

RELATÓRIO DA BOLSA DE INTEGRAÇÃO NA INVESTIGAÇÃO

FUNDAÇÃO
PARA A
CIÊNCIA E
TECNOLOGIA

ANÁLISE DO EFEITO DAS ALTAS
TEMPERATURAS NA ORGANIZAÇÃO
DA CROMATINA E DO
CITOESQUELETO MICROTUBULAR
EM CÉLULAS DA RAÍZ DE SECALE
CEREALE

VÂNIA RAFAELA ANTUNES DAS NEVES
SUPERVISÃO: DOUTORA ANA CRISTINA DELAUNAY CAPERTA
CENTRO DE BOTÂNICA APLICADA À AGRICULTURA (CBAA)

LISBOA 2009

Índice

1. Resumo	3
<i>Abstract</i>	4
2. Introdução	5
2.1 Estrutura da cromatina	5
2.2 Dinâmica do citoesqueleto microtubular	6
2.3 Stress térmico	7
2.4 Modelo estudado – Centeio (<i>Secale cereale</i>)	7
3. Materiais e Métodos	7
3.1 Material vegetal e condições de crescimento	8
3.2 Stress térmico (Altas temperaturas)	8
3.3 Fixação do material vegetal	8
3.4 Realização de esfregaços	8
3.5 Imunodeteção indirecta	9
3.6 Microscopia, processamento de imagem e análise estatística	10
4. Resultados	10
4.1 Quantificação de células interfásicas e mitóticas com anomalias	10
4.2 Estudo da organização da cromatina e padrões de distribuição da metilação do DNA	11
4.3 Análise da dinâmica do citoesqueleto microtubular	12
5. Discussão dos Resultados e Conclusão	17
6. Bibliografia	19

1. Resumo

O presente projecto teve como objectivo analisar alterações epigenéticas na organização e topologia da cromatina e organização do citoesqueleto microtubular, em plântulas sujeitas a altas temperaturas (stress térmico) utilizando *Secale cereale* como modelo. Ainda, pretendeu-se avaliar as consequências do stress térmico após diferentes períodos de recuperação.

Nas fases iniciais de desenvolvimento os ápices radiculares de *Secale cereale* expostos a stress térmico apresentaram alterações morfológicas associadas ao stress. A organização da cromatina e respostas epigenéticas, nomeadamente o padrão de distribuição da metilação do DNA foram analisados citologicamente em núcleos interfásicos e células mitóticas, após diferentes tempos de recuperação (RT) do stress, 0, 7 e 24h. Imediatamente após stress observou-se um aumento da compactação do DNA e a cromatina exibia uma aparência apoptótica, sucessivamente mais pronunciada ao longo dos períodos de recuperação analisados. Também se observou uma redistribuição dos sinais de imunodeteção, com um padrão menos homogéneo que o controlo, e aparente diminuição do nível geral de metilação do DNA. Comparando as células após diferentes tempos de recuperação, verificou-se que a frequência de células com anomalias e o índice mitótico são os mais elevados 7 h após tratamento, contrastando com o controlo. Foram ainda avaliados os efeitos do stress térmico na dinâmica do citoesqueleto microtubular, detectando-se alterações evidentes às 0 RT em células interfásicas e pré-profásicas. 24 horas após tratamento observaram-se configurações microtubulares similares ao controlo. Os resultados apresentados neste trabalho revelaram distintas dinâmicas da metilação do DNA, e do citoesqueleto microtubular, consequentes do stress térmico.

Palavras-chave: *Secale cereale*, stress térmico, cromatina, citoesqueleto

Abstract

In root tip cells from seedlings of *Secale cereale* exposed to high temperatures (heat stress), marked modifications in nuclear morphology and microtubule cytoskeleton dynamics are observed. Seedlings were developed in normal environmental conditions at 21°C, and transferred for 40°C during four hours for the heat shock treatment. Root-tips were excised just after the treatment, and after distinct periods of recovery (RT). The detailed characterization of meristematic cells nuclear morphology revealed striking modifications some of which are maintained even after 24 of RT. These alterations seem to be associated with changes in cell cycle. Immunocytochemistry was used to pursue the study of microtubules (MTs) dynamics in heat treated plants using alfa-tubulin antibodies. These revealed great alterations in MTs organization, preferentially affecting interphase cells. These results clearly indicate for the first time a direct impact of heat stress on nuclear dynamics and cell cycle progression.

Keywords: *Secale cereale*, heat stress, chromatin, cytoskeleton

2. Introdução

2.1 Estrutura da cromatina

Nas células de organismos eucariotas o DNA encontra-se associado a histonas e proteínas não histónicas formando a cromatina (Alberts *et al.*, 2004). A unidade básica da cromatina é o nucleossoma, constituído por um octâmero de histonas H2A, H2B, H3 e H4, duas moléculas de cada tipo, sobre o qual se enrolam 145 a 147 pares de bases de DNA. As caudas N- terminais das histonas e as C- terminais da histona H2A emergem do octâmero e expostas à acção enzimática, sujeitam-se a modificações pós-transcricionais como acetilação, fosforilação, metilação, glicosilação, ADP ribosilação, carbonilação e biotinilação, fundamentais no “código de histonas” (Turner *et al.*, 2002). A metilação dos resíduos de citosina (5-metilcitosina – 5-mC) no DNA é essencial na estrutura e função da cromatina (Zluvova *et al.*, 1998), ocorrendo na maioria dos genomas eucariotas (Ng e Bird, 1999). No genoma nuclear dos animais e plantas, os resíduos de citosina metilada ocorrem predominantemente em sequências simétricas como CpG e CpNpG, esta última característica das plantas (Castilho *et al.*, 1999). A relação entre a metilação do DNA e a estrutura da cromatina tem sido muito estudada na última década, encontrando-se envolvida no *imprinting* genómico e no controlo da expressão génica (Nickoloff *et al.*, 1998; Caperta *et al.*, 2007). Assim, os padrões da expressão de muitos genes têm sido relacionados com a metilação diferencial de alelos ou regiões de promotores, seja associada à hiper- ou hipometilação (Castilho *et al.*, 1999). Por exemplo, a hipometilação induzida pelo agente hipometilante 5-Azacidina provoca modificações na topologia da cromatina: um aumento significativo do volume nuclear em células meristemáticas radiculares de centeio, o que pode ser explicado em termos de alterações na estrutura da cromatina (Caperta *et al.*, 2007). Em raízes de *Zea mays* a expressão de *ZmMI1* causada por stress hipotérmico está relacionado com uma redução do nível de metilação do DNA que se mantém, pelo menos, durante 7 dias (Chinnusany e Zhu, 2009). Citologicamente a cromatina interfásica pode ser classificada como heterocromatina (muito condensada) e eucromatina (de condensação inferior) (Alberts *et al.*, 2004). A eucromatina é constituída por sequências de DNA ricas em genes, apresentando metilação da histona H3 no resíduo lisina 4 e acetilação no resíduo lisina 9 (van Driel *et al.*, 2003). A heterocromatina é constituída por sequências de DNA adjacentes repetidas (“tandem repeats”) (Alberts *et al.*, 2004), caracterizando-se pela metilação da histona H3 no resíduo lisina 9 (van Driel *et al.*, 2003) e elevado nível de metilação do DNA. A distribuição da heterocromatina varia com o organismo, contudo no núcleo interfásico observa-se que os domínios pericentroméricos, teloméricos e subteloméricos são frequentemente heterocromatizados (Alberts *et al.*, 2004). Em cada cromossoma, estes três domínios estabelecem ligações com proteínas específicas e, embora normalmente não sejam codificantes, têm funções estruturais de relevo estando envolvidos nos processos de segregação cromossómica, replicação e protecção das extremidades cromossómicas (Alberts *et al.*, 2004). No núcleo interfásico, a cromatina encontra-se dispersa, mas organizada, sem permitir a individualização dos cromossomas (Leitch *et al.*, 2000; Santos e Shaw, 2004). No caso de plantas com genomas e cromossomas grandes, como o centeio, os cromossomas dispõem-se no núcleo mantendo os centrómeros num pólo e os telómeros no pólo oposto, onde se localiza o nucléolo, estabelecendo a configuração “Rabl” (Leitch *et al.*, 2000). Na mitose, a compactação da cromatina inicia-se na transição G2/profase aumentando até à metafase onde atinge o seu máximo. Após a separação dos cromatídeos-irmãos na anafase, diminui gradualmente, até à típica descondensação interfásica, ao terminar a telofase (Alberts *et al.*, 2004).

2.2 Dinâmica do citoesqueleto microtubular

As células mantêm a sua estrutura interna, robustez e conformação, assim como conseguem alterar a organização interna dos seus componentes, essencial aos processos de crescimento, divisão e adaptação ao meio ambiente (Alberts *et al.*, 2004). Considera-se o citoesqueleto como o conjunto de estruturas proteicas filamentosas que formam uma complexa rede dinâmica responsável por estruturar e manter a forma da célula, associarem às junções celulares e auxiliarem nos movimentos celulares (Azevedo, 2005). Nas células eucarióticas, a função atribuída ao citoesqueleto depende das características de três tipos de estruturas: microtúbulos, filamentos de actina, filamentos intermédios, assim como de proteínas motoras associadas (Alberts *et al.*, 2004).

Os microtúbulos (MTs), o maior componente do citoesqueleto, são compostos por polipéptidos globulares de α - e β -tubulina, com grande afinidade entre si. As tubulinas constituem uma super-família que compreende as três famílias α -, β - e γ -. Cada família apresenta uma sequência de aminoácidos bastante conservada filogeneticamente. A α e β -tubulinas existem em diversas formas isotípicas, sofrendo várias modificações pós-tradução (Schmit and Nick, 2008). Em *Secale cereale* identificaram seis isótipos de α -tubulina e pelo menos 7 de β -tubulina (Kerr *et al.*, 1990). Os MTs formam-se quando as subunidades de $\alpha\beta$ -tubulina se associam heterodímeros, que se agregam direccionalmente em protofilamentos lineares. São estruturas polares com uma extremidade (+) de crescimento rápido, cineticamente mais dinâmica e uma extremidade (-) de crescimento lento. As γ -tubulinas estão relacionadas com as estruturas responsáveis pela nucleação e organização dos MTs nas suas extremidades negativas. Os “Centros de Organização dos Microtúbulos” (*Microtubule Organizing Center* – MTOCs), constituem a região onde se inicia a enucleação dos MTs, como o centrossoma ou um corpo basal (Alberts *et al.*, 2004). As células vegetais não possuem centrossoma e parecem enuclear MTs pelo envelope nuclear (Schmit and Nick, 2008).

Ao longo do ciclo celular os MTs organizam-se em estruturas importantes nos processos de divisão, desenvolvimento e diferenciação celulares (Schmit and Nick, 2008). As células vegetais apresentam três configurações microtubulares únicas: o arranjo de MTs corticais em interfase consistindo em MTs paralelos; a banda pré-profásica (BPP), correspondente ao futuro plano de divisão celular; e o fragmoplasto, que consiste em dois conjuntos de MTs paralelos possibilitado a formação da placa celular (Caperta *et al.*, 2006). Durante a interfase, a malha microtubular é constituída por MTs corticais justapostos orientados perpendicularmente ao eixo primário de alongamento, alguns ligados à membrana celular. No fim de G2, há um aumento na densidade de MTs iniciando a formação da BPP, que assume o aspecto de uma banda estreita e circunscrita à região onde ocorrerá a citocinese. No início da prometáfase inicia-se a formação do fuso acromático, responsável pela correcta segregação dos cromátídeos-irmãos, com forma de gaiola microtubular que envolve o envelope nuclear até este se desagregar. Nas plantas superiores, o fuso acromático é desprovido de MTs astrais e apresenta pólos amplos com numerosos *foci* microtubulares (Schmit and Nick, 2008). O fuso é maioritariamente multipolar, com semi-fusos a apresentarem grupos de fibras cinetocoriais divergentes de *foci* separados. Este tipo de organização implica que alguns MTs se associem aos cinetocoros - MTs cinetocoriais, e outros interactuem na região equatorial - MTs polares (Alberts *et al.*, 2004). Na anáfase dá-se a separação individualizada e simultânea de todos os cromátídeos-irmãos devido ao encurtamento e estreitamento dos MTs e à deslocação dos cromossomas, mediada por proteínas motoras associadas aos MTs. Na telófase, inicia-se a formação de um denso cilindro de MTs, a típica estrutura anelar do fragmoplasto, cuja principal

função parece ser transportar vesículas provenientes do aparelho de Golgi para o plano equatorial, originando as novas membranas plasmáticas e parede das células filhas (Schmit and Nick, 2008).

2.3 Stress térmico

As alterações, causadas por altas ou baixas temperaturas (Went, 1953), afectam as plantas. O stress térmico causado pelo aumento da temperatura é problemático na agricultura provocando alterações morfo-anatómicas, fisiológicas e bioquímicas, que afectam o crescimento e desenvolvimento vegetal, a fotossíntese, respiração, translocação de água e nutrientes, ou reacções enzimáticas (Wahid *et al.*, 2007). Um aumento rápido da temperatura induz em todos os organismos uma resposta ubíqua: expressão de um conjunto de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP - *Heat Shock Proteins*). Em plântulas de *Secale cereale* com três dias, sujeitas 2h a 40°C assiste-se à produção de mais de 150 HSPs (Somers *et al.* 1992).

Embora existam diversos estudos moleculares sobre a influência do stress térmico na estrutura da cromatina em plantas (Chinnusamy e Zhu, 2009), têm sido desenvolvidos muito poucos trabalhos no âmbito citológico. Por exemplo, em caules de ervilha crescidos a temperaturas entre 2°C e 25°C foram detectadas alterações significativas na estrutura da cromatina, sendo a sua digestibilidade pela DNase II superior em amostras de cromatina preparadas a partir de plantas desenvolvidas a temperaturas mais elevadas (Matsumoto *et al.*, 1993). Também, existem poucos estudos citológicos sobre a influência do stress térmico na dinâmica do citoesqueleto microtubular. Em células de *Nicotiana tabacum* sujeitas a stress térmico (38°C durante 30 minutos), observou-se que os MTs do aparelho mitótico e do fragmoplasto são os mais susceptíveis. Nestas condições, observou-se a desagregação do aparelho mitótico, alongamento do fuso acromático, e o alongamento dos MTs do fragmoplasto (entre outros), acompanhado de uma acumulação de telofases. O restabelecimento da estrutura microtubular normal ocorreu após 12 horas de recuperação (Draber *et al.*, 1997).

2.4 Modelo estudado - Centeio (*Secale cereale*)

O centeio (*Secale cereale* L.) encontra-se amplamente descrito na literatura como organismo modelo (Mikhailova *et al.*, 2006; Varshney *et al.*, 2004;). É uma monocotiledónea anual da família das *Poaceae* (gramíneas). O seu grande genoma (1.8pg), organizado em 7 cromossomas (2n=14), é 64 vezes maior que o de *Arabidopsis thaliana*. Constitui um excelente modelo de estudos citológicos, como análise da cromatina em núcleos interfásicos e em cromossomas mitóticos, recombinação nos cereais temperados (Jenkins *et al.* 2005) e organização do citoesqueleto microtubular (Caperta e tal., 2006; Mikhailova *et al.*, 2006; Caperta *et al.*, 2008).

3. Materiais e Métodos

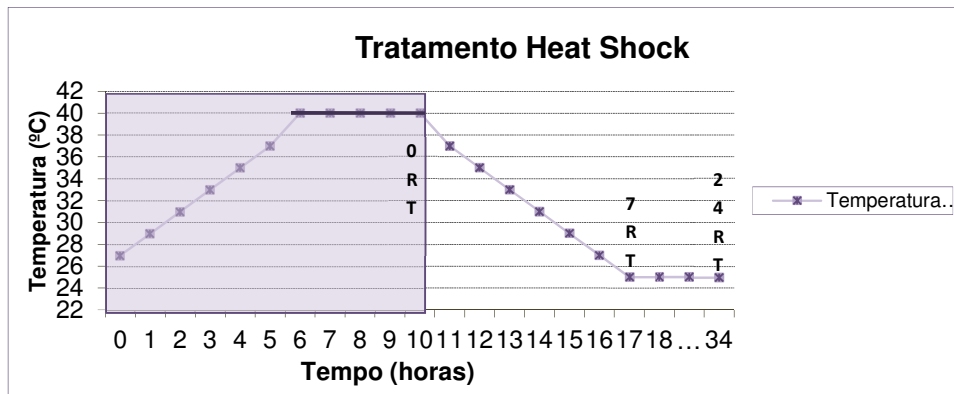
3.1. Material vegetal e condições de crescimento

Neste trabalho usaram-se sementes de *Secale cereale* cv. "Imperial". Para a obtenção de plântulas, as sementes foram colocadas em placas de Petri com papel de filtro humedecido, sem luz, a 4°C, por 3 dias, para quebrar a dormência. Para a germinação as placas foram transferidas para uma fitoclima (Rumed) com um fotoperíodo de 18h de luz e 6 h de escuro, a 22°C±2°C durante 2 dias.

3.2. Stress térmico (Altas temperaturas)

Algumas das plântulas obtidas foram submetidas a um stress térmico na fitoclina, enquanto as plântulas usadas para controlo foram mantidas a $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, com um fotoperíodo de 18h de luz e 6h de escuro. O stress térmico consistiu numa rampa de temperatura crescente, de 27°C a 40°C (aumento de cerca de $2^{\circ}\text{C}/\text{h}$) permanecendo 4 horas a 40°C , período após o qual a temperatura desceu progressivamente até 25°C (descida de cerca de $2^{\circ}\text{C}/\text{h}$), como representado na Figura 1. Após a indução do stress térmico, os ápices radiculares foram excisados das plântulas em três momentos: imediatamente após exposição a 40°C (0 RT); 7h após exposição a 40°C (7 RT), e 24 horas depois de recuperação (24 RT) em fitoclina em condições de controlo.

Figura 1 – Stress térmico aplicado às plântulas de *Secale cereale* 2 dias após germinação das sementes.



3.3. Fixação do material vegetal

Para análise de células com micronúcleos ou com núcleos disformes, alguns dos ápices radiculares foram fixados numa solução 2% (p/v) paraformaldeído em 1XPBS¹ durante 10 minutos, seguidamente lavados em 1XPSB por 10 minutos e conservados em etanol a 70%, a -20°C . Para a análise da organização da cromatina, os ápices radiculares foram fixados numa solução 3:1 (v/v) de etanol-acético² durante 24 horas e conservados nesta solução, a -20°C . Para a fixação de proteínas do citoesqueleto microtubular, os ápices foram fixados numa solução 2% paraformaldeído em 1xMTSB³ durante 1h, com duas lavagens posteriores em 1xMTSB durante 5 minutos cada.

3.4. Realização de esfregaços

Para a obtenção de esfregaços de raízes fixadas em 2% paraformaldeído em 1xPBS, procedeu-se a duas lavagens prévias numa solução de tampão enzimático 1xEB⁴ durante 10 minutos cada. Na digestão foi aplicada uma solução enzimática⁵ durante 65 minutos, em estufa a 37°C , mantendo intacta a parede celular. Seguidamente, aplicou-se uma gota de ácido acético a 45% (v/v) durante

¹ 1xPBS, Tampão Fosfato Salino - NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, a pH 7.4.

² Solução de 3:1 (v/v) etanol absoluto/ácido acético.

³ 1xMTSB, Microtubule Stabilizer Buffer - 50 mM PIPES, 1.9 g EGTA, 1.32 g MgSO₄·7H₂O e 5 g KOH em 800 ml de água destilada, pH= 7.0, 1:10 em água destilada para obter 1xMTSB

⁴ 1xEB: Enzyme Buffer - Ácido cítrico monohidratado 0,1M (A), citrato trissódico desidratado 0,1M (B) na proporção 2:3 (A:B) – 10xEB, diluir 1:10 em água destilada para obter 1xEB.

⁵ Solução enzimática: 20% (p/v) pectinase (P-4716 Sigma), 0,2% (p/v) celulase (R10 Onozuka), 2% (p/v) celulase (C1184 Sigma) em 1xEB.

alguns segundos, procedendo-se à substituição da gota por uma de 1XPBS antes da dispersão do material. Por fim, colocou-se uma lamela sobre o material, removendo o excesso de líquido com papel de filtro, exercendo pressão para separar as células convenientemente.

Para a obtenção de esfregaços de ápices radiculares fixados em 3:1 (v/v) de etanol acético, estes foram retirados do fixador e lavados duas vezes numa solução de tampão enzimático 1xEB durante 10 minutos cada. Seguidamente, o material foi digerido com a solução enzimática⁵ durante 90 minutos, em estufa a 37°C. Os ápices digeridos foram colocados numa gota de ácido acético a 65% (v/v), procedendo-se à remoção da coifa e dispersão do material com o auxílio de pinças e agulhas.

Para a obtenção de esfregaços de células para análise do citoesqueleto microtubular, o esfregaço foi realizado de imediato utilizando lâminas de alvéolos silanizadas⁶. Fez-se um corte na zona imediatamente acima da coifa com auxílio de uma agulha e com alguma pressão libertaram-se células para uma gota de 1xMTSB por alvéolo. Deixou-se secar a gota, imediatamente antes da imunodeteção. A qualidade das preparações foi avaliada com o auxílio de um microscópio de contraste de fase (Leica). À excepção das preparações realizadas para a análise do citoesqueleto microtubular, as preparações seleccionadas foram congeladas com CO₂, descolando-se a lamela com auxílio de uma lâmina de barbear. As preparações obtidas, foram conservadas a 4°C.

3.5. Imunodeteção Indirecta

A imunodeteção indirecta é uma técnica baseada na capacidade de um anticorpo secundário, marcado com uma molécula fluorescente, reconhecer um anticorpo primário, estabelecendo uma ligação, permitindo visualizar e detectar uma região específica do anticorpo primário. Os anticorpos primários utilizados foram: um anticorpo monoclonal de rato anti-5-metilcitosina na detecção dos padrões de metilação do DNA, e um anticorpo monoclonal de ratinho anti α -tubulina na detecção das configurações do citoesqueleto microtubular, respectivamente. Para prevenir ligações não específicas do anticorpo, aplicou-se 30 μ L de solução BSA⁷ sobre o esfregaço, incubando por 30 minutos, à temperatura ambiente. Seguidamente, procedeu-se à lavagem das lâminas em 1XPBS. Após a lavagem, aplicou-se 30 μ L do anticorpo primário – uma solução 1:200 de anticorpo monoclonal produzido em rato anti-5-metilcitosina (Abcam, Ab10805) em 1xPBS -, cobriu-se com lamelas de plástico, e incubou-se em câmara húmida em estufa a 37°C, durante 90 minutos. Após lavagem das lâminas em 1xPBS aplicou-se 30 μ L do anticorpo secundário – uma solução 1:100 de anticorpo monoclonal anti rato conjugado com Cy3 em 1xPBS -, que incubou durante 1 hora, em câmara húmida, na estufa a 37°C. Finda a última incubação, retiraram-se as lamelas de plástico para a lavagem em 1xPBS. Finalmente, a cada preparação aplicou-se 30 μ L do corante específico de DNA DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol - marca regiões ricas em A-T), com capacidade de fluorescência no azul brilhante. As preparações foram conservadas a 4°C. Para a visualização do citoesqueleto microtubular aplicou-se 12 μ L da solução de anticorpo primário – uma solução 1:100 de anticorpo monoclonal produzido em ratinho anti α -tubulina DM1A (Serotec) em MTSB em cada alvéolo e incubaram-se em câmara húmida na estufa a 37°C, durante 1 hora. Após este período de tempo, retirou-se o anticorpo e lavou-se com uma solução 1xMTSB por 5 minutos. Colocou-se 12 μ L da

⁶ A silanização é um tratamento aplicado às lâminas que pretende criar maior aderência. As lâminas são lavadas e agitadas em água quente com detergente. Após a lavagem em água quente corrente até ser retirado o detergente, um cesto com as lâminas foi submerso sequencialmente em tinas com água, água destilada e álcool comercial a 70%, seguidamente foram secas numa estufa a 37°C. Após secagem foram mergulhadas sequencialmente em silano a 2% em acetona (200 mL), acetona (200mL) e água destilada durante 10 segundos em cada tina. A água destilada foi renovada e o cesto foi então retirado e colocado a secar numa estufa a 37°C.

⁷ BSA: Bovine Serum Albumine 8% (w/v) + 0,1% Triton X100 em 1xPBS.

solução de anticorpo secundário – uma solução 1:300 de anticorpo monoclonal anti ratinho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) em MTSB - por alvéolo, incubando em câmara húmida, por 1 hora, na estufa a 37°C. Lavaram-se os esfregaços com uma solução 1xMTSB por 5 minutos e aplicou-se 12 µL de solução DAPI. Por fim colocou-se uma lamela.

3.6 Microscopia, processamento de imagem e análise estatística

Para a análise de microscopia de fluorescência foi utilizado um microscópio equipado com uma câmara digital Zeiss AxioCam. As imagens de fluorescência foram captadas para cada fluorocromo individualmente através de filtros de excitação apropriados. As imagens foram processadas e tratadas através da utilização do software Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Inc). As células interfásicas e metafásicas foram classificadas em diferentes classes consoante o parâmetro em análise. A comparação das distribuições foi feita utilizando o teste estatístico *Qui* quadrado (χ^2).

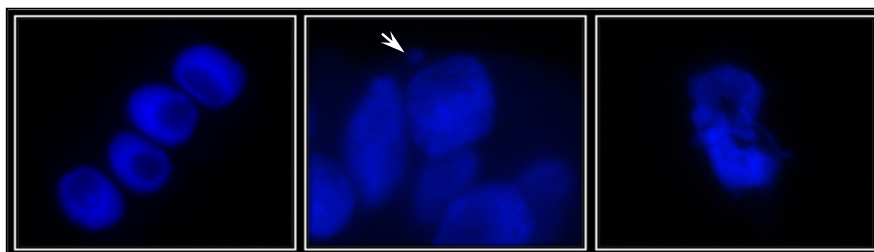
4. Resultados

O estudo citológico realizado neste trabalho consistiu na utilização de ápices radiculares de plântulas de *Secale cereale*, 2 dias após germinação, expostas a altas temperaturas (stress térmico) e controlo. As raízes das plântulas controlo eram longas, finas e com poucos pêlos finos presentes, e os respectivos ápices apresentavam cor branca opaca. Em contraste, as raízes de plântulas sujeitas a stress térmico eram mais curtas e grossas, por vezes com ápice de coloração acastanhada, possuindo muitos e grossos pêlos.

4.1. Quantificação de células interfásicas e mitóticas com anomalias

A análise citológica efectuada com a utilização do corante de DNA DAPI permitiu a observação de células interfásicas e mitóticas imediatamente após stress térmico (ORT), 7 e 24 horas após exposição a stress térmico (7 RT e 24 RT, respectivamente) e controlo. Foi feita a classificação dos núcleos das células interfásicas em normais, com micronúcleos e disformes, de acordo com a morfologia apresentada (Fig. 2).

Figura 2 – Células interfásicas de *Secale cereale* coradas com DAPI provenientes de plântulas expostas a stress térmico e controlo, 2 dias após a germinação das sementes. **2a** – células com núcleos interfásicos normais (controlo); **2b** – célula com micronúcleo (seta); **2c** – célula com núcleo disforme.



Foram consideradas normais as células com núcleos interfásicos com contornos regulares bem definidos, de forma aproximadamente esférica, que não apresentavam micronúcleos (Fig. 2a). As células interfásicas com micronúcleos (Fig. 2b) foram agrupadas independentemente do número de micronúcleos que apresentavam. Por seu turno, os núcleos considerados disformes foram aqueles

que possuíam contornos irregulares e algo fragmentados (Fig. 2c). Nas plântulas não expostas a stress térmico, a maioria dos núcleos interfásicos apresentavam-se normais (93%), embora algumas células exibissem micronúcleos (0,5%) e núcleos disformes (6,5%).

Imediatamente após stress térmico, observou-se um aumento da frequência de células com micronúcleos (3,5%) e núcleos disformes (17,25%) (Tabela 1). Após 7h RT, a frequência de núcleos disformes mais que duplicou (43,5%), observando-se ainda o incremento de células com micronúcleos (6,25%). Findo o tempo de recuperação de 24h observou-se redução da frequência de células com micronúcleos e de núcleos disformes. Foi ainda calculado o índice mitótico, cujo valor mínimo foi observado às 0 RT (1,75%), enquanto o valor máximo foi observado às 7 RT (15,25%). Para determinar a homogeneidade dos resultados entre cada tratamento foi realizado um teste estatístico de homogeneidade que seguiu o modelo do χ^2 . Os resultados apontam para diferenças significativas entre as frequências relativas a cada tipo de célula ($\chi^2=256.98$, Df=6, p=0,95) e índice mitótico ($\chi^2= 49.7198$, Df=3, p=0,95), nos diferentes períodos de recuperação após stress.

Tabela 1 – Frequência de células interfásicas com núcleos normais, micronúcleos e núcleos disformes de *Secale cereale* provenientes de plântulas, 2 dias após a germinação e expostas a stress térmico e controlo. Esta avaliação foi feita imediatamente após stress (0RT), 7 e 24h de recuperação (7 RT e 24 RT, respectivamente), em 400 células para cada período.

Período de tempo após exposição a stress térmico	Células do Ápice Radicular			
	Normais (%)	Com micronúcleos (%)	Disformes (%)	Índice Mitótico (%)
Controlo	93	0,5	6,5	5
0 RT	79,25	3,5	17,25	1,75
7 RT	50,25	6,25	43,5	15,25
24 RT	88,25	2,5	9,25	13,25

Paralelamente determinou-se a frequência de mitoses anormais em 400 células de cada período de recuperação. Foram classificadas de anormais as conformações celulares não características de uma célula em divisão celular, tais como anafases atípicas, apresentando distribuição desequilibrada dos cromossomas para cada pólo. No controlo, não foram observadas mitoses anormais, ao invés dos períodos de recuperação, onde se verificou a sua acumulação. Observou-se que a frequência de mitoses anormais relativamente ao número total de mitoses, foi mais elevada às 0 RT (28,57%), sendo mais baixa às 7 RT (16,39%) e 24 RT (9,43%), frequências consideradas elevadas, quando comparadas com o controlo.

4.2 Estudo da organização da cromatina e padrões de distribuição da metilação do DNA

No sentido de caracterizar alterações nos padrões de organização da cromatina e distribuição da metilação do DNA associadas ao stress térmico procedeu-se à análise citológica de células interfásicas e mitóticas coradas com o corante de DNA DAPI, e imunodetectadas com o anticorpo anti-5-metilcitosina (5-mC) (Castilho *et al.*, 1999). Em plântulas não expostas a stress térmico (controlo), as células exibiram uma marcação DAPI brilhante, distinguindo-se muito bem as zonas de cromatina menos condensada (eucromatina) das zonas de cromatina mais condensada (blocos heterocromáticos – seta aberta) (Fig. 3a), além de apresentarem sinais de 5-mC intensos e pontuados dispersos por todo o núcleo, sendo a distribuição coincidente com zonas marcadas pelo corante de DNA DAPI (Fig. 3b-c). Em contraste, os núcleos interfásicos de células submetidas a stress térmico imediatamente após stress apresentavam agregados de cromatina com uma

aparência muito “granulada” (Fig. 3d – seta aberta), e os sinais de imunodeteção estavam heterogeneamente dispersos por todo o núcleo (“ilhas” – setas fechadas) (Fig. 3e), colocalizando-se com regiões de cromatina mais compactada (Fig. 3f) – que designaremos por “agregados”. Por seu turno, às 7 RT a cromatina apresentava um aumento desses agregados nas células interfásicas (Fig. 3g – seta aberta), e os sinais de imunodeteção também se encontravam dispersos heterogeneamente por todo o núcleo (“ilhas”) (Fig. 3h) correspondendo às zonas muito compactadas (Fig. 3i). As células metafásicas aparentavam “descontinuidades” da cromatina e os sinais de 5-mC encontravam-se distribuídos heterogeneamente ao longo dos braços cromossomas (Figs. 3j-l – seta fechada). Em células com 24 h de tempo de recuperação, a cromatina de células em interfase e metafase apresentava-se drasticamente mais desorganizada que às 7RT (Figs. 3m (seta aberta), e 3p). Os sinais de imunodeteção, finamente pontuados (Figs. 3n e 3q) concentravam-se em pequenas regiões do núcleo (Fig. 3n – setas fechadas) coincidentes com os “agregados” (Fig. 3o e 3r).

4.3. Análise da dinâmica do citoesqueleto microtubular

Em plântulas sujeitas a stress térmico, análise da dinâmica do citoesqueleto microtubular foi realizada utilizando a técnica de imunodeteção indirecta com o anticorpo anti- α -tubulina DM1A. Nas plântulas controlo observaram-se as diferentes configurações características do citoesqueleto microtubular (Caperta *et al.*, 2006), nomeadamente: organização cortical dos microtúbulos, banda pré-profásica, fuso acromático e fragmoplasto (Fig. 4a-l). Em células de plântulas sujeitas a stress térmico, imediatamente após tratamento verificaram-se as conformações microtubulares observadas em controlo. Contudo, nas células interfásicas foram visualizados MTs curtos, grossos, e desorganizados, (Fig. 4m-o) diferindo dos MTs corticais do controlo. Também, as células pré-profásicas exibiam MTs de comprimento médio e grossos, menos organizados que o controlo (Fig. 4p-r). Às 7 RT, as células em interfase exibiam a configuração microtubular característica, embora os MTs fossem mais grossos que no controlo (Fig. 4s-u). Tanto às 0 como 7 RT, foram observadas células com fuso e fragmoplasto semelhantes ao controlo. Após 24 h RT, observou-se recuperação total do citoesqueleto microtubular, apresentando configurações semelhantes ao controlo. Ainda, observaram-se muitas células em telofase-citocinese, findo esse período de recuperação do stress.

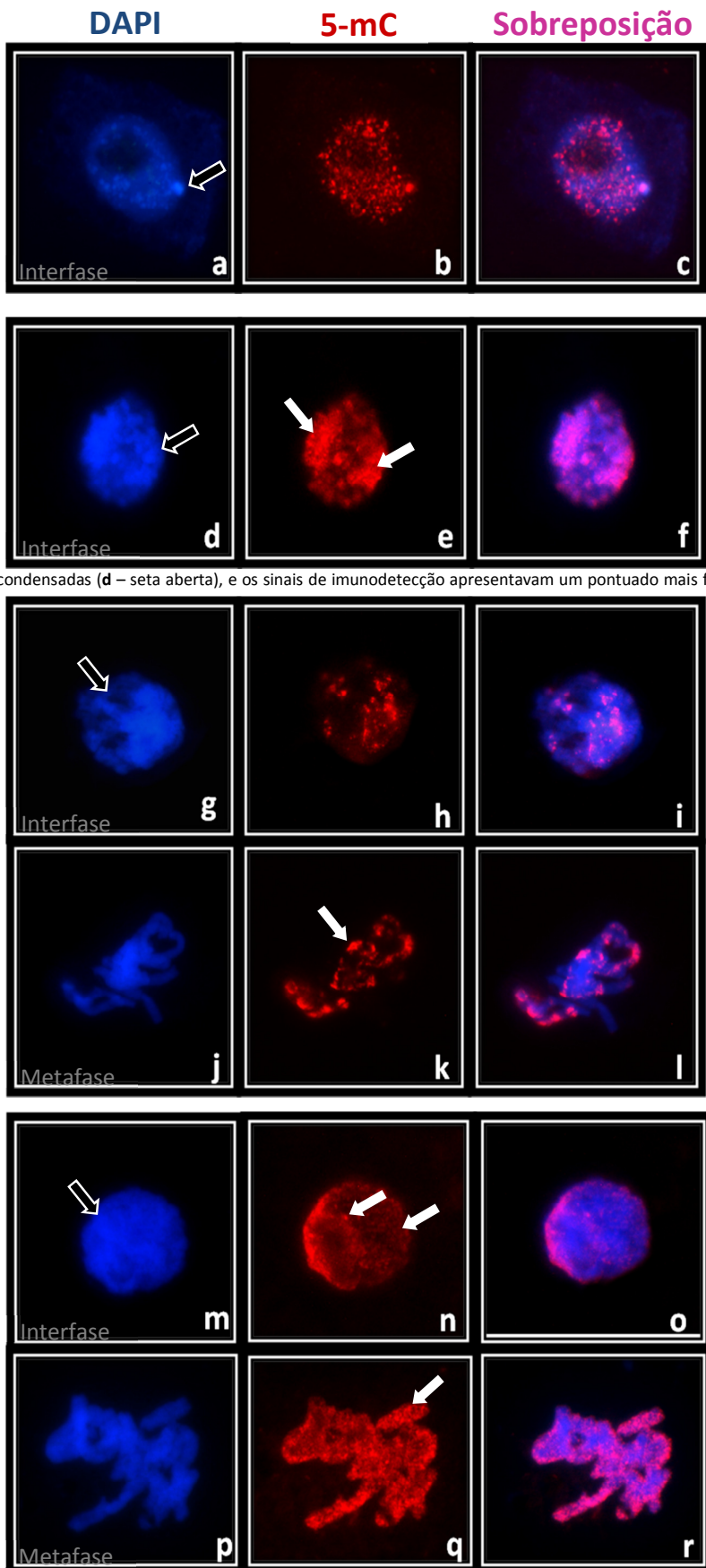


Figura 3. Imunodeteção indirecta do anticorpo anti-5-metilcitosina (anti-5-mC) em células do ápice radicular de *Secale cereale* de plântulas expostas a stress térmico. Foram detectadas diferenças na condensação da cromatina (DAPI - azul) e distribuição do anticorpo anti-5-metilcitosina (vermelho) imediatamente após stress térmico (0 RT), e 7 e 24 h após período de recuperação (7 RT e 24 RT) do stress. **a – c** No controlo, as células interfásicas (**a**) apresentavam zonas de cromatina menos condensada (eucromatina) e zonas de cromatina mais condensada (blocos heterocromáticos – seta aberta), exibindo sinais intensos e pontuados de 5-mC distribuídos por todo o núcleo (**b**), coincidentes com a marcação de DAPI (**c**); **d-f** Nos núcleos interfásicos às 0 RT, a cromatina apresentava zonas muito condensadas (**d** – seta aberta), e os sinais de imunodeteção apresentavam um pontuado mais fino, e dispersos heterogeneamente por todo o núcleo (“ilhas” – setas fechadas) (**e**), coincidentes com regiões de maior grau de compactação / agregação da cromatina (**f**); **g-l** Às 7 RT, nas células interfásicas observaram-se também agregados de cromatina muito condensada (**g** – seta aberta), e detectou-se uma redução dos sinais de imunodeteção embora mantendo a distribuição heterogénea em “ilhas”; (**h**) correspondendo a zonas com maior agregação da cromatina (**i**); nas células metafásicas, a distribuição dos sinais de 5-mC também se apresentou heterogénea ao longo dos braços dos cromossomas (**j-l**; **k** – seta fechada); **m-r** Em células com 24 RT, os núcleos interfásicos apresentavam elevado grau de compactação da cromatina (“aspecto granuloso”) (**m** – seta aberta) visualizando-se sinais de imunodeteção finamente pontuados embora com uma marcante redução da quantidade de “ilhas” (**n** – setas fechadas) DAPI-coincidentes (**o**); nas células metafásicas observou-se que a cromatina apresentava algumas discontinuidades ao longo dos braços cromossómicos (**p**), e os sinais de imunodeteção apresentavam um padrão semelhante ao observado em núcleos interfásicos (**q-r**). Todas as imagens têm igual ampliação, barra=5 µm.

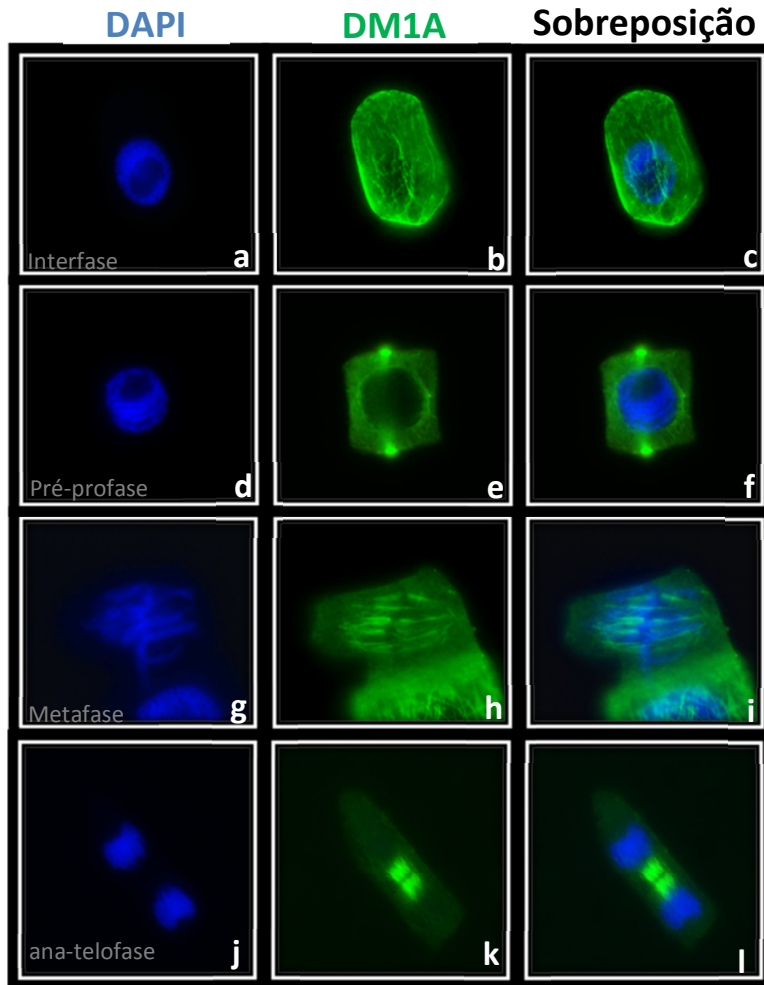
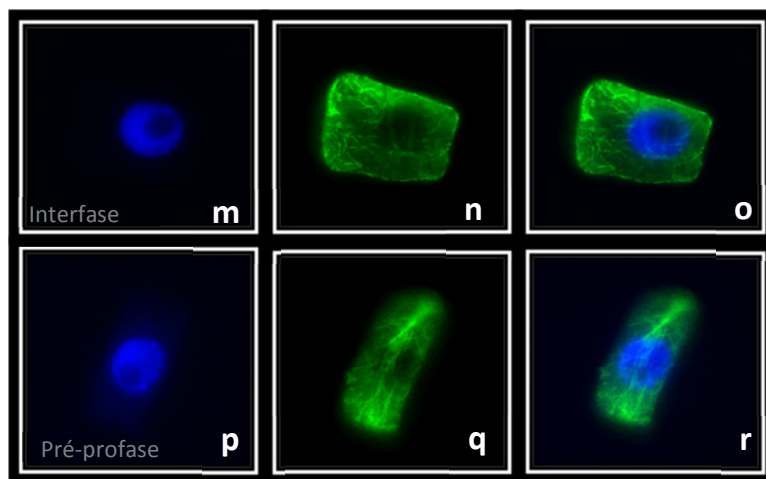
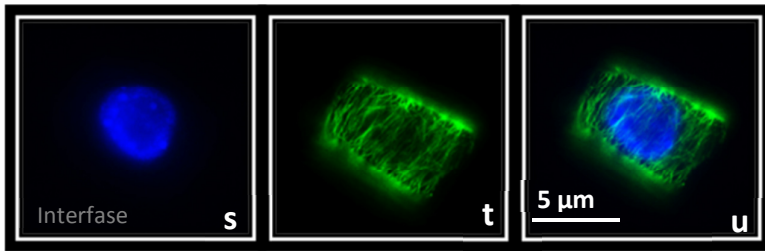


Figura 4. Imunodeteção indirecta do anticorpo anti- α -tubulina DM1A (verde) em células do ápice radicular de *Secale cereale* de plântulas expostas a stress térmico e coradas com DAPI (azul). Foram detectados alterações nos padrões de organização do citoesqueleto microtubular imediatamente após stress térmico (0 RT) e 7 h após período de recuperação (7 RT) do stress. No controlo, em interfase, foi detectado o arranjo dos microtubulos corticais, com sinal forte e brilhante, apresentando MTs longos e finos dispostos numa rede organizada (a-c); nas células pré-profásicas observou-se a banda pré-profásica, com sinal forte e brilhante, apresentando MTs longos e finos concentrados e paralelamente dispostos na zona central da célula (d-f); na metafase visualizou-se o fuso mitótico com longos MTs (g-i); e fragmoplasto bem definido (j-l), profásica, com sinal forte e brilhante, apresentando MTs longos e finos concentrados e paralelamente dispostos na zona central da célula (d-f); na metafase visualizou-se o fuso mitótico com longos MTs (g-i); e fragmoplasto bem definido (j-l).



Imediatamente após stress térmico, visualizaram-se nas células interfásicas MTs curtos, grossos, e desorganizados, pouco brilhantes (m-o), e as células pré-profásicas exibiam MTs de comprimento médio e grossos, menos organizados que o controlo (p-r).



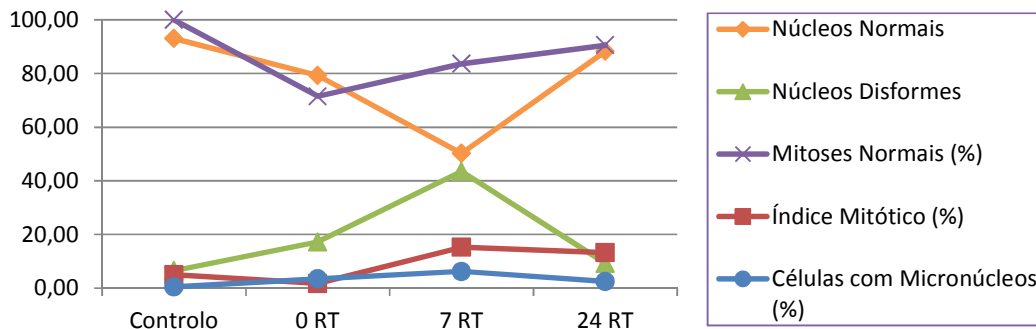
Às 7 RT, os MTs que constituíam o arranjo cortical das células interfásicas apresentavam-se mais grossos que às 0 RT (s-u). Todas as imagens têm igual ampliação, barra=5 μm .

5. Discussão dos Resultados e Conclusão

No presente trabalho foram analisadas citologicamente a dinâmica da cromatina e do citoesqueleto microtubular em ápices radiculares de plântulas *Secale cereale* expostas a altas temperaturas (stress térmico). Para o efeito foram analisadas células interfásicas e mitóticas do meristema radicular, imediatamente após o stress térmico (0 RT), e 7 e 24 RT. Foi utilizada a coloração DAPI, que permitiu a identificação de regiões muito compactadas da cromatina, e a imunodeteccção indirecta com anticorpo para a 5-metilcitosina. Foi ainda analisada a dinâmica do citoesqueleto microtubular através de imunodeteccção indirecta com um anticorpo para a α -tubulina.

A análise estatística dos resultados permite afirmar que, relativamente à conformação apresentada pelos núcleos interfásicos e índice mitótico após stress térmico, as diferenças detectadas entre os diferentes tempos de recuperação são significativas. Analisando a evolução das frequências obtidas para os diferentes tempos de recuperação em relação ao controlo (Fig. 5), observou-se que a frequência de células normais desceu drasticamente até atingir o valor mínimo, às 7 RT, retornando a valores próximos do controlo 24 horas após o stress térmico. Inversamente, a frequência de células com núcleos disformes atingiu o valor máximo às 7 RT, aproximando-se igualmente dos valores do controlo em 24 h. A frequência de células com micronúcleos também apresentou alterações notórias durante os períodos analisados. O índice mitótico variou relativamente ao controlo nos tempos de recuperação, com o valor máximo a 7 RT, mantendo-se elevado a 24 RT.

Figura 5 – Evolução das frequências de células interfásicas com núcleos normais, micronúcleos e núcleos disformes, índice mitótico, e mitoses normais de *Secale cereale* provenientes de plântulas expostas a stress térmico, 2 dias após a germinação das sementes. Esta avaliação foi feita imediatamente após stress térmico (0 RT), 7 e 24h após stress (7 RT e 24 RT, respectivamente).



O facto da frequência de células interfásicas com núcleos disformes ser pouco elevado imediatamente após o stress térmico evoluindo para frequências elevadas 7 horas depois, pode significar que parte das células terá iniciado o processo de apoptose (Houben *et al.* 2007). Também, as células metafásicas correspondentes a este período de recuperação apresentavam cromatina com descontinuidades. Após 24 horas de exposição ao stress, a frequência de células com núcleos normais era aproximadamente similar à observada no controlo, embora a cromatina destas células apresente um nível de agregação superior às 7 RT, reflectindo drásticas alterações na sua organização. Em animais, foi observado que a hipertermia conduz à indução de aberrações cromossómicas associadas a alterações na conformação da cromatina ocorrendo alterações em processos celulares, como inibição da síntese proteica, RNA e DNA (Iliakis e Pantelias, 1989).

Por outro lado, foram detectadas alterações nos padrões de distribuição da metilação do DNA ao longo dos tempos de recuperação. Estas alterações da modificação dos sinais de imunodeteccção apresentaram-se sob a forma de pontuado cada vez mais fino e menos intenso, além de terem sido

detectados “agregados” de concentração dos sinais devido à sua distribuição heterogénea. Estes resultados indicam uma diminuição geral do nível de metilação do DNA, associada à existência de regiões com perda preferencial de resíduos de citosina metilada. Dado o elevado grau de condensação da cromatina às 0, 7 e 24 RT não foi possível associar a marcação de 5-mC com regiões preferencialmente eu- ou heterocromáticas. Também em raízes de milho se demonstrou através de análises moleculares que a exposição a stress térmico de temperaturas baixas produz hipometilação do DNA, não ocorrendo a recuperação da metilação até 7 dias após o stress (Steward *et al.*, 2002). Estudos recentes em organismos vegetais igualmente demonstraram que a sua capacidade de conservar a memória do stress é mediada por processos epigenéticos tais como modificações pós-transcricionais nas caudas de histonas ou metilação do DNA (Chinnusamy e Zhu, 2009). Foi também confirmado que a hipometilação da cromatina induzida por stress está associada a alterações dos padrões de expressão génica (Caperta *et al.* 2007; Chinnusamy and Zhu, 2009). Os resultados obtidos neste trabalho revelam a existência de um padrão dinâmico do citoesqueleto microtubular após a exposição das plantas ao stress. As fases do ciclo celular mais afectadas parecem ser a interfase e a pré-profase, sobretudo em 0 RT, onde os MTs se apresentam mais curtos e grossos e aparentemente mais desorganizados. Estes resultados podem estar relacionados com o aumento do índice mitótico às 7 e 24h e elevada frequência de mitoses anormais pós stress, talvez resultante da dificuldade das células anteriormente afectadas no final da interfase/início da profase progredirem correctamente na mitose. O stress induzido pela colquicina em células vegetais revelou que a inexistência de um citoesqueleto microtubular interfásico apropriado leva à acumulação de mitoses anormais (Caperta *et al.*, 2006). A elevada frequência de células interfásicas com núcleos disformes às 7 RT parece reflectir alterações na dinâmica do citoesqueleto microtubular às 0 RT. Em plântulas de *Phragmites australis* cultivadas *in vitro* observa-se a disrupção do citoesqueleto microtubular acompanhada por alteração na forma das células da raiz aquando de stress induzido pela presença da toxina microscistina-LR (Máthe' *et al.*, 2009). Em ratinho também foram observados anomalias celulares morfológicas resultantes da disrupção completa do citoesqueleto; ainda às 24 RT o citoesqueleto microtubular apresentava uma configuração e arranjo semelhante ao controlo (Bouchard *et al.*, 2000), o que se pode relacionar com a elevada frequência de células com núcleos normais observadas neste trabalho. A partir deste estudo conclui-se que após a exposição de ápices radiculares de *Secale cereale* a um stress de altas temperaturas, são alterados os padrões de organização da cromatina interfásica e de distribuição da metilação do DNA, além de se modificar a dinâmica do citoesqueleto microtubular. Parece que a morfologia nuclear depende apenas da organização microtubular, pois a reorganização total às 24 RT resulta na maioria dos núcleos ter morfologia semelhante à das células de controlo, embora a organização da cromatina se apresente com agregados indicadores de apoptose e se detecte uma distribuição de 5-mC heterogénea. Uma maior compreensão dos resultados exigiria a utilização de outras metodologias, como o TUNEL (Marcação de Terminações dUTP pela Deoxinucleotidil Transferase Terminal), para confirmar a fragmentação e ultra-compactação do DNA. Seria interessante analisar outras respostas epigenéticas ao stress, moleculares e citológicas, como os padrões de distribuição da fosforilação de resíduos da histona H3.

6. Bibliografia

- **Alberts, B.**, Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., *Biologia Molecular da Célula*. 4ª ed P. 192-982, Trad. Beatriz Gorini da Veiga et al., *Porto Alegre; Artmed*, 2004.
- **Azevedo, C.**, *Biologia Molecular e Celular*. 4ª Edição, P 247-262, *LIDEL - Edições técnicas*, 2005.
- **Caperta, A. D.**, Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R. N., Viegas, W., Houben, A., Colchicine-induced polyploidization depends on tubulina polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma* 227: 147-153, 2006.
- **Caperta, A. D.**, Neves, N., Viegas, W., Pikaard, C., Preuss, S., Relationship between transcription, silver staining and organization of nucleolus organizers in *Secale cereale*. *Protoplasma* 232(1-2): 55-59, 2007.
- **Caperta, A. D.**, Rosa, M., Delgado, M., Karimi, R., Demidov, D., Viegas, W., Houben, A., Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis. *Cytogenet. Genome Research* 122: 73–79, 2008.
- **Chinnusamy, V.** e Zhu, J., Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:133–139, 2009.
- **Dráber, P.**, Viklický, V., Opatný, Z., Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant, Cell & Environment*, Vol 20(12): 1534-1542(9), 1997.
- **Castilho, A.**, Neves, N., Rufini-Castiglione, M., Viegas, W. and Heslop-Harrison, J. S., 5-Methylcytosine distribution and genome organization in triticale before and after treatment with 5-azacytidine. *Journal of Cell Science* 112 (Pt 23): 4397-404, 1999.
- **Houben, A.**, Demidov, D., Caperta, A. D., Karimi, R., Agueci, F., Vlasenko, L., Phosphorylation of histone H3 in plants – a dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta* 1769: 308-315, 2007.
- **Iliakis, G. E.** e Pantelias, G. E., Effects of hyperthermia on chromatin condensation and nucleoli disintegration as visualized by induction of premature chromosome condensation in interphase mammalian cells. *Cancer Research* 49, 1254-1260, 1989.
- **Jenkins, G.**, Mikhailova, E. I., Langdon, T., Tikholiz, O. A., Sosnikhina S. P., Strategies for the study of meiosis in rye. *Cytogenet. Genome Res.* 109: 221-227, 2005.
- **Kerr, G. P.** e Carter, J. V., Tubulin isotypes in Rye roots are altered during cold acclimation. *Plant Physiology* 93: 83-88, 1990.
- **Leitch, A. R.**, Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells. *Microbiology and molecular biology reviews* March, 138-152, 2000.
- **Matsumoto, H.**, Yamamoto, Y., Kasai, M., Kahl, G., Changes in the structure of chromatin in pea shoots upon a shift in growth temperature from 29°C to 25°C. *Plant and Cell Physiology* 34(6): 919-926, 1993.
- **Mikhailova, E. I.**, Phillips, D., Sosnikhina, S. P., Lovtsyus, A. V., Jones, R. N., Jenkins, G., Molecular assembly of meiotic proteins Asy1 and Zyp1 and pairing promiscuity in Rye (*Secale cereale* L.) and its synaptic mutant sy10. *Genetics* 174: 1247-1258, 2006.
- **Nickoloff, J. A.** and Hoekstra, M. F., DNA damage and repair, volume II: DNA repair in higher eukaryotes. *Humana Press*, 1998.
- **Santos, A. P.** e Shaw, P., Interphase chromosomes and the Rab1 configuration: does genome size matter? *Journal of Microscopy* 214(2): 201, 2004.
- **Schmit, A.-C.** e Nick, P., Microtubules and the evolution of mitosis, in plant microtubules: Development and flexibility. 2nd Edit., P233-254, Peter Nick Ed., *Springer*, 2008.
- **Somers, D. J.**, Gustafson, J. P., Fillion, W. G., The influence of the rye genome on expression of heat shock proteins in triticale. *Theoretical and Applied Genetics* 83(8): 987-993, 1992.
- **Turner, B.**, Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111(3): 285-291, 2002.
- **van Driel, R.**, Franz, P. F. and Verschure P. J., The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *Journal of Cell Science* 116, 4067-4075, 2003.
- **Varshney, R. K.**, Korzun, V., Börner, A., Molecular maps in cereals: methodology and progress. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands, 2004.
- **Wahid, A.**, Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R., Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61: 199–223, 2007.
- **Went, F. W.**, The effect of temperature on plant growth. *Annual Review of Plant Physiology* Vol. 4: 347-362, 1953.
- **Zluvova, J.**, Janousek, B., Vyskot, B., Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany* Vol 52(365): 2265-2273, 2001.

