



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

KAROLLYNY ROGER PEREIRA LIMA

**EFEITO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INDUZIDO POR
DITIOTREITOL E TUNICAMICINA EM PLANTULAS DE SORGO: ASPECTOS
MOROFISIOLÓGICOS E METABÓLICOS**

FORTALEZA

2020

KAROLLYNY ROGER PEREIRA LIMA

EFEITO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INDUZIDO POR
DITIOTREITOL E TUNICAMICINA EM PLANTULAS DE SORGO: ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS E METABÓLICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho.

Coorientador: Prof. Dr. Enéas Gomes-Filho.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L698e Lima, Karollyny Roger Pereira.
Efeito do estresse do retículo endoplasmático induzido por ditiotreitol e tunicamicina em plantulas de sorgo: aspectos morfofisiológicos e metabólicos / Karollyny Roger Pereira Lima. – 2020.
74 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho.
Coorientação: Prof. Dr. Enéas Gomes-Filho.
1. Metabolômica. 2. Espectrometria de massas. 3. Estresse Abiótico. I. Título.

CDD 572

KAROLLYNY ROGER PEREIRA LIMA

EFEITO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INDUZIDO POR
DITIOTREITOL E TUNICAMICINA EM PLANTULAS DE SORGO: ASPECTOS
MOROFOFISIOLÓGICOS E METABÓLICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ana Luiza Sobral Paiva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, irmãos e avós.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora por serem minha força e proteção e por iluminarem sempre meus caminhos.

Aos meus pais, Lúcia e Jorge, por sempre me proporcionarem a melhor educação possível, por serem alicerces sólidos, amparo, consolo e exemplo, a vocês todo meu amor e dedicação.

Aos meus irmãos, Eduardo e Gleison, por serem meus primeiros amigos, mesmo com todas as nossas diferenças, por todo amor e companheirismo.

Aos meus avós, Elsa e Chico (*in memorium*), por serem exemplo de amor fraterno, por estarem comigo em todos os momentos, por todas as conversas e conselhos.

Ao professor Dr. Humberto Henrique de Carvalho, pela orientação, apoio, conhecimento, e amizade transmitidos a mim ao longo desses anos que embarquei no meio científico, minha gratidão.

Ao professor Dr. Enéas Gomes-Filho, por compartilhar o laboratório e seu conhecimento, e por todas as conversas sempre motivadoras que tivemos.

Ao professor Dr. Ítalo Antônio Cotta Coutinho, por ceder seu tempo, conhecimento e laboratório para a execução de parte deste trabalho, muito obrigada.

Aos membros da banca examinadora: prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso, Dra. Ana Luiza Sobral Paiva, por aceitarem o convite, e pelas críticas e sugestões ao trabalho.

Aos amigos e companheiros desse trabalho: Stelamaris de Oliveira Paula-Marinho, obrigada pela sua amizade, companheirismo, colo e conhecimentos ofertados a mim; Lucas Pacheco, obrigada por toda ajuda, por todas as conversas, e pela amizade sempre presente; Isabelle Mary, obrigada pela paciência em me ajudar e ensinar sempre que precisei, pelo companheirismo e amizade.

Aos queridos IC's, Savio e Anderson, obrigada por toda ajuda nessa jornada e por trazerem boas risadas nos momentos complicados desse trabalho.

Aos colegas de laboratório, Gyedre, Lineker, Dalton, Igor, Cibelle, Daniel e Pedro por toda ajuda e bons momentos compartilhados.

Àqueles que escolhi para estarem comigo e que tornaram todos esses anos mais leves, aos meus amigos: Jacqueline, Debora, Daniele, Thiago, Lyvia, Kyvia, Isabel, Danilo, Ian, Bia, Rayssa, Brenda, Lucas, Marcelo, Mariana, Hilana, Rayanne, Isabelle, Ana Beatriz, Thays, Vanessa A., Marcelle, Vanessa, Joanna, Matheus, Jucilene e Mayara.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, bem como aos meus colegas do curso de mestrado da bioquímica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), que concederam auxílio financeiro para execução deste trabalho.

A Central Analítica da UFC, especialmente ao técnicos João Victor Nunes, por todo auxílio e orientação prestados no uso dos equipamentos.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), representado pelo Dr. José Nildo Tabosa, por sempre fornecer as sementes para este e outros trabalhos do laboratório.

E por fim, a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho e que não foram citados.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e
sim a caminhada. Caminhando e semeando, no
fim terás o que colher.” Cora Carolina

RESUMO

Diversos fatores ambientais podem perturbar a homeostase do retículo endoplasmático (RE), desde estresses abióticos como salinidade, seca, altas temperaturas, como também estresses bióticos, como patógenos e herbivoria. Essa perturbação pode levar a um acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE ocasionando uma condição de estresse; e desse modo ativando uma via citoprotetora, denominada *Unfolded Protein Response* (UPR). Em laboratório, UPR e estresse do RE são também induzidos por diversos agentes químicos, como por exemplo ditiotreitól (DTT) e tunicamicina (TM). Desse modo, o objetivo desse trabalho foi a indução do estresse do RE, por DTT e TM, avaliando alterações morfofisiológicas e metabólicas na parte aérea e nas raízes de sorgo. Para isso, plântulas foram germinadas por três dias somente em água destilada, em seguida transferidas para solução de Clark meia força e submetidas ao estresse do RE por meio da adição de 10mM de DTT e 2.5 µg/ml de TM, individualmente, durante quatro dias e avaliadas a cada 24 horas. Pequenas diferenças foram observadas no peso seco da parte aérea somente nas primeiras 24 e 48 h, enquanto que no comprimento houve diminuição desde 24h no tratamento com TM e 48h no tratamento com DTT. Por outro lado, raízes sob DTT e TM apresentaram uma considerável diminuição tanto na massa seca quanto no comprimento. Raízes tratadas com DTT apresentaram um maior comprimento e menor massa seca em relação às tratadas com TM, que por sua vez apresentou uma maior quantidade de raízes secundárias e maior o comprimento de pelos radiculares. Os diferentes indutores do estresse do RE exibiram diferentes respostas metabólicas tanto na parte aérea quanto nas raízes. Aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos, e outros grupos de metabólitos foram significativamente aumentados ou reduzidos pelo estresse do RE. A parte aérea apresentou uma modulação de 23 e 13 metabólitos nos tratamentos de DTT e TM, respectivamente. Por sua vez, esse número nas raízes foi maior com 37 e 17 metabólitos nas plântulas com DTT e TM, respectivamente. Carboidratos foi o grupo que apresentou maiores diferenças estatísticas tanto na parte aérea quanto raízes. Maltose foi o metabólito com uma maior acumulação nos tempos iniciais, enquanto kestose exibiu maior acúmulo nos tempos finais, esse metabólito também contribuiu para separação de perfis metabólicos nos tempos de 48 e 72h das raízes tratadas com DTT e 72h com TM. Enquanto que ácido glicérico e ácido pirúvico mostraram uma contribuição significativa nas raízes de DTT nos estágios iniciais. Alguns aminoácidos apresentaram um acúmulo nas primeiras horas de tratamento e diminuição de outros nas últimas horas, essa diminuição pode significar uma compensação para as plântulas conseguirem lidar com a condição na qual elas estão submetidas. De modo geral, as raízes das plântulas tratadas

com indutores do estresse do RE apresentaram mais diferenças significativas que a parte aérea. Além disso, na parte aérea, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos mobiliza o acúmulo de aminoácidos nos estágios iniciais, enquanto que nos estágios mais tardios observa-se um maior acúmulo de açúcares. Enquanto que nas raízes observa-se uma inibição tanto da glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e metabolismo de aminoácidos sendo mais evidente em plântulas tratadas com DTT. Isto pode estar relacionado ao fato desse órgão ser o primeiro a ter contato com o estressor e desse modo tentar atenuar os efeitos na parte aérea.

Palavras-chave: Metabolômica. Espectometria de massas. Estresse Abiótico.

ABSTRACT

Adverse environmental conditions can disturb endoplasmic reticulum (ER) homeostasis, from abiotic stresses such as salinity, drought, high temperatures, as well as biotic stresses, such as pathogens and herbivory. This disturbance can lead to an accumulation of misfolded proteins in the lumen, causing an ER stress condition, and thereby activating a cytoprotective pathway, called Unfolded Protein Response (UPR). ER stress and UPR are also induced, in the laboratory, by several chemicals, such as dithiothreitol (DTT) and tunicamycin (TM). Thus, the aim of this work was the induction of ER stress by DTT and TM, evaluating their morphophysiological and metabolic variations in sorghum shoots and roots. For this, seedlings were germinated three days in distilled water, then transferred to half-strength Clark's solution and subjected to ER stress by adding 10 mM DTT and 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ TM, individually, for four days and evaluated every 24 hours. The shoots dry mass (SDM) had slight differences only at 24 and 48h, while the shoot length (SL) decreased from 24 h in the treatment with TM and 48 h in the treatment with DTT. On the other hand, roots under DTT and TM showed a considerable decrease in both dry mass and length from 24h. Under DTT, roots showed longer length and less root dry mass than under TM, which had a wider abundance of secondary roots and a longer root hair length than DTT. Amino acids, organic acids, carbohydrates, and other groups of metabolites were significantly increased or reduced by ER stress. The shoots had a modulation of 23 and 13 metabolites by DTT and TM, respectively. In turn, the roots had a modulation 37 and 17 metabolites by DTT and TM, respectively. Carbohydrates were the group that showed the highest statistical differences in both shoot and roots. Maltose was the metabolite with the highest accumulation in the initial stages, while Kestose exhibited the highest accumulation in the final stages. Conversely, it was contributed to the separation of roots metabolic profiles of 48 and 72h under DTT, and 72h under TM. Whereas glycolic acid and pyruvic acid showed a significant contribution to the roots under DTT in the early stages. Some amino acids were accumulated in the first hours but others were decreased in the last hours. In general, the roots of seedlings under both ER stressors showed more significant differences than shoots. Besides, in shoots, the cycle of tricarboxylic acids mobilizes amino acid accumulation in the early stages, while in the later stages there was an accumulation of sugars. In roots, inhibition of both glycolysis, the cycle of tricarboxylic acids, and metabolism of amino acids are observed, being more evident in seedlings under DTT. This may be related to the fact that this organ is the first to have contact with the stressor and thus try to mitigate the effects on the shoots.

Keywords: Metabolomics. Mass spectrometry. Abiotic Stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mecanismos moleculares de ativação das respostas ao estresse do retículo endoplasmático. 24
- Figura 2 – Growth measurements of sorghum seedlings under endoplasmic reticulum (ER) stress over timer of development. Three days old seedlings were grown under control, tunicamycin (TM), and dithiothreitol (DTT) treatments, over time (24, 48, 72, and 96 h), until they reach seven days old..... 44
- Figura 3 – Hair length of sorghum main roots of seedlings under endoplasmic reticulum (ER) stress and illustrative photomicrography images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of root hairs after 72 h of stress, white bars represent 100 μm 45
- Figura 4 – Two-dimensional principal component (PC) analysis of sorghum grown under endoplasmic reticulum (ER) stress by TM and DTT. The percent variance accounted for each PC is indicated on the X and Y axis; for shoots (A) and roots (C). The loading plot for shoots (B) and shoots (D) indicate the positive and negative contributions of each metabolite..... 46
- Figura 5 – Principal Component Analysis (PCA) of metabolic profiling in shoots (left) and roots (right) of sorghum, cv. CSF 20 grown under control treatment (A and B), or endoplasmic reticulum (ER) stress by DTT (C and D), and Tunicamycin (E and F) overtime (0-96 h of treatment)..... 48
- Figura 6 – S-plots of metabolites in shoots of sorghum cv. CSF 20 grown with dithiothreitol (DTT) and tunicamycin. In highlighted the metabolites that had a more contribution to the stressed seedlings (top right) and to the control (bottom left) 50

Figura 7	– S-plots of metabolites in roots of sorghum cv. CSF 20 grown with dithiothreitol (DTT) and tunicamycin. In highlighted the metabolites that had a more contribution to the stressed seedlings (top right) and to the control (bottom left)	52
Figura 8	– Heat map representation of the relative abundance of 75 detected metabolites by CG-MS in shoots of sorghum, under RE stress by dithiothreitol (DTT) and Tunicamycin (TM)	55
Figura 9	– Heat map representation of the relative abundance of 74 detected metabolites by CG-MS in roots of sorghum, under RE stress by dithiothreitol (DTT) and Tunicamycin (TM)	56
Figura 10	– Metabolic pathway changed by ER stress in shoots of sorghum grown under different ER stress inducer (DTT and TM). The colors indicate the significant fold change of metabolites according to T-test ($p < 0.05$)	64
Figura 11	– Metabolic pathway changed by ER stress in roots of sorghum grown under different ER stress inducer (DTT and TM). The colors indicate the significant fold change of metabolites according to T-test ($p < 0.05$)	65
Figura S1	– Sorghum plants cv. CSF 20 grown in the absence (a) or presence of ER stress inducers DTT (b) and TM (c) over analysis times (24, 48, 72 and 96h).	72
Figura S2	– Loading plot of metabolic profiling in shoots (left) and roots (right) of sorghum grown under control treatment (A and B), or endoplasmic reticulum (ER) stress by DTT (C and D), and Tunicamycin (E and F) overtime (0-96 h of treatment).	75

LISTA DE TABELAS

Tabela S1 – List of detected metabolites in shoots and roots of sorghum with their classification in compound types, retention time, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes identifier number (KEGG ID)	73
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bZIP	<i>Basic leucine zipper</i>
cv.	Cultivar
DTT	Ditieritol
IRE1	<i>Inositol requiring enzyme 1</i>
OPLS-DA	<i>Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
TCA cycle	Ciclo do ácido tricarboxílico
TM	Tunicamicina
UPR	Resposta a proteínas mal dobradas (do Inglês <i>Unfolded Protein Response</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	20
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
4.1	Reticulo Endoplasmático.....	21
4.2	Mecanismos moleculares de resposta ao estresse do RE.....	22
4.3	Promotores químicos do estresse do RE	24
4.4	Estresse do RE e o desenvolvimento das plantas	25
4.5	Metabolômica como estratégia para o estudo de estresses abióticos	26
4.6	Sorgo.....	27
5	MANUSCRITO.....	34
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68