

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

**DEFESA ANTIOXIDATIVA EM PLANTAS DE ARROZ DUPLAMENTE
SILENCIADAS NAS APX_s CITOSÓLICAS E EXPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS**

ADILTON DE VASCONCELOS FONTENELE

FORTALEZA – CEARÁ

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**DEFESA ANTIOXIDATIVA EM PLANTAS DE ARROZ DUPLAMENTE
SILENCIADAS NAS APXs CITOSÓLICAS E EXPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS**

ADILTON DE VASCONCELOS FONTENELE

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO PARTE
DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM BIOQUÍMICA.

FORTALEZA – CEARÁ

2011

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

A transcrição de qualquer trecho desta monografia será permitida desde que seja feita com as normas da ética científica.

Adilton de Vasconcelos Fontenele

Dissertação aprovada em _____ de _____ de 2011

Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, Dr.

(UFC/DBBM – Orientador)

Sérgio Luiz Ferreira da Silva, Dr.

(UFC/DBBM – Conselheiro)

Luiz Ferreira Aguiar Ponte, Dr.

(UVA – Conselheiro)

Dedico este trabalho a minha mãe Maria de Vasconcelos Fontenele e minhas irmãs Cíntia e Cristiana de Vasconcelos Fontenele. E em especial ao meu pai **José Crisostomo Fontenele** (*In Memoriam*), pois sei o quanto minhas vitórias significavam para ele...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nos conceder o dom da vida e nos proporcionar momentos que só são explicados por sua presença em nossas vidas.

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, por sua orientação não apenas na vida acadêmica, mas principalmente por seus ensinamentos para a vida.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva, por aceitar participar da banca examinadora, por seus ensinamentos, amizade, brincadeiras e ótima convivência.

Ao Prof. Dr. Eduardo Luiz Voigt, pelo respeito, amizade, atenção, doação, preocupação, desprendimento e principalmente por ser a pessoa iluminada que é.

Ao Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima, por todos os ensinamentos, pelo exemplo, brincadeiras, conselhos, respeito e preocupação.

Ao Prof. Dr. Josemir Moura Maia, pelas brincadeiras, ensinamentos, doação e amizade. Que esses laços se tornem cada vez mais fortes, mesmo a distância.

Ao Prof. Dr. Luiz Aguiar Ponte por ter aceitado participar da banca examinadora e por seus ensinamentos constantes.

A amiga Edinilda (Nêga), por ser um dos mais importantes membros do LABPLANT e por sua amizade, suas brincadeiras, pelo café, dentre outros.

Aos colegas de laboratório Ana Karla, Aurenívia, Fabrício, Márcio e Milton pela ajuda com os experimentos e aprendizado conjunto. Aos demais (Evandro, Jamille, Marcos, Raquel Ribeiro, Rachel, Samuel, Tathiana, Rafael, Cristina, Cinthya, Naélia, e a todos que passaram pelo LABPLANT) convivência sadia.

AGRADEÇO EM ESPECIAL

A Maria de Vasconcelos Fontenele (minha mãe) pela força e encorajamento nos momentos mais difíceis de minha vida, as minhas irmãs Cíntia e Cristiana, em fim a toda minha família que é a minha força e uma das razões de minha existência e batalha.

Ao grande amigo João Paulo Matos Santos Lima (JP), o irmão que não tive, pela verdadeira amizade, por toda a ajuda, atenção e compreensão. Muito obrigado!!!

Em fim, obrigado a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio financeiro das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará - UFC
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa – FUNCAP
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. Introdução geral	13
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. Fotossíntese e Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	16
2.2. Espécies reativas de oxigênio: Estresse oxidativo.....	21
2.3. Estresses abióticos	27
2.4. Ascorbato Peroxidases (APXs).....	30
2.5. Sistemas de defesa antioxidativa	34
3. Objetivos.....	42
3.1. Objetivo geral.....	42
3.2. Objetivos específicos	43
4. Material e Métodos	44
4.1. Obtenção das plantas.....	44
4.2. Aplicação dos estresses.....	44
4.3. Medidas de fluorescência da clorofila <i>a</i> e trocas gasosas.....	45
4.4. Determinações fisiológicas e bioquímicas	46

4.5. Atividade de enzimas antioxidantes.....	50
5. Resultados	53
5.1. Experimento I.....	53
5.2. Experimento II	61
6. Discussão	75
7. Conclusões	83
8. Referências Bibliográficas	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Interconversão de espécies reativas de oxigênio (ERO) derivadas do oxigênio (O₂).

Figura 2 – Modelo para a resposta de um sistema vegetal a aplicação de estresses no contexto de produção de ERO, estresse oxidativo e morte celular (MULLINEAUX & BAKER, 2010).

Figura 3 – Sistemas de remoção de espécies reativas de oxigênio em plantas superiores (SHIGEOKA et al., 2002).

Figura 4 – Destino da energia dos fótons absorvidos pela clorofila nos cloroplastos em várias intensidades de fótons.

Figura 5 – Vazamento de eletrólitos (A) e peroxidação de lipídios (B) em segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 24h com metil-viologênio 50 µM.

Figura 6 – Conteúdo de peróxido de hidrogênio em segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 24h com metil-viologênio 50 µM.

Figura 7 – Aspecto visual dos segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 24h com metil-viologênio 50 µM.

Figura 8 – Degradação de clorofilas dos segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 24h com metil-viologênio 50 µM.

Figura 9 – Atividade das enzimas citosólicas e cloroplásticas peroxidase do ascorbato (cAPX/chlAPX) (A/B), fosfolipídio hidroperóxido glutationa peroxidase (cPHGPx/chlPHGPx) (C/D) e dismutase do superóxido (cSOD/chlSOD) (E/F) em segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 3h com metil-viologênio 50 µM.

Figura 10 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Eficiência quântica atual do PSII (A), taxa de transporte de elétrons através do PSII (B).

Figura 11 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. *Quenching* fotoquímico (A), *quenching* não fotoquímico (B).

Figura 12 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Eficiência quântica potencial do PSII (A) e excesso de energia relativa ao PSII (B).

Figura 13 – Trocas gasosas em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Fotossíntese em plantas

tratadas com MV 50 μ M por 12h (A) e curva de fotossíntese em plantas tratadas com NaCl-100 mM ou não durante sete dias (B).

Figura 14 – Vazamento de eletrólitos (A) e peroxidação de lipídios (B) em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não.

Figura 15 - Atividade de enzimas antioxidantes em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Peroxidase do ascorbato citosólica (cAPX) (A) e peroxidase do ascorbato cloroplástica (chlAPX) (B).

Figura 16 - Atividade de enzimas antioxidantes em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Fosfolipídio hidroperóxido glutathione peroxidase (cPHGPx) (A) e fosfolipídio hidroperóxido glutathione peroxidase (chlPHGPx) (B).

Figura 17 - Atividade de enzimas antioxidantes em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Dismutase do superóxido citosólica (cSOD) (A) e dismutase do superóxido cloroplástica (chlSOD) (B).

Figura 18 - Atividade de catalase em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não.

DEFESA ANTIOXIDATIVA EM PLANTAS DE ARROZ DUPLAMENTE SILENCIADAS NAS APXs CITOSÓLICAS E EXPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS

Autor: Adilton de Vasconcelos Fontenele

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar aspectos fisiológicos e bioquímicos que mostrem se plantas de arroz (*Oryza sativa*) deficientes da enzima citosólica peroxidase do ascorbato (cAPX) são mais suscetíveis ao estresse oxidativo do que as plantas com cAPX. A APX é uma importante enzima do metabolismo oxidativo de plantas, atuando na regulação dos níveis endógenos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para isso, plantas deficientes em cAPX (Apx1/2s) e plantas não transformadas (WT) foram utilizadas para a experimentação. As plantas foram silenciadas pela técnica do RNA de interferência (iRNA) e cultivadas por 35 dias em vasos de 1.5 L contendo solução nutritiva sob condições de casa de vegetação. O experimento I foi realizado com segmentos de folhas imersos em metil-viologênio (MV) 50 μ M durante 24h, e o experimento II foi realizado pela aplicação dos seguintes estresses abióticos: salinidade, alta luminosidade e MV. Os resultados do experimento I mostraram que as plantas Apx1/2s possuem um nível basal de H_2O_2 maior do que os níveis encontrados nas plantas WT, sugerindo que as plantas Apx1/2s apresentam um nível de H_2O_2 próximo de um nível de sinalização celular. O fato das plantas WT terem acumulado H_2O_2 após 1h de tratamento sugere a necessidade de um nível sinalizador de H_2O_2 para ativação dos sistemas de defesa. As plantas Apx1/2s ao contrario das WT apresentaram uma queda constante no conteúdo de H_2O_2 , indicando uma provável remoção do excesso de H_2O_2 . Após 3h de tratamento as enzimas SOD, APX e PHGPx de cloroplasto apresentaram atividade superior nas plantas Apx1/2s, tanto no controle quanto no estresse, comparadas com as plantas WT. Esses resultados sugerem existência de um sistema antioxidante bastante ativado nas plantas Apx1/2s. No experimento II as plantas Apx1/2s não apresentaram diferenças nos parâmetros fotoquímicos quando comparadas com as plantas WT, mesmo possuindo uma menor fotossíntese em condições controle. A dissipação do excesso de energia (NPQ) nas plantas Apx1/2s tratadas com luz foi, em média, maior que das plantas WT, indicando uma possível maior eficiência na dissipação de energia. Mesmo com eficiente dissipação de energia ambas as plantas não conseguiram evitar energia excessiva no fotossistema e acabaram sofrendo fotoinibição ($\Delta F/Fm'$) e danos no aparato fotossintético (Fv/Fm). Em relação às plantas WT, as Apx1/2s apresentaram maior atividade das enzimas antioxidativas SOD, CAT e PHGPx nas condições controle, na provável tentativa de compensar a ausência da cAPX. No tratamento com MV a isoforma cloroplástica da PHGPx foi estimulada em mais de 100% nas plantas Apx1/2s, indicando que essas plantas podem reparar danos oxidativos com mais rapidez que as WT. Os dados sugerem que as plantas Apx1/2s, apesar da ausência da cAPX, ativam sistemas adicionais de proteção antioxidativa para compensar essa ausência e responder mais rápida e eficientemente a situações de estresse.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, estresse oxidativo, fluorescência da clorofila *a*, peroxidase do ascorbato, estresse foto-oxidativo

DEFESA ANTIOXIDATIVA EM PLANTAS DE ARROZ DUPLAMENTE SILENCIADAS NAS APXs CITOSÓLICAS E EXPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS

Autor: Adilton de Vasconcelos Fontenele

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize physiological and biochemical aspects that show if rice plants (*Oryza sativa*) knockdown on cytosolic ascorbate peroxidase enzyme (cAPX) are more susceptible to oxidative stress than the wild type plants. APX is an important enzyme from oxidative metabolism of plants, acting on regulation of the endogenous levels of hydrogen peroxide (H_2O_2). For this, rice plants knockdown on cAPX (Apx1/2s) and wild type (WT) were used for the experimentation. The plants were silenced by interference RNA technical (iRNA) and were grown for 35 days into 1.5 L pots containing nutritive solution under greenhouse conditions. The experiment I was performed with leaves segments immersed in methyl viologen (MV) 50 μ M for 24h and the experiment II was performed by application of the following treatments: salt stress, high light and MV. The results from experiment I shown Apx1/2s plants have a higher level of H_2O_2 high than the levels found on WT rice plants, suggesting that Apx1/2s plants present a level of H_2O_2 near a level of cell signaling. The fact of WT plants had accumulated H_2O_2 1h after the treatment suggest the necessity of a signaling H_2O_2 level for stimulate defense systems. Apx1/2s plants unlike of WT plants presented a constant decline on H_2O_2 content, indicating a likely H_2O_2 scavenging excess. After 3h of treatment the chloroplastic enzymes SOD, APX and PHGPx presented upper active in Apx1/2s plants, in control and stress, compared with WT plants. These results suggest the existence of an antioxidant system quite active in the Apx1/2s plants. In experiment II the Apx1/2s plants presented no differences in the photochemical parameters when compared with WT plants, even possessing a smaller photosynthesis under controlled conditions. The energy dissipation (NPQ) in the Apx1/2s plants under high light was, in average, higher than WT plants, suggesting better energy dissipation. Even with efficient energy dissipation, the plants could not avoid the excess of energy in the photosystem and they suffered photoinhibition and damage in photosynthetic apparatus (Fv/Fm). In relation the WT plants, Apx1/2s plants presented a higher activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and PHGPx under controlled conditions, probably intending compensate the lack of cAPX. In the MV treatment the chloroplastic PHGPx was stimulated above 100% in the Apx1/2s plants, indicating that these plants can repair oxidative damage faster than the WT plants. The results suggest that Apx1/2s plants, despite the absence of cAPX, activated additional security systems to compensate the lack of cAPX and respond quickly and efficiently to stress situations.

Key words: *Oryza sativa*, oxidative stress, chlorophyll fluorescence, ascorbate peroxidase, photo-oxidative stress

1) INTRODUÇÃO GERAL

Alguns elementos químicos presentes na natureza, e também nos organismos vivos, são capazes de formar espécies reativas, as mais conhecidas e estudadas são as espécies reativas de oxigênio (ERO) (APEL & HIRT, 2004). Existem outras espécies reativas largamente estudadas como, por exemplo, as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Sabe-se que há uma interação entre as vias de produção de ERO e óxido nítrico (NO^{\bullet}) que resultam em mudanças na expressão gênica pela indução de cascatas de sinalização envolvendo GMP cíclico (cGMP) e cálcio (Ca^{+2}) em diversos eventos fisiológicos (FOYER & NOCTOR, 2000; MØLLER, JENSEN & HANSSON, 2007).

As ERO podem reagir rapidamente com importantes biomoléculas presentes nos organismos vivos (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) provocando danos permanentes ao aparato bioquímico. As ERO são responsáveis pelo surgimento de vários tipos de câncer e doenças degenerativas em células animais, principalmente relacionadas a danos causados em proteínas e moléculas de ácidos nucleicos (DNA/RNA) (WARIS & AHSAN, 2006; FRUEHAUF & MEYSKENS, 2007; MØLLER, JENSEN & HANSSON, 2007). Em organismos fotossintetizantes, como as plantas, as ERO apresentam muitos sítios de produção: cloroplastos, peroxissomos (microcorpos), mitocôndrias, apoplasto, membrana plasmática e parede celular (MITTLER, 2002; VRANOVÁ, INZÉ & BREUSEGEM, 2002). Uma das ERO mais estudada é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por ela possuir uma meia vida relativamente longa (~1 ms), permeabilidade através de membranas (aquaporinas) e função de molécula sinalizadora (MITTLER, 2002; DAVLETOVA et al., 2005; BREUSEGEM & DAT, 2006; ŠLESÁK et al., 2007; QUAN et al., 2008; MAUREL et al., 2008).

As ERO são continuamente produzidas em organismos aeróbios como subprodutos do metabolismo oxidativo e são rapidamente removidas por diferentes mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que surgiram com a evolução desses organismos (FOYER & NOCTOR, 2000; APEL & HIRT, 2004). Tanto células animais quanto vegetais possuem sistemas de produção e remoção dos diversos tipos de ERO, e quando o balanço entre produção e remoção entra em colapso a célula entra no chamado estresse oxidativo (SCANDALIOS, 2002; SHULAEV & OLIVER, 2006). As ERO mais conhecidas e estudadas, por seu envolvimento em vias metabólicas, são o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet})

e o oxigênio tripleto (O_2) (SCANDALIOS, 2002; APEL & HIRT, 2004; ASADA, 2006; JALEEL et al., 2009).

Muitos estudos estão sendo realizados com plantas no sentido de entender o efeito de alterações bioquímico-metabólicas tanto em condições controladas quanto em condições que mimetizem as condições de campo. Estudos realizados, utilizando transformação genética, produziram plantas que passavam por um processo de silenciamento ou superexpressão de genes codificadores de importantes enzimas removedoras de ERO tornando as plantas “susceptíveis” ao estresse oxidativo causado por fatores bióticos e/ou abióticos (MÜLLER-MOULÉ, HAVAUX & NIYOGLI, 2003; DAVETOVA et al., 2005; LEE et al., 2007) . O fato mais interessante em alguns desses trabalhos foi que alguns resultados foram contrários a hipótese, levando os autores a conclusões não muito precisas (KOUSSEVITZYK et al., 2008; MARUTA et al., 2010). Plantas como: *Nicotiniana tabacum* (fumo), *Arabidopsis thaliana*, *Triticum* (trigo), *Zea mays* (milho) e *Oryza sativa* (arroz) são largamente utilizadas nas pesquisas pela facilidade de manipulação (cultivo) e amplo conhecimento dos respectivos genomas (NAKAMURA et al., 2003; KAWAURA et al., 2006; THIBAUD-NISSEN et al., 2006; LIU et al., 2008; ZHOU et al., 2010).

Rizhsky et al., 2002 trabalhando com plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) silenciou genes que codificavam para peroxidase do ascorbato 1 (APX1) e uma isoforma de catalase (CAT 1) que são importantes enzimas do metabolismo oxidativo. Foram produzidas plantas silenciadas em *apx1*, *cat1* e *apx1-cat1*, ou seja, três tipos diferentes de plantas foram gerados. Os resultados obtidos mostram que as plantas que tiveram apenas um gene silenciado foram mais sensíveis ao estresse oxidativo quando comparadas as plantas duplamente silenciadas. A teoria defendida pelos autores é de que no duplo silenciamento as plantas ativaram um mecanismo de defesa redundante/alternativo que não foi ativado nas demais. Isso seria creditado a uma indução coordenada de genes metabólicos e de defesa acoplados a uma redução na atividade fotossintética.

Usando a mesma abordagem de transgenia, Davletova et al., 2005 trabalhando com plantas de *Arabidopsis thaliana* silenciadas em *apx1* obteve resultados que mostram uma alta sensibilidade das plantas transformadas a níveis moderados de intensidade luminosa. O acúmulo de H_2O_2 e proteínas oxidadas de cloroplasto foram os fatores que reforçaram a teoria de que a

APX1 é fundamental para a proteção dos cloroplastos sob condições de estresse. Diante de alguns resultados controversos e teorias baseadas em trabalhos com um único modelo vegetal, se faz necessário a ampliação de estudos com modelos não usuais que podem fornecer resultados interessantes no que diz respeito a respostas ao estresse oxidativo. Com este propósito o presente trabalho tem como hipótese que plantas de arroz duplamente silenciadas em APX citosólica (Apx1/2s) são mais sensíveis ao estresse oxidativo causado por estresses abióticos, quando comparadas as plantas tipo selvagem (WT). O mesmo tem como objetivo identificar distinções entre plantas Apx1/2s e WT nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e no acionamento de sistemas antioxidantes enzimáticos que sejam capazes de confirmar ou refutar a hipótese levantada.

2) REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fotossíntese e Fluorescência da Clorofila *a*

A fotossíntese é a forma mais importante de armazenamento da energia solar, se tornando uma importante fonte de energia para os seres vivos. Evidências indicam que a fotossíntese é um processo acidental que ocorreu não muito depois do surgimento das primeiras formas de vida e evoluiu através de rotas complexas que produziram e distribuíram os diferentes organismos e metabolismo fotossintéticos que encontramos até hoje (BLANKENSHIP, 2010). Todos os estudos realizados ao longo da primeira metade do século vinte sobre a natureza das reações fotossintéticas de luz resultaram em dois postulados fundamentais: (I) o conceito de unidade fotossintética e (II) o conceito de dois fotossistemas.

De acordo com o primeiro conceito, em todos os sistemas fotossintetizantes os pigmentos que absorvem luz estão divididos em dois grupos distintos. Apenas um par de moléculas de clorofilas altamente especializadas (centro de reação) presente em grande parte dos organismos que realizam fotossíntese poderia realizar a reação fotoquímica, enquanto que parte essencial dessas moléculas apenas absorve quantidades de luz e transferem a energia luminosa aos centros de reação. O segundo conceito postula que a reação de transferência linear de elétrons da água (H_2O) a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) é realizada pela operação de dois fotossistemas em série (JORDÁN, 2005).

No mesófilo das folhas de plantas superiores estão localizados os cloroplastos, que são as organelas onde está localizado o aparato fotoquímico e onde ocorrem as reações dirigidas pela luz (fase fotoquímica) e de fixação do carbono (fase bioquímica) no ciclo de Calvin (BLANKENSHIP, 2010). Esse aparato está localizado nas membranas internas dos tilacóides formando uma cadeia que transporta elétrons por diferença crescente de potencial de redução. As clorofilas são pigmentos essenciais para todos os organismos fotossintetizantes, sua via de biossíntese é bastante complexa podendo envolver dezessete, ou mais, passos. Existem outros pigmentos, como os carotenóides, que são essenciais para a fotoproteção e também funcionam como pigmento acessório e em muitos casos servem como moléculas reguladoras.

A maioria dos pigmentos serve como um complexo de antenas coletando luz e transferindo a energia aos centros de reação, em eucariotos fotossintetizantes que possuem

clorofila *a* (Chl *a*) e clorofila *b* (Chl *b*) as mais abundantes proteínas antena encontradas são membros de uma grande família de proteínas relacionadas estruturalmente. Algumas dessas proteínas estão relacionadas com o fotossistema II (PSII) e são chamadas de proteínas do complexo II coletoras de luz (LHCII) e outras estão associadas como o fotossistema I (PSI) e são chamadas de proteínas do complexo I coletoras de luz (LCHI), esses complexos são conhecidos como proteínas antena da clorofila *a/b*.

O complexo dos centros de reação (P680 e P700) pode ser considerado o coração da fotossíntese, pois nos centros de reação se encontram as moléculas de clorofila que são capazes de transferir elétrons direcionados pela luz. A cadeia transportadora de elétrons dos cloroplastos é formada por uma série de proteínas e aceptores de elétrons capazes de transportar os mesmos, os principais componentes dessa cadeia são: fotossistema II, plastoquinona, complexo do citocromo *b₆f*, plastocianina, fotossistema I, ferredoxina e uma flavoproteína chamada ferredoxina-NADP-redutase. Esses componentes estão listados em ordem crescente de potencial padrão de redução ($^{\circ}E$) (JORDÁN, 2005; TAIZ & ZEIGER, 2006).

Nas membranas dos tilacóides a água é oxidada, NADP é reduzido e ATP é gerado. Essas reações são catalisadas pelos fotossistemas I e II (PSI e PSII), uma ATP sintase (F-ATPase) que produz o ATP as expensas de uma força próton motora, gerada pelas reações de transferência de elétrons dirigidas pela luz, e o complexo do citocromo *b₆f* (cyt), o qual medeia o transporte de elétrons entre os PSII e PSI e converte parte da energia redox no gradiente de prótons (H^+) usado na formação do ATP. Os produtos gerados na fase fotoquímica serão utilizados na fase bioquímica da fotossíntese para a fixação do dióxido de carbono (CO_2) em carboidratos, pela ação da enzima cloroplástica ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo) (JORDÁN, 2005; NELSON & YOCUM, 2006; EBERHARD, FINAZZI & WOLLMAN, 2008; TAIZ & ZEIGER, 2006).

Estresses abióticos podem afetar o aparato fotossintético de várias formas, dependendo do tipo de estresse. Certos estresses como o causado por excesso de sais no solo e déficit hídrico levam ao fechamento estomático nas plantas. Nessa condição ocorre limitação na fixação do CO_2 e diminuição na redução do carbono pelo ciclo de Calvin, diminuindo a concentração do aceptor fotossintético de elétrons ($NADP^+$). Quando a ferredoxina se encontra super reduzida durante o transporte fotossintético de elétrons, os mesmos podem ser transferidos do PSI para o oxigênio

formando radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por um processo conhecido como reação de Mehler, disparando uma reação em cadeia que levará a produção de mais radicais de oxigênio (AHMAD, SARWAT & SHARMA, 2003). A utilização de medidas de fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) para analisar o desempenho da fotossíntese e a ocorrência de estresse em plantas é uma das ferramentas mais utilizadas em pesquisas recentes. A fluorescência pode ser uma ferramenta potente para estudar o desempenho fotossintético, principalmente quando combinada com outros métodos não invasivos, como por exemplo, espectroscopia de absorção, trocas gasosas e termometria no infravermelho. A partir de quatro parâmetros básicos da fluorescência da clorofila é possível calcular as demais variáveis, são eles: eficiência operacional do PSII (Φ_{PSII}), dissipação fotoquímica de energia (q_P), dissipação não fotoquímica de energia (q_N) e a mínima mudança relativa na fluorescência da Chl *a*. (ROHÁČEK, 2002; BAKER, 2008). Abaixo se encontra uma tabela mostrando alguns dos parâmetros de fluorescência (Chl *a*) mais utilizados para estudos de fotossíntese.

Tabela 1 – Parâmetros de fluorescência da clorofila a frequentemente utilizados em estudos da fotoquímica do fotossistema II (Adaptado de BAKER, 2008).

Parâmetro	Definição	Relevância fisiológica
F, F'	Emissão de fluorescência de folhas adaptadas ao escuro ou claro, respectivamente.	Fornece pouco informação da performance fotossintética, pois são influenciados por muitos fatores. F' algumas vezes é referido como F_s' quando no estado estacionário.
F_o, F_o'	Fluorescência mínima de folhas adaptadas ao escuro e claro, respectivamente.	Nível de fluorescência quando a primeira quinona acceptora de elétrons do PSII (Q_A) está oxidada ao máximo (centros de reação do PSII abertos).
F_m, F_m'	Fluorescência máxima de folhas adaptadas ao escuro e claro, respectivamente.	Nível de fluorescência quando a Q_A esta reduzida ao máximo (centros de reação do PSII fechados).
F_v, F_v'	Fluorescência variável de folhas adaptadas ao escuro e claro, respectivamente.	Demonstra a capacidade do PSII em realizar a fotoquímica (redução da Q_A).
F_q'	Diferença entre a fluorescência de F_m' e F' .	Dissipação fotoquímica da fluorescência através dos centros de reação abertos do PSII.
F_v/F_m	Máxima eficiência quântica do PSII.	Máxima eficiência com a qual a luz absorvida pelo PSII é usada para redução da Q_A .
F_q'/F_m'	Eficiência operacional do PSII.	Estima a eficiência com a qual a luz absorvida pelo PSII é usada para a redução da Q_A . Em uma dada densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativa (PPFD) este parâmetro oferece uma estimativa do rendimento quântico do fluxo linear de elétrons através do PSII. Este parâmetro era chamada anteriormente de $\Delta F/F_m'$ e Φ_{PSII} .
F_v'/F_m'	Máxima eficiência do PSII.	Fornece uma estimativa da eficiência fotoquímica máxima do PSII a um dado PPFD, o qual é a eficiência operacional do PSII se todos os centros de reação estiverem abertos (Q_A oxidada).
F_q'/F_v'	Fator de eficiência do PSII.	Refere-se à máxima eficiência do PSII para a eficiência operacional do PSII. Não linearmente relacionada à proporção dos centros de reação do PSII que estão abertos (Q_A). Matematicamente idêntico ao coeficiente de dissipação fotoquímica, q_p .

NPQ	Dissipação de energia não fotoquímica.	Estima a dissipação não fotoquímica a partir de F_m a F_m' . Monitora a taxa constante aparente de perda de calor do PSII. Calculado a partir de $(F_m/F_m') - 1$.
ETR	Taxa relativa do transporte de elétrons através do PSII	Estima a taxa do transporte não cíclico de elétrons através do PSII.
EXC	Excesso de energia ao nível do PSII	Estima o excesso de energia de excitação ao nível do PSII, ou seja, o grau de super-redução do fotossistema.
q_P	Diferença na fluorescência entre F_m' e F'	<i>Quenching</i> fotoquímico da fluorescência devido a abertura dos centros de reação do PSII.
q_E	Dissipação de energia dependente de energia.	Associado com o transporte de prótons induzido pela luz dentro do lúmen do tilacóide. Regula a taxa de excitação dos centros de reação do PSII.
q_I	Dissipação de energia foto-inibitória.	Resulta da foto-inibição da fotoquímica do PSII.
q_L	Fração dos centros de reação do PSII que estão abertos.	Estima a fração dos centros de reação do PSII que estão abertos (com a QA oxidada) como base no modelo do lago para o aparato fotossintético do PSII. Dado por $(F_q'/F_v')/(F_o'/F')$.
q_T	Dissipação de energia associada com o estado de transição.	Resulta da fosforilação dos complexos coletores de luz associados ao PSII.
Φ_F	Rendimento quântico da fluorescência.	Número de eventos fluorescentes para cada fóton absorvido.

2.2. Espécies reativas de oxigênio: Estresse oxidativo

Como resultado do metabolismo oxidativo os organismos passaram a produzir grande variedade e quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem desempenhar diversas funções no metabolismo celular (APEL & HIRT, 2004). Quando presentes em elevados níveis, as ERO podem danificar importantes componentes celulares como, por exemplo, DNA/RNA, proteínas, lipídios e, algumas vezes, carboidratos (MØLLER, JENSEN & HANSSON, 2007). Alguns danos podem ser evitados por sistemas eficientes de desintoxicação, contudo outros danos como ao material genético, muitas vezes não podem ser reparados com eficiência e acabam resultando em efeitos deletérios no organismo (MITTLER, 2002; HSU & KAO, 2003).

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia, chamados de degenerados, caracterizando, portanto, um estado tripleto (O_2). Por conseqüência, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin (RONSEIN et al., 2006). Esse impedimento eletrônico imposto a molécula de oxigênio é que o impede de reagir indiscriminadamente com muitas moléculas orgânicas, contudo oxigênio no seu estado padrão pode ser convertido a muitas formas reativas por reações de transferência de energia ou elétrons.

A primeira reação leva a formação do oxigênio singlete (1O_2), enquanto a último resulta na redução seqüencial de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila (OH^{\bullet}). O radical OH^{\bullet} é considerado o mais nocivo tipo de ERO, pois mesmo com uma meia-vida muito curta (~ 1 ns) ele reage praticamente com todas as biomoléculas da célula. Essa espécie reativa pode ser formada quando o H_2O_2 reage com íons de metais de transição livres (Cu^{+2} , Fe^{+2} e Mn^{+2}) em uma reação conhecida como reação de Fenton ou Haber-Weiss. Para limitar a formação inadvertida de OH^{\bullet} a célula tenta manter as concentrações desses íons extremamente baixas, pela ligação com moléculas de metalo chaperonas (VRANOVÁ, INZÉ & BREUSEGEM, 2002; MITTLER, 2002; MØLLER, JENSEN & HANSSON, 2007).

Considerando que, uma planta sob condições normais de crescimento a produção de ERO é baixa ($240 \mu M s^{-1} O_2^-$ e um nível estacionário de $0.5 \mu M$ de H_2O_2 nos cloroplastos), muitos estresses podem romper a homeostase celular aumentando a produção de ERO ($240 - 720 \mu M s^{-1}$

O_2^- e um nível estacionário de 5 – 15 μM de H_2O_2). Estes incluem estresse de seca e dissecação, estresse salino, frio, choque térmico, metais pesados, radiação ultravioleta, poluentes do ar como O_3 e SO_2 , estresse mecânico, privação de nutrientes, ataque de patógenos e estresse de alta luminosidade (MITTLER, 2002). A produção de ERO está relacionada com organelas que possuem alta atividade oxidativa ou com uma intensa taxa de fluxo de elétrons. Mitocôndrias, cloroplastos e microcorpos (peroxissomos) são considerados as principais fontes de espécies reativas. Estima-se que aproximadamente 1% do oxigênio consumido pelo tecido vegetal é destinado a produção de ERO, sendo as mitocôndrias a principal fonte dessas espécies em células animais.

Nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTE) ocorre a formação de radicais superóxido, fazendo com que os sejam considerados as principais fontes de ERO nessa organela (MØLLER, 2001; ŠLESÁK et al., 2007). Nos cloroplastos a fonte primária de ERO é o ciclo de Mehler, nas proximidades do PSI, ocorrendo produção do radical superóxido. Em plantas com limitações na fixação do CO_2 (salinidade, seca, calor ou combinações) essa produção é aumentada. Em plantas C_3 , condições limitantes de CO_2 podem ativar a via fotorrespiratória, a qual produz grandes quantidades de H_2O_2 pela atividade da enzima oxidase do glicolato, e na mesma organela ocorre a β -oxidação de ácidos graxos, que também gera quantidades apreciáveis de H_2O_2 (MITTLER, 2004). O catabolismo das purinas, que provavelmente ocorre nos microcorpos, gera ERO como subproduto. A primeira reação dessa cadeia catabólica, a oxidação da xantina a ácido úrico pela oxidase da xantina, gera $O_2^{\bullet-}$, enquanto o ácido úrico é oxidado a alantoína, produzindo H_2O_2 e CO_2 (VRANOVÁ, INZÉ & BREUSEGEM, 2002).

A produção e remoção dos diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio é um processo extremamente regulado, pois a quebra dessa homeostase resulta na produção excessiva e acúmulo dessas espécies ativando sistemas antioxidantes e causando danos a biomoléculas (MØLLER, 2001). O estresse oxidativo ocorre quando as ERO não são rapidamente removidas e a taxa de reparo dos componentes celulares danificados não consegue manter o ritmo com a taxa de dano (SCANDALIOS, 2002; MULLINEAUX & BAKER, 2010). No início se achava que as ERO não passavam de subprodutos do metabolismo oxidativo sem significância fisiológica que representavam uma ameaça para a homeostase celular. Contudo, nos últimos anos, estudos vêm

comprovando que as ERO estão envolvidas em processos fisiológicos importantes, funcionando como molécula sinalizadora em vias de transdução de sinal que estão envolvidas na ativação de fatores de transcrição levando a expressão de genes (VRANOVÁ, INZÉ & BREUSEGEM, 2002; SCANDALIOS, 2002). As ERO podem ativar e induzir cascatas de sinalização que levam a expressão gênica. A sinalização mediada pelas ERO envolve a proteína *G* heterotrimérica e a fosforilação de proteínas reguladas por MAP quinases específicas e fosfatases de tirosina. As bases bioquímicas e estruturais da via de ativação de quinases pelas ERO ainda não estão completamente estabelecidas, mas a oxidação de grupos *tiol* possivelmente desempenha um papel fundamental nesse processo (AHMAD, SARWAT & SHARMA, 2008).

Existe uma classe de enzimas produtora de ERO que merece atenção especial, é a classe das oxidases dependentes de NADPH (NOXs) que usam o NADPH como doador específico de elétrons e estão presentes em membrana plasmática e parede celular (SAGI & FLUHR, 2006). ERO produzidas pela atividade dessa classe de enzimas parecem desempenhar um importante papel no desenvolvimento de plantas. Estas proteínas são similares àquelas primeiramente identificadas em mamíferos, que são responsáveis pela explosão respiratória que ocorre em neutrófilos (GAPPER & DOLAN, 2006). Em plantas, a oxidase de NADPH ligada à membrana plasmática é uma das principais fontes de ERO (NOCTOR & FOYER, 1998) e está diretamente relacionada com aumentos repentinos na formação de ERO (explosão oxidativa) no espaço apoplástico (LALOI, APEL & DANON, 2004). Esta enzima desempenha um papel central na regulação do desenvolvimento da célula vegetal, pois as ERO geradas de sua atividade ($O_2^{\bullet -} \rightarrow H_2O_2$) desempenham papel fundamental nos processos de morfogênese que resultam na ativação de canais de Ca^{+2} envolvidos na regulação de crescimento (FOREMAN et al., 2003; BUCHANAN & BALMER, 2005). O oxigênio singleto é altamente reativo e promove um rápido estresse foto-oxidativo. A geração de 1O_2 está associada com a produção de radicais hidróperóxido, que podem iniciar e propagar sinalização de dano celular. Sabe-se também que 1O_2 está associado com vias de sinalização que resultam em morte celular. Em eventos de morte das extremidades celulares pode ser necessária a produção de ERO (principalmente $O_2^{\bullet -}$), que pode ser gerada da atividade das oxidases de NADPH de membrana plasmática, ou de fontes ambientais externas, como o O_3 (MULLINEAUX & BAKER, 2010). Diferente das demais ERO, o H_2O_2 não é tão reativo e danoso a célula. Essa relativamente baixa reatividade pode sugerir que

o H_2O_2 possa se difundir do seu sítio de produção e iniciar a sinalização intercelular e sistêmica (MULLINEAUX, KARPINSK & BAKER, 2006).

O peróxido de hidrogênio age como uma molécula sinal, um segundo mensageiro, mediando aquisição de tolerância a estresses bióticos e abióticos. O H_2O_2 também faz comunicação com as vias de outras moléculas de sinalização, como por exemplo, modulação da entra e saída de cálcio e potássio, síntese do ácido salicílico, síntese do óxido nítrico, liberação do ácido abscísico e etileno e liberação do ácido jasmônico (QUAN et al., 2008).

Paradoxalmente, a morte é uma parte integral da vida. A morte celular é um evento fundamental para o desenvolvimento e crescimento de eucariotos, pela manutenção da homeostase de tecidos e órgãos em conjunto com a proliferação celular, crescimento e diferenciação (BREUSEGEM & DAT, 2006; REAPE, MOLONY & McCABE, 2008). Assim, a morte celular programada (PCD) pode ser definida como uma forma de morte celular que envolve um ou vários processos moleculares e celulares ordenados mediados por programas de morte intercelular, independentemente do que ocasionou (sinal externo) ou dos sinais que exibem (BREUSEGEM & DAT, 2006).

Estudos indicam que o balanço entre a produção e remoção de ERO é crítico para o início desse processo, em casos de ataque de patógenos a plantas uma explosão oxidativa é seguida de morte celular (BUCHANAM & BALMER, 2005). A primeira evidência do envolvimento de ERO em vias de sinalização para morte celular ao invés de matar a célula alcançando níveis tóxicos veio de experimentos em culturas de células de soja, onde um pequeno pulso de H_2O_2 foi suficiente para ativar um mecanismo de morte celular hipersensitiva (VRANOVÁ, INZÉ & BREUSEGEM, 2002).

A resposta hipersensitiva (HR) está relacionada com o ataque de patógenos a plantas, o reconhecimento da invasão do patógeno resulta em uma ativação coordenada de mecanismos de defesa da planta incluindo a morte celular programada. A HR é definida como a rápida morte celular que está associada com resistência a doenças. A ativação da PCD resulta na formação de uma zona de células mortas entorno do local da infecção inibindo a proliferação do patógeno invasor (NOCTOR & FOYER, 1998). Estresses bióticos e abióticos podem resultar na produção e acúmulo de H_2O_2 , o qual pode iniciar processos de sinalização que podem incluir ativação de

enzimas, expressão gênica, danos celulares e MCP (NEILL, DESIKAN & HANCOCK, 2002; VELLOSILO et al., 2010). Uma explosão oxidativa geralmente iniciada pela atividade de oxidases de NADPH ligadas a membrana plasmática (SAGI & FLUHR, 2006), resulta na rápida síntese e liberação de peróxido de hidrogênio no espaço apoplástico, podendo ser uma resposta a patógenos, elicitores, lesão, calor, luz ultravioleta ou ozônio (DAT et al., 2000; ŚLESÁK et al., 2007).

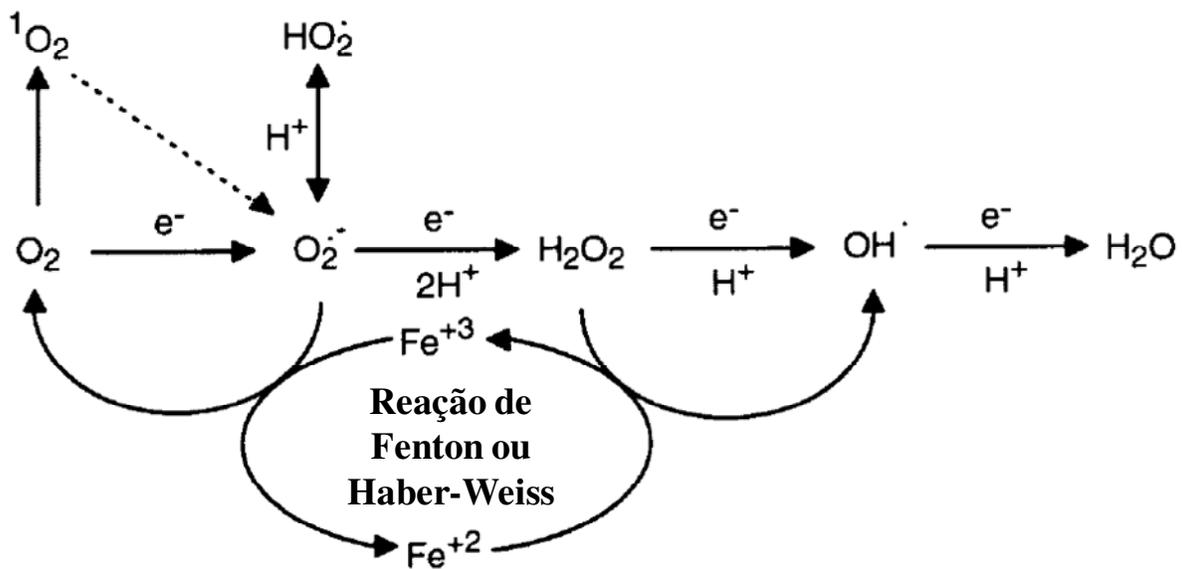


Figura 1 – Interconversão de espécies reativas de oxigênio (ERO) derivadas do oxigênio (O_2). O oxigênio no estado fundamental pode ser ativado por excesso de energia, revertendo o spin de um dos elétrons desemparelhados para formar o oxigênio singleto (1O_2). Alternativamente a redução de um único elétron leva a formação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O radical superóxido existe em equilíbrio com seu ácido conjugado, radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}). Reações subsequentes então formam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e água (H_2O). Íons metálicos que se encontram na célula principalmente na forma oxidada (Fe^{+3}) são reduzidos na presença de $O_2^{\cdot-}$ podendo, conseqüentemente, catalisar a conversão do H_2O_2 em OH^{\cdot} através da reação de Fenton ou Haber-Weiss (VRANOVÁ & BREUSEGEM, 2002).

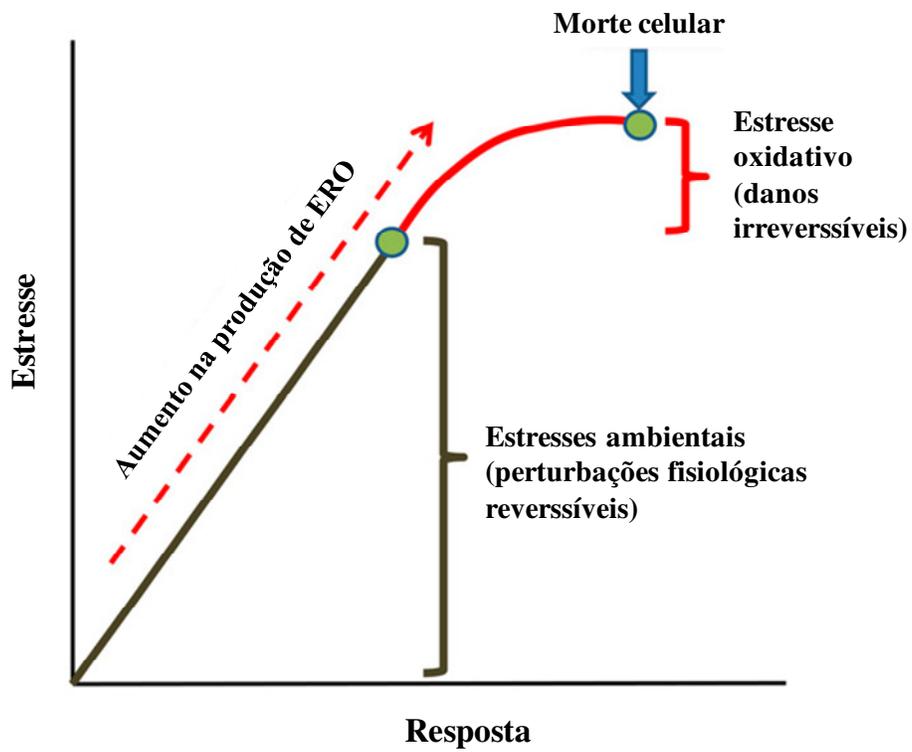


Figura 2 – Modelo para a resposta de um sistema vegetal a aplicação de estresses no contexto de produção de ERO, estresse oxidativo e morte celular (MULLINEAUX & BAKER, 2010).

2.3. Estresses abióticos

A definição biológica mais prática para estresse é uma força ou condição adversa que dificulta o funcionamento e o bem estar de sistemas biológicos como as plantas (MAHAJAN & TUTEJA, 2005). Agricultores adquiriram conhecimento prático de que estresses ambientais simultâneos são bem mais prejudiciais as culturas invés de um único estresse (MITTLER, 2006). Estresses abióticos como altas temperaturas, alta luminosidade, déficit hídrico e baixo disponibilidade de solutos inorgânicos, freqüentemente limitam a produtividade de culturas economicamente importantes (HSU & KAO, 2003; CATTIVELLI et al., 2008). De fato, a combinação de estresses abióticos é bastante comum. Por exemplo, altas temperaturas e alta irradiância de fótons são freqüentemente acompanhadas de baixa disponibilidade de água que por sua vez pode ser intensificado por níveis tóxicos de minerais no solo, restringindo o crescimento radicular (TESTER & BACIC, 2005). Em plantas superiores, limitações abióticas (salinidade, seca, calor, frio, luz) causam estresse oxidativo por conta de um desbalanço entre espécies pró-oxidantes e antioxidantes. De fato um denominador comum em todas essas condições adversas é a super produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em diferentes compartimentos celulares (JALEEL et al., 2009).

Estresse salino – A irrigação com água salina proporciona a salinização progressiva de solos agricultáveis e reduz a produtividade agrícola em muitas partes do mundo. A salinidade afeta 7% da área terrestre do mundo, o que equivale a 930 milhões de hectares (MUNNS, 2002; SAYED, 2003). Entre os íons comumente encontrados em excesso nos solos estão: cloreto (Cl^-), sulfato (SO_4^{2-}), bicarbonato (HCO_3^-), sódio (Na^+), cálcio (Ca^{+2}) e magnésio (Mg^{+2}). O estresse salino pode ser dividido em duas componentes (osmótica e iônica). Grandes concentrações de sais no solo causam o abaixamento do potencial hídrico (Ψ_w) do mesmo, dificultando a captação de água pelas raízes da planta, e ao mesmo tempo podem atingir níveis tóxicos dentro da planta (MUNNS, 2008). O estresse salino reduz a expansão celular, devido à redução no turgor das células, redução da área fotossintética relativa, devido à necrose das pontas das folhas induzidas pelo sal e redução da divisão celular, através da inibição da citocinese (SAYED, 2003; BARTELS & SUNKAR, 2005).

As plantas podem utilizar algumas “estratégias” para contornar esses problemas, como por exemplo, a acumulação de açúcares e a síntese de solutos compatíveis (ajustamento

osmótico). Solutos compatíveis são moléculas não tóxicas, tais como, aminoácidos, glicina-betaína, prolina e açúcares (sacarose, hexoses e alcoóis de açúcar). Essas moléculas têm o papel primário de manter o turgor das células, mas elas podem também estar envolvidas na estabilização de proteínas e estruturas celulares (BARTELS & SUNKAR, 2005; ABOGADALLAH, 2010).

O estresse salino possui efeitos idênticos aos do estresse de seca, como por exemplo, fechamento dos estômatos, baixa evapotranspiração e captação de CO₂ e alterações no metabolismo fotossintético (ZHANG et al., 2010). O aumento na relação NADPH/NADP⁺ está entre as principais alterações que ocorrem na fotossíntese de plantas sob estresse salino, o que pode levar a produção excessiva de ERO no cloroplasto (CHAVES, FLEXAS & PINHEIRO, 2009). A excessiva formação de ERO reduz a capacidade de reparo ao PSII e inibe a síntese da proteína D1 levando a fotoinibição. O estresse salino intensifica o processo de fotorrespiração contribuindo para o aumento nas concentrações de H₂O₂, o qual pode inativar enzimas pela oxidação de seus grupos tiol (BARTELS & SUNKAR, 2005; ABOGADALLA, 2010).

Estresse foto-oxidativo – A luz é fonte básica de energia para as reações fotoquímicas primárias e a fotossíntese é a fonte primária e única de energia para as plantas. (KIMURA et al., 2003). Sendo assim, limitações no fornecimento de luz provocam redução no crescimento das plantas e seu excesso pode ser também um dos fatores mais prejudiciais do ambiente, causando estresse foto-oxidativo em organismos fototrópicos. Foto-inibição é o fenômeno que reflete a foto-inativação do aparato fotossintético e assim prejudica o funcionamento da fotossíntese (KIMURA et al., 2003; JIAO, EMMANUEL & GUIKEMA, 2004). Quando a energia luminosa absorvida pela planta excede a capacidade de utilização da luz na fotossíntese, pode ocorrer o processo de foto-inibição. O PSII é o primeiro sítio a sofrer foto-inibição. *In vivo* esse efeito pode ser detectado facilmente por um decréscimo no parâmetro da máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m) de folhas adaptadas ao escuro (ASADA, 2000; BARTH, KRAUSE & WINTER, 2001). Sob alta luminosidade, a dissipação do excesso de energia de excitação na forma de calor é rapidamente estabelecida. Isto requer, pelo menos, a ativação da de-epoxidase da violaxantina dependente de um delta de pH e o envolvimento da proteína PsbS (ASADA, 1999; BARTH, KRAUSE & WINTER, 2001; MUNNÉ-BOSCH & CELA, 2006).

O PSI é bem menos afetado do que o PSII em condições de alta luminosidade e foi identificado como o principal sítio de formação de ERO, se mostrando intimamente relacionado com os sistemas de remoção de ERO dos cloroplastos (KIMURA et al., 2003; JIAO, EMMANUEL & GUIKEMA, 2004). A produção excessiva de ERO pode causar danos oxidativos ao aparato fotoquímico e inativar a proteína D1 do PSII, comprometendo seriamente o processo de fotossíntese. Contudo, as plantas desenvolveram ao longo do tempo mecanismos de remoção dessas espécies reativas. Mecanismos como o ciclo água-água, transferência cíclica de elétrons através do PSI, formação de oxigênio singlete e sua conseqüente desintoxicação por antioxidantes, principalmente carotenóides e tocoferóis, são importantes formas de defesa induzidos por intensa luminosidade (ASADA, 1999; APEL & HIRT, 2004; MUNNÉ-BOSCH & CELA, 2006; MØLLER, JENSEN & HANSSON, 2007).

2.4 – Ascorbato peroxidases (APXs)

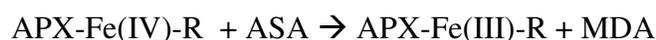
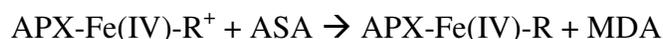
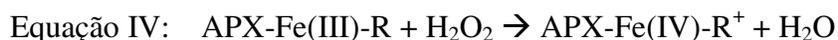
As peroxidases do ascorbato (APXs) compõem uma família de isoenzimas com características bastante distintas localizadas em pelo menos quatro compartimentos celulares diferentes, cloroplastos, mitocôndrias, citosol e microcorpos (SHIGEOKA et al., 2002). As APX cloroplásticas (chlAPX) estão localizadas no estroma (sAPX) e tilacóides (tAPX). As isoformas citosólicas (cAPX) estão solubilizadas no citosol, enquanto que aquelas presentes nos microcorpos e mitocôndrias (mAPX/mitAPX) estão associadas as membranas dessas organelas (ASADA, 1992). A atividade das APXs está relacionada com a proteção da célula a vários tipos de estresses bióticos e abióticos e sua expressão é aumentada na presença de alguns fatores estressantes, tais como: seca, ozônio e dióxido de enxofre (SO₂) (ASAI et al., 2004). Estudos focando as mudanças na APX sob condições de estresse abiótico mostraram níveis elevados dos mRNAs da APX citosólica quando as plantas foram sujeitas aos tratamentos de seca, metilviologênio, calor, elevadas intensidades de luz e ácido abscísico (ABA). Essas respostas reforçam o fato da importância da APX em plantas sob condições de estresse (NISHIKAWA, 2003). Mesmo com muitas evidências de que as APXs são de fundamental importância para a defesa da planta contra o estresse oxidativo, estudos tentam ratificar ao até mesmo refutar esta afirmação trabalhando com plantas deficientes em uma ou algumas isoformas da APX (RIZHISKY et al., 2002; MILLER et al., 2007; KOUSSEVITZKY et al., 2008; MARUTA et al., 2010).

Com base nas seqüências de aminoácidos, as peroxidases podem ser divididas em três classes bem caracterizadas. A Classe I inclui peroxidases intracelulares de origem procariótica, Classe II peroxidases de fungos, e a Classe III as clássicas peroxidases de plantas. A construção de uma árvore filogenética baseada na seqüência de aminoácidos do sítio catalítico mostrou que as isoformas da APX de plantas superiores podem ser divididas em quatro grupos: cAPX I, cAPX II, chlAPX, e mAPX. O primeiro evento na evolução da APX resultou no aparecimento de grupos separados: um grupo cAPX I, um grupo chlAPX, um grupo mAPX e um grupo cAPXII. É provável que cAPX I, chlAPX e mAPX dividam características comuns conservadas entre espécies vegetais, enquanto que o grupo cAPX II possa ter evoluído a partir de cAPX de uma forma específica da espécie. As isoformas da chlAPX são divididas em dois tipos que surgiram

do splicing alternativo de um único gene e por diferentes genes em um estágio muito inicial (SHIGEOKA et al., 2002).

As isoformas da APX vegetal não podem reduzir hidroperóxidos de lipídios. A APX é uma enzima heme que contém uma protoporfirina como grupo prostético e é inibida por cianeto (CN⁻) e azida. As APXs também podem ser inibidas por reagentes tiólicos modificados tais como: *p*-cloro-mercúrio-benzoato e inibidores suicidas tais como: hidroxilamina, *p*-aminofenol e hidroxiureia. Uma das propriedades mais peculiares das APXs é sua instabilidade na ausência do ascorbato (AsA). Sob condições nas quais as concentrações de AsA estão abaixo de 20 µM, a atividade da APX é rapidamente perdida. Os tempos de inativação das chlAPX e mitAPX são menores que 30 s, enquanto que a cAPX e a mAPX são aproximadamente 1 h ou mais. (SHIGEOKA et al., 2002).

Todas as APXs utilizam o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H₂O₂ para H₂O e O₂ (ASADA, 1992). No geral, a APX utiliza dois elétrons intermediários, localizados no átomo de Fe⁺³ e num resíduo de triptofano, para catalisar a redução do H₂O₂ (Equações III e IV).



A família gênica das APXs foi parcialmente caracterizada em *Arabidopsis thaliana* e espinafre (*Spinacia oleracea*) (TEIXEIRA et al., 2004). Em *Arabidopsis thaliana*, existem pelo menos seis genes codificadores de isoformas da APX: duas isoformas de citosol (At1g07890 e At3g09640); duas isoformas de peroxissomo (At4g35000 e At4g35970); uma isoforma ligada ao tilacóide (At1g77490); e uma isoforma estromal/mitocondrial (At4g08390) (TEIXEIRA et al., 2006). Teixeira et al., 2006 estudando plantas de arroz (*Oryza sativa*) identificou oito genes codificadores de isoformas da APX: duas isoformas de citosol (*OsAPx1* e *OsAPx2*), uma isoforma de peroxissomo (*OsAPx3*) e uma outra putativa do mesmo compartimento (*OsAPx4*) e

quatro isoformas de cloroplasto (*OsAPx5* a *OsAPx8*), onde a *OsAPx8* é uma isoforma putativa ligada ao tilacóide (TEIXEIRA et al., 2006).

2.5. Sistemas de defesa antioxidativa

2.5.1. Dissipação do excesso de energia

A evolução dos processos metabólicos aeróbicos como respiração e fotossíntese levaram inevitavelmente a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (APEL & HIRT, 2004). O termo ERO é genérico, englobando não apenas radicais livres como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}), mas também peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (NOCTOR & FOYER, 1998). Atualmente está claro que as ERO nem sempre são subprodutos do metabolismo oxidativo prejudiciais ao meio celular, pois sua fina regulação representa um papel fundamental para inúmeras funções da célula (SCANDALIOS, 2002). Muitas evidências indicam que as espécies reativas, especialmente o radical $O_2^{\bullet-}$ e a molécula de H_2O_2 , desempenham atividade de molécula sinal, especialmente em plantas sob estresse (NEILL et al., 2002; NEILL, DESIKAN & HANCOCK, 2002; APEL & HIRT, 2004; BUCHANAN & BALMER, 2005; GECHEV & HILLE, 2005; CHEESEMAN, 2007; QUAN et al., 2008). Por conta das inúmeras fontes de produção de ERO as plantas desenvolveram complexos sistemas de desintoxicação ao longo da evolução (APEL & HIRT, 2004).

Tão importante quanto os mecanismos de remoção de ERO são os mecanismos que evitam a produção das mesmas, principalmente em plantas sob estresse. Alguns mecanismos que podem reduzir a produção de ERO incluem: (1) *adaptações anatômicas* tais como movimentação e enrolamento das folhas, desenvolvimento de uma epiderme refratária e ocultação dos estômatos em estruturas especializadas; (2) *adaptações fisiológicas* como metabolismo C_4 e CAM; (3) *mecanismos moleculares* que rearranjam o aparato fotossintético e seus centros de reação de acordo com a qualidade e intensidade de luz ou inibe completamente a fotossíntese (MITTLER, 2002). Em plantas superiores, a dissipação de energia fotoquímica excessiva é uma resposta imediata e fina, que ocorre como liberação de calor. A fotorredução do O_2 é um importante dreno alternativo para o consumo do excesso de energia, mas diretamente relacionado com o aumento na quantidade de ERO como 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e posteriormente OH^{\bullet} (JALEEL et al., 2009).

A dissipação do excesso de energia e formação de ERO nos cloroplastos de plantas superiores pode ser efetuada por duas vias: (1) ciclo água-água, onde pelo menos 30% de todo o

fluxo linear de elétrons passa (figura 3) e (2) fluxo cíclico de elétrons em torno do PSI (ciclo de Mehler), onde ocorrem altas taxas de redução do O₂. O ciclo água-água pode dissipar o excesso de fótons usando o O₂ como acceptor de elétrons, sem promover a liberação de O₂^{•-} e H₂O₂, sempre que aceptores fisiológicos de elétrons não estiverem disponíveis, promovendo a regulação do PSII e dissipando a energia na forma de calor (ASADA, 1999), tendo esse ciclo papel fundamental na proteção de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* na ausência de estresses (RIZHSKY, LIANG & MITTLER, 2003).

Como uma via alternativa de fluxo de elétrons, o ciclo de Mehler pode desempenhar as funções fisiológicas de foto-proteção e ajudar a balancear a relação de redutores de ATP (EBERHARD, FINAZZI & WOLLMAN, 2008). A reação de Mehler representa a fotorredução do O₂ no PSI. Essa fotorredução produz radicais O₂^{•-} que são convertidos a H₂O₂ pela ação da enzima dismutase do superóxido (SOD). O H₂O₂ produzido é rapidamente convertido a H₂O pela ação da enzima peroxidase do ascorbato (APX) (MAKINO, MIYAKE & YOKOTA, 2002).

De fato, sob altas densidades de fluxo de elétrons, o acúmulo de energia de excitação nos complexos coletores de luz (LHCs) dos fotossistemas favorece a formação de moléculas de clorofila excitadas no estado tripleto (³Chl), que podem interagir com o O₂ para gerar o oxigênio singleto (HAVAUX & NIYOGI, 1999). Uma das fontes de dissipação do excesso de energia sobre os fotossistemas é o ciclo das xantofilas (violaxantina, anteraxantina e zeaxantina), dissipando essa energia na forma de calor (*NPQ*) (TAIZ & ZEIGER, 2006). Em condições de alta luminosidade ocorre uma rápida mudança na composição dos carotenóides nos LHCs: a violaxantina é convertida em zeaxantina, via o intermediário anteraxantina, pela ação da enzima de-epoxidase da violaxantina (MIYAKE et al., 2005).

Os carotenóides são capazes de eliminar a ³Chl e o radical ¹O₂. Tem sido sugerido que a zeaxantina livre pode eliminar moléculas excitadas de clorofila singleto (¹Chl) ou favorecer a agregação, induzida por prótons, dos complexos coletores de luz, levando a uma dissipação de energia na forma de calor e garantindo a fotoproteção ao PSII (NOCTOR & FOYER, 1998; HAVAUX & NIYOGI, 1999). Juntamente com um aumento na intensidade de fótons, a taxa de energia usada para a assimilação de CO₂ é reduzida. Na natureza, 10, 25 e 80% da energia absorvida é usada para a assimilação de CO₂ a pleno sol (aproximadamente 2000 μmol m⁻² s⁻¹), 50% e 5% da luz solar, respectivamente, e a energia restante é dissipada através do ciclo água-

água. A regulação do PSII é desencadeada pelo ciclo das xantofilas (induzido por um abaixamento no pH do lúmen dos tilacóides) e fotorrespiração (ASADA, 1999). O ciclo água-água não apenas evita a produção de ERO, mas também promove a acidificação do lúmen dos tilacóides gerando um gradiente de prótons (H^+) (ΔpH) entre as membranas dos tilacóides. Esse ΔpH favorece a ativação do ciclo das xantofilas e aumenta a dissipação térmica do excesso de energia (*NPQ*) (ASADA, 1999; MAKINO, MIYAKE & YOKOTA, 2002)

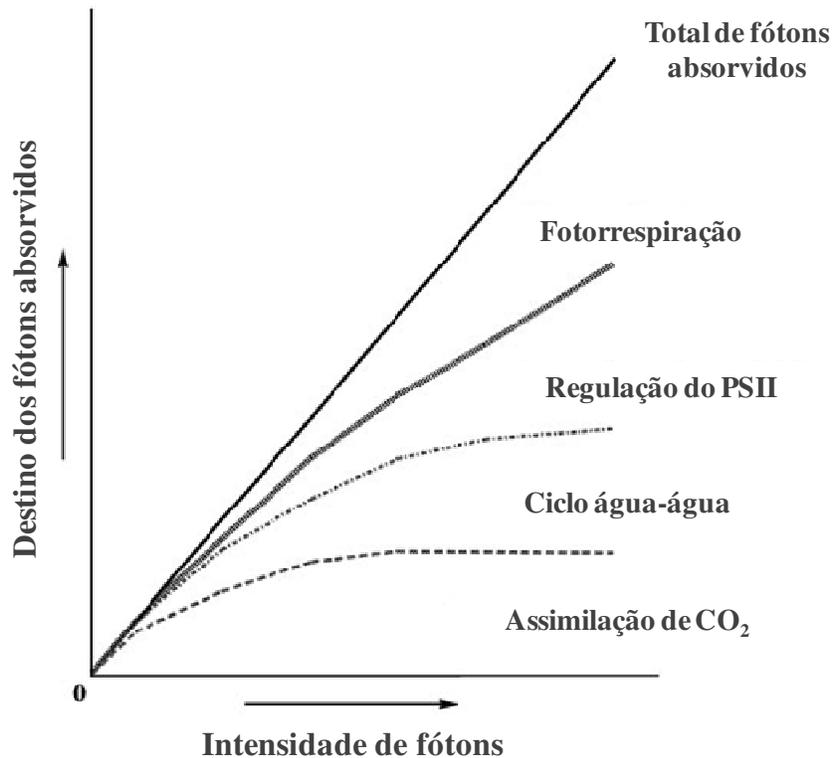
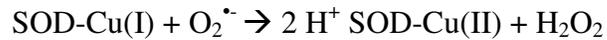
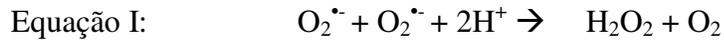


Figura 4 – Destino da energia dos fótons absorvidos pela clorofila nos cloroplastos em várias intensidades de fótons. A capacidade de utilização dos fótons para a assimilação de CO₂ das folhas é grandemente afetada por estresses ambientais, como seca, frio, luz ultravioleta, luz e salinidade. Quando a intensidade de fótons é superior a assimilação de CO₂, o excesso de energia dos fótons é dissipada pelo ciclo água-água, regulação do PSII através da geração de um gradiente de prótons através das membranas dos tilacóides e fotorrespiração. Quando o receptor de elétrons fisiológico, CO₂, não está disponível para os cloroplastos ou o ciclo de fixação do CO₂ não funciona eficazmente, o fluxo linear de elétrons através do ciclo água-água é indispensável para gerar o gradiente de prótons, pelo menos inicialmente (Adaptado de ASADA, 1999).

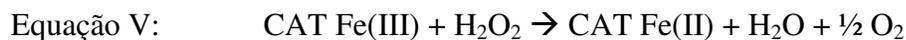
2.5.2. Enzimas antioxidativas

Devido à produção de ERO ser um fenômeno comum, constante e inevitável que ocorre em vários compartimentos subcelulares durante o metabolismo normal das plantas (NEILL, 2002; APEL & HIRT, 2004; BUCHANAN & BALMER, 2005), as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes eficientes que envolvem tanto evitar a formação, quanto à remoção das ERO (ALSCHER, ERTURK & HEATH, 2002). Mecanismos de remoção enzimática de ERO incluem as enzimas dismutases do superóxido (SODs), peroxidases do ascorbato (APXs), peroxidases da glutathiona (GPXs), peroxirredoxinas (Prxs) e catalases (CATs) (MITTLER, 2002; DIETZ, 2003; APEL & HIRT, 2004). O balanço entre as atividades de SOD, APX e CAT nas células é crucial para determinar os níveis basais do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Juntamente com o seqüestro de íons metálicos, esse balanço é essencial para prevenir a formação do radical hidroxila (OH^{\bullet}) pela reação de Fenton ou Haber-Weiss (MITTLER, 2002).

A produção do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode ocorrer em qualquer sítio celular que possui cadeia transportadora de elétrons, como as mitocôndrias e os cloroplastos, além de outros locais onde ocorrem reações do tipo redox, como os microsossomos, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e citosol (FOYER & NOCTOR, 2005). Na célula, as enzimas dismutases do superóxido (SODs) são responsáveis pela dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 (Equações I e II), sendo considerada a primeira linha de defesa oxidativa enzimática. Em plantas, as SODs podem ser encontradas em todos os prováveis compartimentos da célula capazes de produzir ERO, particularmente em cloroplastos, mitocôndria e peroxissomos, os principais sítios de produção de ERO na célula vegetal (FOYER & NOCTOR, 2000; ALSCHER, ERTURK & HEATH, 2002; JIMÉNEZ et al., 1997). As dismutases de superóxido constituem uma família de metaloproteínas que está subdividida em três grupos distintos, dependendo do co-fator enzimático, Fe-SOD, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, localizadas em diferentes compartimentos celulares. As isoformas Fe-SOD estão localizadas nos cloroplastos, enquanto as Mn-SOD podem ser encontradas nas mitocôndrias e peroxissomos. As isoformas Cu/Zn-SOD podem ser encontradas simultaneamente nos cloroplastos, citosol e no espaço extracelular (ASADA, 1999; ALSCHER et al., 2002).



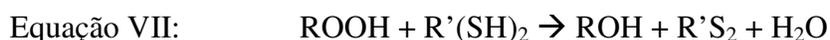
As catalases são enzimas tetraméricas, com quatro subunidades idênticas de 60 kDa, contendo um grupo heme que catalisam a redução do H₂O₂ a H₂O e O₂ (Equações V e VI), protegendo a célula dos danos oxidativos oriundos da acumulação excessiva do H₂O₂ (SÁNCHEZ-CASAS & KLESSIG, 1994). As catalases são enzimas que estão presentes nos peroxissomos, glioxissomos e organelas relacionadas, onde enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio, como a oxidase do glicolato, estão localizadas. As catalases estão associadas principalmente com a remoção do H₂O₂ no microcorpos (WILLEKENS et al., 1997). Além de catalisar a decomposição direta do H₂O₂, as catalases promovem a oxidação de substratos como metanol, etanol, formaldeído e nitritos, utilizando o peróxido de hidrogênio (HAVIR & MCHALE, 1989). Comparadas as peroxidases de ascorbato (APXs), as catalases (CATs) possuem baixa afinidade pelo H₂O₂, porém apresentam alta atividade catalítica. As diferentes afinidades de APX (faixa de µM) e CAT (faixa de mM) ao H₂O₂ sugerem que elas pertencem a duas classes distintas de enzimas removedoras de H₂O₂: APX deve ser responsável por uma fina modulação das ERO para vias de sinalização, enquanto que a CAT deve ser responsável pela desintoxicação do excesso de ERO durante o estresse (MITTLER, 2002). Essa diferença cinética também pode ser atribuída à necessidade da ligação simultânea de duas moléculas de peróxido de hidrogênio ao sítio catalítico das CATs para que a reação ocorra (Equações V e VI) (NOCTOR & FOYER, 1998).



As peroxirredoxinas (Prxs) são abundantes peroxidases de baixa eficiência localizadas em diversos compartimentos subcelulares incluindo cloroplastos e mitocôndrias. Elas são agrupadas em quatro classes distintas baseadas nas suas propriedades estruturais e bioquímicas. São enzimas especializadas na remoção de H₂O₂, hidroperóxidos de alquila e peroxinitritos

(Equação VII), tendo possível envolvimento na sinalização redox (SMIRNOFF, 2007). As Prxs são encontradas em quase todos os organismos, não tendo relação com qualquer outra família de peroxidases e agindo na remoção de peróxidos de vários tipos (ROUHIER & JACQUOT, 2002; DIETZ, 2003). Todas as Prxs possuem um resíduo de cisteína (Cys) conservado em sua região N-terminal, crítico para sua atividade, que ataca peróxidos e também peroxinitritos, pelo menos para alguns membros da família de Prxs.

Curiosamente, as Prxs apresentam seqüências homologas com catalases, dismutases de superóxido ou outras peroxidases tais como peroxidases de glutathiona contendo selenocisteína, embora possam ser estruturalmente bem próximas (DEPONTE, RAHLFS & BECKER, 2007). Existem quatro classes de peroxirredoxinas: (1) 1-Cys Prx que foi a primeira Prx a ser identificada em plantas superiores e está localizada no núcleo, sugerindo um papel de proteção ao DNA e a maquinaria transcricional; (2) 2-Cys Prx localizada nos cloroplastos; (3) Prx do tipo II pode proteger a sintetase da glutamina (GS) da inativação oxidativa e metabolizar o H₂O₂, podendo ser encontrada no citosol, cloroplasto e mitocôndria; e (4) as Prx Q são o quarto grupo de peroxirredoxinas mais recente a ser clonado em plantas e são encontradas nos cloroplastos (DIETZ, 2003).



As peroxidases de glutathiona (GPXs) são enzimas fundamentais na remoção de radicais de oxigênio bem estudadas em animais. A família das GPXs pode ser dividida em cinco classes de acordo com sua seqüência de aminoácidos, especificidade pelo substrato e localização subcelular. Essas enzimas catalisam a redução do H₂O₂ (Equação VIII), hidroperóxidos orgânicos e peróxidos de lipídios (Equação IX) usando a glutathiona (GSH) e/ou equivalentes redutores (ROUHIER & JACQUOT, 2002; MIAO et al., 2006). Pelo menos quatro isoformas de GPX dependentes de selênio foram identificadas até o momento mostrando diferenças com relação à estrutura, especificidade pelo substrato e distribuição nos tecidos.

As GPXs são as principais enzimas celulares capazes de reparar lipídios de membrana e é em geral considerada a principal linha de defesa enzimática contra danos de membrana (YOSHIMURA et al., 2004; YANG, DONG & LIU, 2006; LI et al., 2009). As PHGPx formam uma classe especial de GPX que difere das formas clássicas de GPXs em mamíferos. Mesmo

apresentando menos de 30% de homologia com as formas clássicas de GPX, uma pronunciada similaridade foi detectada nos motivos envolvendo o sítio catalítico e uma tríade catalítica em comum (selenocisteína, glutamina e triptofano) foi identificada por resultados estruturais e cinéticos. Por outro lado as HPGPx de planta contêm um resíduo de cisteína ao invés de selenocisteína em seu pressuposto sítio catalítico, fazendo com que estas apresentem menor atividade quando comparadas ao grupo de GPXs com selenocisteína no sítio ativo (LI et al., 2009).

Em geral, a atividade enzimática total de HPGPx de planta com hidropéroxido de fosfolípido como substrato e glutatona como doador específico de elétrons é três ordens de grandeza menor que em animais. Estas baixas atividades têm dificultado esclarecer o potencial papel fisiológico das GPXs em plantas superiores (YOSHIMURA et al., 2004; YANG, DONG & LIU, 2006).



Outro mecanismo antioxidante muito comum nas plantas é o de antioxidantes não enzimáticos como o ácido ascórbico ou ascorbato na sua forma reduzida (ASA) e a glutatona também na sua forma reduzida (GSH). Em plantas, a biossíntese do ácido ascórbico (ASA) pode ocorrer em tecidos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, indicando que sua produção não depende diretamente do processo fotossintético (NOCTOR & FOYER, 1998). O ascorbato reduzido é considerado o mais importante substrato para redução do H_2O_2 em água e oxigênio na célula vegetal (NAKANO & ASADA, 1987). A glutatona reduzida (GSH) é um tripeptídeo (γ -Glu-Cys-Gly) encontrado na célula na forma oxidada GSSG, formando o par redox GSH/GSSG (NOCTOR & FOYER, 1998; FOYER & NOCTOR, 2005). A glutatona reduzida é a forma predominante de grupos SH não protéicos da célula e está relacionada à regulação da absorção de enxofre no tecido radicular, além de atuar como antioxidante no tamponamento redox e na expressão de genes de defesa (NOCTOR & FOYER, 1998; ROUHIER, LEMAIRE & JACQUOT, 2008). O estado redox da glutatona, conteúdo da GSH em relação ao *pool* total (GSH+GSSG), a exemplo do ascorbato, indica o conteúdo da glutatona capaz de atuar na proteção oxidativa e na homeostase redox celular. Na célula um *pool* de GSH em estado

altamente reduzido, mantido pela atividade constante da enzima redutase da glutathione (GR), é necessário para a manutenção da atividade de muitas enzimas, e para evitar a formação de pontes dissulfeto entre proteínas, impedindo a agregação e inativação enzimática, sendo assim, a glutathione se apresenta como um antioxidante altamente eficaz na remoção de ERO (TAUSZ, ŠIRCELJ & GRILL, 2004).

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

As APXs citosólicas são importantes enzimas do metabolismo oxidativo, desempenhando o papel de reguladoras dos níveis endógenos de H_2O_2 na célula vegetal. A baixa atividade destas enzimas causa um descontrole dos níveis endógenos de H_2O_2 , o que pode levar a respostas sinalizadas pelo mesmo incluindo principalmente: ativação de sistemas antioxidativos enzimáticos (SOD, CAT, GR, GPOD, GPX, entre outras) e não enzimáticos (AsA, GSH, tocoferóis, entre outros).

Sabendo disso, o objetivo do presente trabalho foi identificar parâmetros fisiológicos e bioquímicos que mostrem que plantas deficientes em peroxidase do ascorbato citosólica (Apx1/2s) são mais sensíveis ao estresse oxidativo do que as plantas não deficientes (WT).

3.2 – Objetivos específicos

I – Determinar parâmetros de fluorescência da clorofila *a*:

- Eficiência quântica atual do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$)
- Eficiência potencial do fotossistema II (F_v/F_m)
- Taxa de transporte de elétrons através do fotossistema II (ETR)
- Excesso de energia ao nível do fotossistema II (EXC)
- *Quenching* não fotoquímico (NPQ)
- *Quenching* fotoquímico (qP)

II – Determinar parâmetros de trocas gasosas:

- Fotossíntese (P_N)

III – Determinar indicadores de estresse fisiológico:

- Dano de membrana (DM)

IV – Determinar indicadores de estresse oxidativo:

- Conteúdo de TBARS e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

IV – Determinar a atividade das enzimas antioxidativas peroxidase do ascorbato (APX), dismutase do superóxido (SOD), fosfolipídio hidroperóxido glutaciona peroxidase (PHGPx) e catalase (CAT) nos compartimentos subcelulares citosol e cloroplasto.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Obtenção das plantas

Foram utilizadas plantas de arroz (*Oryza sativa* spp. *Japonnica*; cultivar Nipponbare) não silenciadas (WT) e silenciadas para a expressão das duas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) pelo uso da técnica do RNA de interferência (RNAi) de acordo com Rosa et al., 2010. Calos de arroz obtidos com o uso de diferentes meios de cultivo foram submetidos à transformação por *Agrobacterium tumefaciens* por choque térmico (UPADHYAYA et al., 2000). Após a transformação por *A. tumefaciens*, as plantas foram cultivadas até a obtenção das sementes. As sementes que germinaram em meio de Murashige & Skoong (MS) contendo o antibiótico canamicina foram transferidas para solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950), diluída 1/4, em vasos de 1.5 L e cultivadas em casa de vegetação (12/12h dia/noite, 75% UR, ~1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por aproximadamente trinta e cinco dias. As pl\u00e2ntulas foram fornecidas pelo Laborat\u00f3rio de Gen\u00e9tica Vegetal do Departamento de Gen\u00e9tica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em tubos contendo o meio MS, representado pela Prof^a. Dra. M\u00e1rcia Margis-Pinheiro.

4.2 – Aplica\u00e7\u00e3o dos estresses

4.2.1 – Tratamento salino

Plantas com aproximadamente trinta e cinco dias foram submetidas ao estresse salino, sob condi\u00e7\u00f5es de casa de vegeta\u00e7\u00e3o, pela troca da solu\u00e7\u00e3o nutritiva contendo NaCl 100 mM, enquanto que as plantas controle tiveram apenas a solu\u00e7\u00e3o nutritiva trocada. Ap\u00f3s sete dias as plantas foram transferidas para c\u00e2mara de crescimento controlado (27\u00b0C/24\u00b0C (dia/noite) / 70% U.R / ~400 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e aclimatadas por 12h, em seguida foram realizadas medidas de fotoss\u00edntese e fluoresc\u00eancia da clorofila *a*.

4.2.2 – Tratamento de alta intensidade luminosa

Plantas com aproximadamente trinta e cinco dias foram transferidas para c\u00e2mara de crescimento controlado a 27\u00b0C/24\u00b0C (dia/noite) e 70% de umidade relativa com um P.A.R de

400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas foram aclimatadas por aproximadamente 24h e logo em seguida iluminadas com lâmpadas de 400 watts ($\sim 2000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) do tipo vapor de s\u00f3dio por 48h. Durante o tratamento foram selecionados pontos para a realiza\u00e7\u00e3o de medidas de fluoresc\u00eancia da clorofila *a* nas condi\u00e7\u00f5es de claro e escuro.

4.2.3 – Tratamento com metil-violog\u00eancio em segmentos de folhas

Para esse experimento folhas de plantas aclimatadas em crescimento controlado a 27\u00b0C/24\u00b0C (dia/noite) e 70% de umidade relativa com um P.A.R de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram destacadas e cortadas em segmentos de aproximadamente 10 cm cada. Essas folhas, totalizando 2 g de massa fresca, foram colocadas em placas de vidro com metil-violog\u00eancio (50 μM) dissolvido em uma solu\u00e7\u00e3o 0.1% de TRITON^{\u2122} – X – 100 por 24h. Durante esse tempo foram selecionados os tempos de 0h, 1h, 3h, 12h e 24h para serem feitas coletas e determina\u00e7\u00f5es de par\u00e2metros fisiol\u00f3gicos e bioqu\u00edmicos, e o tempo zero contendo apenas TRITON^{\u2122} – X – 100 foi considerado como controle.

4.2.3 – Tratamento com metil-violog\u00eancio em plantas

Plantas com aproximadamente trinta e cinco dias foram transferidas para c\u00e2mara de crescimento controlado a 27\u00b0C/24\u00b0C (dia/noite) e 70% de umidade relativa com um P.A.R de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ap\u00f3s seis horas de aclima\u00e7\u00e3o o tratamento foi aplicado pela borrifa\u00e7\u00e3o das folhas com metil-violog\u00eancio (50 μM) dilu\u00eddo em uma solu\u00e7\u00e3o 0.1% de TRITON^{\u2122} – X – 100. As plantas permaneceram sob condi\u00e7\u00f5es controladas durante um per\u00edodo total de 24h e foram selecionados pontos para realiza\u00e7\u00e3o de medidas de fluoresc\u00eancia da clorofila *a* e trocas gasosas. As plantas controle foram mantidas tamb\u00e9m sob condi\u00e7\u00f5es controladas, mas sob um P.A.R de $\sim 400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 24h, onde foram realizadas medidas de fluoresc\u00eancia da clorofila *a* e trocas gasosas.

4.3 – Medidas de fluoresc\u00eancia da clorofila *a* e trocas gasosas

Medidas de trocas gasosas e fluoresc\u00eancia da clorofila *a* foram feitas por um analisador de g\u00e1s infravermelho (IRGA - 6400XT LI-LI-COR, EUA) com um fluor\u00edmetro modulado acoplado (LI-6400-40, LI-COR, EUA).

As medidas de fluorescência foram realizadas por meio do método do pulso de saturação (SCHREIBER et al., 1994) para folhas iluminadas e adaptadas por 20 minutos ao escuro completamente expandidas. A intensidade e a duração do pulso de saturação de luz, foram, respectivamente, $8.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 0.7s. Os parâmetros avaliados foram: eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII) [$F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$], o rendimento quântico efetivo do PSII [$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s) / F_m'$], o coeficiente de extinção não fotoquímica [NPQ = $(F_m - F_m') / F_m'$], o fluxo aparente de elétrons através do fotossistema II [ETR = $(\Delta F/F_m' \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84)$] e o excesso de energia ao nível do fotossistema II [EXC = $(F_v/F_m) - (\Delta F/F_m') / (F_v/F_m)$]. Para a avaliação da ETR, o valor 0,5 foi usado para representar a fração da energia de excitação distribuída ao PSII e 0,84 como a fração de luz incidente absorvida pelas folhas e PPFD é a densidade do fluxo de fótons fotossintéticos. Os parâmetros F_m e F_o são, respectivamente, máxima e mínima fluorescência de folhas adaptadas ao escuro; F_m e F_s são, respectivamente, fluorescência máxima e fluorescência no estado estacionário em condições de luz, e F_o' é a fluorescência mínima após a iluminação do vermelho intenso de folhas previamente expostas a luz (GENTY et al, 1989; SCHREIBER et al, 1994).

4.4 – Determinações fisiológicas e bioquímicas

4.4.1 – Dano de membranas

O dano de membrana foi determinado conforme Shanahan et al., (1990). Ao final dos tratamentos foram coletados vinte segmentos foliares (~10 cm de comprimento) que foram imersos em 10 ml de água deionizada em tubos fechados. Após 24h de incubação à temperatura ambiente foi realizada a primeira leitura de condutividade elétrica da solução (C1), e em seguida os tubos foram incubados a 100 °C em banho-maria durante 1h. Após o resfriamento dos tubos foi determinada a condutividade elétrica da solução (C2). O dano de membrana (DM) foi estimado pela relação, $(C1/C2) \times 100$.

4.4.2 – Conteúdo de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de H₂O₂ foi mensurado pelo método do tetracloreto de titânio de acordo com Brennan & Frenkel (1977). Após a pesagem de 100 mg de matéria fresca foi realizada a maceração em almofariz com N₂ líquido na presença de TCA 5%, em seguida o extrato foi centrifugado a 12000 x g em centrífuga refrigerada por 20 min a 4°C. Após a centrifugação o pellet foi descartado e o sobrenadante foi usado no ensaio. Para o ensaio foram utilizados 500 µL do sobrenadante, 100 µL do tetracloreto de titânio (20% em HCl 11M) e 150 µL de NH₄OH concentrado na seqüência citada. Após a reação os tubos contendo os reagentes foram centrifugados a 10000 x g por 5 min em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com TCA 5%. Após a última lavagem o pellet foi ressuspenso com 400 µL de H₂SO₄ 1M e 180 µL de TCA%, para dissolver o composto de cor amarela no fundo do tubo. Após a ressuspensão os tubos foram centrifugados nas mesmas condições dantes e o sobrenadante de cor amarela foi lido em espectrofotômetro visível em 425 nm. O conteúdo de H₂O₂ foi calculado com base em uma curva padrão e expressado em µmol H₂O₂ g⁻¹ MF.

4.4.2 – Peroxidação de lipídios

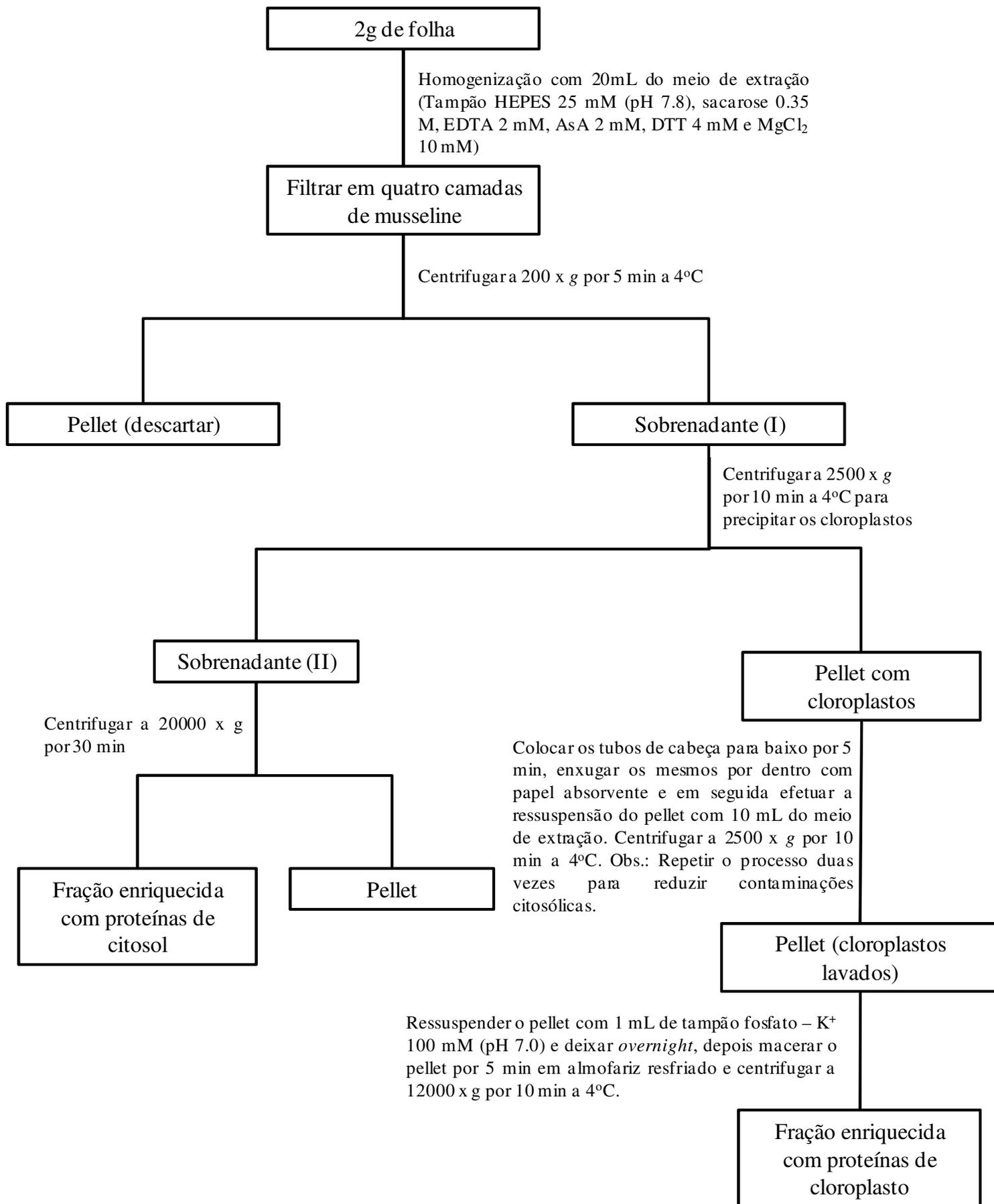
A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Heath & Packer (1968). Para isto 100 mg de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N₂ líquido, seguido da adição de 1,0 mL de TCA 5% e maceração por mais 3 minutos. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 minutos a 4 °C. 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 2,0 mL de uma solução B contendo TCA 20% (p/v) e TBA 0,5% (p/v), em tubos hermeticamente fechados. A reação foi levada ao banho-maria a 95 °C durante 1 h, em seguida foi interrompida em banho de gelo. Após 30 minutos, a temperatura ambiente, duas leituras da absorbância da amostra foram feitas em espectrofotômetro, a 532 nm e 660 nm (formação do complexo MDA-TBA). Para o cálculo do conteúdo de TBARS faz-se (L_{660nm} - L_{532nm}) e o resultado é utilizado, com base em um coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹, para calcular o conteúdo de TBARS expresso em nmol g⁻¹ MF.

4.4.3 – Extração de proteínas solúveis totais

Amostra de folhas frescas (200 mg) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido seguido da adição de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) adicionado de EDTA 0.1 mM. Após a extração o extrato foi centrifugado a 14.000 x g à 4°C durante 30 minutos. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando albumina de soro bovino (BSA).

4.4.4 – Extração de proteínas do citosol e cloroplasto

A extração das enzimas citosólicas e cloroplásticas foi efetuada por uma adaptação do método de Quiles & Cuello, 1998 descrito abaixo.



Adaptado de Quiles & Cuello, 1998

4.5 – Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da **peroxidase de ascorbato** (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano & Asada (1981). Alíquotas de 0,1 mL de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (30 mM) ao meio de reação e acompanhado o decaimento da absorbância a 290 nm em espectrofotômetro durante 120 segundos com leituras sucessivas em intervalos de 30 segundos. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o ascorbato, à 290 nm e expressa como μmol ASA g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da **catalase** (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir & Mchale, (1987). Alíquotas de 0,05 mL de extrato protéico foram adicionadas a 2,95 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo H₂O₂ (20 mM). A reação ocorreu a 30°C e foi acompanhada pelo decaimento da absorbância a 240 nm em espectrofotômetro durante 300 segundos com leituras sucessivas a cada 30 segundos. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ($\epsilon_{340} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressa em μmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da **dismutase de superóxido** (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Giannopolitis & Ries (1977). Alíquotas de 0,1 mL do extrato protéico foram transferidas para o meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 750 μM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de riboflavina 1 mM e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por uma lâmpada de 30 watts (30 μmol de fótons m⁻² s⁻¹), durante 5 minutos. A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras em espectrofotômetro a 560 nm. A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, uma unidade de atividade corresponde à quantidade da enzima necessária para inibir 50% da redução (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971). A atividade foi expressa em U.A. g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da **fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase** (PHGPx; EC 1.11.1.9) foi determinada de acordo com o método de Awasthi et al. (1975), utilizando o hidroperóxido de

cumeno com substrato. O meio de reação contendo 100 μL do extrato enzimático, glutathiona (GSH) 4 mM, NADPH 0.2 mM, 0.05 U de glutathiona redutase (GR) e 0.5 mM de hidroperóxido de cumeno em tampão fosfato de potássio (100 mM/pH 7.0) em um volume total de 1 mL. O consumo do NADPH foi monitorado utilizando um espectrofotômetro (UV/Vis) a 340 nm. O consumo não específico de NADPH foi deduzido através de medidas adicionais na ausência do substrato. A atividade foi calculada com base no coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.6 – Delineamento estatístico e análise dos dados

No experimento I foram utilizados dois genótipos (WT & APX1/2s) com cinco tempos de coleta totalizando 10 tratamentos representados por amostras compostas. No experimento II foram utilizados também os mesmos genótipos antes citados nas condições controle, luz, MV e NaCl totalizando oito tratamentos. Cada tratamento foi representado por três repetições para cada genótipo. Os dados foram submetidos ao teste de análise de variância ANOVA a um nível de significância de 0.001, em seguida as médias das variáveis foram submetidas ao teste de Tukey em um nível de significância de 0.005.

5 – RESULTADOS

5.1 – EXPERIMENTO I – Estresse oxidativo induzido por metil-viologênio em segmentos de folhas de arroz

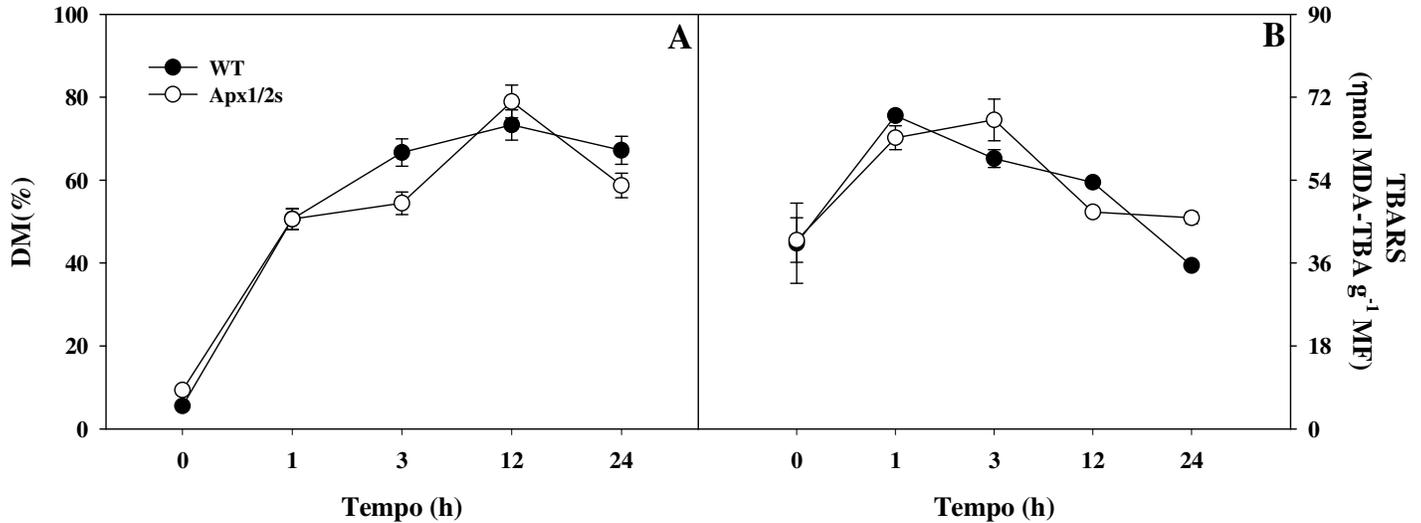


Figura 5 – Vazamento de eletrólitos (A) e peroxidação de lipídios (B) em segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 24h com metil-viologênio 50 μ M.

Indicadores de estresse fisiológico e oxidativo em segmentos de folhas de arroz tratadas com metil-viologênio 50 μ M.

O vazamento de eletrólitos é um indicador fisiológico utilizado para avaliar a taxa de viabilidade celular dos tecidos, utilizando a condutividade elétrica de soluções em contato com esses tecidos como parâmetro. Tanto plantas tipo selvagem (WT), quanto plantas transformadas (Apx1/2s) sofreram danos similares durante o período de tratamento. Os resultados mostraram que após uma hora de tratamento aproximadamente 50% das células apresentavam danos estruturais, seguido de um aumento de 20% até 12h de tratamento e um leve declínio após 24h indicando degradação generalizada do tecido. Os resultados são reforçados pelo aspecto visual das folhas durante o tratamento (figura 7), onde após 3h as folhas apresentaram forte clorose e degradação de pigmentos (figura 8).

O conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método utilizado para avaliar danos oxidativos causados nos lipídios, em especial ácidos graxos insaturados de membranas. Os resultados mostram uma correlação entre os dados de danos celulares e a peroxidação de lipídios, pois após uma hora de tratamento os níveis de TBARS alcançaram praticamente os valores máximos. No restante do tempo o conteúdo de TBARS sofre um gradual declínio, podendo indicar um processo de degradação generalizada, uma vez que aproximadamente 80% das células estão danificadas (figura 5A).

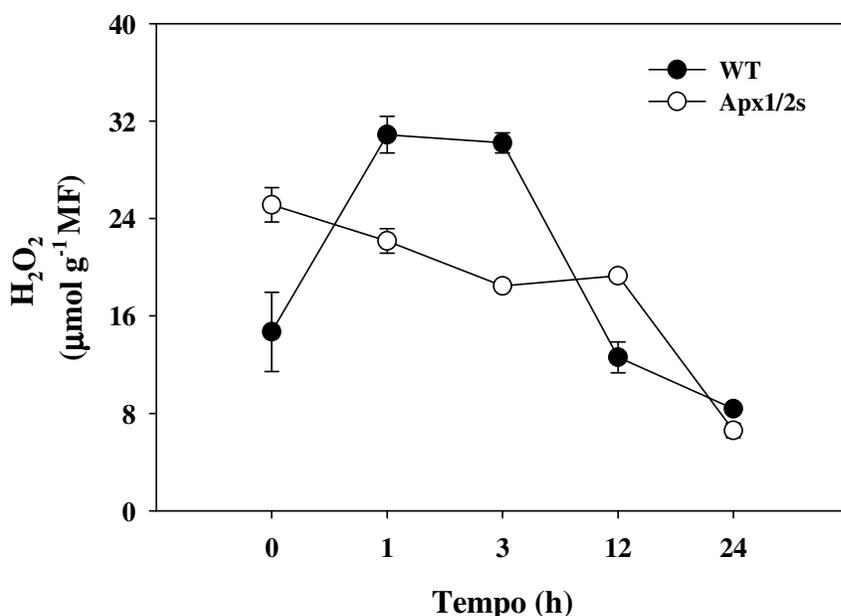


Figura 6 – Conteúdo de peróxido de hidrogênio em segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 24h com metil-viologênio 50 µM.

O acúmulo de peróxido de hidrogênio é um parâmetro utilizado para verificar a ocorrência ou não de estresse oxidativo e fazer uma correlação com danos oxidativos, como o TBARS. Os resultados mostram que as plantas transformadas (Apx1/2s) apresentaram um nível inicial de H₂O₂ maior do que as não transformadas (WT), sendo um possível resultado da transformação dessas plantas. Após uma hora de tratamento os níveis de H₂O₂ mais que dobram nas plantas WT, atingindo um pico que se mantém constante até 3h, podendo ser resultado de uma explosão oxidativa no sentido de ativar mecanismos de defesa antioxidativa. Após 3h o conteúdo de peróxido diminui drasticamente nas plantas não transformadas, atingindo níveis abaixo do controle. Esses resultados podem indicar autodegradação do H₂O₂ por conta de danos generalizados nas células (figura 5A), ou seja, a maquinaria bioquímica da célula já estava

bastante comprometida. Nas plantas transformadas os níveis de H_2O_2 decrescem praticamente ao longo de todo o tempo de tratamento, se mantendo constante apenas de 3h às 12h. Provavelmente, nas três primeiras horas a planta conseguiu ativar mecanismos eficientes para remoção do excesso de H_2O_2 , ativação que foi possível por conta do elevado conteúdo de H_2O_2 já em condições controle, contudo não é possível afirmar o mesmo nas horas seguintes devido aos sérios danos celulares (figura 5A). Os resultados de WT foram os que guardaram maior correlação com os resultados de vazamento de eletrólitos (figura 5A) e TBARS (figura 5B), pois os picos de peróxido coincidem com os picos de dano de membrana e peroxidação de lipídios nessas plantas.

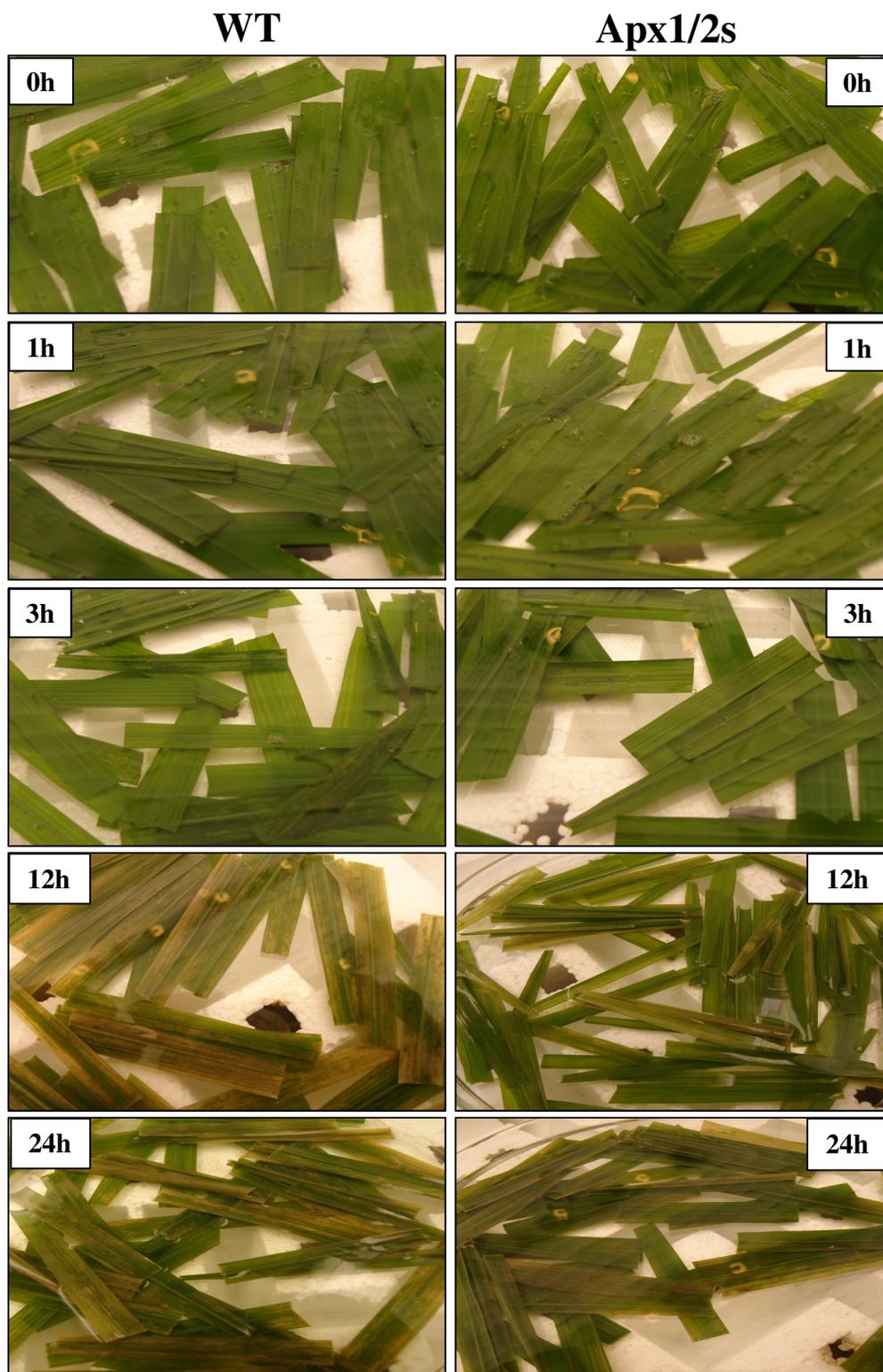


Figura 7 – Aspecto visual dos segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 24h com metilviologênio 50 μ M.

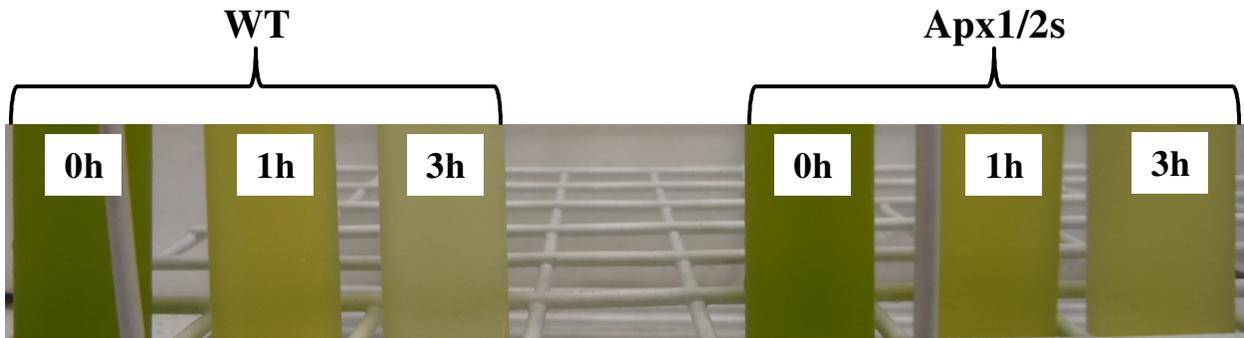


Figura 8 – Degradação de clorofilas dos segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 24h com metil-viologênio 50 μ M.

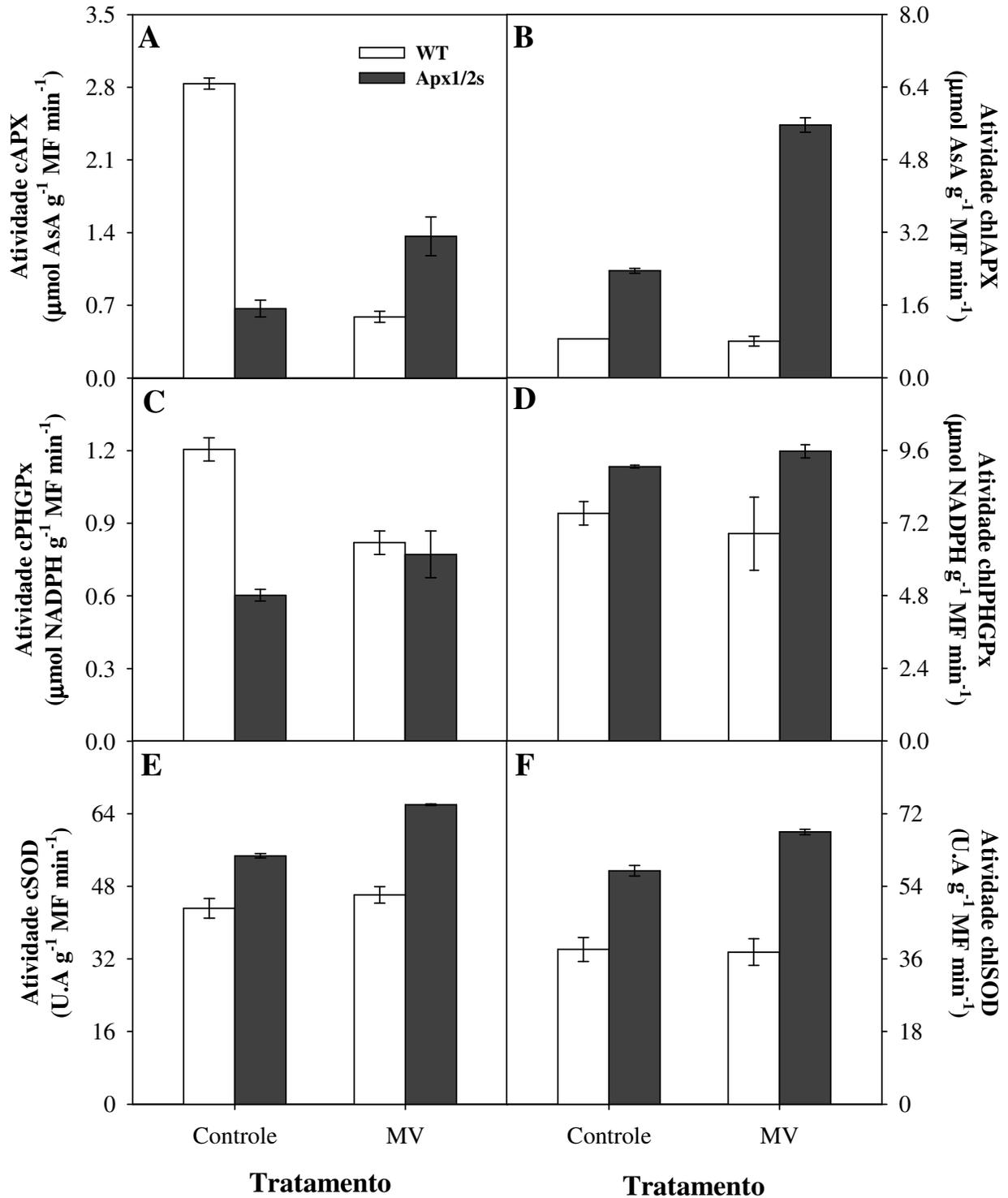


Figura 9 – Atividade das enzimas citosólicas e cloroplásticas peroxidase do ascorbato (cAPX/chlAPX) (A/B), fosfolipídio hidroperóxido glutaciona peroxidase (cPHGPx/chlPHGPx) (C/D) e dismutase do superóxido (cSOD/chlSOD) (E/F) em segmentos de folhas de arroz tratadas ou não por 3h com metil-viologênio 50 μM .

Atividades de enzimas antioxidantes das frações citosólica e cloroplástica em segmentos de folhas de arroz tratadas com metil-viologênio 50 μ M.

Como resultado da transformação as plantas Apx1/2s apresentaram aproximadamente 80% menos na atividade de cAPX em relação às plantas não transformadas (figuras 9A e 9B), ou seja, o silenciamento do gene foi confirmado. Contudo as plantas WT apresentaram mais de 80% de redução na atividade dessa enzima no tratamento com metil-viologênio (MV), enquanto nas plantas silenciadas a atividade dessa enzima foi dobrada no mesmo tratamento. Possivelmente as plantas Apx1/2s possuem um sistema antioxidante mais ativado, podendo responder prontamente a estresses. Esse fato pode ser reforçado pelos resultados na atividade da isoforma cloroplástica da APX (chlAPX). As plantas WT não responderam ao estresse e mesmo em condições controle a atividade da chlAPX era inferior a das plantas Apx1/2s. Quando sob condições de estresse a atividade da chlAPX foi mais que dobrada nas plantas Apx1/2s (aumento de 135%), enquanto que nas WT o sistema não foi estimulado. Esses resultados reforçam ainda mais a idéia de que plantas Apx1/2s possuem um sistema antioxidante mais ativado.

A atividade da enzima cPHGPx nas plantas WT foi maior em relação as Apx1/2s em condições controle (figuras 9C e 9D), contudo após o tratamento com MV as plantas WT apresentaram uma redução de 30% na atividade dessa enzima e as plantas transformadas apresentaram um aumento de 15%. A menor atividade da cPHGPx nas plantas Apx1/2s sob condições controle pode ser devido a necessidade da planta manter os níveis de H₂O₂ elevados, tornando a planta mais eficiente na resposta ao estresse (figura 6). A atividade da isoforma cloroplástica da PHGPx (chlHPGPx) foi maior nas plantas Apx1/2s e não foi estimulada nas plantas WT, apresentando um leve aumento nas plantas Apx1/2s no tratamento com MV. Isso pode indicar que a chlPHGPx possivelmente compensou sua isoforma citosólica, agindo em um dos maiores sítios produtores de ERO.

A atividade da enzima cSOD foi maior nas plantas transformadas (figuras 9E e 9F), mesmo em condições controle, não sendo estimulada nas plantas WT e sofrendo um aumento de 20% nas plantas Apx1/2s no tratamento com MV. A enzima cSOD é uma enzima produtora de H₂O₂, logo sua maior atividade nas plantas Apx1/2s, em condições controle, pode ser correlacionada com os níveis de H₂O₂ que também são elevados nas mesmas condições. Como esperado, a atividade dessa enzima foi ainda mais estimulada quando as plantas Apx1/2s foram

tratadas com o indutor da produção de radicais $O_2^{\bullet-}$ (MV). A isoforma cloroplástica da SOD (chlSOD) apresentou resultados similares aos da cSOD, estando sempre mais ativada nas plantas Apx1/2s no controle e no estresse e não sendo estimulada nas plantas WT em qualquer condição.

Esses resultados reforçam a tentativa da planta Apx1/2s em manter um nível de H_2O_2 sempre maior nas condições controle. A elevada atividade das três isoformas cloroplásticas de APX, PHGPx e SOD pode inferir uma possível fragilidade do sistema fotossintético das plantas transformadas, pois a atividade das mesmas indica que está ocorrendo a produção de ERO (SOD) e a tentativa de reparar os danos causados pelas mesmas (PHGPx).

5.2 - EXPERIMENTO II – Estresse oxidativo induzido por estresses abióticos em plantas de arroz

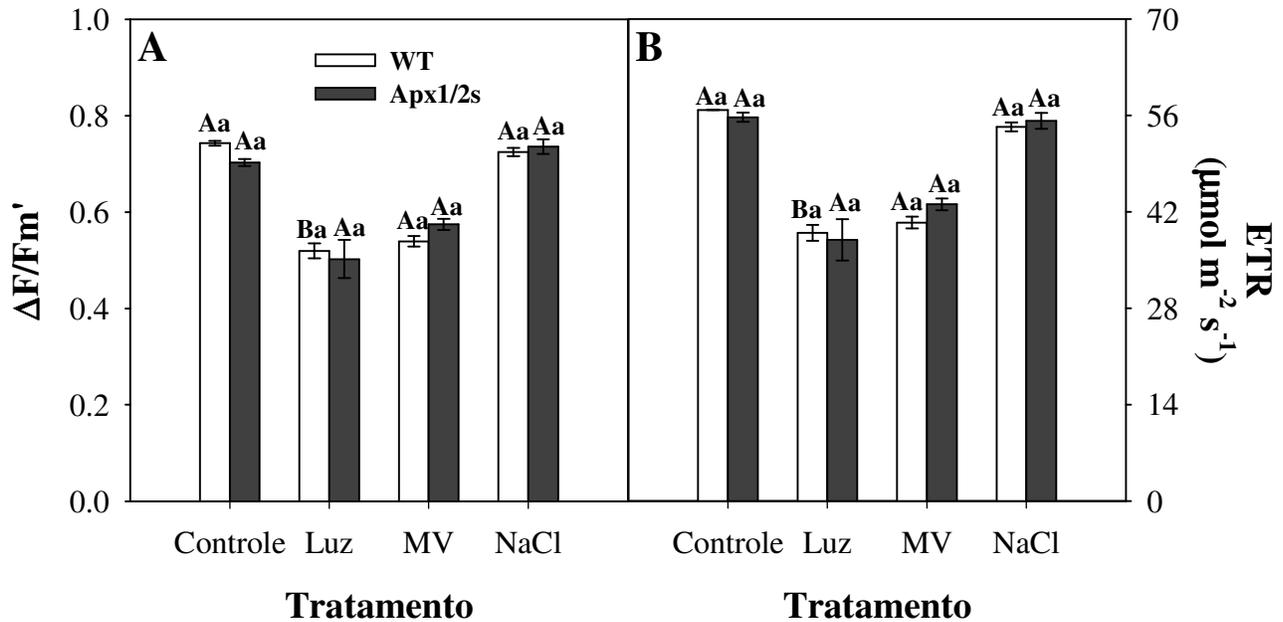


Figura 10 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Eficiência quântica atual do PSII (A), taxa de transporte de elétrons através do PSII (B).

Parâmetros de fluorescência da clorofila a

1) *Eficiência do PSII e taxa de transporte de elétrons através do PSII*

Medidas de fluorescência da clorofila *a* são amplamente utilizados em estudos para analisar a eficiência fotossintética de plantas. Os resultados mostram que em condições controle as plantas Apx1/2s apresentaram uma pequena redução na eficiência quântica do PSII (figura 10A) quando comparadas as plantas WT. Esse fato pode ser resultado do processo de transformação, contudo não deve ser visto como negativo, pois a planta pode apenas estar regulando a quantidade de energia que entra nos fotossistemas para não os comprometer. Já nos tratamentos de alta luz e MV, tanto plantas controle quanto Apx1/2s sofreram uma considerável queda em $\Delta F/F_m'$, contudo o estresse salino não apresentou alterações. Os tratamentos com luz e MV apresentaram resultados esperados, pois ambos agem diretamente sobre a cadeia transportadora de elétrons (CTE) cloroplástica. Os resultados mostram que o sistema

fotoquímico das plantas teve sua eficiência comprometida devido a possíveis danos causados pelo excesso de energia sobre o mesmo durante os estresses. A taxa de transporte de elétrons (figura 10B) seguiu a mesma tendência dos resultados de $\Delta F/F_m'$ para as plantas WT e Apx1/2s. Esses parâmetros apresentam forte correlação, pois se a taxa de elétrons que passa através do PSII é reduzida sobre uma intensidade luminosa constante, isso significa que o PSII está sofrendo regulação para não captar energia em excesso, conseqüentemente reduzindo sua eficiência ($\Delta F/F_m'$). A regulação do PSII no tratamento de luz pode ter ocorrido por fotoinibição, enquanto no tratamento com MV devido a danos oxidativos. Contudo não há praticamente diferenças entre plantas WT e Apx1/2s na ETR, podendo esse resultado estar correlacionado com a menor eficiência do PSII.

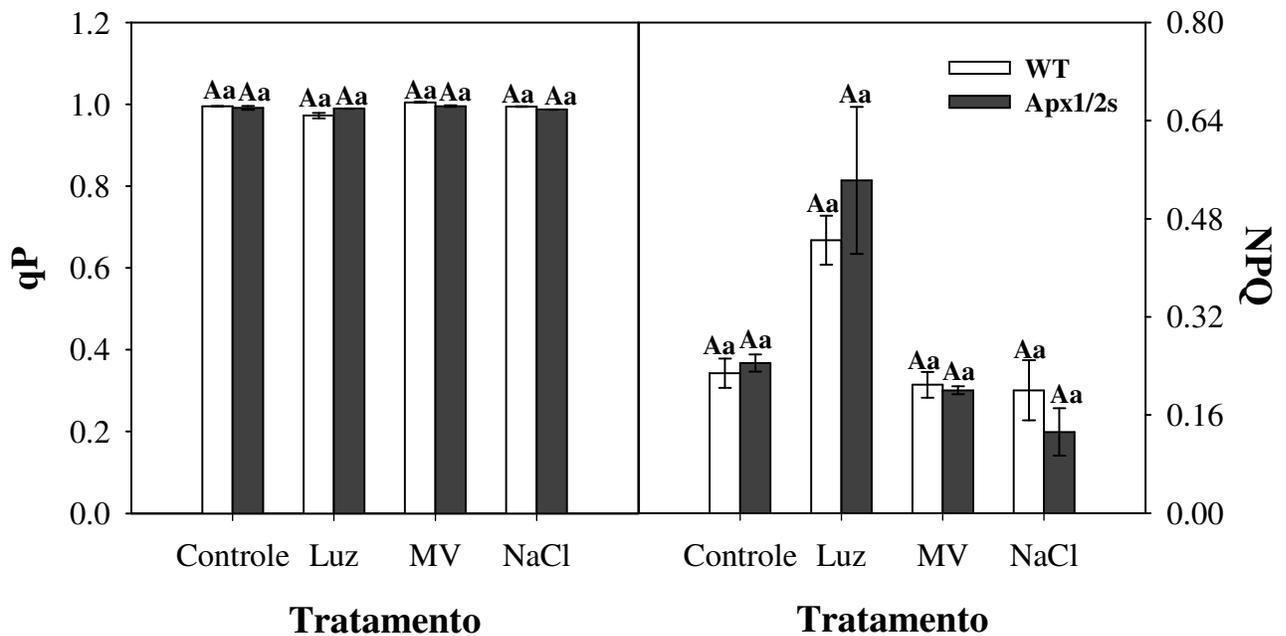


Figura 11 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. *Quenching* fotoquímico (A) e *quenching* não fotoquímico (B).

2) *Quenching fotoquímico e não fotoquímico*

Os resultados do *quenching* não fotoquímico (figura 11B) mostram que as plantas WT e Apx1/2s não diferiram com relação a esse parâmetro, contudo no estresse de luz esse parâmetro quase foi duplicado para ambas as plantas. Esse resultado mostra que uma parte da energia dos elétrons, que foram possivelmente desviados, foi dissipada na forma de calor (NPQ). Com relação aos outros tratamentos não houve alterações significativas. No estresse de luz os resultados do EXC (figura 12B) foram similares aos de NPQ (figura 11B), mostrando que esse tratamento sobrecarregou a CTE cloroplástica e forçou a dissipação dessa energia de alguma forma. Apenas nos estresses de luz e MV as plantas WT apresentaram aumento no excesso de energia, estando inalterada no estresse salino. Já nas plantas Apx1/2s os tratamentos MV e salino provocaram um decréscimo no EXC em relação a essas plantas sob condições controle. Talvez em cada tratamento, tanto plantas WT quanto apx1/2s ativaram mecanismos alternativos de dissipação de energia que não foram mensurados no presente trabalho. Um dado curioso é que nas condições controle as plantas Apx1/2s já apresentam um excesso de energia sobre o PSII quando comparadas as plantas WT.

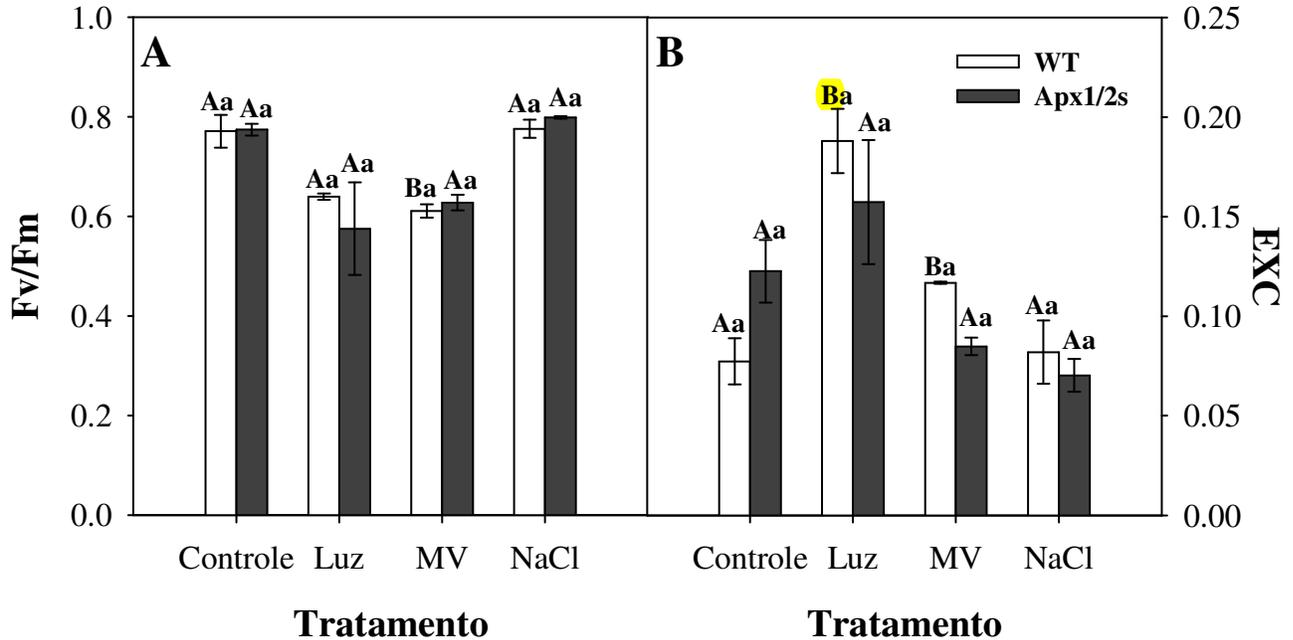


Figura 12 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Eficiência quântica potencial do PSII (A) e excesso de energia relativa ao PSII (B).

3) Eficiência potencial do PSII e excesso de energia relativa ao PSII

Os mecanismos de dissipação de energia citados acima, e outros não mencionados, podem ter influenciado na manutenção do *quenching* fotoquímico (figura 11A). Os resultados mostram que plantas WT e Apx1/2s não apresentaram mudanças em qP em nenhum momento (controle, luz, MV ou NaCl). Isso sugere que o fotossistema das plantas conseguiu de alguma forma contornar os danos causados pelo excesso de energia e manter um fluxo de elétrons para formação de NADPH e ATP. Contudo danos permanentes foram causados ao fotossistema das plantas (figura 12A), pois a eficiência quântica potencial sofreu uma redução de aproximadamente 20% nos estresses de luz e MV. Apesar de todos os mecanismos utilizados pelas plantas (WT e Apx1/2s) para evitar danos ao aparato fotossintético, não foi possível evitar o comprometimento do fotossistema causado possivelmente por ERO geradas durante os estresses de luz e MV. O estresse salino provocado não foi suficiente para provocar danos permanentes ao aparato fotoquímico.

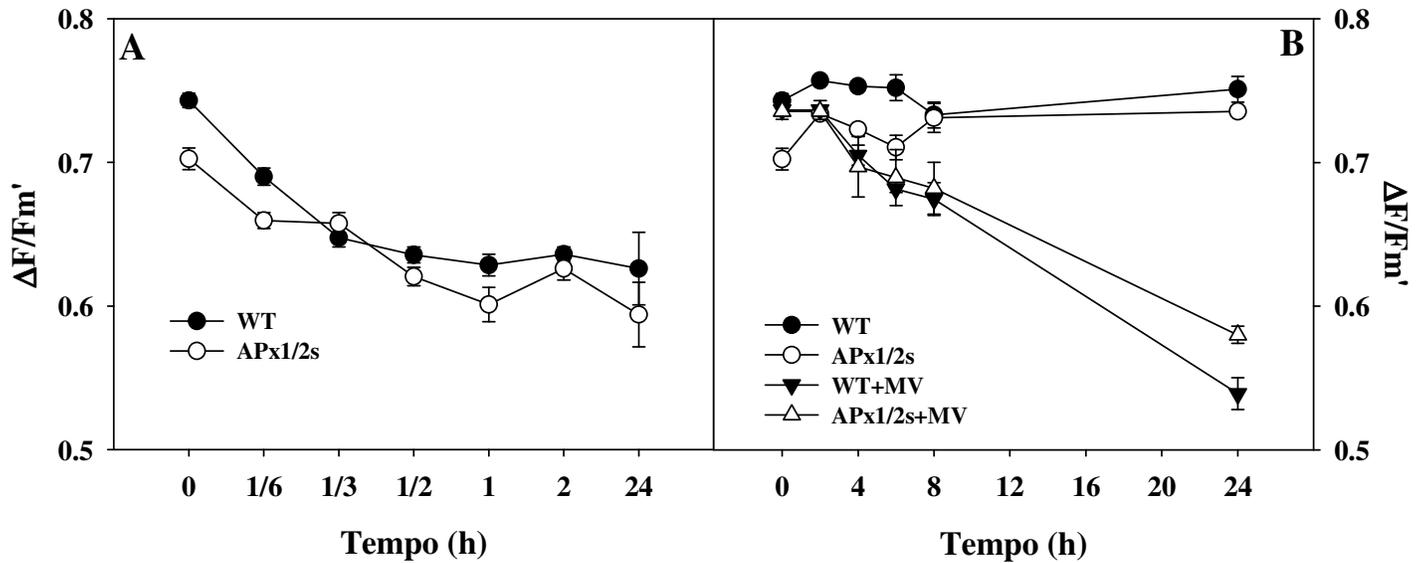


Figura 13 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Eficiência quântica atual do PSII em plantas expostas por 24h à alta luz (~2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A), eficiência quântica atual do PSII em plantas tratadas com metil-viogênio (MV) 50 μM por 24h (B).

Eficiência quântica atual do PSII em plantas expostas a alta luz

A correlação entre parâmetros fotoquímicos e trocas gasosas constitui uma importante ferramenta para a análise do desempenho fotossintético de plantas. Tanto as plantas WT quanto Apx1/2s tiveram a eficiência do PSII reduzida durante o período de luz (figura 13A). Como visto anteriormente as plantas Apx1/2s apresentam uma menor $\Delta F/F_m'$ quando comparadas as WT em condições controle. As plantas WT descrevem uma queda até meia hora de tratamento, tendendo a uma estabilidade no restante do tempo. As plantas Apx1/2s apresentam um comportamento mais instável, como se tentassem adaptar seus fotossistemas as novas condições de intensidade luminosa. Mesmo com um menor $\Delta F/F_m'$ inicial, as plantas Apx1/2s não sofreram mais que as plantas WT ao longo do tempo de tratamento. No tratamento com MV as plantas WT e Apx1/2s mantiveram, durante o período de luz, uma distância constante nos valores de $\Delta F/F_m'$ (figura 13B) comportamento que sempre se manteve entre essas plantas nas condições controle. Quando tratadas com MV as plantas apresentaram resposta similar até 8h, após esse período as plantas

WT apresentaram uma maior queda na eficiência fotoquímica do que as plantas Apx1/2s. Ressaltando que as plantas Apx1/2s começaram com um valor de $\Delta F/F_m'$ menor que o das plantas WT, contudo as Apx1/2s apresentaram uma menor variação em $\Delta F/F_m'$ quando comparadas com as WT.

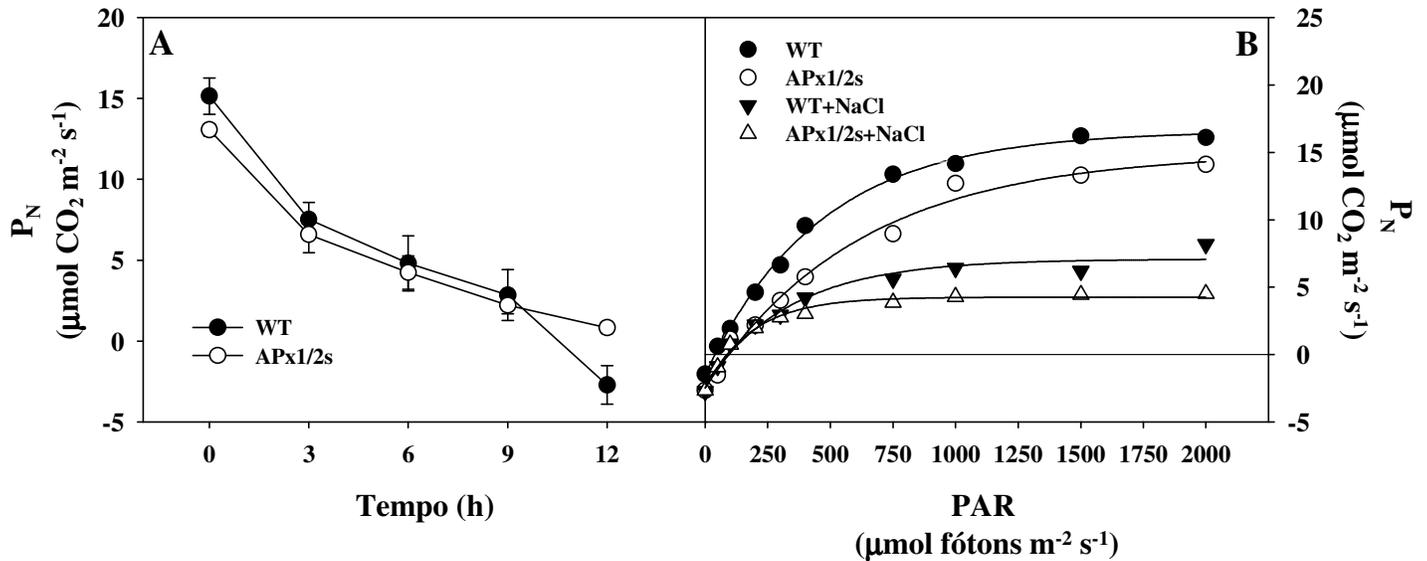


Figura 14 – Trocas gasosas em plantas de arroz n\u00e3o transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citos\u00f3lica (Apx1/2s) sob estresses abi\u00f3ticos ou n\u00e3o. Fotoss\u00edntese em plantas tratadas com MV 50 μM por 12h (A) e curva de fotoss\u00edntese em plantas tratadas com NaCl-100 mM durante sete dias (B).

Fotoss\u00edntese ao longo do tempo

Semelhante ao que acontece com $\Delta F/F_m'$ a fotoss\u00edntese das plantas transformadas tamb\u00e9m inicia com uma taxa abaixo da taxa das plantas WT (figura 14A). Contudo, nas \u00faltimas horas de tratamento a taxa de fotoss\u00edntese das plantas WT atingiu valores negativos (respira\u00e7\u00e3o), enquanto as plantas Apx1/2s ainda apresentam uma taxa fotossint\u00e9tica positiva. Isso pode indicar que as plantas Apx1/2s, ap\u00f3s 9h de tratamento com MV, conseguem regular melhor seu aparato fotossint\u00e9tico sob condi\u00e7\u00f5es de estresse tendo uma melhor fotoss\u00edntese nessas condi\u00e7\u00f5es, o contr\u00e1rio das plantas WT. A figura 14B mostra uma curva de fotoss\u00edntese ao longo de diferentes

fluxos de fótons fotossinteticamente ativos (PPFDs) em condições controle e sob estresse salino para as plantas WT e Apx1/2s. Os resultados mostram que nas condições controle as plantas WT apresentam sempre um taxa de fotossíntese maior do que a taxa das plantas Apx1/2s, com uma leve tendência de encontro dessas curvas nos maiores PPFDs. No mesmo gráfico podemos visualizar a fotossíntese dessas plantas comprometida por conta do tratamento salino, possivelmente causado pelo fechamento estomático e conseqüente diminuição na captação de CO₂. Apesar de ambas as plantas sofrerem uma diminuição de aproximadamente 50% em sua fotossíntese, a tendência analisada nas condições controle se manteve com WT tendo uma fotossíntese maior que Apx1/2s.

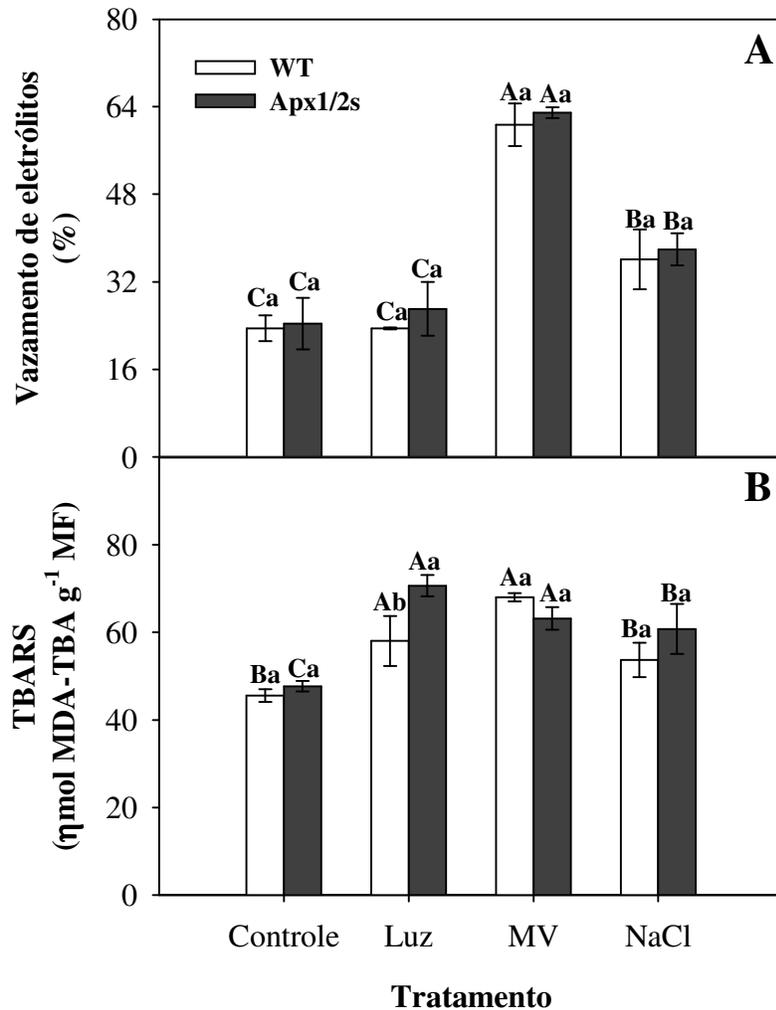


Figura 15 – Vazamento de eletrólitos (A) e peroxidação de lipídios (B) em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não.

Indicadores de estresse fisiológico e oxidativo em plantas de arroz sob estresses abióticos

O vazamento de eletrólitos é um indicador fisiológico utilizado para avaliar a taxa de viabilidade celular dos tecidos, utilizando a condutividade elétrica de soluções em contato com esses tecidos como parâmetro. Os resultados mostram que apenas os tratamentos com MV e NaCl foram capazes de causar danos celulares aos tecidos das plantas WT e Apx1/2s (figura 15A), sendo o tratamento com MV o mais pronunciado de todos. O tratamento salino apresentou

56% de danos nas plantas WT e 54% nas Apx1/2s, enquanto o tratamento com MV provocou aumento de 160% em WT e 158% em Apx1/2s. Os resultados mostram que os tratamentos com MV e NaCl provocaram os maiores danos devido provavelmente a produção em excesso de ERO, causada pelo comprometimento da fotossíntese dessas plantas.

Um padrão similar de resposta foi observado no conteúdo de TBARS das plantas WT e Apx1/2s (figura 15B), contudo neste caso o estresse de luz provocou os maiores níveis de TBARS nas plantas Apx1/2s (aumento de 48%) enquanto nas plantas WT o tratamento com MV foi o mais severo (aumento de 51%). Comparando esses resultados com os de vazamento de eletrólitos notamos que TBARS aumentou em todos os tratamentos onde o vazamento também aumentou. Contudo o estresse de luz apresentou níveis elevados de TBARS, indicando que esse tratamento pode ter inibido enzimas importantes na remoção de ERO possivelmente por essas enzimas sofrerem algum tipo de regulação dependente de luz.

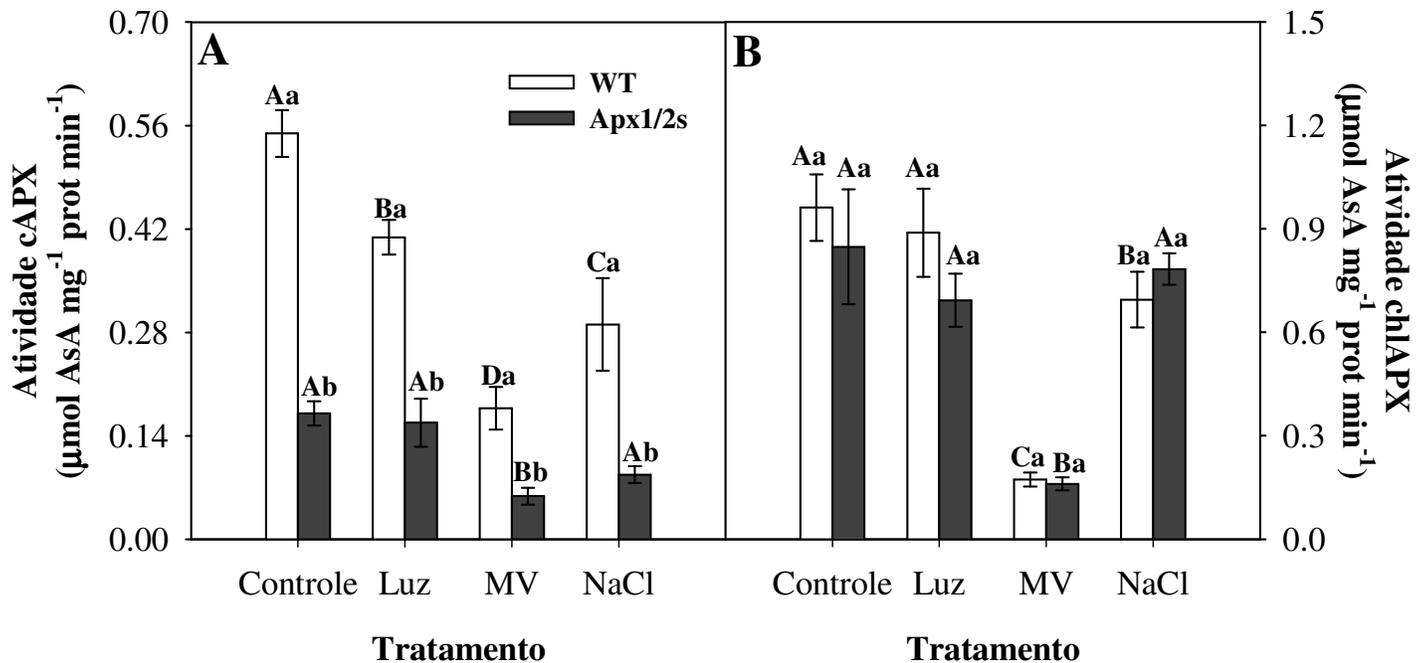


Figura 16 - Atividade de enzimas antioxidantes em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Peroxidase do ascorbato citosólica (cAPX) (A) e peroxidase do ascorbato cloroplástica (chlAPX) (B).

Atividades de enzimas antioxidantes das frações citosólica e cloroplástica

A capacidade de acionar diferentes enzimas envolvidas na remoção de espécies reativas de oxigênio demonstra a capacidade da planta em enfrentar os vários tipos de estresse. A exemplo do experimento com segmentos de folha, a atividade da cAPX se manteve reduzida nas plantas Apx1/2s, chegando a 30% da atividade encontrada nas plantas WT (figura 16A). Todos os tratamentos reduziram a atividade da cAPX nas plantas WT, com ênfase para o tratamento com MV que reduziu a atividade desta em 70%. O tratamento com NaCl reduziu a atividade da cAPX em 45% e no tratamento com luz em 25%. O tratamento com MV ou NaCl provavelmente aumentou o nível de ERO, em especial o H_2O_2 que em elevados níveis pode inibir a ação da APX. As plantas Apx1/2s apresentaram atividade de cAPX ainda mais reduzida nos tratamentos com MV e NaCl, reduzindo a atividade em 65% e 50% respectivamente.

Nas plantas WT a isoforma chlAPX apresentou redução de atividade significativa apenas nos tratamentos com MV e NaCl (figura 16B), sendo mais uma vez o MV o mais severo. Não houve diferença entre as plantas WT e Apx1/2s, nas condições controle, para a atividade da chlAPX. Nas plantas Apx1/2s apenas o MV provocou uma forte redução na atividade da chlAPX, não apresentando redução significativa nos demais tratamentos. A atividade da chlAPX nas plantas Apx1/2s praticamente acompanhou a atividade daquela nas plantas WT, ou seja, reduzindo fortemente no tratamento com MV e se mantendo próxima da atividade nas plantas WT nos demais tratamentos. Isso pode indicar um possível efeito compensatório nas plantas Apx1/2s que são silenciadas para cAPX.

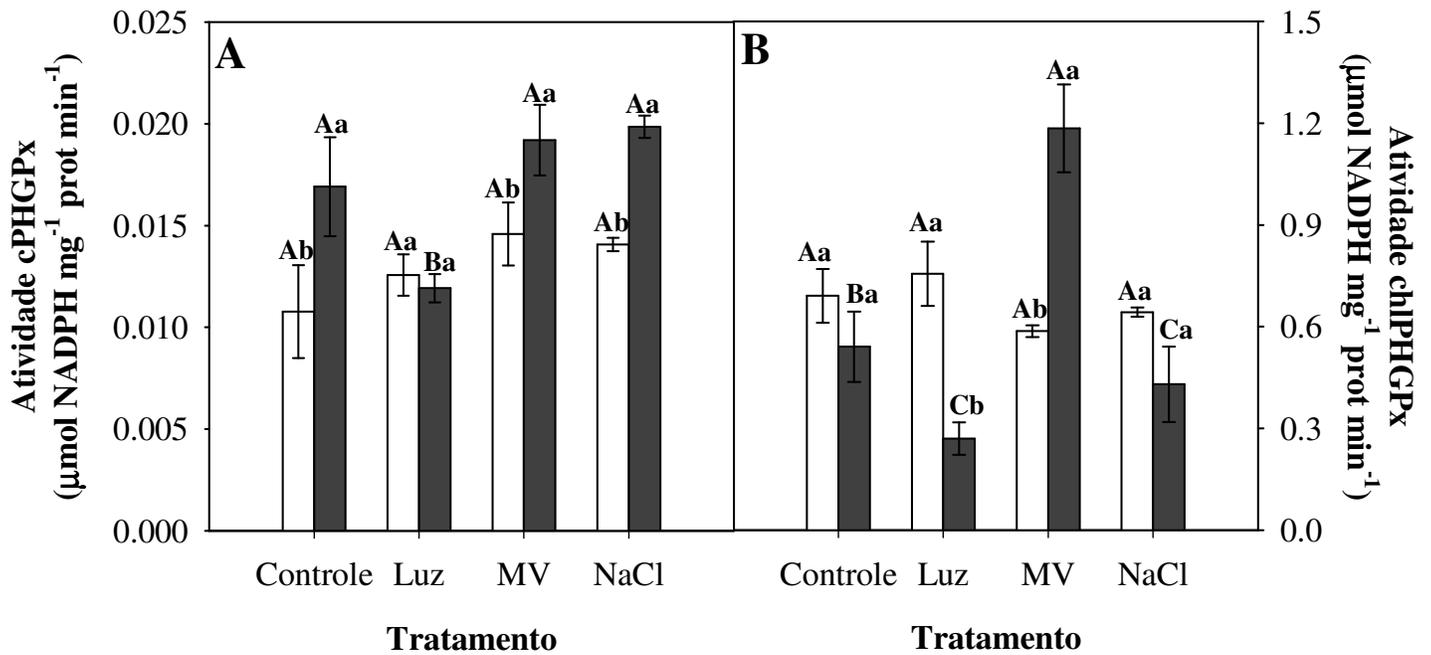


Figura 17 - Atividade de enzimas antioxidantes em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Fosfolípido hidroperóxido glutaciona peroxidase (cPHGPx) (A) e fosfolípido hidroperóxido glutaciona peroxidase (chlPHGPx) (B).

A atividade da enzima PHGPx é essencial para a proteção dos fosfolípídios estruturais de membrana. Em condições controle as plantas Apx1/2s apresentaram uma maior atividade da enzima cPHGPx comparando com as plantas WT (figura 17A). Apenas no tratamento de luz essa

atividade foi reduzida, apresentando uma tendência de aumento, não significativa, nos tratamentos de MV e NaCl. As plantas WT apresentaram uma atividade de cPHGPx praticamente constante em todos os tratamentos, com uma tendência de aumento, não significativa, no tratamento salino. O elevado e constante nível de atividade desta enzima nas plantas Apx1/2s pode sugerir um sistema adicional de defesa contra danos oxidativos, tendo em vista que essas plantas apresentam níveis elevados de H_2O_2 em condições controle. A isoforma chlPHGPx não apresentou diferença de atividade quando comparadas plantas WT e Apx1/2s nas condições controle (figura 17B). Nos tratamentos com MV e NaCl a atividade da chlPHGPx nas plantas WT apresentou uma leve tendência de redução (não significativa). Nas Apx1/2s apenas o tratamento de luz reduziu a atividade da chlPHGPx, podendo a mesma sofrer algum tipo de regulação pela luz. O resultado que merece mais destaque é a atividade da chlPHGPx no tratamento com MV, resultando em um aumento de 115% na atividade desta enzima. Esse último resultado, mais os resultados da atividade de cPHGPx fortalecem a ideia que plantas Apx1/2s possuem um sistema antioxidante mais ativado quando comparado com plantas WT.

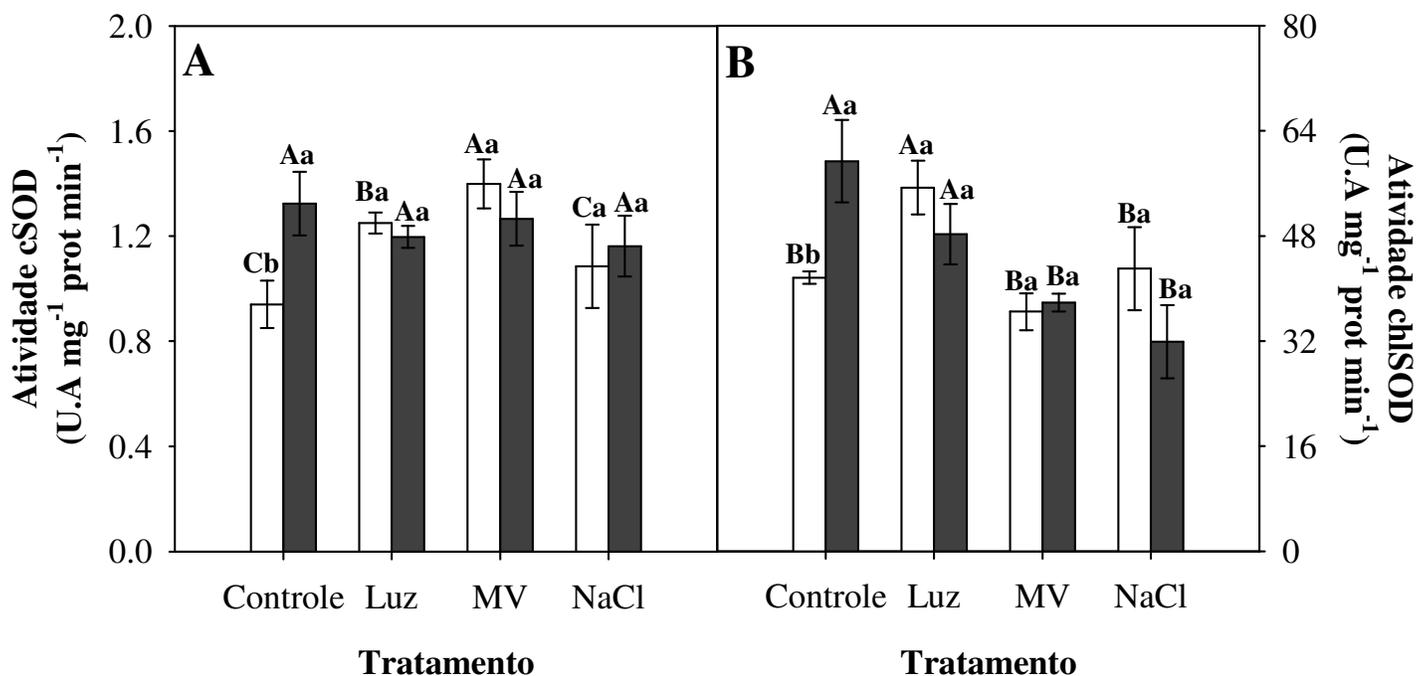


Figura 18 - Atividade de enzimas antioxidantes em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não. Dismutase do superóxido citosólica (cSOD) (A) e dismutase do superóxido cloroplástica (chlSOD) (B).

A atividade das dismutases do superóxido (SODs) é correlacionada com os conteúdos de H₂O₂ encontrados em tecidos vegetais, pois essa enzima catalisa a dismutação do superóxido à peróxido de hidrogênio. Nas condições controle, plantas Apx1/2s apresentam maior atividade da cSOD em comparação com as plantas WT (figura 18A), podendo ser um dos motivos para o elevado nível inicial de H₂O₂ nessas plantas. Nenhum dos tratamentos foi capaz de estimular a atividade da cSOD nas plantas Apx1/2s, contudo os tratamentos de luz e MV provocaram aumentos de 33% e 48% respectivamente, nas plantas WT. O estímulo dessa enzima nas plantas WT pode ser devido a necessidade de um nível sinalizador de H₂O₂ para ativar sistemas antioxidantes, nível esse que já existe nas plantas Apx1/2s nas condições controle. Sob condições controle a atividade da chlSOD também é maior nas plantas Apx1/2s em relação em comparação com as plantas WT (figura 18B). Interessante notar que nos tratamentos com MV e NaCl a chlSOD sofre uma redução significativa nas plantas Apx1/2s, sugerindo uma regulação negativa dessa enzima, pois já existe um nível de H₂O₂ basal que poderia atuar na sinalização e ativação da maquinaria antioxidativa. Estímulos significativos da chlSOD em plantas WT foram

observados apenas no tratamento de luz, podendo ser resultado do desvio de elétrons oriundos dos fotossistemas para o ciclo de Mehler.

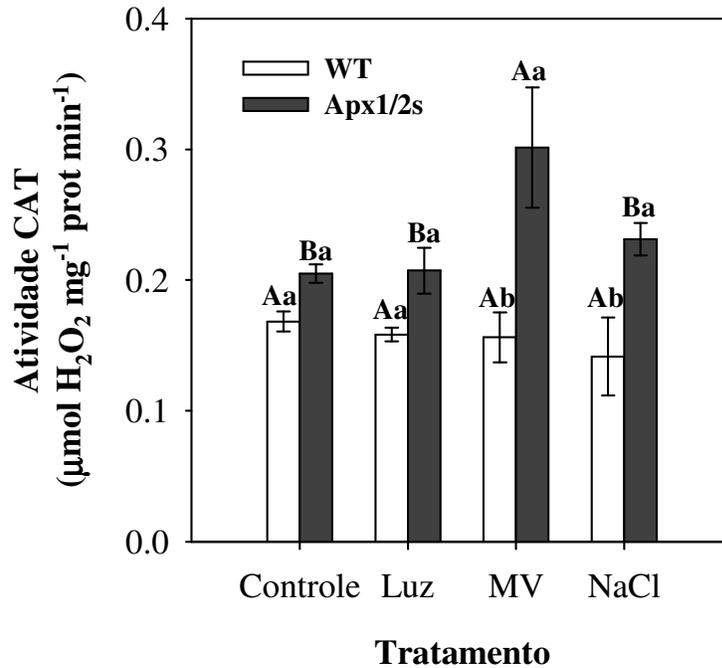


Figura 19 - Atividade de catalase em plantas de arroz não transformadas (WT) e silenciadas nas isoformas da APX citosólica (Apx1/2s) sob estresses abióticos ou não.

A atividade de catalase é vista como fundamental para a desintoxicação de ERO nas células, pois à mesma é atribuído o papel de removedora do excesso de ERO, diferente da APX que apenas modula os níveis de H_2O_2 para sinalização celular. As plantas WT mantiveram a atividade de CAT inalterada em todos os tratamentos. Não apenas nas condições controle, mas também em todos os tratamentos a atividade de CAT nas plantas Apx1/2s foi maior em comparação com as plantas WT. O tratamento de luz não afetou a atividade de CAT de forma alguma, enquanto que o tratamento salino apresentou uma tendência de aumento na atividade de CAT (não significativo). Deve-se destacar ainda o grande aumento na atividade dessa enzima (50%) no tratamento com MV nas plantas Apx1/2s, reforçando a proposta que os níveis basais de H_2O_2 mais elevados nessas plantas ativam os sistemas de defesa antioxidativa com mais rapidez e eficiência.

6 – DISCUSSÃO

6.1 – Experimento I

Os dados obtidos nesse experimento mostraram que as plantas Apx1/2s foram mais eficientes na ativação de seus sistemas de defesa antioxidativa (figura 9). A molécula de metilviologênio é conhecida por sequestrar os elétrons que migram do PSI para o NADP⁺ na CTE dos cloroplastos, transferindo esses elétrons para o oxigênio e gerando grandes quantidades do radical superóxido (ALSCHER, ERTURK & HEATH, 2002). O radical superóxido pode reagir com os centros Fe-S de proteínas (MØLLER, JENSEN & HANSSON, 2007), contudo ele é rapidamente convertido em H₂O₂ pelas SODs do cloroplasto (APEL & HIRT, 2004). Os conteúdos de H₂O₂ (figura 6) e os níveis de TBARS (figura 5B) ao longo do tempo de tratamento guardaram forte correlação, principalmente nas plantas não transformadas (WT), indicando a ocorrência de estresse oxidativo (MULLINEAUX & BAKER, 2010). Nas plantas WT o conteúdo de H₂O₂ mais que dobrou em apenas uma hora, indicando uma explosão oxidativa com função de sinalização e ativação dos sistemas antioxidativos (FOYER & NOCTOR, 2003; CHEESEMAN, 2007; QUAN et al., 2008). Apesar do aumento e manutenção dos altos níveis de peróxido até 3h de tratamento nenhuma das enzimas antioxidativas testada (isoforma citosólica ou cloroplástica) foi estimulada (figura 9).

Provavelmente os sistemas de defesa foram ativados após o período de 3h nas plantas WT, visto que com 12h de tratamento os níveis de H₂O₂ caem drasticamente (figura 6). A análise dos dados de vazamento de eletrólitos (figura 5A) mostrou que após 1h de tratamento as plantas WT apresentaram aproximadamente 70% de danos de membrana, indicando danos generalizados que possivelmente não poderiam mais ser revertidos. Esse fato pode ser reforçado pela visual degradação dos tecidos (figura 7) e clorofilas (figura 8), indicando que entre o período de 3h e 12h pode ter ocorrido eventos de sinalização para a morte celular programada das células e conseqüente morte do tecido (NEILL, DESIKAN & HANCOCK, 2002; GECHEV & HILLE, 2005).

Nas plantas transformadas (Apx1/2s) muitas variáveis diferem daquelas nas plantas WT, começando pelo conteúdo de H₂O₂ já nas condições controle (figura 6). As plantas Apx1/2s mostraram um nível de H₂O₂ inicial 75% maior quando comparadas com as plantas WT,

apresentando correlação com a atividade das enzimas cSOD e chlSOD (figura 9) produtoras de H_2O_2 . A atividade da cSOD em condições controle se mostrou maior nas plantas Apx1/2s do que nas plantas WT, esse aumento pode ser devido ao desvio de elétrons da CTE cloroplástica para o O_2 , gerando o radical superóxido e concomitantemente H_2O_2 pela ação das SODs (ALSCHER, ERTURK & HEATH, 2002).

Koussevitzky et al., 2008 trabalhando com plantas de *Arabidopsis thaliana* silenciadas no gene que codifica a enzima APX1, verificou que os níveis de H_2O_2 nas plantas transformadas eram quase que o dobro daqueles encontrados nas plantas não transformadas nas condições controle. Esse nível de H_2O_2 pode estar muito próximo de um nível que separa as condições celulares normais da iminência de um estresse oxidativo, sendo necessárias pequenas quantidades adicionais de H_2O_2 para ativar os sistemas de defesa antioxidativa. Os níveis de H_2O_2 nas plantas Apx1/2s apresentaram uma queda constante até 3h de tratamento, alcançando estabilidade até 12h e voltando a declinar após esse período (figura 6). A atividade da enzima cAPX foi aumentada significativamente nas plantas Apx1/2s tratadas por 3h com MV, sugerindo a existência de um tipo de regulação a nível de proteína ou mesmo a nível de transcrito.

Rosa et al., 2010 trabalhando com plantas do mesmo tipo (WT e Apx1/2s) mostrou que nas plantas duplamente silenciadas o transcrito mais abundando era o da APX2, podendo essa enzima ser responsável pelo aumento de atividade encontrada. Morita et al., 1999 trabalhando com embriões de arroz em germinação mostrou que o tratamento com MV aumentou em 5 vezes a quantidade de transcritos da cAPX (em relação ao controle) em apenas 4h, sugerindo a mesma modulação no presente trabalho. Apesar do aumento da atividade da cAPX nas plantas Apx1/2s não podemos creditar a diminuição do H_2O_2 naquelas plantas a essa atividade, pois a APX apenas regula os níveis de peróxido intracelular enquanto a catalase é a enzima que remove o excesso de H_2O_2 (SHIGEOKA et al., 2002; MHANDI et al., 2010).

Nas plantas Apx1/2s a atividade da enzima chlAPX era mais que o dobro da atividade da mesma enzima nas plantas WT. A alta atividade desta enzima nas plantas Apx1/2s pode indicar uma compensação do sistema antioxidativo em um dos principais sítios de produção de ERO nas plantas. Provavelmente a redução nos níveis de H_2O_2 com o passar do tempo se deu pela atividade das enzimas CAT e GR (dados não mostrados). Estudos utilizando a supressão de

enzimas removedoras de ERO em plantas, como a APX, costumam acionar mecanismos redundantes para a remoção dessas ERO (SOD, CAT e GR) (MITTLER, 2002).

Nas plantas *Apx1/2s* foi detectada maior da atividade da enzima chlPHGPx do que nas plantas WT sob condições controle. Essa enzima é considerada uma das mais importantes enzimas reparadoras de danos oxidativos, pois ela atua no reparo de hidroperóxidos de lipídio das membranas (YANG, DONG & LIU, 2006). Quando o estresse foi aplicado essa enzima não apresentou alteração em sua atividade. Além de seu papel crucial na proteção contra danos oxidativos, Faltin et al., 2010 mostrou que essa enzima também é fundamental no controle da morfogênese de plantas *in vitro*. Esses resultados podem ser correlacionados com os dados de TBARS onde nas plantas *Apx1/2s* esse parâmetro praticamente não difere de plantas WT, sugerindo que a atividade tanto da cPHGPx quanto da chlPHGPx protegem as estruturas celulares de plantas *Apx1/2s* mais eficientemente que nas plantas WT. A análise conjunta desses resultados fornece o indício de que as plantas *Apx1/2s* não são mais suscetíveis ao estresse oxidativo, comparando com as plantas WT, como estipulado anteriormente.

6.2 – Experimento II

1) *Fotoquímica e Fotossíntese*

Um dos principais efeitos dos estresses abióticos, como seca e salinidade, em plantas superiores é o comprometimento da fase fotoquímica e bioquímica da fotossíntese (MAXWELL & JOHNSON, 2000; MITTLER, 2006). O parâmetro $\Delta F/F_m'$ estima diretamente a eficiência de uso da luz para o transporte de elétrons através do PSII (BAKER & ROSENQVIST, 2004). Os resultados de eficiência quântica atual do PSII ($\Delta F/F_m'$) mostraram que tanto as plantas WT quanto as *Apx1/2s* sofreram fotoinibição nos tratamentos com luz e MV (figura 10A), esse fenômeno é observado em plantas sob alta ou moderada intensidade luminosa (FEIERABEND, SCHAAN & HERTWIG, 1992; EBERHARD, FINAZZI & WOLLMAN, 2008). O efeito fotoinibitório não pode ser interpretado como apenas um dano ao aparato fotoquímico, mas sim um mecanismo eficiente de fotoproteção contra o excesso de luz (RASCHER & NEDBAL, 2006). Não foram observadas diferenças entre as plantas WT e *Apx1/2s* na redução do parâmetro $\Delta F/F_m'$ no estresse de luz, indicando que a menor eficiência fotoquímica das plantas *Apx1/2s*

sob condições controle é um fator inerente a planta. No tratamento com MV a fotoinibição provavelmente ocorreu por conta da produção excessiva de ERO, causando a degradação da proteína D1 e o parcial desmonte dos centros de reação (BAKER, 2008; EBERHARD, FINAZZI & WOLLMAN, 2008). A taxa de transporte de elétrons (ETR) apresentou o mesmo padrão de resposta em ambas a plantas (WT e Apx1/2s) em todos os tratamentos (figura 10B), até porque ETR é uma medida que depende de $\Delta F/F_m'$ para ser calculada (BAKER, 2008). Este parâmetro está relacionado com o fluxo de elétrons através do PSII que potencialmente levarão a formação de NADPH e ATP, se esse parâmetro sofre uma redução isso reforça a ocorrência de fotoinibição do PSII e uma potencial fonte de ERO.

Os resultados do *quenching* não fotoquímico (NPQ) (figura 11B) são facilmente correlacionados com os resultados de $\Delta F/F_m'$ e ETR nas plantas WT e Apx1/2s. *Quenching* não fotoquímico é um dos mecanismos utilizado pelas plantas para evitar danos ao aparato fotossintético (fotoproteção) e dissipar o excesso de energia na forma de calor, ajustando o funcionamento da CTE cloroplástica quando elétrons estão disponíveis em excesso (RASCHER & NEDBAL, 2006). No estresse de luz tanto as plantas WT quanto as Apx1/2s apresentaram forte aumento nesse parâmetro, mais que dobrando em relação a seus respectivos controles. Isso demonstra que ambas a plantas acionaram mecanismos alternativos de dissipação do excesso de energia (ciclo das xantofilas e ciclo água-água, por exemplo) para evitar a fotoinibição do PSII (ASADA, 1999; RASCHER & NEDBAL, 2006), contudo os artifícios utilizados não foram eficazes, pois foram registradas reduções em $\Delta F/F_m'$ (figura 10A). No tratamento com MV tanto as plantas WT quanto as Apx1/2s não apresentaram alteração significativa nos dados de NPQ, contudo apresentaram redução em $\Delta F/F_m'$ indicando que ocorreu fotoinibição. A não ativação dos mecanismos de dissipação de energia (NPQ) pode ser relacionada ao efeito do metilviologênio, que transfere elétrons para o O₂ formando ERO, mas não ocasiona o bloqueio da CTE cloroplástica (ALSCHER, ERTURK & HEATH, 2002; TAIZ & ZEIGER, 2006). A fotoinibição do PSII nas plantas tratadas com MV pode ter sido consequência do excesso de ERO produzidas nos cloroplastos. As plantas Apx1/2s tratadas com NaCl chegaram a apresentar uma leve redução de NPQ, contudo esses resultados apresentam correlação com os dados de $\Delta F/F_m'$ para as plantas Apx1/2s e plantas WT também. O *quenching* fotoquímico (qP) resulta do uso da energia de excitação no PSII para dirigir o transporte de elétrons do P680 para a quinona

A (Q_A) (BAKER, 2008). Os mecanismos relacionados com a dissipação do excesso de energia conseguiram manter estável o qP de ambas as plantas em todos os tratamentos (figura 11A). Nas plantas WT e Apx1/2s submetidas ao tratamento luminoso observamos que a manutenção de qP pode ter ocorrido por causa da grande dissipação de energia na forma de calor (NPQ) e nas tratadas com MV esse parâmetro possivelmente não seria alterado, pois o MV desvia os elétrons no final da CTE cloroplástica. No tratamento salino a estabilidade desse parâmetro pode ser correlacionada com os demais ($\Delta F/F_m'$, ETR e NPQ).

O excesso de energia ao nível do PSII (EXC) é um parâmetro que estima o nível de redução do PSII. Geralmente o EXC ocorre quando existem limitações na fixação de CO_2 e uma conseqüente diminuição no consumo de NADPH e ATP (CHAGAS et al., 2008). Como as plantas Apx1/2s apresentaram uma taxa fotossintética menor que a das plantas WT sob condições controle (figura 13), possivelmente o excesso de energia encontrado sob as mesmas condições (figura 12A) pode ser creditado a esse fator. O excesso de energia encontrado nas plantas WT e Apx1/2s tratadas com luz pode ser correlacionado com os níveis de NPQ, ou seja, tentativa de dissipar esse excesso de energia na forma de calor evitando a fotoinibição do PSII. O aumento do EXC nas plantas WT tratadas com MV pode ser correlacionado com os níveis de fotossíntese dessas plantas sob o mesmo tratamento (figura 14). Os resultados mostram que em apenas 1h de tratamento a fotossíntese dessas plantas caiu cerca de 50% e alcançou taxas negativas após 12h, mostrando o efeito do metil-viologênio na depleção do NADPH e conseqüente inibição da fotossíntese dessas plantas (BAKER & ROSENQVIST, 2004).

No tratamento salino das plantas WT o excesso de energia não foi alterado, mas a fotossíntese foi inibida (figura 14), sugerindo que nessas condições as plantas conseguiram acionar mecanismos de dissipação de energia não abordados no presente trabalho. O mesmo pode ser sugerido para as plantas Apx1/2s que apresentaram redução do EXC nos tratamentos com MV e NaCl. Ao final dos resultados de fotoquímica observamos que mesmo tendo utilizado vários recursos para evitar danos ao aparato fotoquímico em todos os tratamentos, as plantas WT e Apx1/2s tiveram seu aparato fotossintético danificado (figura 12A). Contudo foi possível analisar as respostas de ambas as plantas sob cada um dos estresses estudados e observar características inerentes de cada planta.

2) *Estresse oxidativo e resposta antioxidativa*

Os resultados de vazamento de eletrólitos revelam que os tratamentos com MV e NaCl foram capazes de causar danos celulares nas plantas WT e Apx1/2s (figura 14). Os elevados níveis de radicais superóxido e posteriormente H_2O_2 no tratamento com MV provavelmente foram os responsáveis pelo excessivo dano celular, sendo confirmados pelos dados de TBARS (figura 14) tanto para o tratamento com MV quanto para NaCl (não tão pronunciados) (ALSCHER, ERTURK & HEATH, 2002). O fechamento estomático causado pelo estresse salino (MUNNS & TESTER, 2008) inibiu a fotossíntese e com isso provocou a super-redução da CTE cloroplástica, esse fenômeno acarretou na formação de níveis elevados de ERO que foram responsáveis pelos danos celulares e uma provável sinalização de morte celular programada (DAT et al., 2000; GECHEV & HILLE, 2005; MØLLER, JENSEN & HANSSON, 2007). Mesmo não tendo apresentado danos de membrana, tanto as plantas WT quanto as Apx1/2s apresentaram peroxidação de lipídios no tratamento com luz, podendo esse resultado ter correlação com a fotoinibição (figura 10) e o excesso de energia (figura 12B) encontrada nessas plantas sob o tratamento de luz. O elevado excesso de energia e sua dissipação insuficiente resultaram na transferência da energia de excitação para o O_2 , o que ocasionou um aumento no nível de ERO e danos oxidativos nas plantas WT e apx1/2s tratadas com luz (MITTLER, 2002; APEL & HIRT, 2004).

Da mesma forma que aconteceu no experimento com segmentos de folhas, a atividade da cAPX se manteve reduzida nas plantas Apx1/2s nas condições controle (figura 15A), apresentando uma atividade 70% menor em relação às plantas WT confirmando o silenciamento. O tratamento com MV reduziu drasticamente a atividade da cAPX nas plantas WT e Apx1/2s, sugerindo uma possível inibição, principalmente da APX1, pelo excesso de H_2O_2 no citosol (ZIMMERMANN et al., 2006). Apenas o tratamento de luz não reduziu a atividade da cAPX nas plantas Apx1/2s, sugerindo que os níveis de H_2O_2 permaneceram inalterados. Contudo, nas plantas Apx1/2s a atividade de CAT foi sempre maior que nas plantas WT em todas as condições, sugerindo que a CAT foi estimulada para compensar a ausência da cAPX (MITTLER, 2002). Foi encontrado também nas plantas Apx1/2s tratadas com MV um aumento de 50% na atividade de CAT (figura 17), sugerindo que essa enzima não apenas está mais ativa nas condições controle, mas também mais preparada para responder ao estresse oxidativo. As

plantas WT não apresentaram mudanças na atividade de CAT em nenhum dos tratamentos (figura 17). Os tratamentos com NaCl e luz não foram suficientes para estimular a CAT das plantas *Apx1/2s*, indicando que a atuação da CAT está mesmo relacionada com a remoção do excesso de H_2O_2 (SHIGEOKA et al., 2002).

A tendência de redução na atividade da enzima *chlAPX* nas plantas WT tratadas com NaCl (figura 15B) pode ter sido ocasionada por um súbito aumento dos níveis de H_2O_2 , tendo em vista que H_2O_2 em concentrações nano molares inibem a atividade da isoforma tilacoidal (*tAPX*) (MIYAKE & ASADA, 1996). Ainda nas plantas WT a atividade da *chlAPX* sofreu uma redução de mais de 80% no tratamento com MV, mais uma vez podendo ser o resultado da inibição da *tAPX* pelo excesso de H_2O_2 promovido pela ação do MV (MORITA et al., 1999). Nas plantas *Apx1/2s* o único tratamento que afetou a atividade da *chlAPX* foi MV, chegando a reduzir a atividade desta em 80%.

A maior atividade da *cPHGPx* nas plantas *Apx1/2s* sob condições controle em relação as plantas WT (figura 15A), sugere um maior nível de proteção na proteção contra danos celulares nessas plantas (CHEN et al., 2004), levando em conta os elevados níveis endógenos de H_2O_2 nas plantas *Apx1/2s*. Assim, a *cPHGPx* pode ser mais uma enzima estimulada para compensar a ausência da *cAPX* (MITTLER, 2002). A redução da atividade da *cPHGPx* no tratamento de luz pode ter ocorrido por uma modulação dependente de luz, contudo pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação dessa enzima. O conjunto de resultados dos parâmetros fotoquímicos (figuras 10, 11 e 12) e conteúdo de TBARS (figura 14B) suportam a idéia de que *cPHGPx* é importante para a proteção da célula, pois o tratamento de luz foi o que mais alterou os parâmetros fotoquímicos e causou um aumento na peroxidação de lipídios que não foi correlacionado com danos de membrana (figura 14A). Os tratamentos com MV e NaCl também aumentaram o conteúdo de TBARS nas plantas *Apx1/2s*, contudo a atividade da *cPHGPx* foi aumentada (diferente do tratamento com luz) apresentado conteúdos de TBARS relativamente menores que nas mesmas plantas tratadas com luz, sugerindo a modulação dessa enzima pela luz.

As plantas WT não apresentaram alterações significativas na atividade da *cPHGPx*. Em condições controle as plantas WT e *Apx1/2s* não apresentaram diferenças na atividade da *chlPHGPx* (figura 15B) o que diferiu dos resultados da *cPHGPx*, provavelmente a *PHGPx* foi mais estimulada no citosol por conta da ausência da *cAPX* e não de sua isoforma cloroplástica.

Semelhante ao ocorrido com a cPHGPx nas plantas Apx1/2s a chlPHGPx teve sua atividade reduzida no tratamento de luz, confirmada pelo aumento no conteúdo de TBARS e reforçando a idéia de uma possível regulação dependente de luz. No tratamento com MV nas plantas Apx1/2s a atividade da chlPHGPx mais que dobrou, mostrando que o sistema antioxidativo respondeu prontamente tentando reparar os lipídios de membrana danificados, contudo o MV causa um estresse oxidativo muito severo e colápsa a fotossíntese, levando a danos sistêmicos generalizados (BAKER & BAKER & ROSENQVIST, 2004).

A maior atividade das isoformas cSOD e chlSOD nas plantas Apx1/2s nas condições controle (figura 16A), sugere uma provável fonte do excesso de H₂O₂ encontrado nessas plantas quando comparas as plantas WT. Nenhum dos estresses estimulou a atividade da cSOD nas plantas Apx1/2s, provavelmente por essas plantas apresentarem um nível endógeno de H₂O₂ para sinalizar e ativar sistemas antioxidantes (QUAN et al., 2008). Nas plantas WT a cSOD foi estimulada nos tratamentos com luz e MV (figura 16A), na provável tentativa de aumentar os níveis endógenos de H₂O₂ e acionar sistemas de defesa contra estresse oxidativo, o que não se repetiu no estresse salino. A indução da chlSOD nas plantas WT tratadas com luz se correlaciona com o parâmetro fotoquímico EXC. A atividade aumentada da chlSOD nessas plantas pode estar relacionada as SODs do ciclo de Mehler e do ciclo água-água, drenos alternativos do excesso de energia (ASADA, 1999; APEL & HIRT, 2004; MØLLER, JENSEN & HANSSON, 2007). Nas plantas Apx1/2s a atividade da chlSOD sofreu redução em todos os tratamentos, sugerindo que a planta possivelmente acionou mecanismos alternativos para a dissipação do excesso de energia. A teoria mais provável é que a produção do peróxido de hidrogênio foi tão exacerbada que o elevado nível de H₂O₂ inibiu a atividade das isoformas cloroplástica (Fe-SOD e Cu/Zn-SOD) que são sensíveis ao H₂O₂ (ALSCHER, ERTURK & HEATH, 2002).

Carvalho, 2010 trabalhando com plantas do mesmo tipo (WT e Apx1/2s) identificou a superexpressão de pelo menos cinco proteínas relacionadas com o complexo de evolução do oxigênio e sete proteínas relacionadas com o ciclo de Calvin em plantas Apx1/2s sob condições controle. Esses resultados fortalecem a idéia de que a alteração genética das plantas promove um rearranjo metabólico no sentido de compensar suas deficiências.

7 – CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que as plantas Apx1/2s estimularam outras enzimas antioxidativas (CAT-PHGPx-SOD) para compensar a ausência das APX citosólicas, um mecanismo redundante de defesa encontrado em plantas que apresentam supressão de enzimas antioxidativas. Os parâmetros fotoquímicos mostraram que as plantas Apx1/2s não apresentaram diferenças marcantes, quando comparadas com as plantas WT, que pudessem ser relacionadas com fragilidade ou ineficiência dos fotossistemas.

O presente estudo nos leva a afirmar que as plantas Apx1/2s não são mais sensíveis que as plantas WT aos estresses oxidativo e foto-oxidativo, contudo estudos bioquímicos e fisiológicos acoplados com análise molecular e proteômica devem ser efetuados para ratificar os resultados e levar a uma melhor compreensão dos efeitos da transformação gênica nessas plantas e uma resposta aparentemente controversa.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOGADALLAH GM. antioxidative defense under salt stress. *Plant signaling & behavior*. 2010; 5(4):369-74.

AHMAD P, SARWAT M, SHARMA S. reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008;51(3):167-173.

ALSCHER, R.G., ERTURK, N. and HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.

APEL, K. & HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p.373-399. 2004.

ASADA K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. 2006; 141(2):391.

ASADA K. the water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 2000; 355(1402):1419-31.

ASADA, K. Ascorbate Peroxidase - a Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzyme in Plants, *Physiologia Plantarum*, v. 85, p. 235-241. 1992.

ASADA, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 50, p. 601-639. 1999.

Asai N, Matsuyama T, Tamaoki M, et al., others. Compensation for lack of a cytosolic ascorbate peroxidase in an Arabidopsis mutant by activation of multiple antioxidative systems. *Plant Science*. 2004; 166(6):1547–1554.

AWASTHI Y, BEUTLER E, SRIVASTAVA SK. purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of biological chemistry*. 1975;250(13):5144-5149.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 89-113. 2008.

BAKER, N. R., & ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 403, p. 1607-1621. 2004

- BARTELS D, SUNKAR R. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005; 24(1):23-58.
- BARTH C, KRAUSE GH, WINTER K. Responses of photosystem I compared with photosystem II to high-light stress in tropical shade and sun leaves. *Plant, Cell and Environment*. 2001; 24(2):163-176.
- BEAUCHAMP, C. e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, p. 276–287. 1971.
- BLANKENSHIP RE. Early evolution of photosynthesis. *Plant physiology*. 2010; 154(2):434-8.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254. 1976.
- BRENNAN, T. & FRENKEL, C. Involvement of Hydrogen Peroxide in the Regulation of Senescence in Pear, *Plant Physiology*, v. 59, p. 411-416. 1977.
- BREUSEGEM FV, DAT JF. Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death 1. *Plant physiology*. 2006; 141(June):384-390.
- BUCHANAN, B.B. e BALMER, Y. Redox Regulation: A Broadening Horizon. *Annual Review of Plant Biology*, v. 56, p. 187–220. 2005.
- CARVALHO, F. E. L. Análise proteômica de folhas de arroz (*Oryza sativa* spp. *japônica* cv. Nipponbare) com silenciamento dos genes das peroxidases do ascorbato citosólicas. (Monografia). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. *Universidade Federal do Ceará*, Fortaleza, 2010.
- CATTIVELLI, L., RIZZA, F., BADECK, F.W., MAZZUCOTELLI, E., MASTRANGELO, A.M., FRANCA, E., MARÉ, CATERINA., TONDELLI, A. and STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, v. 105, p. 1–14. 2008.
- CHAVES MM, FLEXAS J, PINHEIRO C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*. 2009;103(4):551-60.
- CHAVES MM. How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany*. 2002; 89(7):907-916.
- CHEESEMAN JM. Hydrogen Peroxide and Plant Stress : A Challenging Relationship. *Journal of Biological Chemistry*. 2007.

- CHEN S, VAGHCHHIPAWALA Z, LI W, ET AL. Tomato Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Inhibits Cell Death Induced by Bax and Oxidative Stresses in Yeast and Plants 1. *Plant physiology*. 2004; 135(July):1630-1641.
- CUELLO J, WITH JOSE QUILES M. Association of ferredoxin-NADP oxidoreductase with the chloroplastic pyridine nucleotide dehydrogenase complex in barley leaves. *Plant physiology*. 1998; 117(1):235-44.
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., MONTAGU, M.V., INZE, D. and BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 57, p. 779–795. 2000.
- DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHENGQIANG, Z.; OLIVER, D.J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; MITTLER, R. 2005. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell*. v. 17, p. 268-281.
- DEPONTE M, RAHLFS S, BECKER K. Peroxiredoxin systems of protozoal parasites. *Sub-cellular biochemistry*. 2007; 44:219-29.
- DIETZ K-J. Plant peroxiredoxins. *Annual review of plant biology*. 2003; 54:93-107.
- EBERHARD S, FINAZZI G, WOLLMAN F-A. The dynamics of photosynthesis. *Annual review of genetics*. 2008; 42:463-515.
- FALTIN Z, HOLLAND D, VELCHEVA M, ET AL. Glutathione peroxidase regulation of reactive oxygen species level is crucial for in vitro plant differentiation. *Plant & cell physiology*. 2010; 51(7):1151-62.
- FLEXAS J, BOTA J, LORETO F, CORNIC G, SHARKEY TD. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C(3) plants. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*. 2004; 6(3):269-79.
- FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL JHF, ET AL. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 2003;422(6930):442-6.
- FOYER, C. & NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context, *Plant, Cell and Environment*, v. 28, p. 1056-1071. 2005.
- FOYER, C. H. & NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, v. 146, p. 359-388. 2000.
- FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, v. 119, p. 355–364. 2003.

- FRUEHAUF JP, MEYSKENS FL. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007; 13(3):789-94.
- GAPPER C, DOLAN L. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology*. 2006; 141(2):341.
- GECHEV TS, HILLE J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *The Journal of cell biology*. 2005; 168(1):17-20.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.990, p.87-92, 1989.
- GIANNOPOLITIS, C. N. e RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology*, v. 59, n. 2, p. 309-314. 1977.
- GULEN H. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science*. 2004; 166(3):739-744.
- HAVIR, E.A. & MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. *Plant Physiology*, v. 84, n. 2, p. 450-455. 1987.
- HEATH, R.L. & PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 125, n.1, p. 189-198. 1968.
- HSU S-YUNG, KAO CH. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation*. 2003:83-90.
- JALEEL CA, RIADH K, GOPI R, ET AL. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2009; 31(3):427-436.
- JIAO S. High light stress inducing photoinhibition and protein degradation of photosystem I in Brassica rapa. *Plant Science*. 2004; 167(4):733-74.
- JIMÉNEZ, A., HERNÁNDEZ, J.A., DEL RÉO, L.A. and SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, v. 114, p. 272-84. 1997.
- JORDÁN F. Handbook of Biological Networks. Lecture Notes in Complex Systems-Vol. 10. Stefano Boccaletti, Vito Latora, and Yamir Moreno (Eds.). (2010, World Scientific Publishing Company, Singapore.) GBP90.00 (hardcover), x + 441 pages. ISBN: 978-981-283-879-7. *Artificial life*. 2011; 17(1):69-71.

- KAWAURA K, MOCHIDA K, YAMAZAKI Y, OGIHARA Y. Transcriptome analysis of salinity stress responses in common wheat using a 22k oligo-DNA microarray. *Functional & integrative genomics*. 2006; 6(2):132-42.
- KIMURA M, YAMAMOTO YY, SEKI M, ET AL. Rapid Communication Identification of Arabidopsis Genes Regulated by High Light – Stress. *Photochemistry and Photobiology*. 2003; 77(2):226-233.
- KOUSSEVITZKY S, SUZUKI N, HUNTINGTON S, ET AL. Ascorbate Peroxidase 1 Plays a Key Role in the Response of Arabidopsis thaliana to Stress Combination. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(49):34197-34203.
- LALOI C, APEL K, DANON A. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current opinion in plant biology*. 2004; 7(3):323-8.
- LEE Y-P, KIM S-H, BANG J-W, ET AL. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant cell reports*. 2007; 26(5):591-8.
- LI Z, WAKAO S, FISCHER BB, NIYOGI KK. Sensing and responding to excess light. *Annual review of plant biology*. 2009; 60:239-60.
- LIU X, FU J, GU D, ET AL. Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.). *Genomics*. 2008; 91(4):378-87.
- LUNA CM, PASTORI GM, DRISCOLL S, ET AL. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of experimental botany*. 2005; 56(411):417-23.
- MAHAJAN S, TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2005; 444(2):139-58.
- MAKINO A, MIYAKE C, YOKOTA A. Physiological Functions of the Water – Water Cycle (Mehler Reaction) and the Cyclic Electron Flow around PSI in Rice Leaves. *Plant Cell*. 2002; 43(9):1017-1026.
- MARUTA T, TANOUCHI A, TAMOI M, ET AL. Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant & cell physiology*. 2010; 51(2):190-200.
- MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU D-T, SANTONI V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual review of plant biology*. 2008; 59:595-624.
- MAXWELL K, JOHNSON GN. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *Journal of experimental botany*. 2000; 51(345):659-68.

- MIAO Y, LV D, WANG P, ET AL. An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant cell*. 2006; 18(10):2749-66.
- MILLER G, SUZUKI N, RIZHSKY L, ET AL. Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant physiology*. 2007; 144(4):1777-85.
- MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, VAN BREUSEGEM F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*. 2004; 9(10):490-8.
- MITTLER R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*. 2006; 11(1):15-9.
- MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*. 2002; 7(9):405-10.
- MIYAKE C, ASADA K. Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; hydrogen peroxide decomposes compound I of ascorbate peroxidase. *Plant and cell physiology*. 1996; 37(4):423.
- MIYAKE C, HORIGUCHI S, MAKINO A, ET AL. Effects of light intensity on cyclic electron flow around PSI and its relationship to non-photochemical quenching of Chl fluorescence in tobacco leaves. *Plant & cell physiology*. 2005; 46(11):1819-30.
- MØLLER IM. PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 2001; 52:561-591.
- MØLLER, M. I., JENSEN, P. E. and HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants, Annual Review of Plant Biology, v. 58, p. 459-581. 2007.
- MORITA S, KAMINAKA H, MASUMURA T, TANAKA K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant and cell physiology*. 1999; 40(4):417.
- MULLER-MOULE P, HAVAUX M. Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2003; 133(October):748-760.
- MULLINEAUX PM, BAKER NR. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant physiology*. 2010; 154(2):521-5.
- MULLINEAUX PM, KARPINSKI S, BAKER NR. Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. *Plant Physiology*. 2006; 141(2):346.

MUNNÉ-BOSCH S, CELA J. Effects of water deficit on photosystem II photochemistry and photoprotection during acclimation of lyreleaf sage (*Salvia lyrata* L.) plants to high light. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 2006; 85(3):191-7.

MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*. 2008;59:651-81.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, v. 25, p. 239-250. 2002.

NAKAMURA T, FURUHASHI Y, HASEGAWA K, ET AL. Array-based analysis on tobacco plastid transcripts: preparation of a genomic microarray containing all genes and all intergenic regions. *Plant & cell physiology*. 2003; 44(8):861-7

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

NAKANO, Y. & ASADA K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, v. 28, p. 131-40. 1987.

NEILL S, DESIKAN R, HANCOCK J. Hydrogen peroxide signalling. *Current opinion in plant biology*. 2002; 5(5):388-95.

NEILL SJ, DESIKAN R, CLARKE A, HURST RD, Hancock JT. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of experimental botany*. 2002; 53(372):1237-47.

NELSON N, YOCUM CF. Structure and function of photosystems I and II. *Annual review of plant biology*. 2006; 57:521-65.

Nishikawa F. Two ascorbate peroxidases from broccoli: identification, expression and characterization of their recombinant proteins. *Postharvest Biology and Technology*. 2003; 27(2):147-156.

NOCTOR G, FOYER CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998; 49:249-279.

QUAN L-J, ZHANG B, SHI W-W, LI H-Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of integrative plant biology*. 2008; 50(1):2-18.

RASCHER U, NEDBAL L. Dynamics of photosynthesis in fluctuating light. *Current opinion in plant biology*. 2006; 9(6):671-8.

- REAPE TJ, MOLONY EM, MCCABE PF. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of experimental botany*. 2008; 59(3):435-44.
- RIZHSKY L, LIANG H, MITTLER R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*. 2002; 130(3):1143.
- RIZHSKY L, LIANG H, MITTLER R. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(40):38921-5.
- ROHÁČEK K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning and natural relationships. *Photosynthetica*. 2002; 40(1): 13-29.
- ROSEIN EG, MIYAMOTO S, BECHARA E, MASCIO Di P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*. 1996; 25(3):563-568.
- ROSA SB, CAVERZAN A, TEIXEIRA FK, ET AL. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry*. 2010; 71(5-6):548-58.
- ROUHIER N, JACQUOT J-P. Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynthesis research*. 2002; 74(3):259-68.
- SAGI M, FLUHR R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology*. 2006; 141(2):336.
- SÁNCHEZ-CASAS, P. e KLESSIG, D. F. A salicylic acid binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiology*, v. 106, p. 1675-1779. 1994.
- SAYED OH. Chlorophyll Fluorescence as a Tool in Cereal Crop Research. *Photosynthetica*. 2003; 41(3):321-330.
- SCANDALIOS JG. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant physiology*. 1993; 101(1):7-12.
- SCANDALIOS JG. The rise of ROS. *Trends in biochemical sciences*. 2002; 27(9):483-6.
- SHANAHAN, J.F., EDWARDS, I.B., QUICK, J.S. e FENWICK, J.R. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. *Crop Science*, v. 30, p. 247-251. 1990
- SHCHEREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E.D.; CALDWELL, M.M. (Ed.). *Ecophysiology of photosynthesis*. Berlin: Springer, 1994. P.49-70. (Ecological Studies, 100).

SHULAEV V, OLIVER DJ, S VV. Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. New Tools for Reactive Oxygen Species Research 1 [OA]. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*. 2006; 141(June):367-372.

ŚLESIAK I, LIBIK M, KARPINSKA B, KARPINSKI S, MISZALSKI Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta biochimica Polonica*. 2007; 54(1):39-50.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Plant Physiology*, fourth edition, p. 164. 2006.

TAUSZ M, SIRCELJ H, GRILL D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of experimental botany*. 2004; 55(404):1955-62.

TESTER M, BACIC A, CENTRE A, GENOMICS F, OSMOND G. Abiotic Stress Tolerance in Grasses . From Model Plants to Crop Plants. *Plant Breeding*. 2005; 137(March):791-793.

VELLOSILLO T, VICENTE J, KULASEKARAN S, HAMBERG M, CASTRESANA C. Emerging Complexity in Reactive Oxygen Species Production and Signaling during the Response of Plants to Pathogens. *Plant physiology*. 2010; 154(2):444-8.

VRANOVÁ E, INZÉ D, VAN BREUSEGEM F. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany*. 2002; 53(372):1227-36.

WAHID A, GELANI S, ASHRAF M, FOOLAD M. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*. 2007; 61(3):199-223.

WARIS G, AHSAN H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis*. 2006; 5:14.

WILLEKENS H, CHAMNONGPOL S, DAVEY M, ET AL., D undefined Camp VW. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J*. 1997;16:4806-4816.

YANG X-D, DONG C-J, LIU J-Y. A plant mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: its precise localization and higher enzymatic activity. *Plant molecular biology*. 2006; 62(6):951-62.

YOSHIMURA K, MIYAO K, GABER A, ET AL. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing Chlamydomonas glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *The Plant Journal*. 2004; 37(1):21-33.

ZHANG T, GONG H, WEN X, LU C. Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of plant physiology*. 2010; 167(12):951-8.

ZHOU L, LIU Y, LIU Z, ET AL. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany*. 2010;61(15):4157-68.

ZIMMERMANN P, HEINLEIN C, ORENDI G, ZENTGRAF U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, Cell and Environment*. 2006;29(6):1049-1060.