizando marcação dupla com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (PI). O FDA é utilizado como marcador de viabilidade, observando-se a fluorescência verde para as células viáveis (CHAVES *et al.*, 2002). Em contraste, o PI é um intercalante de DNA que só é internalizado em células que apresentem alterações da permeabilidade da membrana celular, de modo que sua fluorescência (vermelha) se torna uma medida do número de células mortas.

Os resultados dos ensaios de viabilidade estão expressos como razão FDA / PI (FIGURA 9), ou seja, quanto maior o valor desta razão, maior o número de células viáveis. Houve uma redução significativa na viabilidade celular para todos os tratamentos quando comparados ao controle ($25 \circ C \pm 1$), sendo de ~ 20% após 24 h a 30 ° C, 40 % após 48 h a 30 ° C e 6 h a 37 ° C, respectivamente. As incubações de 40 e 42 ° C por 2h reduziram a viabilidade para cerca de 20% (~80 de redução), um valor comparável ao controle de morte celular (FIGURA 1).

Neste estudo, a respiração foi determinada como parâmetro metabólico das células submetidas às condições de estresse. Observa-se na FIGURA 9 que a adição dos substratos (glutamato + malato) estimulou a respiração, como esperado. No entanto, a adição de FCCP teve pouco efeito. Por sua vez, a adição de SHAM promoveu uma redução da velocidade respiratória de $\sim 30\%$, enquanto que a antimicina (inibidor do Complexo III) inibiu completamente a oxidação insensível a SHAM.

Em relação às condições de estresse, somente a temperatura de 42 ° C por 2 h promoveu uma redução significativa da respiração (~80% - FIGURA 10). Não houve indicação de que a via da citocromo oxidase e a via da AOX respondessem de forma diferente ao tratamento por alta temperatura nestas células (ver APÊNDICE 2).

Os resultados dos ensaios de respiração indicam que a redução da viabilidade celular nas temperaturas de 30-37 °C FIGURA 9 não se deve ao comprometimento do transporte de elétrons na cadeia respiratória e, consequente, diminuição da síntese de ATP devido a ineficiência da fosforilação oxidativa. Assim, pode-se sugerir que outros mecanismos estejam envolvidos, particularmente vias mais sensíveis a aumentos de temperatura.



FIGURA 9. VIABILIDADE DE CULTURA DE A. angustifolia EXPOSTAS AO ESTRESSE PELO CALOR

FONTE: O autor (2018).

NOTA: A viabilidade celular foi determinada por microscopia de fluorescência após coloração com diacetato de fluoresceína (FDA - 2,5 μ g / mL) e iodeto de propídio (PI - 5 μ g / mL), como descrito no item 5.3 da seção Material e Métodos. Painéis, da esquerda para a direita: imagens de contraste de fase de campo brilhante, fluorescência FDA e fluorescência PI, os dois últimos visualizados usando filtros de excitação violeta e verde, respectivamente. (A) Controle; (B) Controle de morte; (C) 30 ° C durante 24 h, (D) 30 ° C durante 48 h, (E) 37 ° C durante 6 h, (F) 40 ° C durante 2 h e (G) 42 ° C por 2 h. As imagens foram analisadas usando o programa ImageJ medindo a fluorescência / área e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média de quatro experimentos independentes em triplicata. **, ***, **** Significativamente diferente do controle em p <0,01; p <0,001; p <0,0001, respectivamente.

Apesar dos mecanismos de envelhecimento não serem completamente conhecidos, sabe-se que a indução desse processo está relacionada a integridade da mitocôndria e a eficiência dos sistemas antioxidantes. A exposição de plantas a altas temperaturas e umidade resulta no aumento dos níveis de H₂O₂, lipoperoxidação, fragmentação do DNA e queda da viabilidade e, inibição da respiração em soja, girassol e aveia respectivamente (PARRISH; LEOPOLD, 1978; KIBINZA *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2015). Estes efeitos foram observados no presente estudo e são similares aos processos de envelhecimento.

FIGURA 10. EFEITOS DO ESTRESS PELO CALOR SOBRE A RESPIRAÇÃO DE CULTURAS DE *A. angustifolia*



FONTE: O autor (2018).

NOTA: A respiração celular foi determinada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) como descrito no item 5.6 da seção de Material e Métodos. As adições foram feitas consecutivamente: M+G (malato + glutamato), FCCP, SHAM e AA. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. A análise foi feita dentro de cada adição, basal, M+G, FCCP, SHAM e AA, comparando os tratamentos por temperatura, utilizando ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey.**a**Valores significativamente diferentes do controle de 25 ° C (condição de cultivo); **b** valores significativamente diferentes de 30 ° C 24 h; **c** valores significativamente diferentes de 30 ° C 48 h; **d** valores significativamente diferentes de 37 ° C 6 h, **e** valores equivalentes significativamente diferentes de 42 ° C 2 h.

6.2.2 Efeito do estresse pelo calor na atividade de enzimas de reparo do DNA em extrato celular.

Sabe-se que as mitocôndrias são particularmente expostas a altos níveis de ROS por serem geradoras destas espécies. Por sua vez, elevados níveis de ROS, em resposta a condições de estresse, por exemplo, podem causar danos a proteínas, lipídeos e DNA. Danos ao DNA, se não reparados, podem levar mutações permanentes que podem comprometer o desenvolvimento vegetal (MOLLER *et al.*, 2007).

Para a avaliação dos efeitos do estresse por alta temperatura sobre o sistema de reparo de DNA nas células de *A. angustifolia*, neste estudo avaliou-se a via BER, que em mamíferos tem suas enzimas localizadas no núcleo e mitocôndrias (JEPPESEN *et al.*, 2011). Apesar do sistema de reparo tipo BER vegetal ainda ser pouco estudado, sabe-se que guarda similaridades com o sistema animal, sendo que a grande maioria das enzimas homólogas foi descrita em algumas espécies vegetais como *Saccharum officinarum*, *Arabidopsis thaliana* e *Triticum aestivum* (SCORTECCI *et al.*, 2007; CORDOBA-CANERO *et al.*, 2014; JOLDYBAYEVA *et al.*, 2014). Para Arabidopsis já foram descritas algumas das enzimas do sistema BER

mitocondrial (BOESCH *et al.*, 2009). Porém, não foram encontrados relatos desse tipo de estudo para mitocôndrias de gimnospermas (KIMURA *et al.*, 2002; BALESTRAZZI *et al.*, 2011; JOLDYBAYEVA *et al.*, 2014).

Neste estudo, inicialmente foi determinada a atividade das AP endonucleases, enzimas do sistema BER, em duas frações celulares, a primeira fração contendo proteínas solúveis (Fração sobrenadante ou S), incluindo fragmentos de núcleos e, a segunda fração, contendo enzimas ligadas à membrana celular e compartimentos (Fração pellet ou P), incluindo mitocôndrias e plastídeos. A atividade destas enzimas foi determinada usando um oligonucleótido duplex contendo tetrahidrofurano (THF) na posição abásica TABELA 2, conforme descrito na seção de materiais e métodos item 5.17.

TABELA 2. OLIGONUCLEOTIDEOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE REPARO DE DNA

Oligonucleotideos	Sequência
dU	5' ATA TAC CGC G ${f U}$ C CGG CCG ATC AAG CTT ATT 3' 3'TAT ATG GCG CGG GCC GGC TAG TTC GAA TAA 5'
5-OHC em bolha	5' GCT TAG CTT GGA ATC GTA TC <u>A TGT A5A CTC G</u> TG TGC CGT GTA GAC CGT GCC 3' 3' GGC ACG GTC TAC ACG GCA <u>CAA ACA GCC CAC G</u> GA TAC GAT TCC AAG CTA AGC 5'
THF	5'ATA TAC CGC GG F CGG CCG ATC AAG CTT ATT 3' 3'TAT ATG GCG CCG GCC GGC TAG TTC GAA TAA 5'

Bases modificadas são mostradas em negrito: U - deoxiuracila (dU); 5- 5-OH-citosina (5-OHC); F - tetrahidrofurano; Bases sublinhadas não são pareadas.

Observa-se na FIGURA 11 que a atividade da AP endonuclease, medida in vitro, foi discretamente inibida em 30-37 °C na fração P, enquanto que no estresse a 42°C por 2h esta inibição foi mais pronunciada em ambas as frações (Frações S e P). Nesta última condição, a inativação térmica da enzima deve ser considerada. No entanto, não se pode descartar a participação de ROS. Neste contexto, sabe-se que os níveis de ROS aumentam em condições de estresse (Møller et al., 2007), e uma vez que nas mitocôndrias há uma concentração destas espécies, pode-se sugerir que tanto a inibição da AP endonuclease, como a significativa inibição da respiração observadas após a exposição das células a 42°C por 2h (FIGURA 10 e FIGURA 11), podem relacionar-se aos efeitos deletérios destas espécies reativas.

FIGURA 11. EFEITO DO ESTRESSE pelo CALOR NA ATIVIDADE DE AP ENDONUCLEASES IN VITRO EM EXTRATOS DE CULTURA DE A. angustifolia



FONTE: O autor (2018).

NOTA: A atividade enzimática foi determinada utilizando oligonucleotideos duplex contendo tetrahidrofurano para mimetizar o sítio abásico como mostrado na TABELA 2. A reação enzimática da AP endonuclease foi realizada in vitro por um ensaio de incisão de base como descrito no item 5.17 da seção de Material e Métodos. Os resultados, normalizados em relação ao controle, estão apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. Os asteriscos representam diferenças estatísticas dentro dos mesmos tratamentos de temperatura entre as duas frações celulares (pellets e sobrenadante) ao nível de p < 0,05 (*) e p < 0,0001 (****).;**a** valores significativamente diferentes do controle; **b** valores significativamente diferentes de 30 ° C 24h; **c** valores significativamente diferentes de 42 ° C 2h. A atividade da endonuclease AP foi normalizada em relação aos valores do controle. A atividade do controle corresponde a 372 ± 126 fmol de formação de produto min⁻¹mg⁻¹ e do sobrenadante a 543 ± 185 fmol de formação de produto min⁻¹mg⁻¹ para sobrenadante e fração de precipitado, respectivamente. Sobrenadante: fração contendo proteínas solúveis; Precipitado: fração contendo proteínas anexadas à membrana.

6.2.3 Efeito do estresse pelo calor na atividade de enzimas de reparo do DNA em mitocôndrias isoladas

Como mencionado, uma vez que as mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS, seu DNA é constantemente exposto a esses agentes genotóxicos, o que gera um grande número de lesões, como bases oxidadas, sítios abásicos e quebra de fita simples ou duplas. Se estas lesões não forem reparadas podem levar a mutações permanentes, deletérias para as células.

No presente estudo foram investigadas as duas primeiras etapas da via BER: o reconhecimento de lesão (incluindo remoção de bases) e, processamento de sitio abásico (AP), também denominado de sítio AP. O reconhecimento e / ou clivagem de diferentes tipos de

lesões é feito por glicosilases específicas e o processamento do sítio AP é realizado por AP endonucleases (JEPPESEN *et al.*, 2011).

Para avaliar o sistema de reparo mitocondrial do tipo BER em mitocôndrias de *A. angustifolia*, estas organelas foram isoladas e purificadas das culturas embriogênicas e, oligonucleotídeos com diferentes tipos de lesões (TABELA 2) foram utilizados para monitorar três enzimas da via BER, uracil e NEIL glicosilases e AP endonuclease. Visto que esse tipo de ensaio ainda é pouco descrito na literatura, o primeiro passo foi otimizar suas condições, em relação a concentração de MgCl₂ - uma vez que esse íon é geralmente requerido para catálise -, bem como a concentração de proteína (duas primeiras colunas na FIGURA 12A). A quantidade de proteína precisa ser otimizada porque existem muitas endonucleases e exonucleases, nas células e nas mitocôndrias, que podem remover o substrato sintético (oliogonucleotídeo utilizados no ensaio, substratos específicos de cada enzima) antes que a enzima de reparo tenha a chance de atuar, o que subestimaria os valores da atividade enzimática.

As concentrações ótimas de proteína e MgCl₂ para AP endonuclease, uracil glicosilase e NEIL glicosilase estão mostradas na FIGURA 12A, colunas 1 e 2, sendo: uracil glicosilase (13% de atividade de incisão) com 2,5 µg de proteína e 5 mM de MgCl₂; para NEIL glicosilase (20% de atividade de incisão) com 4 µg de proteína e 4 mM de MgCl₂; e para a AP endonuclease (24 % do substrato foi clivado) utilizando 1 µg de proteína com 10 mM de MgCl₂ (FIGURA 12B). Após esta padronização, estas condições foram então utilizadas nos ensaios de variação de temperatura (FIGURA 12A, coluna 3 e FIGURA 13).

O efeito do tratamento por alta temperatura em mitocôndrias isoladas foi avaliado de duas maneiras: (1) com variação na temperatura do ensaio de atividade (20, 25, 30, 37 e 40 °C) (FIGURA 4, coluna 3); (2) as mitocôndrias foram pré-incubadas durante 30 min a 20, 25, 30, 37 e 40 °C e posteriormente incubadas a 25 °C para o monitoramento da atividade enzimática, utilizando concentrações ótimas de MgCl₂ e proteína como especificado na FIGURA 12B.

Todas as três enzimas da via BER em mitocôndrias isoladas tiveram uma temperatura ótima de 30 °C para o ensaio (FIGURA 12A, coluna 3). A atividade a 42 °C foi semelhante ou inferior à atividade a 20 °C. Por outro lado, o pré-tratamento por alta temperatura afetou diferencialmente as enzimas. A atividade da AP endonuclease, determinada a 25 °C, não foi afetada pelas condições de pré-tratamento testadas. A atividade de NEIL glicosilase, medida a 25 °C, foi constante após o pré-tratamento a 20-37 °C, mas diminuiu acentuadamente após o pré-tratamento a 42 °C. Finalmente, a atividade da uracil glicosilase diminuiu após todos os

pré-tratamentos acima dos 25 °C e a atividade a 40 ° C foi drasticamente inibida (20% do controle) (FIGURA 13).

O pré-tratamento das mitocôndrias isoladas em diferentes temperaturas (FIGURA 13) teve como objetivo avaliar a estabilidade térmica das três enzimas de reparo do DNA, cujas atividades foram determinadas em ensaios realizados a 25 °C (FIGURA 12). Nestes ensaios, as mitocôndrias foram incubadas na ausência de substratos oxidáveis, portanto, admite-se que não ocorreu a respiração, como também a produção de ROS durante a incubação (MØLLER 2001). A atividade da AP endonuclease não foi afetada em todas as temperaturas de pré-tratamento (FIGURA 13), portanto, sugere-se que é termicamente estável, indicando que a inibição da atividade de endonuclease AP observada após o pré-tratamento das células intactas (FIGURA 11) foi causada por fatores diferentes da inativação térmica da enzima. As outras duas enzimas de reparo do DNA mitocondrial apresentaram menor estabilidade térmica. A atividade de NEIL glicosilase foi estável até 37°C e depois inibida a 40 °C, e a atividade de uracil glicosilase diminuiu continuamente com o aumento da temperatura (FIGURA 13). Esta inativação térmica das enzimas de reparo do DNA mitocondrial pode ter levado ao acúmulo de danos no DNA nas células intactas e, assim, contribuir para a redução da viabilidade celular. É importante ressaltar que, embora isto não tenha sido observado no presente estudo, não descarta sua ocorrência em outras escalas de tempo não avaliadas aqui. Neste contexto, sabe-se que tratamentos por altas temperaturas podem levar à inativação de muitos processos de reparo celular, incluindo o reparo do DNA (DIKOMEY et al., 1987; FANTINI et al., 2013; KANTIDZE et al., 2016).

Embora o genoma completo da *A. angustifolia* não tenha sido sequenciado, análises proteômicas (DOS SANTOS *et al.*, 2016) e transcriptômicas (ELBL *et al.*, 2015) identificaram mais de 200 correspondências para enzimas de reparo de DNA de todos os tipos, incluindo glicosilases de DNA, AP endonucleases e DNA polimerases. No presente estudo foram evidenciadas atividades correspondentes às duas primeiras etapas da via BER nas mitocôndrias de Araucária. Assim, é provável que toda a via BER esteja presente, como descrito em mitocôndrias de batata [submetido para publicação - (FERRANDO *et al.*, 2017)].

A via BER é importante para a célula superar condições de estresse (BALESTRAZZI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012). Neste sentido, Chen e colaboradores (2012) demonstraram que mutantes de Arabidopsis, que super expressaram a glicosilase bifuncional / AP liase (AtOGG1), uma enzima de reparação para danos do tipo 7,8-dihidro-8-oxoguanina (80xoG), apresentaram maior resistência ao estresse osmótico e de alta temperatura (CHEN *et al.*, 2012).

Em mamíferos, a causa do processo de envelhecimento tem sido associada principalmente a acumulação de dano oxidativo a proteínas e DNA mitocondriais (LARSSON, 2010; KAUPPILA *et al.*, 2017). Para as plantas, ainda há muito a ser esclarecido. Vários tipos de agentes de estresse celulares endógenos e exógenos foram capazes de promover a senescência celular e o envelhecimento de muitas espécies (MILLER; SADEH, 2014; SANCHES SILVEIRA; MYAKI PEDROSO, 2014). A exposição das plantas a altas temperaturas, por exemplo, leva à diminuição da viabilidade e à inibição da respiração, como observado nesse e em outros estudos (PARRISH; LEOPOLD, 1978; KIBINZA *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2015). Portanto, é possível que, em *A. angustifolia*, as consequências do estresse por alta temperatura também possam estar associadas aos processos de envelhecimento, uma possibilidade interessante a ser explorada em estudos futuros.



В

Condições ótimas para o ensaio da AP endonuclease, uracil glicosilase e NEIL glicosilase

Oligonucleotideo	Enzima	Proteina (µg)	MgCl₂ (mM)	Formação produto (%)	Tempo reação (min)	Temperatura (°C)
dU	dU glicosilase	2.5	5	13	30	25
5-OHC bubble	NEIL glicosilase	4	4	20	90	25
THF	AP1	1	10	24	30	25

FONTE: O autor (2018).

NOTA: O sistema BER no extrato mitocondrial de *A. angustifolia* foi avaliado utilizando oligonucleotideos dúplex contendo diferentes lesões como indicado na TABELA 3. A reação enzimática de cada enzima foi determinada in vitro como descrito no item 5.18 da seção de Material e Métodos. **A.** Quantificação da via mitocondrial BER de endonuclease AP, uracil glicosilase e NEIL glicosilase (linha 1, 2 e 3, respectivamente) em resposta à variação da concentração de MgCl₂, a quantidade de proteína e a temperatura (colunas 1, 2 e 3, respectivamente). Os parâmetros fixos (MgCl₂, proteína ou temperatura) para cada curva foram como indicado no painel B. **B.** Condições ideais para ensaios de endonuclease AP, uracil glicosilase e NEIL glicosilase e NEIL glicosilase. Os valores representam a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata.

Apesar das causas do processo de envelhecimento nos vegetais não serem um consenso, parece estar relacionado ao desbalanço redox e ao aumento de danos oxidativos como a lipoperoxidação, fragmentação do DNA e redução da viabilidade celular (PARRISH; LEOPOLD, 1978; KIBINZA *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2015). Para algumas espécies já foi descrito o comprometimento da integridade estrutural e funcional das mitocôndrias, como observado após a exposição a variações de temperatura no presente estudo.

FIGURA 13. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE IN VITRO DE ENZIMAS DA VIA DE REPARAÇÃO DE EXCISÃO BASE (BER) EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE CULTURA DE A. angustifolia



FONTE: O autor (2018).

O sistema BER no extrato mitocondrial de *A. angustifolia* foi avaliado utilizando oligonucleotídeos dúplex contendo diferentes lesões como indicado na TABELA 2. A reação enzimática de cada enzima foi determinada in vitro como descrito no item 5.18 da seção de Material e Métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata.

6.2.4 Conclusão

A partir dos resultados é possível concluir que as células de *A. angustifolia* cultivadas a 25 ° C possuem diferentes sensibilidades à temperatura. Entre 25 e 37 ° C, parece haver uma modulação da respiração celular entre as temperaturas intermediárias (30° C - 37° C, não significativo), sendo a temperatura de 42°C altamente danosa, não havendo respiração nessas

condições. Quanto a atividade das enzimas do sistema BER mitocondriais avaliadas, uma maior atividade foi observada a 30°C. No pré-tratamento por temperatura (20 - 40°C) a AP endonuclease foi a mais resistente pois não teve sua atividade alterada. Por outro lado, a dU glicosilase foi a mais sensível, apresentando queda da atividade com o aumento da temperatura, enquanto que a NIEL só apresentou queda da atividade a 40 °C. Assim, podemos concluir que temperaturas de 40 ou 42 ° C representam condições extremas para estas células, reduzindo sua viabilidade, respiração celular e atividade das enzimas de reparo da via BER de forma pronunciada. A partir destes resultados, pode-se sugerir que a *A. angustifolia* é uma espécie vulnerável ao aumento de temperatura associado ao fenômeno de aquecimento global.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE LINHAGENS DE A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO

6.3.1 Morfologia das linhagens SE1 e SE6

A análise morfológica das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) (FIGURA 14), mostrou que ambas as linhagens apresentam características morfológicas macro e microscópicas de culturas embriogênicas. Microscopicamente, as células apresentam reatividade à coloração com carmim acético e azul de Evans (JO *et al.*, 2014). Possuem células embriogênicas e suspensoras, organizadas em agregados denominados como massas pró embriogênicas (PEM) (FILONOVA *et al.*, 2000). As PEM apresentam no centro as células embrionárias, coradas em vermelho e, nas extremidades, as células suspensoras coradas em azul. Macroscopicamente, apresentam-se na forma de calo, massa de células de coloração branco-translucida e com aspecto mucilaginoso (FIGURA 14).

FIGURA 14. MORFOLOGIA DAS LINHAGENS DE A. angustifolia RESPONSIVA (SE1) E NÃO RESPONSIVA (SE1) A FATORES DE MATURAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Imagem macroscópica, a. linhagen SE1; b. linhagem SE6 das células controle de *A. angustifolia* (15 dias de cultura - 25 ± 1 °C).

6.3.2 Sistema antioxidante enzimático

Estudos prévios mostraram que durante a fase de proliferação, a linhagem SE1 apresenta níveis mais elevados de ROS em relação a SE6 (JO *et al.*, 2014). Sabendo da importância das espécies reativas de oxigênio em vias de sinalização de diferentes processos

celulares, entre estes o desenvolvimento embrionário (CHENG *et al.*, 2015), no presente estudo buscou-se avaliar o sistema antioxidante nestas linhagens, através da determinação da atividade de algumas enzimas antioxidantes. Foram avaliadas quatro enzimas pertencentes ao ciclo do Ascorbato-Glutationa, a APX (EC 1.11.1.11), DHAR (EC 1.8.5.1), MDHAR (EC 1.6.5.4) e GR (EC 1.6.4.2) e, a POD (EC 1.11.1.7). Estas enzimas são responsáveis pela eliminação do H_2O_2 e, portanto, mantém controlados os níveis celulares desta ROS.

Os resultados da TABELA 3 mostram que atividade da APX foi semelhante nas duas linhagens. As atividades das enzimas GR, MDHAR e POD foram maiores na linhagem SE1. Observa-se que para GR e MDHAR este aumento foi de ~ 2x, enquanto que para POD foi de ~1x. Somente a enzima DHAR foi mais ativa na linhagem SE6 (~ 9 x em relação a SE1) (TABELA 3).

		,	
ENZIMA	SE1	SE6	-
GR ^a	$6,2 \pm 0,8*$	3,1 ± 0,7	-
MDHAR ^b	$5,7 \pm 0,6*$	$3,5 \pm 0,1$	
DHAR °	0,3 ± 0,1 *	$2,6 \pm 0,9$	
APx ^d	$244,2\pm59$	$235,2 \pm 44$	
POD ^e	122,8 ± 11 *	97 ± 9	

TABELA 3. ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE CULTURAS DE *A. angustifolia* RESPONSIVA (SE1) E NÃO RESPONSIVA (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO

FONTE: O autor (2018)

NOTA: A extração das enzimas foi realizada através da maceração das células utilizando nitrogênio líquido em almofariz de porcelana, utilizando respectivo tampão para cada enzima, conforme descrito no item 5.13 da seção Material e Métodos. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. * indica diferença estatística entre as duas linhagens com P > 0,05; Os resultados estão apresentados como: **a**: nmol de NADPH oxidado por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína; **b**: nmol de NADH oxidado por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína; **c**: µmol de ascorbato oxidado min⁻¹ mg⁻¹ de proteína; **d** nmol de ascorbato oxidado por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína; **e**: mU/ml.

Esses resultados sugerem que a linhagem SE1 (responsiva), em comparação a SE6 (não responsiva), apresenta uma maior proteção contra ROS, particularmente contra o H₂O₂. De fato, em estudo realizado por (Kaziuk, comunicação pessoal) demonstrou-se que os níveis de H₂O₂ estão aumentados em SE6, em torno de 55%, em relação a SE1. Por outro lado, estes resultados poderiam parecer contraditórios aos de JO et al. (2014), que demonstraram níveis maiores de ROS para SE1 durante a fase de proliferação. Porém, para esta determinação os autores utilizaram a sonda 2',7'-dichlorodihidrofluoresceina diacetato (H₂DCFDA), não específica para H₂O₂, e abrangente para ROS e RNS, enquanto que no estudo de KAZIUK (2017), o método utilizado foi específico para o H₂O₂. É importante também considerar que
KAZIUK (2017) realizou estes ensaios com as células durante o estágio de proliferação, como no presente estudo. Curiosamente, ensaios preliminares utilizando a mesma sonda (H₂DCFDA), mostraram que os níveis de ROS total são maiores na linhagen SE1 (Kaziuk, comunicação pessoal). Ainda neste contexto, o aumento específico do H₂O₂ observado por Kaziuk (2017) pode ser devido a menor atividade, na linhagem SE6, das enzimas antioxidantes (GR, MDHR e POD), considerando que GR e MDHR - que participam do Ciclo Glutationa/Ascorbato -, e a POD são as principais enzimas responsáveis pela eliminação do H₂O₂ no sistema celular. O estímulo destas enzimas (TABELA 3) está de acordo com os resultados descritos por em análises de transcriptoma e proteomica das mesmas linhagens, Elbl et al. (2015) evidenciaram a maior expressão de transcritos de genes ortólogos (GOs) na categoria resposta ao estresse e DOS SANTOS *et al.* (2016) maior abundancia de proteína na categoria resposta a ROS, ambos para SE1 em comparação as linhagens SE6.

Sabe-se que, de uma forma geral, níveis elevados de ROS em células responsivas a maturação, podem relacionar-se a capacidade proliferativa destas células. Deve-se considerar que além do H₂O₂, outros sinalizadores como o NO[•] são importantes no processo de diferenciação celular (WIMALASEKERA et al., 2011; RODRIGUEZ-SERRANO et al., 2012; HUANG et al., 2014). A disponibilidade de NO' durante a embriogênese somática do milho foi demonstrada por HUANG et al. (2014). Os autores sugeriram que níveis aumentados de NO[•] ativariam a via cascata MAPK, que por sua vez levam ao burst oxidativo e indução da morte celular programada, resultando no desenvolvimento do embrião no milho. A morte celular programada quando ocorre de uma forma controlada leva a eliminação seletiva das células suspensoras do embrião, favorecendo o processo de embriogênese somática (HUANG et al., 2014). Indícios da participação do NO[•] nesse processo foram descritos para as culturas de Araucária. Nesse contexto, SILVEIRA et al. (2006) demonstraram que a incubação com poliaminas causou um aumento nos níveis de NO[•], favorecendo o desenvolvimento de embriões polares. Assim, não se pode descartar a possibilidade de que ambos, H₂O₂ e NO[•] atuem como sinalizadores nessas culturas e que níveis elevados de H2O2 não indicam necessariamente maior responsividade a maturação da linhagem. Ao que tudo indica, outras moléculas reativas de oxigênio ou nitrogênio seriam sinalizadores mais importantes do que o peróxido de hidrogênio nas culturas Araucária. Nesse sentido, a geração de embriões globulares em Araucária utilizando meio semissólido foi favorecida pela suplementação com GSH (5 mM). Os autores discutem que nessas condições a GSH, levaria ao aumento gradual de liberação NO[•], via decomposição do S-nitrosoglutationa, chegando até 66% maior em relação a cultura não

suplementada, esse aumento ocorre principalmente no ápice do embrião favorecendo o desenvolvimento mais eficiente nesse estágio, em relação a cultura sem a suplementação com GSH (VIEIRA *et al.*, 2012).

Por outro lado, níveis elevados de ROS podem induzir processos de morte celular (GILL; TUTEJA, 2010). No entanto, observou-se que os níveis mais elevados de H₂O₂ nas células SE6 não afetaram sua viabilidade (Kaziuk, 2018).

Uma das principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio e outras moléculas reativas é a mitocôndria. A mitocôndria tem uma série de mecanismos capazes de manter baixa produção dessas moléculas reativas, especialmente ROS. Isso ocorre principalmente através da ativação de três enzimas localizadas na cadeia transportadora de elétrons: a oxidase alternativa (AOX), a proteína desacopladora de planta UCPs e as NAD(P)H desidrogenases alternativas internas e externas (NDs), que além de participarem da fosforilação oxidativa, também ajudam a manter o balanço redox celular. Essas enzimas trabalham de forma a evitar o aumento da produção de ROS a partir de elétrons desviados da cadeia respiratória, (MOLLER, 2001; MOLLER *et al.*, 2007).

6.3.3 Respiração Celular

Os ensaios de respiração (TABELA 4) mostram que o fluxo de oxigênio é maior na linhagem SE6 em comparação com a linhagem SE1. É importante ressaltar que os resultados correspondem somente a respiração mitocondrial, pois foi descontado o valor correspondente ao fluxo de oxigênio residual (após a adição de Antimicina A), relacionado à atividade de enzimas não ligadas à cadeia respiratória, como peroxidases e oxidases (GNAIGER, 2016).

Nestes experimentos, a linhagem SE 6 mostrou-se mais ativa, ou seja, apresentou maiores valores de fluxo de oxigênio, para a maioria das condições avaliadas. A respiração foi maior (em ~30%), na linhagem SE 6 após a adição de glutamato/malato e do desacoplador FCCP. Por sua vez, para a AOX, o fluxo de oxigênio também foi maior, em ~ 54 %, em relação a SE1. Neste contexto, sabe-se que a via da AOX tem um importante papel antioxidante em plantas (MOLLER, 2001), assim sua atividade maior nessa linhagem pode ser uma resposta aos maiores níveis H₂O₂ (Kaziuki, F., 2017). A via da AOX, também denominada de via alternativa, utiliza elétrons provenientes do complexo I, complexo II e NAD(P)H alternativas para a redução do oxigênio a H₂O. Assim, seu estímulo pode estar relacionado aos maiores fluxos de oxigênio após adição de malato/glutamato, cuja oxidação fornece NADH para o complexo I e para NADH desidrogenases alternativas internas.

Quando as duas vias envolvidas na respiração mitocondrial em vegetais - a dependente do citocromo c e a via da AOX - estão simultaneamente ativas, há um maior consumo de oxigênio pelas células, uma vez que duas vias de redução do oxigênio estão atuando. Isso parece acontecer na linhagem SE6 (TABELA 4). Por outro lado, curiosamente, na linhagem SE 1 o único estado mais ativo em relação a SE6 foi o basal, observando-se um aumento da respiração em ~ 30 %.

RESPIRAÇÃO CELULAR - CULTURAS SE1 E SE6 O2 pmol / (min*mg de peso fresco)			
SE1	SE6		
Média ± SEM	Média ± SEM		
16,6 ± 1*	11,6±1		
23,7 ± 3*	34 ± 3		
37,7 ± 3*	54,4±7		
$21,5 \pm 1$	$18,6 \pm 2$		
16,2 ± 7**	35,7 ± 2		
	D CELULAR - CULTURAS S mol / (min*mg de peso fresco) SE1 Média \pm SEM $16,6 \pm 1*$ $23,7 \pm 3*$ $37,7 \pm 3*$ $21,5 \pm 1$ $16,2 \pm 7**$		

TABELA 4. RESPIRAÇÃO CULTURAS EMBRIOGÊNICAS A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO

FONTE: O autor (2018).

NOTA: Na Tabela estão apresentados os resultados da respiração das células *A. angustifolia* determinadas a partir do monitoramento do fluxo de oxigênio em oxígrafo de alta resolução, como descrito no item 5.6 da seção Material e Métodos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. * P < 0,05 ou *** P <0,002 vs.

A respiração no estado basal é decorrente da oxidação de substratos endógenos, uma vez que nenhuma adição de substratos é realizada. Neste caso, pode-se sugerir que para SE1, a disponibilidade e/ou a utilização destes substratos para obtenção de energia é mais significativa em relação a SE6. Navarro et al. (2017), demonstraram que o metabolismo de carboidratos é importante para a responsividade zigótica e somática durante o processo de embriogênese em Araucárias. Assim, não se pode descartar que esta via metabólica estaria mais ativa nestas células, sustentando o fornecimento de equivalentes redutores durante o estado basal da respiração (NAVARRO *et al.*, 2017).

Considerando a diferença nas velocidades respiratórias entre as células SE1 e SE6 (TABELA 4), observadas neste estudo e, ainda, o conhecimento de que o número de mitocôndrias pode ser alterado durante processos de germinação (LIBERATORE et al., 2016), foram determinadas a massa e a respiração mitocondrial destas células, sendo os resultados apresentados a seguir.

6.3.4 Massa e Respiração Mitocondrial

A avaliação da densidade mitocondrial nas linhagens SE1 e SE6 foi determinada a partir das imagens obtidas em microscópio confocal, utilizando a sonda MitoTracker® Green FM, para marcação das mitocôndrias, seguindo a metodologia do fabricante e Hoeschst 33258 para marcação do núcleo (MEADOWS; POTRYKUS, 1981). Os resultados da FIGURA 15 mostram que não há diferença na densidade mitocondrial entre as linhagens.

O Mitotracker® Green FM é uma sonda capaz de marcar em células viáveis a localização mitocondrial sem diferenciação do potencial de membrana, $\Delta\Psi$ m, não sendo necessária a fixação das amostras (AGNELLO *et al.*, 2008). A sonda torna-se fluorescente no ambiente lipídico das membranas mitocondriais, ao reagir com grupos tiol de resíduos de cisteína de proteínas para formar um conjugado estável tioéter, fluorescente, que é retido na organela. Portanto, está sonda é usada para localização mitocondrial e detecção da densidade / massa mitocondrial total (PRESLEY *et al.*, 2003). No entanto, não é possível a análise de ultraestrutura, massa ou volume individual da mitocôndria, por isso o uso desta sonda limita-se a localização mitocondrial e detecção da densidade / massa mitocondrial e detecção da densidade / massa mitocondrial e detecção da densidade massa mitocondrial total. Sabendo que o estado redox celular influencia no estado redox dos resíduos de cisteína de proteínas e, desta forma, possivelmente na ligação do Mitotracker, foram realizadas também análises por microscopia eletrônica de transmissão nas culturas SE1 e SE6.

Estes ensaios foram realizados em parceria com a Prof.^a Lucélia Donatti do Departamento de Biologia Celular da UFPR. As imagens da FIGURA 16 o maior número de mitocôndrias em células da linhagen SE6, no entanto, a média de volume mitocondrial e a eletrodensidade foram maior para a linhagem SE1.

FIGURA 15. MASSA MITOCONDRIAL DE CULTURAS DE *A. angustifolia* RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: A massa mitocondrial foi determinada por microscopia confocal, utilizando MitoTracker® Green FM e Hoechst 33258 como marcadores de mitocôndrias e núcleos, respectivamente, como descrito no item 5.14 da seção Materiais e Métodos. Nas microscopias representativas observam-se mitocôndrias em verde (MitoTracker® Green FM) e núcleos em azul (Hoechst 33258). A intensidade de fluorescência das imagens foi avaliada pelo programa NIS-Elements Viewes (NIKON). No gráfico estão apresentadas as intensidades de fluorescência como média \pm erro padrão da média. Os dados são representativos de dois experimentos independentes em quintuplicata. * P < 0.05 vs. Controle. SE1 e SE6, células de *A. angustifolia* responsivas e não responsivas a fatores de maturação, respectivamente.

O papel da mitocôndria no desenvolvimento vegetal está ligado principalmente a regulação do metabolismo e da indução da morte celular programada. A literatura descreve que danos mitocondriais estão ligados a deficiências no desenvolvimento, infertilidade floral e mudanças na morfologia (LIBERATORE *et al.*, 2016). Processos de germinação de sementes, amadurecimento do fruto ou desenvolvimento do pólen exigem altos níveis respiratórios (LIBERATORE *et al.*, 2016). Sabe-se que durante a gametogênese, por exemplo, ou durante a indução da maturação para culturas in vitro, ocorre o aumento dos níveis de expressão gênica mitocondrial e dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, sendo que este último pode ocorrer de forma independente ao aumento do número de mitocôndrias (EHRENSHAFT; BRAMBL, 1990; SMART *et al.*, 1994; DUKOWIC-SCHULZE *et al.*, 2014; LIBERATORE *et al.*, 2016). Porém, não existem relatos a respeito de culturas no estágio de proliferação, como é o caso das culturas utilizadas neste estudo.

FIGURA 16. MICROSCOPIA ELETRONICA DE MITOCONDRIAS DE CULTURAS DE A. angustifolia RESPONSIVA (SE1) E NÃO RESPONSIVA (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO



Linhagem	Média de volume mitocondrial	Densidade	Eletrodensidade mitocondrial
	(µm ³)	(número de mito / µm ³ de tecido)	(RawIntDen / área mito)
SE 1	$0,43 \pm 0,14$ ****	$0,44 \pm 0,15$ ****	7,68 x $10^7 \pm 1,42$ x 10^{7****}
SE 6	0,31 ± 0,11	$0,83 \pm 0,2$	$1,05 \ge 10^8 \pm 1,34 \ge 10^7$

RawIntDen = soma dos valores de pixels

FONTE: O autor (2018).

NOTA: As micrografías foram obtidas a partir das células de *A. angustifolia* (15 dias de cultura) em microscópio eletrônico como descrito no item 5.15 da seção de Material e Métodos. **a.** mitocôndrias das células SE1; **b.** mitocôndrias das células SE1 próximas a parede. celular **c.** mitocôndrias das células SE6; **d.** mitocôndrias das células SE1 próximas a parede celular. Tabela com as análises estatísticas das imagens. Para cada grupo foi utilizado um n=12 imagens com pelo menos uma mitocôndria em cada imagem. * P < 0.0001 SE1 vs SE6, células de *A. angustifolia* responsivas e não responsivas a fatores de maturação, respectivamente.

Para avaliar os parâmetros fisiológicos durante o processo de proliferação das duas linhagens foram realizados os ensaios de respiração. As mitocôndrias foram isoladas das células SE1 e SE6 (MARIANO *et al.*, 2008) e o fluxo de oxigênio determinado em oxígrafo de alta resolução, durante o estado 3 (em presença de ADP), e estado 4 (após o consumo de ADP - síntese de ATP) da respiração.

Em acordo com os resultados em células TABELA 4 e FIGURA 17, os resultados em mitocôndrias isoladas (FIGURA 17), também mostram que a respiração é maior para a linhagen SE6 (~ 50 %) em comparação com a linhagem SE1, nos estados 3 e 4. Observa-se uma velocidade respiratória de 103 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ e 147 nmol de O₂ nmol.min⁻¹.mg⁻¹ para o estado 3 e, de 36 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ e 80 nmol.min⁻¹.mg⁻¹, para o estado 4, para as linhagens SE6 e SE1, respectivamente. Este resultado também reforça que a AOX está mais ativa nas células SE6.

Frente às diferenças observadas nos resultados da respiração e massa (eletrodensidade) mitocondriais (TABELA 4 e FIGURA 16), pode-se sugerir que haja uma diferença na atividade e/ou expressão de proteínas dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória entre as linhagens. Neste contexto, JO *et al.* (2014), demonstraram maior abundância expressão da subunidade beta da ATPase em linhagens SE1 e subunidade F da NADH desidrogenasse (complexo I) em linhagens SE6, sugerindo que a atividade mitocondrial é importante para o desenvolvimento dessas culturas e, é diferentemente organizada entre as linhagens. Adicionalmente, um estudo de proteômica mostra que na linhagem SE1 (responsiva) ocorre uma maior abundância de enzimas como a aldolase, piruvato quinase e fosfoenolpiruvato carboxilase, enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, sugerindo que há uma diferença metabólica entre as duas linhagens (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

FIGURA 17. RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL DE CULTURAS DE A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: O fluxo de oxigênio foi determinado em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria), utilizando mitocôndrias isoladas sob condições experimentais descritas no item 5.8 da seção Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão de cinco experimentos

independentes em duplicata. * P < 0.05 ou **P < 0,001 vs. controle. SE1 e SE6, células de *A. angustifolia* responsivas e não responsivas a fatores de maturação, respectivamente.

Por outro lado, o maior consumo de oxigênio no estágio basal na respiração, observado para a linhagem SE1 (Responsiva), sugere que nestas células os níveis de substratos endógenos são maiores, o que poderia, in vivo, resultar em maior atividade da cadeia respiratória e, consequentemente, em maior síntese de ATP. Ainda, é importante ressaltar que a eletrodensidade e volume das mitocôndrias também são maiores nestas células (TABELA 4). Neste contexto, sabe-se que a massa mitocondrial é maior em tecidos com maior demanda energética ou tecidos em desenvolvimento, pois, nessas condições a respiração mitocondrial é mais intensa. Um aumento de cerca de três vezes no número de mitocôndrias, acompanhado do incremento das velocidades respiratórias foram observados em tecidos meristemáticos de raiz (LIBERATORE *et al.*, 2016). Em análise de transcripitoma de milho e *Arabidopsis*, também se demonstrou que durante o processo de meiose ocorre uma maior expressão de enzimas da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (DUKOWIC-SCHULZE *et al.*, 2014).

6.3.5 Níveis de ATP e NADP(H)

Para avaliar se as diferenças observadas na respiração celular e mitocondrial (TABELA 4 e FIGURA 17) poderiam resultar em diferentes níveis de ATP e NADP(H), foram realizados ensaios para determinar seus níveis nas células SE1 e SE6. Observa-se na FIGURA 18, que não há diferença estatística nos níveis de ATP entre as linhagens. Já os níveis de NAD(P)H são significativamente maiores (~31 %) nas células SE1.

Níveis elevados de NADP(H) para as células SE1 (Responsivas) estão de acordo com relatos da literatura para outras espécies. PETRUSSA *et al.* (2009) observaram em *Abies alba* que durante o estágio de maturação, os níveis celulares de ATP, glucose-6-fosfato e NAD(P)H encontravam-se aumentados em relação ao estágio de proliferação. Ainda, durante a maturação os autores observaram um aumento das atividades da AOX, NADH desidrogenases externas e desacoplamento mediado por ácidos graxos, indicando a ativação dos sistemas antioxidantes mitocondriais. Considerando estas informações, neste estudo também foram avaliadas as atividades AOX, PUMP e NADP(H) desidrogenases (NDs) nas células SE1 e SE6. Os resultados são apresentados no item a seguir.

FIGURA 18. NÍVEIS DE ATP DE CULTURAS DE *A. angustifolia* RESPONSIVA (SE1) E NÃO RESPONSIVA (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Os níveis de ATP foram determinados utilizando Kit comercial Sigma, como descrito no item 5.9 da seção Material e Métodos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. * P < 0.05 vs. controle. SE1 e SE6, células de *A. angustifolia* responsivas e não responsivas a fatores de maturação, respectivamente.

FIGURA 19. NÍVEIS DE NAD(P)H DAS CULTURAS DE A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Os níveis de NAD(P)H foram determinados espectrofotometricamente, através do monitoramento indireto da atividade da glicerol fosfato desidrogenase e da glutamato desidrogenasse para NADH e NADPH respectivamente, como descrito no item 5.9 da seção Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de são os valores de três experimentos independentes em triplicata. * P < 0.05 vs.

controle. SE1 e SE6, células de *A. angustifolia* responsivas e não responsivas a fatores de maturação, respectivamente.

6.3.6 Atividades da AOX, UCP e NDs alternativas

Os resultados de respiração em células e mitocôndrias isoladas obtidos neste estudo (TABELA 4 e FIGURA 17) sugerem uma maior atividade da cadeia respiratória para as células SE6 (não responsiva). Os resultados obtidos ainda sugerem que as linhagens responsivas apresentam maior atividade metabólica no estado basal (sem adição de substratos exógenos – TABELA 4), enquanto que um aumento da respiração foi observado em todos os demais estados avaliados, em células e mitocôndrias isoladas, para a linhagem SE 6. Porém, o aumento da respiração não resultou no aumento da síntese de ATP, sugerindo que a energia liberada pelo transporte de elétrons não estaria sendo utilizada para este fim. Para avaliar esta hipótese, a atividade da AOX, UCPs e NDs foram avaliadas.

A Oxidase Alternativa (AOX) é uma proteína de 34 kDa localizada na face interna da membrana mitocondrial interna (PINHEIRO *et al.*, 2004). Catalisa a oxidação do ubiquinol com a transferência de elétrons diretamente para o oxigênio reduzindo-o a água, sem o bombeamento de prótons. Ácidos orgânicos monocarboxilicos como o piruvato, hidroxipiruvato e glicoxilato e dicarboxilicos como α -cetoglutarato, oxaloacetato, L-malato e succinato são estimuladores da AOX. A enzima não é inibida por cianeto, antimicina A ou mixotiazol, mas sim por agentes complexantes de ferro, os ácidos hidroxâmicos como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o ácido benzohidroxâmico (BHAM) e o tiocianato de potássio (MILLAR *et al.*, 1996).

A caracterização da atividade da AOX neste estudo foi realizada em sistema em que as UCPs são inibidas. Nestas condições, os valores absolutos de respiração foram de 38 e 67 nmol/min/mg de proteína para a SE1 e SE6, respectivamente FIGURA 20. A atividade da AOX corresponde a ~37 % e ~31 % da respiração total para a SE1 e SE6, respectivamente. Assim, para a via do citocromo C (COX), a respiração corresponde a 63% e 69% para SE1 e SE6 respectivamente. Esses resultados confirmam os anteriores de respiração celular e mitocondrial deste estudo, os quais demostraram que nas células SE6 os fluxos de oxigênio são maiores. A maior atividade da via da AOX na linhagen SE1 pode ser uma estratégia para a eliminação dos altos níveis de ROS totais encontrados nessa mesma linhagem (KAZIUK, 2017).

A proteína desacopladora de plantas (UCP), também avaliada neste estudo, é uma proteína integral de membrana capaz de dissipar o gradiente eletroquímico de prótons, por facilitar a reentrada de prótons na matriz mitocondrial, regulando, assim como a AOX, a

produção de ROS (VERCESI *et al.*, 2006). Apesar de possuírem funções fisiológicas similares, estas proteínas são reguladas de modo inverso pelos ácidos graxos livres. A UCP é ativada pelo aumento da concentração de ácidos graxos, enquanto que a AOX é inibida, sugerindo que estas proteínas não podem apresentar atividade máxima simultaneamente (SLUSE *et al.*, 1998; CALEGARIO *et al.*, 2003). As UCPs são inibidas por ATP, GDP, GTP e BSA e, ativadas por ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido láurico, mirístico, linoléico, oleico e palmítico (PASTORE *et al.*, 2000)

FIGURA 20. RESPIRAÇÃO VIA CITOCROMO C OXIDASE (COX) E OXIDASE ALTERNATIVA (AOX) DE CULTURAS DE *A. angustifolia* RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: A respiração celular foi determinada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) como descrito no item 5.8 da seção de Material e Métodos. A. Traçado demonstrativo, com as adições: MG (malato e glutamato), KCN e SHAM. A linha vermelha corresponde ao fluxo de oxigênio e a linha azul a concentração de oxigênio. B. gráfico com os resultados apresentados como média \pm erro padrão de seis experimentos independentes em duplicata e são expressos. As análises estatísticas foram realizadas pelo ANOVA de duas vias, foram comparados todos os resultados entre si. As indicações de letras mostram diferença estatística com valor de P < 0.05, sendo: a. valores significativamente diferentes de Resp Total SE1; b. valores significativamente diferentes Res.Total SE6; c. valores significativamente diferentes COX. SE1; d valores significativamente diferentes COXSE6; e. valores significativamente diferentes AOXSE1; f. valores significativamente diferentes AOXSE6. No presente estudo, a atividade das UCPs foi avaliada frente a diferentes adições: malato e glutamato (substratos para a cadeia respiratória), ácido linoleico (ativador das UCPs), BSA, ATP (inibidores das UCPs) e FCCP. A atividade das UCPs foi maior para SE6 em todas as condições avaliadas. Apenas a linhagem SE1 foi responsiva a ativação com ácido linoleico, o estímulo foi de 20 % em relação a adição de M+G. A inibição por BSA +ATP frente aos valores do ácido linoleico, como esperado, foi observada para ambas as linhagens, sendo de ~25% e ~26% para SE1 e SE6, respectivamente (

As NAD(P)H desidrogenases alternativas, também denominadas NDs do tipo II, também foram avaliadas neste estudo. Estas enzimas são insensíveis à rotenona, não bombeadoras de prótons e doam elétrons diretamente à ubiquinona (UQ) (MOLLER, 2001). Rasmusson e colaboradores (2008) descrevem seis diferentes NAD(P)H desidrogenases em plantas, sendo quatro externas e duas internas, possibilitando assim a oxidação de NAD(P)H citosólico e mitocondrial, respectivamente, apresentando diferentes respostas a regulação pelo cálcio. Em *Arabidopsis thaliana*, as NDs foram agrupadas em três famílias: NDA 1-2 membros, NDB 1-4 membros e NDC com 1 membro. Sendo as NDA1 e NDA2: NADH internas não dependente de calcio, NDB1: NADPH externa dependente de calcio, NDB2, NDB3, NDB4: NADH externas dependente de cálcio e NDC1: NADPH interna não dependente de cálcio. Os genes do tipo NDB possuem motivos em sua sequência de DNA que indicam fortemente a existência de uma região de ligação ao cálcio além da atividade se afetada pela mudança de pH (GEISLER *et al.*, 2007; RASMUSSON *et al.*, 2008; HAO *et al.*, 2015).

FIGURA 21).

É interessante ressaltar que, como observado neste estudo, Petrussa e colaboradores (2009) também descreveram a ativação das UCPs (~ 40%) por ácidos graxos no estado de maturação do embrião de *Abies alba*. Valente e colaboradores (2012) demonstraram que em cultura embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas ao estresse pelo frio (4°C for 24h e 48h) a atividade das UCPs teve um significativo aumento, enquanto a AOX foi discretamente estimulada. Os autores sugeriram que a UCP seria responsável pelo controle dos níveis de ROS e também pela superação da condição de estresse pelo frio.

Surpreendentemente apenas a UCP foi mais ativa na linhagem SE6. Sendo assim, os resultados de respiração em células (

As NAD(P)H desidrogenases alternativas, também denominadas NDs do tipo II, também foram avaliadas neste estudo. Estas enzimas são insensíveis à rotenona, não bombeadoras de prótons e doam elétrons diretamente à ubiquinona (UQ) (MOLLER, 2001). Rasmusson e colaboradores (2008) descrevem seis diferentes NAD(P)H desidrogenases em plantas, sendo quatro externas e duas internas, possibilitando assim a oxidação de NAD(P)H citosólico e mitocondrial, respectivamente, apresentando diferentes respostas a regulação pelo cálcio. Em *Arabidopsis thaliana*, as NDs foram agrupadas em três famílias: NDA 1-2 membros, NDB 1-4 membros e NDC com 1 membro. Sendo as NDA1 e NDA2: NADH internas não dependente de calcio, NDB1: NADPH externa dependente de calcio, NDB2, NDB3, NDB4: NADH externas dependente de cálcio e NDC1: NADPH interna não dependente de cálcio. Os genes do tipo NDB possuem motivos em sua sequência de DNA que indicam fortemente a existência de uma região de ligação ao cálcio além da atividade se afetada pela mudança de pH (GEISLER *et al.*, 2007; RASMUSSON *et al.*, 2008; HAO *et al.*, 2015).

FIGURA 21) estão de acordo com os resultados apresentados em mitocôndrias isoladas, ou seja, a respiração foi maior na linhagem SE6 em comparação com a linhagem SE1. Esses resultados suportam a ideia de que as linhagens responsivas apresentam ativados os mecanismos das vias respiratórias dissipadoras de energia.

As NAD(P)H desidrogenases alternativas, também denominadas NDs do tipo II, também foram avaliadas neste estudo. Estas enzimas são insensíveis à rotenona, não bombeadoras de prótons e doam elétrons diretamente à ubiquinona (UQ) (MOLLER, 2001). Rasmusson e colaboradores (2008) descrevem seis diferentes NAD(P)H desidrogenases em plantas, sendo quatro externas e duas internas, possibilitando assim a oxidação de NAD(P)H citosólico e mitocondrial, respectivamente, apresentando diferentes respostas a regulação pelo cálcio. Em *Arabidopsis thaliana*, as NDs foram agrupadas em três famílias: NDA 1-2 membros, NDB 1-4 membros e NDC com 1 membro. Sendo as NDA1 e NDA2: NADH internas não dependente de calcio, NDB1: NADPH externa dependente de calcio, NDB2, NDB3, NDB4: NADH externas dependente de cálcio e NDC1: NADPH interna não dependente de cálcio. Os genes do tipo NDB possuem motivos em sua sequência de DNA que indicam fortemente a existência de uma região de ligação ao cálcio além da atividade se afetada pela mudança de pH (GEISLER *et al.*, 2007; RASMUSSON *et al.*, 2008; HAO *et al.*, 2015).



FIGURA 21. ATIVIDADE DE PROTEÍNAS DESACOPLADORAS (UCP) DE CULTURAS DE A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO

FONTE: O autor (2018).

NOTA: A respiração celular foi determinada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) como descrito no item 5.8 da seção de Material e Métodos. A. Traçado demonstrativo, com as adições: MG (malato e glutamato), Ác. Lin. (ácido linoleico), BSA, ATP e FCCP. A linha vermelha corresponde ao fluxo de oxigênio e a linha azul a concentração de oxigênio. B. gráfico com os resultados apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicada. As análises estatísticas foram realizadas pelo ANOVA de duas vias, foram comparados todos os resultados entre si. As indicações de letras mostram diferença estatística com valor de P < 0.05: a. valores significativamente diferentes M+G SE1; b. valores significativamente diferentes M+G SE6; c. valores significativamente diferentes BSA SE1; f. valores significativamente diferentes BSA SE6; g. valores significativamente diferentes ATP SE1; h. valores significativamente diferentes ATP SE6; i. valores significativamente diferentes FCCP SE1; j. valores significativamente diferentes FCCP SE6.

A atividade das NDs, nas culturas de Araucária foi determinada pela adição de substratos específicos: Malato + Glutamato para NADHint; NADH para a NADHext, e NADPH para NADPHext. Apenas a NADH interna foi significativamente mais ativa na linhagen SE6 em comparação a com a SE1 (FIGURA 22 - gráfico b). A adição de 1 mM de cálcio foi capaz de ativar (100%) todas as NDs testadas, com exceção da ND interna da

linhagem SE6 (FIGURA 22 - gráfico b e c). A ativação por cálcio na ND interna já foi relatado na literatura, em *A. thaliana* a regulação por cálcio ocorre nas ND externas e pode ser dependente do pH citosólico (GEISLER *et al.*, 2007; RASMUSSON *et al.*, 2008; HAO *et al.*, 2015).

Curiosamente, não foram encontrados relatos da ativação exercida pelo cálcio para a NDA1-2, NADH interna alternativa, apesar da existência de indícios de que a NDA2 pode oxidar tanto o NADH quanto o NADPH, ou seja a presença de uma variante NAD(P)H interna (WALLSTRÖM *et al.*, 2014). Em Araucária, a adição de cálcio parece ativar as NADH internas na linhagem SE1, o que não ocorreu para a linhagem SE6 (FIGURA 22 – adição de M+G mais cálcio).

A. angustifolia RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) A FATORES DE MATURAÇÃO

FIGURA 22. ATIVIDADE DE NAD(P)H DESIDROGENASES ALTERNATIVAS (NDs) DE CULTURAS DE



FONTE: O autor (2018).

NOTA: A respiração celular foi determinada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) como descrito no item 5.8 da seção de Material e Métodos. **a.** Traçado demonstrativo, com as adições: NADPH, Cálcio, KCN e SHAM. A linha vermelha corresponde ao fluxo de oxigênio e a linha azul a concentração de oxigênio. **b.** gráfico com os resultados após a adição de substrato específico para ND. **c.** gráfico com os resultados com adição consecutiva dos substratos mais Cálcio. Os resultados apresentados como média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas pelo ANOVA de duas vias, foram comparados todos os resultados entre si. As indicações de letras mostram diferença estatística com valor de P < 0.05: a. valores significativamente diferentes NADHin SE1; b. valores significativamente diferentes de NADHext SE1; c. valores significativamente diferentes de NADHext SE1; d. valores significativamente diferentes NADHin SE6; e. valores significativamente diferentes de NADHext SE6; f. valores significativamente diferentes de NADHext SE6.

As NAD(P)H desidrogenases externas podem atuar cooperativamente com a AOX, evitando a formação de ROS, ao prevenir flutuações nos níveis de redução da ubiquinona (UQ) (RASMUSSON *et al.*, 2009). HO *et al.* (2007) mostraram que os genes codificantes da NDB4 (uma das variantes de NAD(P)H externa) e AtAOX1c (AOX1), respectivamente, são co expressos durante o desenvolvimento de cultura vegetal transformada de *A. thaliana*. Os autores destacam que a cooperatividade destas duas enzimas estaria contribuindo para uma menor produção de ROS e maior fornecimento de energia requerido para a divisão celular. De forma semelhante, mutantes de *A. thaliana* com RNA de interferência para NDB4 aumentaram a expressão de NDB2 (uma das variantes de NAD(P)H externa) e AOX, resultando em aumento das velocidades respiratórias, o que facilitaria a superação do estresse abiótico (SMITH *et al.*, 2011).

Sabe-se que alterações na atividade das NAD(P)H internas (NDA1-2) levam a modificações no balanço NAD(P)H/NAD(P)⁺ e por consequência em todo metabolismo dependente dessas moléculas. A sub expressão das NDA1-2 em Arabidopsis elevou a razão NAD(P)H/NAD(P)⁺. A baixa disponibilidade de NAD⁺, leva a diminuição do ciclo do ácido cítrico. Para superar essa diminuição a célula induz concomitantemente a fermentação aeróbica (WALLSTRÖM *et al.*, 2014).

Os resultados do presente estudo demostram que ambas as culturas de Araucária, no estágio de proliferação, exibem atividade simultânea das NDs, AOX e UCPs. Sendo a NDs e UCP, mais ativas para a linhagem SE6 (não responsiva) em comparação com a SE1. Somado a isso, a maior taxa de respiração celular e mitocondrial na presença do substrato M + G na linhagem SE 6, poderia explicar os maiores níveis de NAD(P)H para a linhagem responsiva.

6.3.7 Conclusão

A partir dos resultados é possível sugerir que a maior velocidade respiratória na linhagem SE6 (não responsiva) deve-se a maior atividade das enzimas dissipadoras de energia UCPs e NDs e também da respiração via complexo I. Este estímulo da respiração poderia ocorrer em resposta aos elevados níveis de peróxido de hidrogênio nestas células e, como resultado, os níveis de ROS e NAD(P)H total estão diminuídos em relação a SE1 (responsiva). Por sua vez, na linhagem SE1 o estímulo de importantes enzimas antioxidantes (GR, MDHAR e POD) pode ter ocorrido em resposta aos níveis mais elevados de ROS. Outro ponto importante é a ativação por cálcio das NDs internas observada apenas para a linhagem SE1 (responsiva), que pode estar relacionado com a maior responsividade aos fatores de maturação dessas células, porém, estudos mais aprofundados devem ser feitos para confirmar essa hipótese.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste estudo permitiu que se demonstrassem, em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, as respostas celulares e mitocondriais ao estresse pelo frio e calor e, pela primeira vez, identificou os efeitos do aumento de temperatura nas enzimas de reparo genético do sistema BER nesta gimnosperma. Além disso, funções mitocondriais foram diferencialmente relacionadas à capacidade de resposta destas culturas celulares aos agentes promotores de maturação dos embriões somáticos.

A exposição ao frio (4 °C), apesar de não levar a alterações na viabilidade, modulou diferencialmente as enzimas antioxidantes, resultando em uma condição de estresse oxidativo, com aumento da massa mitocondrial. De forma semelhante, a exposição ao calor também levou ao estresse oxidativo, porém, com diferentes sensibilidades à temperatura. Temperaturas intermediárias (30 °C – 37 °C) reduziram a viabilidade, mas não alteraram significativamente a respiração. Temperaturas de 40 - 42 °C foram deletérias para as células, levando a diminuição pronunciada de todos os parâmetros avaliados: viabilidade, respiração e atividade enzimática do sistema BER. Assim, conclui-se que temperaturas extremas, tanto baixas como altas, induzem ao estresse oxidativo nas células de *A. angustifolia*, sugerindo que esta espécie é bastante vulnerável às variações de temperatura utilizadas nas culturas in vitro e possivelmente as variações climáticas. Adicionalmente, esses resultados contribuem para a compreensão das vias envolvidas na superação desse tipo de estresse e do reparo genético nas gimnospermas, informações que serão valiosas para o desenvolvimento de metodologias para a propagação in vitro, uma vez que esse processo depende da sinalização por ROS e RNS.

Outra contribuição significativa deste estudo foi a caracterização de funções mitocondriais de células responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) aos agentes promotores de maturação (ácido abscísico e agentes osmóticos). A linhagem não responsiva (SE6) apresentou maior atividade das enzimas mitocondriais UCPs e NDs, bem como do complexo I, o que pode representar um reflexo dos altos níveis de H₂O₂ nestas células. Por outro lado, os níveis de ROS e NAD(P)H total foram diminuídos nesta cultura em relação à cultura responsiva (SE1). Na linhagem responsiva (SE1), por sua vez, a atividade das enzimas antioxidantes foi maior. Interessantemente as NDs internas são ativadas por cálcio exclusivamente nessa linhagem, o que pode ser um fator importante para a responsividade aos fatores de maturação.

Espera-se que os resultados deste estudo sirvam de subsídios para o estabelecimento de técnicas eficientes de micropropagação in vitro destas células e, com isto, contribuam para a preservação da espécie.

Os resultados desse trabalho se mostraram relevantes e abrem novas perspectivas de investigação. Em relação a caracterização da resposta ao estresse abiótico por temperatura em Araucária, especialmente o estresse ao calor, abre-se perspectivas para a investigação e caracterização mais aprofundada das alterações celulares provocadas por esse tipo de estresse, os mecanismos de superação mitocondrial e de reparo genético. Já a caracterização de funções mitocondriais de células responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) foi mostrado que existem diferenças na bioenergética, bem como na produção e resposta contra ROS entre uma cultura responsiva e não responsiva. Esses resultados são relevantes e abrem perspectivas para a investigação mais aprofundada do papel e importância da bioenergética mitocondrial na responsividade a fatores de maturação das culturas embriogênicas.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. v. 105, n. p. 121-126, 1984.

AGNELLO, M.; MORICI, G.; RINALDI, A. M. A method for measuring mitochondrial mass and activity. **Cytotechnology**. v. 56, n. 3, p. 145-149, 2008.

AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. Journal of Plant Biology. v. 51, n. 3, p. 167-173, 2008.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**. v. 55, n. p. 373-399, 2004.

AQUEA, F.; POUPIN, M. J.; MATUS, J. T.; GEBAUER, M.; MEDINA, C.; ARCE-JOHNSON, P. Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*. **Biotechnol** Lett. v. 30, n. 10, p. 1847-1852, 2008.

ARMSTRONG, A. F.; LOGAN, D. C.; TOBIN, A. K.; O'TOOLE, P.; ATKIN, O. K. Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Cell Environ**. v. 29, n. 5, p. 940-949, 2006.

ARNHOLDT-SCHMITT, B.; COSTA, J. H.; DE MELO, D. F. AOX - a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? **Trends in Plant Science**. v. 11, n. 6, p. 281-287, 2006.

ASTARITA, L.; GUERRA, M. Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (coniferae). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. v. 36, n. 3, p. 194-200, 2000.

BALESTRAZZI, A.; CONFALONIERI, M.; MACOVEI, A.; DONA, M.; CARBONERA, D. Genotoxic stress and DNA repair in plants: emerging functions and tools for improving crop productivity. **Plant Cell Rep.** v. 30, n. 3, p. 287-295, 2011.

BARRETO, P.; OKURA, V. K.; NESHICH, I. A. P.; MAIA, I. D. G.; ARRUDA, P. Overexpression of UCP1 in tobacco induces mitochondrial biogenesis and amplifies a broad stress response. **BMC Plant Biology**. v. 14, n. 1, p. 144, 2014.

BECWAR, M. R.; WANN, S. R.; JOHNSON, M. A.; VERHAGEN, S. A.; FEIRER, R. P.; NAGMANI, R. (1988). Development and Characterization of in Vitro Embryogenic Systems in Conifers. <u>Somatic Cell Genetics of Woody Plants: Proceedings of the IUFRO Working</u> Party S2. 04–07 Somatic Cell Genetics, held in Grosshansdorf, Federal Republic of Germany, <u>August 10–13, 1987</u>. AHUJA, M. R. Dordrecht, Springer Netherlands: 1-18.

BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnol Adv**. v. 29, n. 6, p. 850-859, 2011.

BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in Plant** Science. v. 4, n. p. 273, 2013.

BOESCH, P.; IBRAHIM, N.; PAULUS, F.; COSSET, A.; TARASENKO, V.; DIETRICH, A. Plant mitochondria possess a short-patch base excision DNA repair pathway. **Nucleic Acids Res.** v. 37, n. 17, p. 5690-5700, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v. 72, n. p. 248-254, 1976.

CALEGARIO, F. F.; COSSO, R. G.; FAGIAN, M. M.; ALMEIDA, F. V.; JARDIM, W. F.; JEZEK, P.; ARRUDA, P.; VERCESI, A. E. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. J Bioenerg Biomembr. v. 35, n. 3, p. 211-220, 2003.

CASTRO-CONCHA, L.; ESCOBEDO, R.; MIRANDA-HAM, M. (2006). Measurement of Cell Viability in In Vitro Cultures. <u>Plant Cell Culture Protocols</u>. LOYOLA-VARGAS, V. and VÁZQUEZ-FLOTA, F., Humana Press. **318:** 71-76.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. J Biol Chem. v. 217, n. 1, p. 383-393, 1955.

CHAVES, I.; REGALADO, A. P.; CHEN, M.; RICARDO, C. P.; SHOWALTER, A. M. Programmed cell death induced by (β -d-galactosyl)3 Yariv reagent in Nicotiana tabacum BY-2 suspension-cultured cells. **Physiologia Plantarum**. v. 116, n. 4, p. 548-553, 2002.

CHEN, H.; CHU, P.; ZHOU, Y.; LI, Y.; LIU, J.; DING, Y.; TSANG, E. W.; JIANG, L.; WU, K.; HUANG, S. Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. **J Exp Bot**. v. 63, n. 11, p. 4107-4121, 2012.

CHENG, W.-H.; WANG, F.-L.; CHENG, X.-Q.; ZHU, Q.-H.; SUN, Y.-Q.; ZHU, H.-G.; SUN, J. Polyamine and Its Metabolite H(2)O(2) Play a Key Role in the Conversion of Embryogenic Callus into Somatic Embryos in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Frontiers in Plant Science**. v. 6, n. p. 1063, 2015.

CORDOBA-CANERO, D.; ROLDAN-ARJONA, T.; ARIZA, R. R. Arabidopsis ZDP DNA 3'-phosphatase and ARP endonuclease function in 8-oxoG repair initiated by FPG and OGG1 DNA glycosylases. **Plant J**. v. 79, n. 5, p. 824-834, 2014.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; CHEVALIER, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. **J Exp Bot**. v. 57, n. 3, p. 581-588, 2006.

DIETZ, K. J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. Antioxid Redox Signal. v. 15, n. 4, p. 1129-1159, 2011.

DIKOMEY, E.; BECKER, W.; WIELCKENS, K. Reduction of DNA-polymerase beta activity of CHO cells by single and combined heat treatments. **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.** v. 52, n. 5, p. 775-785, 1987.

DOS SANTOS, A. L. W.; ELBL, P.; NAVARRO, B. V.; DE OLIVEIRA, L. F.; SALVATO, F.; BALBUENA, T. S.; FLOH, E. I. S. Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. **Journal of Proteomics**. v. 130, n. p. 180-189, 2016.

DUKOWIC-SCHULZE, S.; HARRIS, A.; LI, J.; SUNDARARAJAN, A.; MUDGE, J.; RETZEL, E. F.; PAWLOWSKI, W. P.; CHEN, C. Comparative Transcriptomics of Early Meiosis in Arabidopsis and Maize. **Journal of Genetics and Genomics**. v. 41, n. 3, p. 139-152, 2014.

EHRENSHAFT, M.; BRAMBL, R. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. **Plant Physiol**. v. 93, n. 1, p. 295-304, 1990.

ELBL, P.; LIRA, B.; ANDRADE, S.; JO, L.; DOS SANTOS, A.; COUTINHO, L.; FLOH, E.; ROSSI, M. Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).** v. 120, n. 3, p. 903-915, 2015.

ELBL, P.; LIRA, B. S.; ANDRADE, S. C. S.; JO, L.; DOS SANTOS, A. L. W.; COUTINHO, L. L.; FLOH, E. I. S.; ROSSI, M. Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**. v. 120, n. 3, p. 903-915, 2015.

ESTABROOK, R. W. (1967). [7] Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios. <u>Methods in Enzymology</u>. RONALD W. ESTABROOK, M. E. P., Academic Press. **Volume 10:** 41-47.

FANTINI, D.; MORITZ, E.; AUVRE, F.; AMOUROUX, R.; CAMPALANS, A.; EPE, B.; BRAVARD, A.; RADICELLA, J. P. Rapid inactivation and proteasome-mediated degradation of OGG1 contribute to the synergistic effect of hyperthermia on genotoxic treatments. **DNA Repair (Amst)**. v. 12, n. 3, p. 227-237, 2013.

FERRANDO, B.; FURLANETTO, A. L. D. M.; GREDILLA, R.; HAVELUND, J. F.; HEBELSTRUP, K. H.; MØLLER, I. M.; STEVNSNER, T. DNA repair in plant mitochondria – A complete base excision repair pathway in potato tuber mitochondria. **Submitted for publication**. v. n. p. 2017.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOV, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; VON ARNOLD, S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **J Cell Sci**. v. 113 Pt 24, n. p. 4399-4411, 2000.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOV, P. V.; VON ARNOLD, S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **Journal of Experimental Botany**. v. 51, n. 343, p. 249-264, 2000.

FREDERICO, A. M.; CAMPOS, M. D.; CARDOSO, H. G.; IMANI, J.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Alternative oxidase involvement in *Daucus carota* somatic embryogenesis. **Physiol Plant**. v. 137, n. 4, p. 498-508, 2009.

GEISLER, D. A.; BROSELID, C.; HEDERSTEDT, L.; RASMUSSON, A. G. Ca2+-binding and Ca2+-independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of Arabidopsis thaliana. **J Biol Chem**. v. 282, n. 39, p. 28455-28464, 2007.

GIAVALISCO, P.; NORDHOFF, E.; LEHRACH, H.; GOBOM, J.; KLOSE, J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. **Electrophoresis**. v. 24, n. 1-2, p. 207-216, 2003.

GIEGE, P.; HEAZLEWOOD, J. L.; ROESSNER-TUNALI, U.; MILLAR, A. H.; FERNIE, A. R.; LEAVER, C. J.; SWEETLOVE, L. J. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. **Plant Cell**. v. 15, n. 9, p. 2140-2151, 2003.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GILLESPIE, K. M.; AINSWORTH, E. A. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. **Nat Protoc**. v. 2, n. 4, p. 871-874, 2007.

GNAIGER, E. (2016). Residual oxygen consumption: a baseline correction of mitochondrial respiration. <u>Mitochondr Physiol Network</u>

GREDILLA, R.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. Mitochondrial DNA repair and association with aging--an update. **Exp Gerontol**. v. 45, n. 7-8, p. 478-488, 2010.

GREDILLA, R.; WEISSMAN, L.; YANG, J. L.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. Mitochondrial base excision repair in mouse synaptosomes during normal aging and in a model of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**. v. 33, n. 4, p. 694-707, 2012.

GUO, F.-X.; ZHANG, M.-X.; CHEN, Y.; ZHANG, W.-H.; XU, S.-J.; WANG, J.-H.; AN, L.-Z. Relation of several antioxidant enzymes to rapid freezing resistance in suspension cultured cells from alpine Chorispora bungeana. **Cryobiology**. v. 52, n. 2, p. 241-250, 2006.

GUPTA, P.; HOLMSTROM, D. (2005). Double Staining Technology for Distinguishing Embryogenic Cultures. <u>Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants</u>. JAIN, S. M. and GUPTA, P., Springer Netherlands. **77:** 573-575.

GUPTA, P. K.; PULLMAN, G. S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. **5.036.007**. v. n. p. 1991.

GUTMAN, B. L.; NIYOGI, K. K. Evidence for base excision repair of oxidative DNA damage in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. **J Biol Chem**. v. 284, n. 25, p. 17006-17012, 2009.

GUY, C. Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. **J Mol Microbiol Biotechnol**. v. 1, n. 2, p. 231-242, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C., Eds. (2000). <u>Free Radicals in Biology and</u> <u>Medicine</u>. New York, Oxford University Press. HAO, M.-S.; JENSEN, A. M.; BOQUIST, A.-S.; LIU, Y.-J.; RASMUSSON, A. G. The Ca(2+)-Regulation of the Mitochondrial External NADPH Dehydrogenase in Plants Is Controlled by Cytosolic pH. **PLoS ONE**. v. 10, n. 9, p. e0139224, 2015.

HAVELUND, J. F.; THELEN, J. J.; MOLLER, I. M. Biochemistry, proteomics, and phosphoproteomics of plant mitochondria from non-photosynthetic cells. **Frontiers in Plant Science**. v. 4, n. p. 2013.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol**. v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HO, L. H.; GIRAUD, E.; LISTER, R.; THIRKETTLE-WATTS, D.; LOW, J.; CLIFTON, R.; HOWELL, K. A.; CARRIE, C.; DONALD, T.; WHELAN, J. Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development. **Plant Physiol**. v. 143, n. 4, p. 1519-1533, 2007.

HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**. v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.

HUANG, S.; HILL, R. D.; WALLY, O. S.; DIONISIO, G.; AYELE, B. T.; JAMI, S. K.; STASOLLA, C. Hemoglobin Control of Cell Survival/Death Decision Regulates in Vitro Plant Embryogenesis. **Plant Physiol**. v. 165, n. 2, p. 810-825, 2014.

HUANG, S.; HILL, R. D.; WALLY, O. S. D.; DIONISIO, G.; AYELE, B. T.; JAMI, S. K.; STASOLLA, C. Hemoglobin Control of Cell Survival/Death Decision Regulates in Vitro Plant Embryogenesis. **Plant Physiology**. v. 165, n. 2, p. 810-825, 2014.

IPCC (2014). Climate Change 2007: Working Group I: The Physical Science Basis. <u>http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/spmsspm-projections-of.html</u>, Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC.

JEPPESEN, D. K.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. **Prog Neurobiol**. v. 94, n. 2, p. 166-200, 2011.

JIN, F.; HU, L.; YUAN, D.; XU, J.; GAO, W.; HE, L.; YANG, X.; ZHANG, X. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. **Plant Biotechnol J**. v. 12, n. 2, p. 161-173, 2014.

JO, L.; DOS SANTOS, A. L.; BUENO, C. A.; BARBOSA, H. R.; FLOH, E. I. Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. **Tree Physiol**. v. 34, n. 1, p. 94-104, 2014.

JOLDYBAYEVA, B.; PROROK, P.; GRIN, I. R.; ZHARKOV, D. O.; ISHENKO, A. A.; TUDEK, B.; BISSENBAEV, A. K.; SAPARBAEV, M. Cloning and characterization of a

wheat homologue of apurinic/apyrimidinic endonuclease Ape1L. **PLoS One**. v. 9, n. 3, p. e92963, 2014.

KANTIDZE, O. L.; VELICHKO, A. K.; LUZHIN, A. V.; RAZIN, S. V. Heat Stress-Induced DNA Damage. Acta Naturae. v. 8, n. 2, p. 75-78, 2016.

KAUPPILA, T. E. S.; KAUPPILA, J. H. K.; LARSSON, N. G. Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. Cell Metab. v. 25, n. 1, p. 57-71, 2017.

KAZIUK, F. D. EFEITO DO ESTRESSE POR ALTA TEMPERATURA EM CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia* RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) À MATURAÇÃO **Dissertação Mestrado**. v. n. p. 2017.

KIBINZA, S.; VINEL, D.; COME, D.; BAILLY, C.; CORBINEAU, F. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. **Physiologia Plantarum**. v. 128, n. 3, p. 496-506, 2006.

KIMURA, S.; UCHIYAMA, Y.; KASAI, N.; NAMEKAWA, S.; SAOTOME, A.; UEDA, T.; ANDO, T.; ISHIBASHI, T.; OSHIGE, M.; FURUKAWA, T.; YAMAMOTO, T.; HASHIMOTO, J.; SAKAGUCHI, K. A novel DNA polymerase homologous to Escherichia coli DNA polymerase I from a higher plant, rice (Oryza sativa L.). **Nucleic Acids Res**. v. 30, n. 7, p. 1585-1592, 2002.

KLIMASZEWSKA, K.; OVERTON, C.; STEWART, D.; RUTLEDGE, R. G. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. **Planta**. v. 233, n. 3, p. 635-647, 2011.

KUBO, T.; NEWTON, K. J. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. **Mitochondrion**. v. 8, n. 1, p. 5-14, 2008.

LAING, W.; CHRISTELLER, J. Extraction of proteins from plant tissues. Curr Protoc Protein Sci. v. Chapter 4, n. p. Unit 4.7, 2004.

LANNER, R. M.; CONNOR, K. F. Does bristlecone pine senesce? **Exp Gerontol**. v. 36, n. 4-6, p. 675-685, 2001.

LARSSON, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. **Annu Rev Biochem**. v. 79, n. p. 683-706, 2010.

LIBERATORE, K. L.; DUKOWIC-SCHULZE, S.; MILLER, M. E.; CHEN, C.; KIANIAN, S. F. The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. **Free Radic Biol Med.** v. 100, n. p. 238-256, 2016.

LIN, H. C.; MORCILLO, F.; DUSSERT, S.; TRANCHANT-DUBREUIL, C.; TREGEAR, J. W.; TRANBARGER, T. J. Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot Elaeis guineensis: evidence for conserved gene functions in early development. **Plant Mol Biol**. v. 70, n. 1-2, p. 173-192, 2009.

LIN, J.; WANG, Y.; WANG, G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is med iated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. **Journal of Plant Physiology.** v. 163, n. p. 8, 2006.

LIN, J.; WANG, Y.; WANG, G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. **J Plant Physiol**. v. 163, n. 7, p. 731-739, 2006.

LIU, X.; WILLIAMS, C. E.; NEMACHECK, J. A.; WANG, H.; SUBRAMANYAM, S.; ZHENG, C.; CHEN, M. S. Reactive oxygen species are involved in plant defense against a gall midge. **Plant Physiol**. v. 152, n. 2, p. 985-999, 2010.

LIU, Y.; JIANG, H.; ZHAO, Z.; AN, L. Abscisic acid is involved in brassinosteroids-induced chilling tolerance in the suspension cultured cells from *Chorispora bungeana*. Journal of **Plant Physiology**. v. 168, n. 9, p. 853-862, 2011.

LOGAN, D. C. Annual Plant Reviews, Plant Mitochondria. Wiley, 2007.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J Biophys Biochem Cytol**. v. 9, n. p. 409-414, 1961.

LYNCH, P. T.; SIDDIKA, A.; JOHNSTON, J. W.; TRIGWELL, S. M.; MEHRA, A.; BENELLI, C.; LAMBARDI, M.; BENSON, E. E. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. **Plant** Sci. v. 181, n. 1, p. 47-56, 2011.

MARIANO, A. B.; VALENTE, C.; MAURER, J. B. B.; CADENA, S. M. S. C.; ROCHA, M. E. M.; DE OLIVEIRA, M. B. M.; SALGADO, I.; CARNIERI, E. G. S. Functional characterization of mitochondria isolated from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. **Plant Science**. v. 175, n. 5, p. 701-705, 2008.

MCINTOSH, L.; EICHLER, T.; GRAY, G.; MAXWELL, D.; NICKELS, R.; WANG, Y. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. **Biochimica et Biophysica** Acta (BBA) - Bioenergetics. v. 1365, n. 1–2, p. 278-284, 1998.

MEADOWS, M. G.; POTRYKUS, I. Hoechst 33258 as a vital stain for plant cell protoplasts. **Plant Cell Reports**. v. 1, n. 2, p. 77-79, 1981.

MILLAR, A. H.; HOEFNAGEL, M.; DAY, D. A.; WISKICH, J. T. Specificity of the Organic Acid Activation of Alternative Oxidase in Plant Mitochondria. **Plant Physiol**. v. 111, n. 2, p. 613-618, 1996.

MILLER, M. W.; SADEH, N. Traumatic stress, oxidative stress and post-traumatic stress disorder: neurodegeneration and the accelerated-aging hypothesis. **Mol Psychiatry**. v. 19, n. 11, p. 1156-1162, 2014.

MINAGAWA, N.; KOGA, S.; NAKANO, M.; SAKAJO, S.; YOSHIMOTO, A. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in Hansenula anomala. **FEBS Lett.** v. 302, n. 3, p. 217-219, 1992.

MOLLER, I. M. PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. v. 52, n. p. 561-591, 2001.

MOLLER, I. M. What is hot in plant mitochondria? **Physiol Plant**. v. 157, n. 3, p. 256-263, 2016.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu Rev Plant Biol**. v. 58, n. p. 459-481, 2007.

MURSHED, R.; LOPEZ-LAURI, F.; SALLANON, H. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. **Anal Biochem**. v. 383, n. 2, p. 320-322, 2008.

NAVARRO, B. V.; ELBL, P.; DE SOUZA, A. P.; JARDIM, V.; DE OLIVEIRA, L. F.; MACEDO, A. F.; DOS SANTOS, A. L. W.; BUCKERIDGE, M. S.; FLOH, E. I. S. Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. **PLoS ONE**. v. 12, n. 7, p. e0180051, 2017.

NAZARI, M.; MAALI AMIRI, R.; MEHRABAN, F. H.; KHANEGHAH, H. Z. Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 59, n. 2, p. 183-189, 2012.

PARRISH, D. J.; LEOPOLD, A. C. On the mechanism of aging in soybean seeds. **Plant Physiol**. v. 61, n. 3, p. 365-368, 1978.

PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. **FEBS Lett**. v. 470, n. 1, p. 88-92, 2000.

PASTORE, D.; TRONO, D.; LAUS, M. N.; DI FONZO, N.; FLAGELLA, Z. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. **J Exp Bot**. v. 58, n. 2, p. 195-210, 2007.

PATEL, P. K.; HEMANTARANJAN, A. Antioxidant Defence System in Chickpea (Cicer arietinum L.): Influence by Drought Stress Implemented at Pre- and Post-anthesis Stage. Am. J. Plant Physiol. v. 7, n. 4, p. 9, 2012.

PETRUSSA, E.; BERTOLINI, A.; CASOLO, V.; KRAJNAKOVA, J.; MACRI, F.; VIANELLO, A. Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of Abies alba. **Planta**. v. 231, n. 1, p. 93-107, 2009.

PINHEIRO, H. A.; BORGES, R.; SILVA, M. A. P.; CENTENO, D. C. Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 16, n. 2, p. 7, 2004.

PRESLEY, A. D.; FULLER, K. M.; ARRIAGA, E. A. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. v. 793, n. 1, p. 141-150, 2003.

RASMUSSON, A. G.; FERNIE, A. R.; VAN DONGEN, J. T. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? **Physiol Plant**. v. 137, n. 4, p. 371-382, 2009.

RASMUSSON, A. G.; GEISLER, D. A.; MOLLER, I. M. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. **Mitochondrion**. v. 8, n. 1, p. 47-60, 2008.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol**. v. 17, n. p. 208-212, 1963.

RODRIGUEZ-SERRANO, M.; BARANY, I.; PREM, D.; CORONADO, M. J.; RISUENO, M. C.; TESTILLANO, P. S. NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. **J Exp Bot**. v. 63, n. 5, p. 2007-2024, 2012.

RUREK, M.; WOYDA-PLOSZCZYCA, A. M.; JARMUSZKIEWICZ, W. Biogenesis of mitochondria in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis) curds subjected to temperature stress and recovery involves regulation of the complexome, respiratory chain activity, organellar translation and ultrastructure. **Biochim Biophys Acta**. v. 1847, n. 4-5, p. 399-417, 2015.

SANCHES SILVEIRA, J. E.; MYAKI PEDROSO, D. M. UV light and skin aging. **Rev Environ Health**. v. 29, n. 3, p. 243-254, 2014.

SANTOS, A. L. W.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; VIDOR, M.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in Parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). Braz. Arch. Biol. Tech. v. 45, n. p. 9, 2002.

SANTOS, A. L. W.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; ZOGLAUER, K.; MOERSCHBACHER, B. M. Somatic embryogenises in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum.** v. 51, n. 1, p. 4, 2008.

SCORTECCI, K. C.; LIMA, A. F.; CARVALHO, F. M.; SILVA, U. B.; AGNEZ-LIMA, L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. A characterization of a MutM/Fpg ortholog in sugarcane--A monocot plant. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 361, n. 4, p. 1054-1060, 2007.

SHOHAEL, A. M.; ALI, M. B.; YU, K. W.; HAHN, E. J.; ISLAM, R.; PAEK, K. Y. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 5, p. 1179-1185, 2006.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F. E.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**. v. 171, n. 1, p. 91-98, 2006.

SLUSE, F. E.; ALMEIDA, A. M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; VERCESI, A. E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. **FEBS Lett.** v. 433, n. 3, p. 237-240, 1998.

SMART, C. J.; MONEGER, F.; LEAVER, C. J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. **Plant Cell**. v. 6, n. 6, p. 811-825, 1994.

SMITH, C.; BARTHET, M.; MELINO, V.; SMITH, P.; DAY, D.; SOOLE, K. Alterations in the Mitochondrial Alternative NAD(P)H Dehydrogenase NDB4 Lead to Changes in Mitochondrial Electron Transport Chain Composition, Plant Growth and Response to Oxidative Stress. **Plant and Cell Physiology**. v. 52, n. 7, p. 1222-1237, 2011.

SONG, Y.; CHEN, Q.; CI, D.; SHAO, X.; ZHANG, D. Effects of high temperature on photosynthesis and related gene expression in poplar. **BMC Plant Biol**. v. 14, n. p. 111, 2014.

STEINER, N.; VIEIRA, F. D.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

STUPNIKOVA, I.; BENAMAR, A.; TOLLETER, D.; GRELET, J.; BOROVSKII, G.; DORNE, A.-J.; MACHEREL, D. Pea Seed Mitochondria Are Endowed with a Remarkable Tolerance to Extreme Physiological Temperatures. **Plant Physiology**. v. 140, n. 1, p. 326-335, 2006.

SUN, J.; WANG, M.-J.; DING, M.-Q.; DENG, S.-R.; LIU, M.-Q.; LU, C.-F.; ZHOU, X.-Y.; SHEN, X. I. N.; ZHENG, X.-J.; ZHANG, Z.-K.; SONG, J. I. N.; HU, Z.-M.; XU, Y. U. E.; CHEN, S.-L. H2O2 and cytosolic Ca2+ signals triggered by the PM H+-coupled transport system mediate K+/Na+ homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells. **Plant, Cell & Environment.** v. 33, n. 6, p. 943-958, 2010.

SVENSSON, Å. S.; JOHANSSON, F. I.; MØLLER, I. M.; RASMUSSON, A. G. Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves. **FEBS Letters**. v. 517, n. 1–3, p. 79-82, 2002.

SWEETLOVE, L. J.; HEAZLEWOOD, J. L.; HERALD, V.; HOLTZAPFFEL, R.; DAY, D. A.; LEAVER, C. J.; MILLAR, A. H. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. **Plant J.** v. 32, n. 6, p. 891-904, 2002.

TESKEY, R.; WERTIN, T.; BAUWERAERTS, I.; AMEYE, M.; MCGUIRE, M. A.; STEPPE, K. Responses of tree species to heat waves and extreme heat events. **Plant Cell Environ**. v. 38, n. 9, p. 1699-1712, 2015.

THEOCHARIS, A.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. **Planta**. v. 235, n. 6, p. 1091-1105, 2012.

THOMAS, P. (2013). *Araucaria angustifolia*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. < <u>www.iucnredlist.org</u> >. Downloaded on 07 November

UMBACH, A. L.; FIORANI, F.; SIEDOW, J. N. Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. **Plant Physiol**. v. 139, n. 4, p. 1806-1820, 2005.

VALENTE, C. Efeito do estresse pelo frio sobre células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* em cultura: disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. v. n. p. 2012.

VALENTE, C.; PASQUALIM, P.; JACOMASSO, T.; MAURER, J. B.; SOUZA, E. M.; MARTINEZ, G. R.; ROCHA, M. E.; CARNIERI, E. G.; CADENA, S. M. The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress. **Plant Sci**. v. 197, n. p. 84-91, 2012.

VERCESI, A. E.; BORECKY, J.; MAIA IDE, G.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I. M.; CHAIMOVICH, H. Plant uncoupling mitochondrial proteins. **Annu Rev Plant Biol**. v. 57, n. p. 383-404, 2006.

VERCESI, A. E.; MARTINS, I. S.; SILVA, M. A. P.; LEITE, H. M. F.; CUCCOVIA, I. M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**. v. 375, n. p. 1995.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**. v. 164, n. 4, p. 645-655, 2003.

VIEIRA, L. D. N.; SANTA-CATARINA, C.; DE FREITAS FRAGA, H. P.; DOS SANTOS, A. L. W.; STEINMACHER, D. A.; SCHLOGL, P. S.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. **Plant Science**. v. 195, n. 0, p. 80-87, 2012.

WALLSTRÖM, S. V.; FLOREZ-SARASA, I.; ARAÚJO, W. L.; ESCOBAR, M. A.; GEISLER, D. A.; AIDEMARK, M.; LAGER, I.; FERNIE, A. R.; RIBAS-CARBÓ, M.; RASMUSSON, A. G. Suppression of NDA-Type Alternative Mitochondrial NAD(P)H Dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* Modifies Growth and Metabolism, but not High Light Stimulation of Mitochondrial Electron Transport. **Plant and Cell Physiology**. v. 55, n. 5, p. 881-896, 2014.

WANG, W. Q.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; MOLLER, I. M.; SONG, S. Q. Changes in the Mitochondrial Proteome of Developing Maize Seed Embryos. **Physiol Plant**. v. n. p. 2018.

WATSON, M. L. Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**. v. 4, n. 4, p. 475-478, 1958.

WIMALASEKERA, R.; TEBARTZ, F.; SCHERER, G. F. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. **Plant Sci**. v. 181, n. 5, p. 593-603, 2011.

WU, A.; ALLU, A. D.; GARAPATI, P.; SIDDIQUI, H.; DORTAY, H.; ZANOR, M. I.; ASENSI-FABADO, M. A.; MUNNE-BOSCH, S.; ANTONIO, C.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R.; KAUFMANN, K.; XUE, G. P.; MUELLER-ROEBER, B.; BALAZADEH, S. JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. **Plant Cell**. v. 24, n. 2, p. 482-506, 2012.

XIA, F.; WANG, X.; LI, M.; MAO, P. Mitochondrial structural and antioxidant system responses to aging in oat (*Avena sativa* L.) seeds with different moisture contents. **Plant Physiol Biochem**. v. 94, n. p. 122-129, 2015.

ZAVATTIERI, M. A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 13, n. 1, p. 2010.

APÊNDICE 1 – ARTIGO SUBMETIDO: COLD STRESS PAPER

COLD STRESS MODULATES THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND INDUCES OXIDATIVE STRESS IN Araucaria angustifolia EMBRYOGENIC CELLS

Ana L. D. M. Furlanetto^a, Caroline Valente^a, Glaucia R. Martinez^a, Maria. E.M. Rocha^a, Juliana. B. B. Maurer^a And Silvia M. S. C. Cadena^{a *}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

*Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Coronel Francisco H. dos Santos, C. Postal 19046. Curitiba 81531-990, Paraná, Brasil. Tel.: +55 41 33611535; fax: +55 41 3266 2042. e-mail address: silvia.cadena@ufpr.br (S.M.S.C. Cadena).

APÊNDICE 2 – ARTIGO SUBMETIDO: HEAT STRESS AND DNA REPAIR PAPER

SHORT-TERM HIGH TEMPERATURE TREATMENT REDUCES VIABILITY AND INHIBITS RESPIRATION AND DNA REPAIR ENZYMES IN *Araucaria angustifolia* CELLS

Ana Luiza Dorigan de Matos Furlanetto^{1,2}; Silvia Maria Suter Correia Cadena¹; Glaucia Regina Martinez¹; Beatriz Ferrando²; Tinna Stevnsner²; Ian Max Møller^{2*}

1) Department of Biochemistry and Molecular Biology - Life sciences sector; Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil; 2) Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Denmark

*Corresponding author at: Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University Forsøgsvej 1, DK-4200 Slagelse, Denmark. Phone:+45-87158263. E-mail: ian.max.moller@mbg.au.dk (Moller, I. M.)