

# Universidade Técnica de Lisboa

Instituto Superior de Agronomia

Relatório de Estágio de Iniciação à Investigação Científica

**Análise dos Efeitos do *Stress* Térmico (calor) na Dinâmica do Citoesqueleto  
Microtubular em Células da Raíz de *Secale cereale* L.**



# Índice

1. Resumo .....	2
2. Introdução .....	3
2.1 Ciclo celular - Interfase e Mitose .....	3
2.2 Citoesqueleto microtubular.....	3
2.3 MTs e <i>stress</i> térmico .....	6
2.4 Modelo estudado - Centeio (Secale cereale) .....	6
3. Objectivos .....	6
4. Materiais e métodos .....	6
4.1 Material vegetal e condições de crescimento .....	6
4.2 <i>Stress</i> térmico (calor) .....	6
4.3 Fixação e digestão do material vegetal .....	7
4.4 Realização de esfregaços .....	7
4.5 Imunodeteccção indirecta .....	8
4.6 Microscopia, processamento de imagem e análise estatística .....	8
5. Resultados .....	9
6. Discussão dos resultados e conclusão .....	14
7. Bibliografia .....	16

## 1. Resumo

Elevadas temperaturas induzem *stress* térmico que afectam o crescimento e processos fisiológicos das plantas superiores. Neste estudo citológico, pretendeu-se analisar o efeito do *stress* térmico na morfologia do núcleo em interfase e na dinâmica do citoesqueleto microtubular de células do ápice radicular de centeio *Secale cereale* L., imediatamente após *stress* (0 RT) e após diferentes períodos de recuperação (7 RT e 24 RT). Para o estudo da morfologia do núcleo foi utilizado o corante específico DAPI, e a análise do citoesqueleto microtubular foi realizada através de imunodeteção com anticorpos anti- $\alpha$ -tubulina total e anti- $\alpha$ -tubulina tirosinada no grupo carboxilo terminal. Em interfase, às 0 e 7 RT, observou-se o aumento de núcleos anormais e de células com micronúcleos. Também, o índice mitótico foi mais elevado às 7 RT em relação ao controlo e restantes períodos de recuperação. Apesar de não se ter observado despolimerização total do citoesqueleto microtubular, as células interfásicas apresentaram diferentes padrões de organização dos microtúbulos corticais, aparecendo configurações do citoesqueleto com microtúbulos ramificados e ondulados. Relativamente às células em mitose, após *stress* térmico observaram-se alterações na organização dos microtúbulos que formam a banda pré-profásica e o fragmoplasto, além de alterações nas frequências relativas de células em distintas fases da mitose. Embora 24 h após tratamento se tenham detectado padrões de organização dos microtúbulos similares ao controlo em células interfásicas e mitóticas, as frequências de cada tipo celular diferem do controlo, indicando a não recuperação completa do citoesqueleto após este período de recuperação, nomeadamente ao nível da mitose. Finalmente, não foram detectadas diferenças entre as marcações dos anticorpos utilizados. Os resultados apresentados neste trabalho revelam alterações reversíveis nas dinâmicas dos microtúbulos interfásicos e mitóticos sujeitos a *stress* térmico.

**Palavras-chave:** *Secale cereale*, *stress* térmico, microtúbulos.

## 2. Introdução

### 2.1 Ciclo celular - Interfase e Mitose

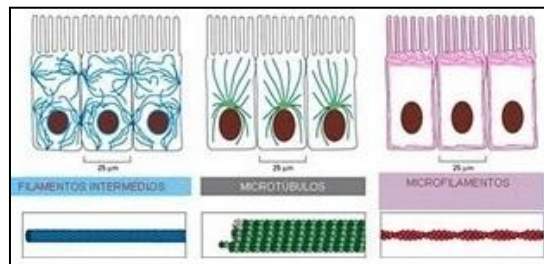
O ciclo celular ou ciclo reprodutivo de uma célula define-se como a sequência ordenada de eventos pelos quais uma célula duplica o seu conteúdo e divide-se em duas, sendo composto pela interfase (subdivide-se em três fases: G1, S e G2) e pela fase M. A replicação do DNA nuclear ocorre na fase S; a fase G1 é o intervalo entre a fase M e a S, enquanto a fase G2 é o intervalo entre a fase S e M. Na fase M (composta por profase, metafase, anafase e telofase) ocorre a divisão do núcleo (cariocinese), do citoplasma e respectivos constituintes (citocinese). Durante a interfase, a célula transcreve activamente a informação contida nos seus genes e sintetiza proteínas. Antes da divisão celular o DNA é replicado, permitindo a duplicação dos cromossomas. Durante a fase M, o envelope nuclear desagrega-se e há formação de um fuso mitótico a partir de microtúbulos e outras proteínas auxiliares. Os cromossomas são capturados pelo fuso e alinhados na placa equatorial pelos centrómeros, com os cromátídeos orientados para os pólos (metafase). O passo seguinte é a segregação dos cromossomas através da quebra do centrómero, com consequente migração dos cromátídeos para os respectivos polos mediados pela despolimerização dos microtúbulos (anafase). Quando os cromossomas chegam aos respectivos pólos inicia-se a descondensação da cromatina e ocorre a formação do fragmoplasto em células vegetais, para separação das células filhas. Nesta última fase (telofase), o invólucro nuclear reorganiza-se, voltando a formar-se o núcleo. Após este conjunto de etapas a célula entra em interfase, preparando-se para uma nova divisão (Criqui e Genschik., 2002; Alberts *et al.*, 2004).

### 2.2 Citoesqueleto microtubular

As células são capazes de manter a sua estrutura interna, conformação e possuem a capacidade de alterar a organização interna dos seus componentes, essencial nos processos de crescimento, divisão e adaptação ao meio ambiente (Alberts *et al.*, 2004). Estas funções estruturais e mecânicas são asseguradas em células eucarióticas por um complexo sistema de filamentos extremamente organizado denominado citoesqueleto.

O citoesqueleto separa os cromossomas durante a mitose permitindo a divisão das células somáticas, sendo também indispensável na divisão meiótica; guia e direcciona o trânsito intracelular de organelos, transportando materiais entre diferentes regiões celulares. Este sistema é constituído por três famílias de moléculas proteicas que se associam para formar três tipos principais de filamentos (fig. 1): (a) filamentos intermédios que conferem resistência mecânica e contra *stress*, são fibras semelhantes a cabos, com diâmetro aproximadamente de 10 nm, formados por subunidades fibrosas e longas (Alberts *et al.*, 2004); (b) filamentos de actina ou microfilamentos que determinam a forma da superfície celular, estruturalmente são constituídos por dois protofilamentos enrolados em paralelo numa hélice. Possuem uma extremidade (+) e uma (-), com concentrações críticas diferentes. Tal como o sinal sugere, a extremidade “mais” tem maior afinidade para se ligarem os monómeros, contribuindo para o aumento do comprimento do microfilamento. Na extremidade “menos”, acontece o contrário. Como a afinidade é menor a tendência é para que a cadeia se desagregue nesta extremidade e (c) microtúbulos que determinam a posição de organelos delimitados por membrana, direccionam o transporte celular e são responsáveis pela segregação dos cromossomas.

**Figura 1** – Estruturas filamentosas constituintes do citoesqueleto: filamentos intermédios (azul), microtúbulos (verde) e filamentos de actina (rosa) (adaptado de Alberts *et al.*, 2004).

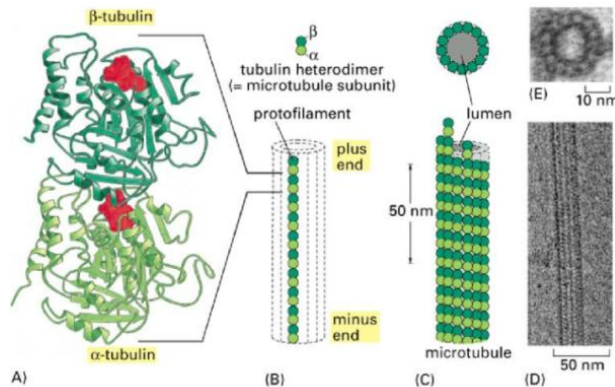


Os microtúbulos (MTs) são cilindros ocos constituídos por polipéptidos globulares de  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, com grande afinidade entre si (Schmit e Nick, 2008). As tubulinas pertencem a uma super-família de proteínas que engloba as três famílias  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -. Cada família de tubulinas apresenta uma sequência de aminoácidos bastante conservada filogeneticamente. Em *Secale cereale* foram identificados seis isótipos de  $\alpha$ -tubulina e pelo menos sete de  $\beta$ -tubulina (Kerr e Carter, 1990). Algumas isoformas da tubulina resultam de várias modificações pós-tradução afectando ambas as subunidades  $\alpha$ - e  $\beta$ -, nomeadamente tirosinação e acetilação. Uma das modificações pós tradução mais estudadas em células vegetais de plantas superiores e também em células animais é a tirosinação na extremidade carboxilo, que é adicionada por uma enzima, tubulina-tirosina ligase e retirada por uma enzima designada carboxipeptidase (Smertenko *et al.*, 1997b). Foram observados microtúbulos tirosinados e destirosinados em células de ervilha (Duckett e Lloyd, 1994) e em células de tabaco em cultura (Smertenko *et al.*, 1997b). Também MTs tirosinados mas não destirosinados foram detectados em células isoladas e secções da raiz de *Pinus radiata* e *Allium cepa* (Gilmer *et al.*, 1999). Níveis elevados de  $\alpha$ -tub tirosinada foram detectados em novos MTs em células vegetais (Duckett e Lloyd, 1994; Gilmer, 1999). MTs menos dinâmicos são caracterizados pela presença de  $\alpha$ -tubulina acetinada e  $\alpha$ -tubulina não tirosinada (Duckett e Lloyd, 1994; Gilmer, 1999).

MTs menos dinâmicos são caracterizados pela presença de  $\alpha$ -tubulina acetilada e  $\alpha$ -tubulina não tirosinada. Estas modificações são importantes na regulação dos processos fisiológicos das plantas (Smertenko *et al.*, 1997; Duckett e Lloyd, 1994).

Os MTs formam-se quando as subunidades de  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina se associam através de ligações não-covalentes para formar heterodímeros que se agregam direccionalmente formando protofilamentos lineares, com um diâmetro exterior de 24-25 nm e interior de 13-15 nm (Mayer e Jürgens, 2002) (*figura 2*). São estruturas polares com duas extremidades distintas, uma extremidade (+) de crescimento rápido e uma extremidade (-) de crescimento lento, sendo a extremidade (+) cineticamente mais dinâmica (Hashimoto, 2003). Durante a divisão celular organizam-se em estruturas dinâmicas que configuram e conduzem as diferentes fases da mitose. Esta dinâmica requer a cooperação funcional de diferentes proteínas que se associam aos MTs (Vanstraelen *et al.*, 2006). As  $\gamma$ -tubulinas existem em baixa quantidade nas células e estão relacionadas com as estruturas responsáveis pela nucleação e organização dos MTs nas extremidades negativas. Os “Centros Organizadores de Microtubulos” (em inglês: Microtubule Organizing Center - MTOCs) constituem a região celular onde se inicia a enucleação dos MTs.

**Figura 2 - Estrutura de um microtúbulo e das suas subunidades.** (A) A subunidade de cada protofilamento é um heterodímero de tubulina, formado por um par de monómeros de  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina fortemente ligados. A molécula de GTP Guanosina Trifosfato está fortemente associada ao monómero de  $\alpha$ -tubulina, sendo considerada parte integrante da proteína. No monómero de  $\beta$ -tubulina, a GTP apresenta uma associação menos intensa e desempenha uma função importante na dinâmica do filamento. Os nucleótidos estão representados a vermelho. (B) Representação esquemática de uma subunidade de tubulina (heterodímero  $\alpha$  e  $\beta$ ) e um protofilamento. Um protofilamento é composto por muitas subunidades adjacentes com a mesma orientação. (C) O microtúbulo é um cilindro oco rígido formado por 13 protofilamentos alinhados paralelamente. (D) Segmento de um microtúbulo visto em microscopia electrónica. (E) Microfotografia electrónica de uma secção transversal de um microtúbulo onde se consegue observar os 13 protofilamentos. (adaptado de Albert *et al.*, 2004).



Os microtúbulos das células vegetais formam quatro tipos básicos de arranjos durante o ciclo celular: microtúbulos corticais em interfase, banda pré-profásica que corresponde ao futuro plano de divisão celular, fuso mitótico e fragmoplasto que consiste em dois conjuntos de microtúbulos paralelos que possibilitam a formação da placa celular e consequente citocinese (Cyr e Palevitz, 1995). Durante a mitose, a malha microtubular é constituída por MTs corticais justapostos e orientados perpendicularmente ao eixo primário do alongamento, estando alguns ligados à membrana celular. No fim da fase G2, a densidade de MTs aumenta dando-se início à formação da banda pré-profásica, que assume o aspecto de uma banda estreita e circunscrita à região onde mais tarde ocorrerá a divisão celular (citocinese) (Schmit e Nick, 2008). No início da prometáfase inicia-se a formação do fuso acromático, responsável pela correcta segregação dos cromátídeos irmãos em cada ciclo celular, adquirindo uma forma de gaiola microtubular que envolve o envelope nuclear até este se desagregar no final da profase. Na anáfase dá-se a separação individualizada e simultânea de todos os cromátídeos irmãos devido ao encurtamento dos MTs. Por fim, na telófase inicia-se a formação de um denso cilindro de MTs formando-se a típica estrutura anelar, o fragmoplasto, cuja principal função parece ser o transporte de vesículas provenientes do aparelho de Golgi para o plano equatorial, originando as novas membranas plasmáticas e parede das células (Schmit e Nick, 2008).

## 2.3 Mts e *stress* térmico

A organização dos microtúbulos é sensível a vários factores ambientais como a luz, a gravidade, pelas altas e baixas temperaturas (Smertenko *et al.*, 1997; Müller *et al.* 2007). Estudos em células de *Nicotiana tabacum* sujeitas a *stress* térmico 3 h a 38 °C usando anticorpos para a  $\alpha$ -tubulina, mostraram desorganização dos MTs interfásicos e mitóticos. Os arranjos de MTs mais sensíveis ao aumento da temperatura nestas células foram o fuso mitótico e o fragmoplasto. Também observaram-se vários tipos de anomalias tais como: (i) quebra do fuso mitótico em várias partes, (ii) alongamento do fuso, (iii) formação de MTs em forma de estrela em células mitóticas e (iv) alongamento dos microtúbulos do fragmoplasto (Smertenko *et al.*, 1997).

A temperatura ambiente pode variar significativamente em torno do valor óptimo durante o período vegetativo da planta. Elevadas temperaturas induzem *stress* por calor, que afectam o crescimento e todos os processos fisiológicos das plantas superiores.

A resposta celular ao aumento da temperatura é conservada filogeneticamente e envolve: a diminuição da síntese proteica, degradação de proteínas e dos respectivos mRNAs e indução da síntese de proteínas que protegem os componentes celulares dos efeitos do calor, como por exemplo as proteínas de choque térmico, (*Heat Shock Proteins* HSPs) que permitem que os tecidos das plantas sobrevivam a temperaturas acima do limite que conseguem tolerar.

## 2.4 Modelo estudado - Centeio (*Secale cereale*)

O modelo usado neste trabalho foi o centeio, *Secale cereale* L.. É uma monocotiledónea anual pertencente à família *Poaceae* (gramíneas). O seu genoma relativamente grande encontra-se organizado em 7 pares de cromossomas (2n=14). O centeio constitui um excelente modelo para estudos citológicos, nomeadamente na análise da organização do citoesqueleto microtubular (Caperta *et al.*, 2006).

## 3. Objectivos

O presente trabalho teve como objectivos o estudo dos efeitos do calor não letal e da recuperação do citoesqueleto como parte do comportamento adaptativo, seguindo os efeitos perturbadores do calor que representa um dos grandes desafios ambientais para as plantas. A organização do citoesqueleto está muito bem estudada numa grande variedade de tipos de células e órgãos vegetais, incluindo as raízes. Neste trabalho, pretende-se analisar a dinâmica do citoesqueleto microtubular em ápices radiculares de plântulas de *Secale cereale* expostas a *stress* térmico (calor), através da imunodeteção com anticorpos anti  $\alpha$ -tubulina total e anti  $\alpha$ -tubulina tirosinada no grupo carboxilo terminal.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1 Material vegetal e condições de crescimento

Neste trabalho foram usadas sementes de *S. cereale* (cultivar *Russian*). Para obtenção de plântulas, foram colocadas 5 sementes em cada placa de Petri, num total de 4 placas, com papel de filtro humedecido, na ausência de luz, durante 2 dias a 4°C, com o objectivo de quebrar a dormência das sementes. Posteriormente foram colocadas numa fitoclina (Rumed),

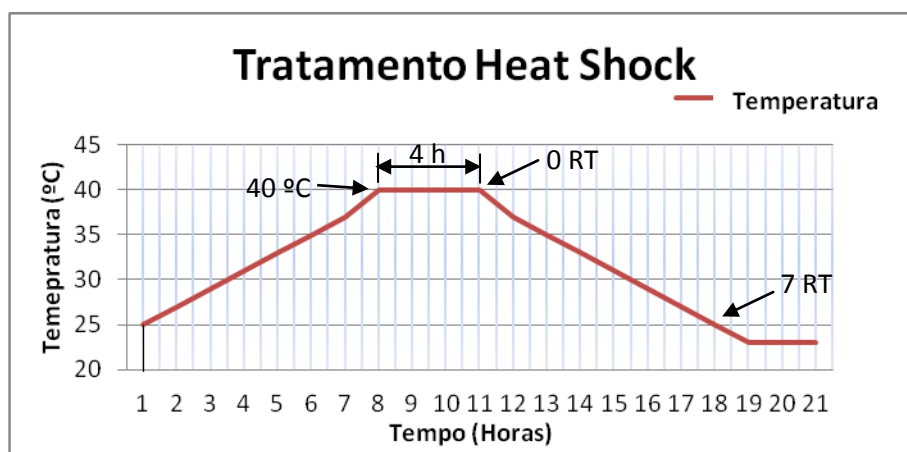
a  $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante cerca de 2 dias, para induzir a sua germinação. Este procedimento foi repetido 4 vezes.

## 4.2 Stress térmico (calor)

As plântulas usadas para controlo foram mantidas a  $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . As outras foram submetidas a *stress* térmico na fitoclíma. O *stress* consistiu numa rampa de temperatura crescente de 25 a  $40^{\circ}\text{C}$  (com incrementos de  $2^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ) permanecendo 4 horas a  $40^{\circ}\text{C}$ . Após este período, a temperatura desceu progressivamente (cerca de  $2^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ) até  $25^{\circ}\text{C}$  (fig. 3).

Após indução do *stress* térmico, os ápices foram excisados das plântulas em três momentos diferentes: imediatamente após exposição (0 RT - *Recovery Time*), 7 horas e 24h após exposição (7 RT e 24 RT, respectivamente). O período de recuperação das plântulas imediatamente após *stress* foi feito na fitoclíma, em condições de controlo.

Figura 3 – Stress térmico aplicado às plântulas de *Secale cereale*, 2 dias após germinação das sementes.



## 4.3 Fixação e digestão do material vegetal

Os ápices radiculares com cerca de 1-2 cm foram excisados e posteriormente fixados numa solução 4% (p/v) paraformaldeído em 1x MTSB<sup>1</sup> (preparada de fresco), durante 50 minutos. Após fixação foram feitas três lavagens em 1x MTSB durante 5 minutos cada.

## 4.4 Realização de esfregaços

Para obtenção de esfregaços de células foram usadas lâminas de vidro com alvéolos previamente silanizadas<sup>2</sup>, para maior aderência das células. Com o auxílio de pinças e agulhas, fez-se um corte na zona imediatamente acima da coifa dos ápices radiculares e com alguma pressão (com o cuidado de manter as células intactas) libertaram-se células para uma gota de 1x MTSB em cada alvéolo. Deixou-se secar completamente a gota antes de iniciar o procedimento de imunodeteção.



## 4.5 Imunodeteccção indirecta

A imunodeteccção indirecta é uma técnica que se baseia na capacidade de um anticorpo secundário, marcado com uma molécula fluorescente, reconhecer um anticorpo primário, estabelecendo uma ligação que permite a visualização e deteção de uma região específica do anticorpo primário.

Para a imunodeteccção do citoesqueleto microtubular, em ápices radiculares, foram usados dois anticorpos procedendo-se de acordo com o protocolo descrito em Caperta *et al.*, 2006. Os anticorpos primários monoclonais usados foram anti  $\alpha$ -tubulina DM1A, produzido em rato (1:100; 6  $\mu$ l) e YL 1/2 anti  $\alpha$ -tubulina tirosinada na extremidade do grupo carboxilo terminal, produzido em coelho (1:200; 6  $\mu$ l), ambos diluídos em 1x MTSB, em cada alvéolo e incubaram-se as lâminas em câmara húmida na estufa a 37 °C, durante 60 minutos. Posteriormente retiraram-se os anticorpos e lavou-se com uma solução de 1x MTSB três vezes, durante 5 minutos. Os anticorpos secundários monoclonais usados foram anti-rato conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:300; 6  $\mu$ l) (emite fluorescência na gama do verde) e anti-coelho associado ao fluorocromo Cy3 (1:200; 6  $\mu$ l) (emite fluorescência na gama do vermelho), ambos diluídos em 1x MTSB, em cada alvéolo, incubando as lâminas em câmara húmida durante 60 minutos a 37 °C. Terminado o período de incubação, fez-se três lavagens com 1x MTSB durante 5 minutos. Aplicou-se ainda 12  $\mu$ l do corante específico de DNA 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) que marca regiões ricas em A-T, com capacidade de fluorescência no azul brilhante e colocou-se uma lamela sobre a lâmina. As preparações foram conservadas a 4 °C, no escuro (Caperta *et al.*, 2006).

## 4.6 Microscopia, processamento de imagem e análise estatística

Para a visualização das células marcadas com as moléculas fluorescentes, foi utilizado um microscópio de fluorescência equipado com uma câmara digital Zeiss AxioCam. As imagens de fluorescência foram captadas para cada fluorocromo separadamente através da utilização de filtros de excitação apropriados. As imagens foram processadas e tratadas utilizando o software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc.).

As células interfásicas e metafásicas foram classificadas em diferentes classes consoante o parâmetro em análise e a comparação das distribuições obtidas foi realizada através do teste estatístico de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

O índice mitótico foi obtido através do cálculo do quociente entre o número de células na fase M pelo número total de células observadas respectivamente para o controlo e após *stress* (0, 7 e 24 RT).

---

<sup>1</sup> 10x MTSB (Microtubule Stabilizer Buffer) – 50 mM PIPES, 1.9g EGTA, 1.32 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O e 5g KOH em 800 ml de água destilada, pH=7.0. 1:10 em água destilada para obter 1x MTSB.

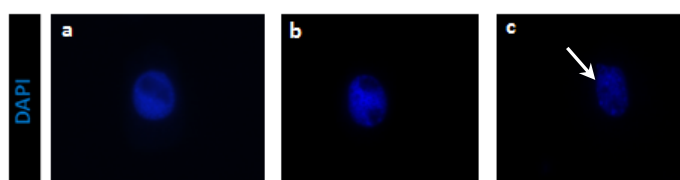
<sup>2</sup> A *silanização* é um tratamento aplicado às lâminas com o objectivo de criar maior aderência. As lâminas são lavadas e agitadas em água quente com detergente. Após a lavagem em água quente corrente até ser retirado o detergente, um cesto com lâminas foi submerso sequencialmente numa tina com água, água destilada e álcool comercial a 70%. Seguidamente foram mergulhadas sequencialmente numa solução de 2% (p/v) de silano em acetona (durante 10 segundos), acetona e água destilada. Após este último passo as lâminas foram colocadas a secar numa estufa a 37 °C.

## 5. Resultados

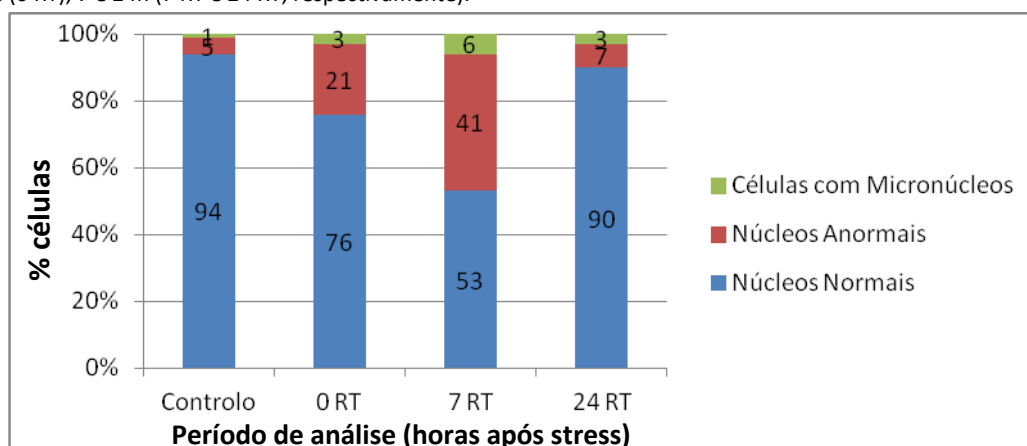
A análise citológica da dinâmica do citoesqueleto microtubular foi realizada em células de ápices radiculares de plântulas de *Secale cereale*, 2 dias após germinação, em condições de controlo e sujeitas a *stress* térmico. Recolheram-se também ápices radiculares nos diferentes períodos de recuperação (0, 7 e 24h). No controlo, as raízes eram longas, finas e com poucos pêlos na região de absorção e os ápices apresentavam cor branca opaca. Em contraste, as raízes de plântulas sujeitas a *stress* eram mais curtas e grossas, com pêlos grossos, compridos e numerosos e os ápices possuíam coloração menos esbranquiçada. Realizou-se a técnica de imunodeteção indirecta, com um anticorpo para tubulina total (DM1A) e outro anticorpo com afinidade para a  $\alpha$ -tubulina tirosinada no grupo carboxilo terminal (YL ½), para visualizar a dinâmica do citoesqueleto. Para este estudo apenas foram consideradas as células que apresentavam contornos regulares.

A morfologia do núcleo em interfase foi caracterizada usando o corante DAPI, tendo-se considerado células com núcleos: normais (fig. 5a), com forma e contornos regulares; anormais (fig. 5b), com contornos irregulares; e micronúcleos (fig. 5c), independentemente do número de micronúcleos presentes. No controlo, a maioria das células apresentavam núcleos normais (94%) (figura 6). Imediatamente após *stress* (0 RT), observou-se um aumento de células com núcleos anormais (21%) e de micronúcleos (3%). Às 7 RT (7h após *stress*) a frequência de núcleos anormais e de micronúcleos duplicou (41 e 6% respectivamente). Após 24h de recuperação (24 RT) observou-se que a frequência de células com núcleos anormais e micronúcleos diminuiu acentuadamente. Foram detectadas diferenças significativas nos tipos de n+núcleos comparando com o controlo ( $\chi^2=35.31$ ,  $P<0.05$ ). Também foram encontradas diferenças significativas entre o controlo e células sujeitas a *stress* térmico após 7 RT ( $\chi^2=92.36$ ,  $P<0.05$ ).

**Figura 4 - Caracterização da morfologia do núcleo.** Células interfásicas de *Secale cereale* coradas com DAPI provenientes de plântulas controlo e exposta a *stress* térmico, 2 dias após a germinação das sementes. (a) Núcleo normal; (b) Núcleo anormal; (c) Núcleo com micronúcleo.

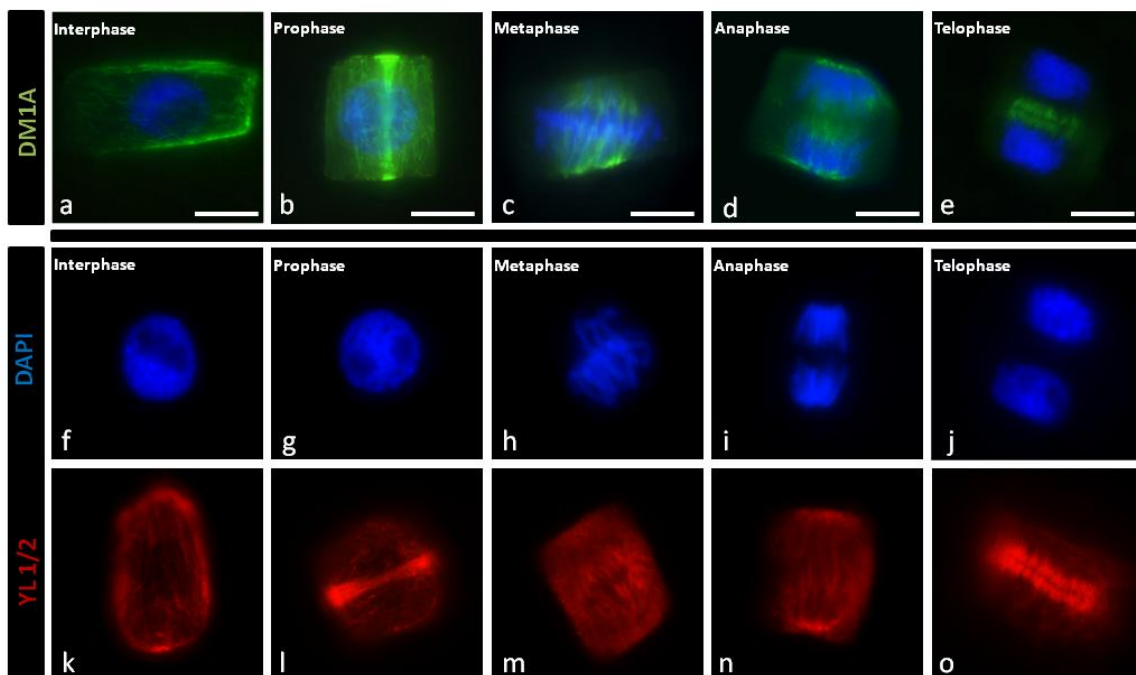


**Figura 5 -** Frequências de células interfásicas com núcleos normais, anormais e micronúcleos de *Secale cereale* provenientes de plântulas expostas a *stress* térmico, 2 dias após a germinação das sementes imediatamente após *stress* (0 RT), 7 e 24h (7 RT e 24 RT, respectivamente).



Para a análise do citoesqueleto microtubular usou-se inicialmente apenas o anticorpo anti  $\alpha$ -tubulina DM1A (a verde), que detecta tubulina total. Nas células de plântulas controlo observaram-se as diferentes configurações típicas do citoesqueleto microtubular para plantas superiores (Caperta *et al.*, 2006), tanto em interfase como em mitose. Foi observada a organização cortical dos microtúbulos, banda pré-profásica, fuso acromático e fragmoplasto (fig. 6 a-e). Posteriormente foi usado o anticorpo e YL 1/2 (a vermelho, aplicando a mesma técnica) (fig. 6 k-o), que tem afinidade para a  $\alpha$ -tubulina tirosinada no grupo carboxilo terminal. Não se observou alteração no sinal. 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 região central da célula. Em metafase e anafase o fuso mitótico era constituído por MTs longos, bem definidos e organizados dos polos até ao centro da célula e o fragmoplasto igualmente bem definido.

**Figura 6** - Imunodeteção indirecta do anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina DM1A (verde) e YL 1/2 (vermelho) em células de ápice radicular de *Secale cereale* de plântulas sujeitas a condições de controlo e corados com DAPI (azul). **(a)** Célula em interfase. **(b) e (l)** Nas células pré-profásicas observou-se a banda pré-profásica, apresentando MTs longos e finos concentrados e paralelamente dispostos na região central da célula; **(c), (m), (d) e (n)** as células em metafase e anafase, respectivamente, exibiram o fuso mitótico e o **(e) e (o)**. Núcleos das células filhas e fragmoplasto, respectivamente **(f) e (g)**. Cromossomas em metafase e anafase, respectivamente **(h) e (i)**.



Nas células sujeitas a *stress*, não se verificaram diferenças de marcação, tanto em interfase como em mitose. Contudo foram observadas diferenças na organização dos MTs, tanto em interfase como durante a mitose.

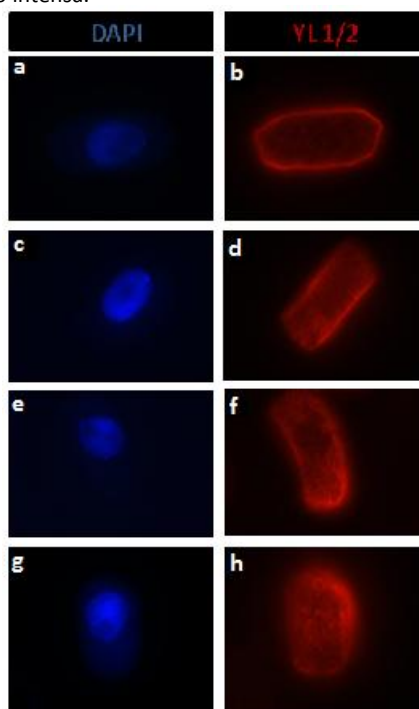
Imediatamente após o período de exposição das plântulas a 40 °C durante 4h (0 RT) observou-se uma redução significativa na frequência de células com a configuração típica dos microtúbulos corticais, nas células interfásicas e mais de metade (56%) das células observadas apresentavam microtúbulos ondulados e 28% microtúbulos ramificados (fig. 7h), ausentes no controlo (fig. 7 e 8). Em células mitóticas observam-se anomalias como bandas pré-profásicas constituídas por poucos MTS e de sinal menos intenso, fuso acromático aparentemente com

MTs mais curtos e fragmoplasto com microtúbulos mais finos comparativamente com o controlo. Relativamente à configuração padrão dos MTs em células mitóticas, destaca-se um aumento muito acentuado da frequência de células com banda pré-profásica (BPP) anormal (73%) comparativamente com o controlo (0%). Este aumento foi acompanhado de uma redução de BPP normais de 64% no controlo para 5% imediatamente após *stress*. Houve uma redução para metade da percentagem de células observadas com fuso mitótico. A frequência de células em profase aumentou em relação ao controlo (fig. 9 e 10).

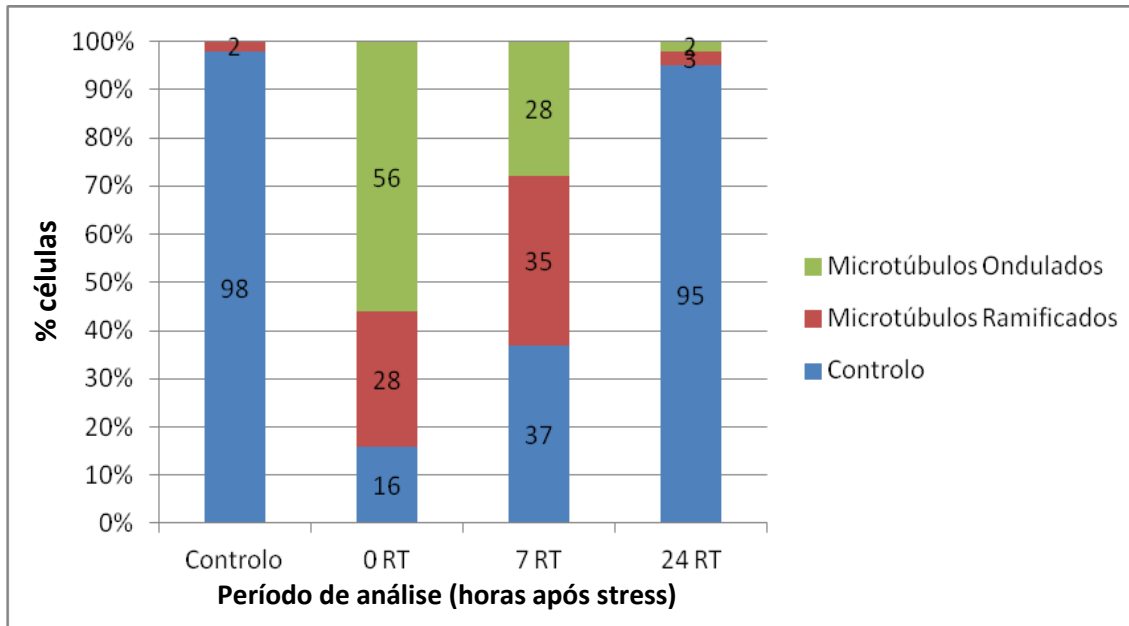
Após 7h de recuperação, houve redução significativa do número de células que exibiam configuração microtubular observada em células controlo e aumento da frequência de microtúbulos ramificados (35%) e uma redução para 28% dos MTs ondulados. Nas células mitóticas houve anomalias na formação da banda pré-profásica, fuso acromático e no fragmoplasto, também encontradas às 0 RT. A frequência de células em Profase (48%) diminuiu em relação ao controlo e 0 RT. A percentagem de células com BPP normais aumentou para 17%. A frequência de células com fragmoplasto (telofase) aumentou para mais do dobro (25%).

Após 24 h, as células exibiam as configurações típicas do controlo e verificou-se a recuperação total do citoesqueleto em interfase (95%) (fig. 8). Contudo, nas células em divisão os BPP normais aumentaram para 27%, contudo a percentagem ainda é muito reduzida comparando com os dados do controlo. Houve uma grande redução dos BPP anormais para 6% e um aumento para 48% da percentagem de células mitóticas com fuso (metafase). A frequência de células em telofase manteve-se elevada (19%). Ou seja, às 24 RT o citoesqueleto microtubular de células mitóticas não estava recuperado (fig. 10).

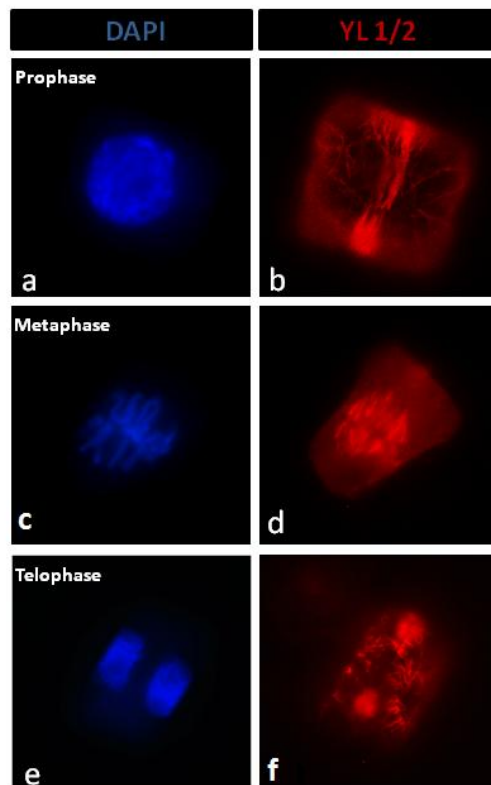
**Figura 7** - Imunodeteção indirecta do anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina YL 1/2 (vermelho) em células interfásicas de ápice radicular de *Secale cereale* de plântulas expostas a *stress* térmico e corados com DAPI (azul). **(a)** e **(b)** Núcleo com contornos irregulares. Microtúbulos corticais muito curtos e finos. **(c)** e **(d)** Núcleo com um nucléolo ao centro e blocos com marcação mais intensa agrupados no topo da célula. MTs com várias direcções. **(e)** e **(f)** Núcleo com dois nucléolos. Conseguem-se visualizar vários blocos de DNA com marcação mais intensa localizados na parte inferior da célula; **(g)** e **(h)** célula com contornos irregulares e cromatina pouco uniforme. MTs desorganizados, pouco numerosos e com marcação pouco intensa.



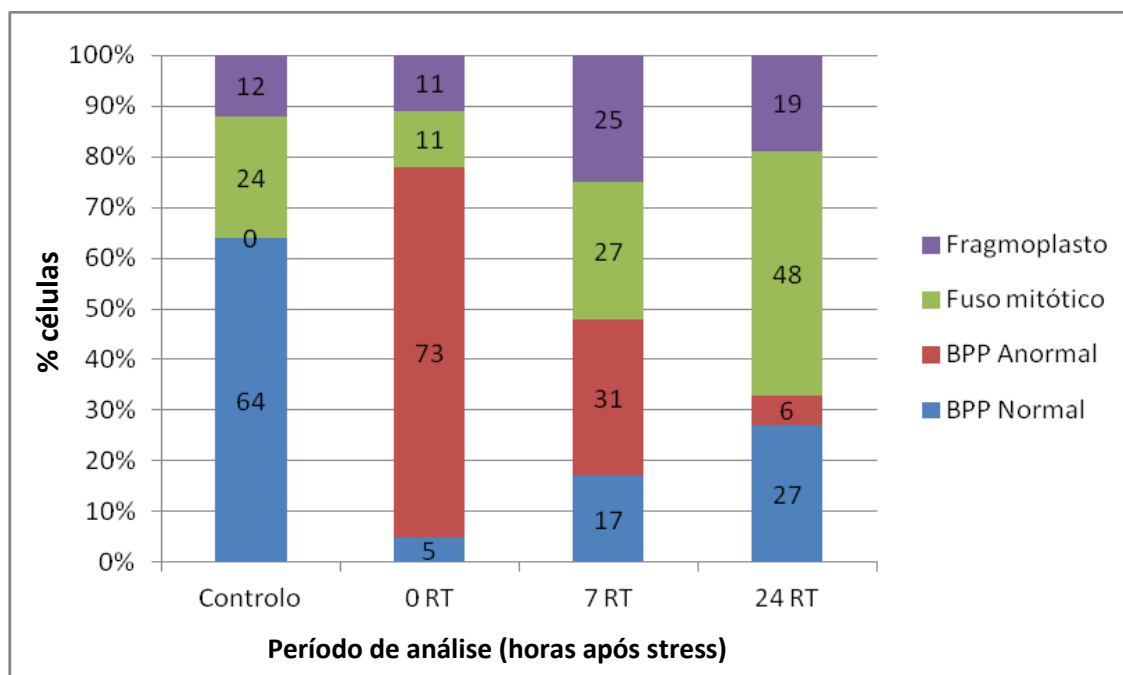
**Figura 8** – Frequência dos tipos de configuração padrão de microtúbulos corticais observados em células interfásicas (anticorpo YL ½) de ápices radiculares de plântulas de *Secale cereale* em condições de controlo e após os diferentes períodos de recuperação (0, 7 e 24 RT), 2 dias após a germinação das sementes.



**Figura 9** - Imunodeteção indirecta do anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina YL ½ (vermelho) em células mitóticas de ápice radicular de *Secale cereale* de plântulas expostas a stress térmico e corados com DAPI (azul). **(a)** e **(b)** Célula em profase. Microtúbulos corticais muito curtos e desorganizados, banda pré-profásica surge com aspecto diferente do controlo apresentando-se mais intensa na zona cortical e menos intensa no centro. **(c)** e **(d)** Célula em metafase.. Célula em telofase (7 RT) com MTs corticais finos, muito curtos e desorganizados, com fragmoplasto desorganizado.



**Figura 10** – Frequência dos tipos de configuração padrão de microtúbulos corticais observados em células mitóticas (anticorpo YL ½) de ápices radiculares de plântulas de *Secale cereale* em condições de controlo e após os diferentes períodos de recuperação (0, 7 e 24 RT), 2 dias após a germinação das sementes. BPP – banda pré-profásica,



Posteriormente, foi determinado o índice mitótico no controlo e para os diferentes períodos de recuperação após *stress* térmico. No controlo o índice mitótico era de 6%, tendo diminuído às 0 RT para 3%. Após 7 RT registou-se um aumento para 18%, três vezes superior ao controlo. Contudo, após 24h de recuperação a frequência desceu significativamente (9%) (tabela 1). Os resultados apontam para diferenças significativas entre as frequências do índice mitótico ( $\chi^2=49.72$ , Df=3, p=0.95).

**Tabela 1** - Índice mitótico observado imediatamente após *stress* térmico (0 RT), 7 e 24 horas após *stress*.

Fase	Índices			
	Controlo (%)	0 RT (%)	7RT (%)	24RT (%)
Interfase	94	97	82	91
<b>Mitose</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>18</b>	<b>9</b>
Total	100	100	100	100

## 6. Discussão dos resultados e conclusão

O *stress* térmico, 4h a 40 °C nos ápices radiculares de *S. cereale*, induziu alterações na morfologia do núcleo, no índice mitótico e na dinâmica do citoesqueleto microtubular em interfase e mitose. Porém, não se observaram diferenças entre as marcações dos anticorpos anti  $\alpha$ -tub total e  $\alpha$ -tubulina tirosinada na extremidade carboxilo terminal, o que sugere que o *stress* térmico não afecta esta modificação pós tradução da  $\alpha$ -tubulina.

Analisando a evolução das frequências obtidas para os diferentes tempos de recuperação em relação ao controlo, observou-se que a frequência de células normais desceu drasticamente até atingir o valor mínimo às 7 RT, aproximando-se dos valores do controlo 24 horas após *stress*. Relativamente à frequência de células com micronúcleos esta duplicou às 0 e 7 RT, atingindo o valor máximo neste último período de recuperação. A presença de micronúcleos em núcleos interfásicos resulta de erros na disjunção dos cromossomas durante a anafase, com consequente perda de cromossomas inteiros ou fragmentos. As anomalias no citoesqueleto, devido a *stress* são responsáveis por estas formações. Às 24 RT, as frequências de núcleos normais eram semelhantes ao controlo. O índice mitótico variou relativamente ao controlo nos diferentes tempos de recuperação, com o valor máximo em 7 RT, mantendo-se elevado às 24 RT. A análise estatística dos resultados obtidos permite afirmar que, relativamente à conformação apresentada pelos núcleos interfásicos após *stress* térmico, as diferenças detectadas nos diferentes períodos de recuperação são significativas comparando com o controlo ( $\chi^2 = 424.97$ ,  $P < 0.05$ ).

Em células interfásicas, imediatamente após *stress* (0 RT) observou-se o aumento de 2 para 84% da frequência de células com microtúbulos alterados (ondulados e ramificados), tendo havido uma redução para 63% das células com microtúbulos alterados às 7RT. Após 24h do período de recuperação, verificou-se uma redução muito significativa de células interfásicas com anomalias, apresentando frequências similares às do controlo, havendo portanto, recuperação total do citoesqueleto. Em relação aos MTs mitóticos detectou-se uma frequência mais elevada de células em profase às 0 RT (78%) comparativamente com o controlo. Às 7 RT houve diminuição da frequência de células em profase e um aumento de células em anafase e telófase, em relação ao controlo. A maioria das células em profase apresentava BPP com anomalias. Em 7 RT houve diminuição da frequência de células em profase e um aumento de células em anafase e telofase, embora com as configurações típicas observadas no controlo.

Em células de *N. tabacum*, os microtúbulos interfásicos e a banda pré-profásica formam os arranjos mais estáveis, permanecendo inalterados 2 h após *stress* térmico (38°C), enquanto o fuso mitótico e fragmoplasto são bastante afectados. Relativamente ao fuso mitótico detectaram-se três grandes tipos de anomalias: (i) divisão em várias partes (fragmentado), (ii) formação atípica de MTs finos e longos e (iii) indução de novos focos de polimerização (Smertenko *et al.*, 1997b). No presente trabalho, os resultados obtidos sugerem que os arranjos dos MTs mitóticos são muito sensíveis ao *stress* térmico, possivelmente devido às diferentes estruturas que têm de formar (banda pré-profásica, fuso mitótico, fragmoplasto, etc) num curto espaço de tempo, ou seja, são muito dinâmicos.

Em *S. cereale*, as células interfásicas mostraram uma recuperação total do citoesqueleto às 24 RT apresentando frequências similares às do controlo. Contudo, o citoesqueleto microtubular das células mitóticas não estava ainda completamente recuperado após este período de recuperação. Também as frequências de cada uma das fases da mitose

diferem das do controlo, observando-se cerca de metade das células em profase e o dobro das células em anafase. Provavelmente a inexistência de citoesqueleto microtubular apropriado em interfase, leva à acumulação de mitoses anormais, tal como foi observado em células vegetais expostas a concentrações elevadas de colquicina (droga que induz a despolimerização dos MTs) (Caperta et al., 2006).

Com este estudo, conclui-se que a exposição de ápices radiculares de *S. cereale* a *stress* por calor provoca alterações na morfologia dos núcleos interfásicos verificando-se que a morfologia nuclear aparenta resultar da organização do citoesqueleto microtubular, dado que a sua reorganização total às 24 RT possibilita a visualização da maioria dos núcleos com morfologia normal, em frequência aproximadamente semelhante à observada nas células do controlo. As alterações na organização dos microtúbulos corticais em células interfásicas parecem também contribuir para a formação de BPP anómalas imediatamente após *stress* térmico. Contudo, estas alterações do citoesqueleto são temporárias, uma vez que as células mitóticas são capazes de polimerizar microtúbulos formando as configurações usuais observadas em plantas superiores quando as plântulas recuperam do *stress*.



## 7. Bibliografia

**Alberts, B.;** Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004) *Biologia Molecular da Célula*. 4 ed., Tradução: Beatriz Gorini da Veiga *et al.*, Porto Alegre; Artmed. pp. 192-985

**Bulinski, J. C.;** Richards, J. E. and Piperno, G. (1988) Modifications of  $\alpha$ -Tubulin: Detyrosination and Acetylation Differentiate Populations of Interphase Microtubules. The Rockefeller University Press, *The Journal of Cell Biology* 106: 1213-1220

**Caperta, A. D.;** Delgado, M.; Ressurreição, F.; Meister, A.; Jones, R. N.; Viegas, W.; Houben, A. (2006) Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma* 227: 147-153

**Criqui, M. C. and Genschik P.** (2002) Mitosis in plants: how far we have come at the molecular level? Elsevier, *Current Opinion in Plant Biology* 5: 487-493

**Cyr, R. J. e Palevitz, B** (1995) Organization of cortical microtubules in plant cells. Elsevier, *Current Opinion in Cell Biology* 7: 65-71

**Duckett, C. M. e Lloyd, C. W.** (1994) Giberellic acid-induced microtubule reorientation in dwarf pea is accompanied by rapid modification of an  $\alpha$ -tubulin isotype. *Plant* 5: 363-372

**Gilmer, S.;** Clay, P.; Macrae, T. H. e Fowke, L. C. (1999) Tyrosinated, but not detyrosinated,  $\alpha$ -tubulin is present in root tip cells. *Protoplasma* 210: 92-98

**Hashimoto, T.** (2003) Dynamics and regulation of plant interphase microtubules: a comparative view. Elsevier, *Current Opinion in Plant Biology* 6: 568-576

**Kerr, G. P. e Carter, J. V.** (1990), Tubulin isotypes in Rye roots are altered during cold acclimation. *Plant Physiology* 93: 83-88

**Mayer, U. e Jürgens, G.** (2002) Microtubule cytoskeleton: a track record. Elsevier, *Current Opinion in Plant Biology* 5: 494-501

**Müller, J;** Menzel, D; Šamaj, J. (2007), Cell-type-specific disruption and recovery of the cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* epidermal root cells upon heat shock stress. Springer, *Protoplasma* 230: 231-242

**Sanchez, M.;** Caro, E; Desvoyes, B.; Ramirez-Parra, E (2008), Chromatin dynamics during plant cell cycles. Elsevier, *Seminars in Cell & Development Biology* 19: 537-546

**Schmit, A. C. e Nick, P.** (2008), Microtubules and the evolution of mitosis in Plant Microtubules: Development and flexibility, 2nd Edit., Peter Nick Ed., Springer, 233-254

**Smertenko, A.;** Blume, Y.; Viklický, V. e Opatrný, Z. e Dráber, P. (1997), Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. Springer, *Planta* 201: 349-359 (a)

**Smertenko, A.;** Dráber, P.; Viklický, V. e Opatrný, Z. (1997), Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant, Cell and Environment* 20: 1534-1542 (b)

**Vanstraelen, M.;** Inzé, D.; Geelen, D. (2006) Mitosis-specific kinesins in *Arabidopsis*. Elsevier, TRENDS in Plant Science 4: 167-175