

EFEITO DO ALUMÍNIO NA DINÂMICA DA PAREDE CELULAR
DA LEVEDURA DE FISSÃO
(*Schizosaccharomyces pombe*)

LUDMILLA CARVALHO RANGEL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
SETEMBRO – 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EFEITO DO ALUMÍNIO NA DINÂMICA DA PAREDE CELULAR
DA LEVEDURA DE FISSÃO
(*Schizosaccharomyces pombe*)

LUDMILLA CARVALHO RANGEL

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Anna Lvovna Okorokova-Façanha

EFEITO DO ALUMÍNIO NA DINÂMICA DA PAREDE CELULAR
DA LEVEDURA DE FISSÃO
(*Schizosaccharomyces pombe*)

LUDMILLA CARVALHO RANGEL

Aprovada em 26 de setembro de 2007

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dra. Solange Silva Samarão – ISTCA

Prof^a. Dra. Ângela Pierre Vitória – LCA/CBB/UENF

Prof. Dr. Vanildo Silveira – LBT/CBB/UENF

Prof^a. Dra. Anna Lvovna Okorokova-Façanha – LFBM/CBB/UENF
(Orientadora)

ÍNDICE

SUMÁRIO

Índice de figuras e tabelas.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Abreviaturas.....	xii
1.Introdução.....	01
1.1.Natureza química do alumínio.....	02
1.2.Alumínio: um agente neurotóxico..	02
1.3.Alumínio em plantas.....	04
1.4.Leveduras: um excelente organismo- modelo	12
2.Objetivos.....	17
2.1.Objetivos gerais.....	18
2.2.Objetivos específicos.....	18
3.Materiais e Métodos.....	19
3.1.Cepa utilizada.....	20
3.2.Meio de cultura.....	20
3.3.Cultivo de Fy1180 na presença ou não de alumínio.....	20
3.4.Hidrólise enzimática da parede celular de <i>S. pombe</i> na presença de alumínio.....	20
3.5.Análise da regeneração da parede celular da levedura de fissão <i>S. pombe</i>	21
3.6.Análise da morfologia de <i>S. pombe</i>	22
3.7.Análise ultraestrutural de <i>S. pombe</i>	23
3.8. Determinação da atividade da glucanase de <i>S. pombe</i>	23
3.9.Isolamento das membranas celulares de <i>S. pombe</i>	24
3.10.Análise da atividade das H ⁺ -ATPases do tipo P e V da levedura de fissão.....	25
3.11.Determinação do conteúdo de proteínas.....	26
4.Resultados.....	27
4.1.O efeito do Al sobre o cultivo celular de <i>S. pombe</i>	28
4.2.O efeito do Al na ultraestrutura da parede celular de <i>S.pombe</i>	30

4.3.O efeito do Al sobre a atividade glucanásica.....	33
4.4.O efeito do Al na resistência da parede celular à hidrólise enzimática.....	35
4.5.O efeito do Al no crescimento e morfologia celular durante a regeneração da parede celular.....	36
4.6.O efeito do Al sobre o transporte de H ⁺	40
5.Discussão.....	44
6.Conclusões.....	55
7.Referências Bibliográficas.....	57

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Curva do cultivo de células de <i>S. pombe</i> sem (ctrl) e com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	29
FIGURA 2 - Valores de células morfologicamente aberrantes na cultura, após o tratamento com $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, na fase estacionária de crescimento (36 horas).....	29
FIGURA 3 - MET de células de <i>S. pombe</i> controle.....	31
FIGURA 4 - MET de células de <i>S. pombe</i> cultivadas com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	32
FIGURA 5 - Atividade da enzima β -1,3-glucanase em membranas totais de <i>S. pombe</i> , isoladas de células cultivadas com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	33
FIGURA 6 - Curva de decaimento da densidade ótica durante a hidrólise enzimática da parede celular (PC) da levedura de fissão.....	34
FIGURA 7 - Curva do cultivo de esferoplastos/células durante a regeneração da PC na presença ou não de 0,5 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	36
FIGURA 8 - Microscopia eletrônica de varredura de células/esferoplastos tratados ou não 0,5 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ durante a regeneração da PC.....	37
TABELA 1 - Valores indicativos da fluorescência máxima (Fmax) encontrada nas ATPases P e V de membranas totais isoladas de células cultivadas (Al) e não cultivadas (Ctrl) com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	39

FIGURA 9 - Média da fluorescência máxima do transporte de H ⁺ das P-ATPases de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO ₄) ₂	39
FIGURA 10 - Média da fluorescência máxima do transporte de H ⁺ das V-ATPases de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO ₄) ₂	39
TABELA 2 - Valores indicativos da velocidade inicial (V ₀) encontrada nas ATPases P e V de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO ₄) ₂	40
FIGURA 11 – Média da velocidade inicial do transporte de H ⁺ das P-ATPases de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO ₄) ₂	41
Figura 12. Média da velocidade inicial do transporte de H ⁺ das V-ATPases de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO ₄) ₂	42
Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura de células de <i>S. pombe</i> tratadas ou não com Al.....	45

RESUMO

O alumínio (Al) é o terceiro elemento químico e o metal mais abundante da crosta terrestre, estando solúvel em pH ácido. O Al é um dos principais fatores que afeta a produtividade agrícola de todo mundo, comprometendo parte da economia mundial. Além disso, estudos reportam o envolvimento do Al com o desenvolvimento de encefalopatias como Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson. Nestas e em outras patologias neurodegenerativas têm se observado que o Al é acumulado no cérebro, inibe as atividades sinápticas e promove a apoptose. Neste estudo, nós usamos como modelo de estudo a levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*, um excelente organismo-modelo para estudos genéticos, morfológicos e bioquímicos. Em nossos estudos verificamos o efeito de 0,5 mM of AlK (SO₄)₂ na ultraestrutura da parede celular (PC) de *S. pombe*. Verificamos que o Al afeta a deposição do material que compõe a PC, promovendo células com PC espessa e septo. Além disso, verificamos que o septo da levedura de fissão na presença do Al apresenta-se deformado e descentralizado. Evidenciamos que a PC desse microrganismo possui resistência a hidrólise enzimática e que a atividade da enzima β-1,3-glucanase diminui cerca de 40% na presença do Al. Sugerindo que o espessamento da PC seja uma consequência da redução da atividade da enzima que degrada o maior constituinte da PC de *S. pombe*, β-1,3-glucano. Analisamos o transporte de H⁺ ATP-dependente nas ATPases do tipo P e verificamos que a fluorescência máxima atingida pelo transporte de H⁺ em membranas isoladas de células cultivadas na presença do Al, foi maior 3,5 vezes do que o controle. Ao passo que a atividade das H⁺ ATPases do tipo V foi 2,5 vezes menor em membranas isoladas de células cultivadas na presença do Al. Esses dados indicam que existe uma ação coordenada entre as ATPases afim de manter a homeostase de H⁺ no interior da célula. O aumento do alongamento celular pode estar correlacionado com a extrusão de H⁺, de acordo com a “teoria do crescimento ácido”. Nossos resultados reúnem um novo conjunto de dados que pela primeira vez demonstram o efeito do Al na ultraestrutura e bioquímica da PC e seus componentes.

ABSTRACT

The Aluminum (Al) is the third chemical element and the metal most abundant of the terrestrial crust, being under acid the soluble form in pH. The Al is one of the main factors that the crop productivity of everybody affects, compromising part of the world-wide economy. Moreover, studies report the involvement of the Al with the development of encefalo disease as Alzheimer's and Parkinson's diseases. In these and other neurodegeneratives pathology they have been observed that the Al is accumulated in the brain, inhibits the synaptics activities and promotes cellular the death programmed. In this study, we use as tool the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, an excellent organism model for morphologic, biochemistry and genetic studies. In our study we verify the effect of 0,5 mM of AlK (SO₄)₂ in the ultrastructure of the cell wall (CW) of *S. pombe*. We verify that the Al affects the deposition of the material that composes the CW, forming cells with thick PC and sept. Moreover, we verify that sept of the fission yeast in the presence of the Al is deformed and decentralized. We evidence that the PC of this microorganism becomes resistant enzymatic hydrolysis and that the β -1,3-glucanase activity is diminished in about 40%. Suggesting that the thickness of the CW must to a reduction of the activity of the enzyme that degrade the main constituent of the CW, β -1,3-glucan. We analyzed the transport of H⁺ ATP-dependent in the ATPases of type P and verified that the maxima fluorescence reached for the transport of H⁺ in total membranes isolated of cells cultivated in the presence of the Al, was 3,5 times of what the control. In other hand, the activity of the H⁺ ATPases of type V was 2,5 times lesser in isolated membranes of cells cultivated in the presence of the Al. These data indicate that a coordinated action exists enters the similar ATPases to keep the homostasis of H⁺ in the interior of the cell. The increase of the cellular allonge can be correlated with the drawing of H⁺, in accordance with the "theory of the acid growth". Our results congregate a new data set that for the first time demonstrates to the effect of the Al in the ultrastructure and biochemist of the CW and its components.

ABREVIATURAS

Al – alumínio

MA – Mal de Alzheimer

MTs – microtúbulos

Ca – cálcio

RE – retículo endoplasmático

ATP – adenosina trifosfato

Mg – magnésio

Cl – cloro

Fe – ferro

Si – silício

Na – sódio

K – potássio

PC – parede celular

MP – membrana plasmática

PBS – *phosphate buffered saline*

CDK – ciclina dependente de quinase

SIN – *septation initiation network*

MEV – microscopia eletrônica de varredura

PA – paraformaldeído

GA – glutaraldeído

MET – microscopia eletrônica de transmissão

EPON[®] – resina epóxi Poly – Bed 812

PIPES – ácido 1,4-piperazinodietanosulfônico

MOPS[®] – *3(N – morpholino)propane sulfonic acid*

F_{máx} – fluorescência máxima

V₀ – velocidade inicial

BSA - Soro albumina bovina

YES – meio *yeast extract supplemented* (meio rico de crescimento para levedura)

AGRADECIMENTOS

Ao fim de mais uma importante etapa na minha vida, tenho muito a agradecer. Não se trata de mais uma página comum de agradecimentos obrigatórios pertinentes a uma tese, mas sim de sinceros agradecimentos. Tentarei aqui, listar todas as pessoas que foram e que são de grande importância para a conclusão dessa tese.

Ao professor Lev Alexandrovich Okorokov, chefe do LFBM. Obrigada pelos ensinamentos.

À minha orientadora Anna, que foi a mola-mestra desse trabalho. Nossas discussões sempre regadas a café, foram incrivelmente enriquecidas por sua sabedoria. Muitas vezes me deu palavras de incentivo quando se fez necessário. Obrigada.

Aos professores Arnaldo Rocha Façanha e Valdirene Moreira Gomes, pelas colaborações que foram de grande valia para o desenvolvimento desse trabalho.

As minhas lindas amigas de grupo: Ana Cristina, Flávia Azevedo e Lívia. Lindas mesmo, mas o mais importante, lindas de alma. Obrigada, por terem me proporcionado momentos tão agradáveis, de amizade, alegria, risos, trabalho, incentivo e verdadeiro apoio e colaboração. Gostaria de incluir aqui Keilla e Gislaine alunas de iniciação adoráveis, engraçadíssimas e muito comprometidas com o trabalho, vocês são ótimas. Formamos verdadeiramente um grupo.

Aos colegas de laboratório: André, Mariângela, Flávia Emenegilda, Camila, Suzanna, Érica, Luana, Renan, Flávia Paiva, obrigada pelo convívio muitas vezes agradável.

À Beatriz, Geovana, Márcia Adriana, Luis e Noil pelo apoio técnico, foi muito importante, muito obrigada.

As minhas amigas Oneida, Marcela e Ingrid, muitas, muitas, muitas saudades.

A minha mais recente amiga, Natália, por todo carinho e amizade.

Aos professores Solange Silva Samarão, Ângela Pierre Vitória e Vanildo Silveira, que aceitaram gentilmente fazer parte desta banca. À professora Maura da Cunha que foi a revisora desse trabalho. Muito obrigada.

A esta universidade que proporciona a tantas pessoas a oportunidade e apoio necessários para continuarmos a sonhar.

A minha família e aos meus amores Álvaro e Renan...
...por tudo.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Natureza Química do Alumínio

O alumínio (Al) é o terceiro elemento químico e o metal mais abundante da crosta terrestre, sendo a exposição de organismos vivos, incluindo plantas, fungos e animais a este metal praticamente inevitável.

O Al está presente na água, no solo e no ar, e mais do que isto, está incorporado em minerais sólidos de aluminossilicatos e somente uma pequena quantidade (a níveis sub-micromolares) apresenta-se na forma solúvel capaz de influenciar sistemas biológicos (May & Nordstrom, 1991). Diferentes formas de Al estão presentes sob a forma solúvel no solo: Al(OH)^{2+} e Al(OH)_2^+ em pH 4–5, Al^{3+} em pH 5,5–7, e Al(OH)_4 em pH 7–8 (Kiss, 1995; Mossor-Pietraszewska, 2001).

1.2. Alumínio: um agente neurotóxico

A hipótese do Al como um agente etiológico de neuropatologias como o Mal de Alzheimer (MA) foi originada quando Klatzo e colaboradores (1965) verificaram que ao injetar sais de Al no cérebro de coelhos ocorria degeneração das neurofibrilas. Esses resultados foram reproduzidos posteriormente injetando ou expondo sistematicamente os animais ao Al (Strong *et al.*, 1992, 1996; Yokel, 2000). Crapper e colaboradores (1973) replicaram esses resultados em felinos e também demonstraram que a concentração do Al no cérebro de pacientes portadores de MA é aumentada. Alfrey e colaboradores (1976) mostraram que as lesões neuronais produzidas pelo Al são morfológicamente semelhantes às lesões produzidas por inibidores de microtúbulos (MTs). Esses resultados impulsionaram os estudos sobre o efeito do alumínio na integridade do citoesqueleto em pacientes com MA e Mal de Parkinson (Macdonald *et al.*, 1987). Bonhaus e colaboradores (1980) verificaram que o Al inibe, de fato, a polimerização dos MTs na concentração de 100 μM , quantidade encontrada em cérebros de pacientes com deficiências neurocomportamentais.

Apesar de existirem vários estudos em torno do Mal de Alzheimer (Miu & Benga, 2006), o papel desempenhado pelo Al nessa e em outras neuropatologias como Mal de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica, Doença de Huntington, entre outras, ainda permanece controverso, provavelmente devido ao envolvimento destas neuropatologias com eventos multifatoriais, como por exemplo, herança genética (Savory *et al.*, 1996).

Guo e Liang (2001) verificaram que o Al ativa a via apoptótica de cerca de 50% das células em cultura de astrócitos de ratos na faixa de 400 μM devido a um aumento expressivo dos níveis de Ca^{2+} citosólico.

Colomina e colaboradores (2002) demonstraram através de espectrofotometria de massa que em cérebro de ratos com idade avançada o Al, 100 mg/kg de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, é armazenado em maiores quantidades, isso poderia induzir um declínio das atividades sinápticas e ao desenvolvimento de uma série de alterações intracelulares, tais como, mudanças no citoesqueleto e no tráfego de vesículas. Relacionando este fato ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, Savory e colaboradores (2003) demonstraram, utilizando células cerebrais de coelhos, que o estresse causado por Al desencadeia o processo de apoptose ou morte celular programada. Os autores verificaram que o Al promove o estresse do RE que levaria a perturbações na homeostase de Ca^{2+} e essa perturbação desencadearia o processo de apoptose por ativar caspases como caspase 12 e caspase 3, ambas envolvidas na via apoptótica da célula. Além disso, eles sugerem que o estresse do RE poderia levar a um aumento do Ca^{2+} mitocondrial, resultando na despolarização da mitocôndria, ocorrendo conseqüentemente a liberação de citocromo-C que iniciaria a cascata de sinalização de morte celular programada, pela ativação da caspase 9.

Uma das possíveis causas da neurotoxicidade do Al é a precipitação de algumas proteínas associadas ao citoesqueleto provocadas por esse metal, e que por sua vez, levaria à desorganização do citoesqueleto (Diaz-Nido & Ávila, 1990), ou ainda, a agregação de proteínas hiperfosforiladas (Yokel, 2000). Estudos *in vitro* indicaram que o Al induz a associação das moléculas de tubulina, formadoras de MTs, e, ao mesmo tempo, inibe sua despolimerização

(Macdonald *et al.*, 1987). Esses eventos estariam associados a distúrbios na neurotransmissão.

Outra possibilidade consiste em perturbações na homeostase de cálcio (Gandolfi *et al.*, 1998) e próton (Siegel & Haug, 1983) que afetariam toda a maquinaria de transdução de sinal na célula. Estudos indicaram que a interação Al-ATP na célula pode regular positivamente a homeostase de Ca^{2+} no interior dos neurônios, aumentando a ligação entre o Ca^{2+} e proteínas citosólicas e fosfolipídeos, ativando o transporte de Ca^{2+} para o RE e mitocôndria e causando a extrusão em grandes quantidades do Ca^{2+} neuronal por ATPases dependentes de calmodulina (Szutowicz *et al.*, 1998; Kawahara, 2005). Essa toxicidade mediada pela extrusão do Ca^{2+} induzida pelo Al pode amplificar e orquestrar uma cascata de eventos neurotóxicos que comprometem as atividades sinápticas e eventualmente favorecem a neurodegeneração (Beal *et al.*, 1993; Disterhoft *et al.*, 1994; Etcheberrigaray *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 1999; Exley, 1999; Aremu & Meshitsuka, 2006).

Estudos envolvendo o efeito do Al no transporte de H^+ nas V-ATPases de células animais mostrou que este metal inibe a atividade do transporte de H^+ lisossomal. O complexo estável Al-Mg promove uma diminuição do complexo Mg-ATP na célula, o que prejudica a atividade das H^+ -ATPases (Siegel & Haug, 1983).

Exley (1999) verificou que o tratamento com Al pode causar problemas na divisão celular e alterações na homeostase de íons, sendo estas alterações, capazes de levar qualquer organismo a apresentar distúrbios funcionais diversos. Porém, as relações de causa e efeito envolvidas na ação do Al sobre as células eucarióticas e as diversas patologias associadas à sua toxicidade, ainda estão por ser estabelecidas.

1.3. Alumínio em plantas

Além de seu efeito neurotóxico, o alumínio também é tóxico para as células vegetais. A fitotoxicidade do alumínio é um dos principais fatores que afetam a produtividade agrícola em solos ácidos do mundo todo (pH abaixo de 5,0) (Foy *et al.*, 1978). A acidificação do solo resulta do: desequilíbrio nos ciclos de elementos como o nitrogênio, enxofre e carbono (Bolan & Hedley, 2003; Tang & Rengel, 2003), da captação em excesso de cátions e ânions (Tang &

Rengel, 2003), do uso contínuo de amônia e amida, contidas nos fertilizantes (Mahler *et al.*, 1985), e da fixação de nitrogênio por plantas leguminosas (Bolan *et al.*, 1991; Tang & Rengel, 2003). O Al é encontrado na natureza complexado com outros elementos, tais como o Cl, Fe e Si. Em pH ácido ocorre a dissociação entre esses elementos e o Al, tornando-o um íon livre e passível de penetrar nas células vegetais com maior facilidade.

Alguns estudos reportam a inibição do crescimento radicular como um dos primeiros e mais dramáticos sintomas exibidos por plantas que sofrem estresse por Al, que se observada após horas, ou apenas minutos, de exposição a concentrações micromolares (5-50 μM) de Al contido em soluções de cultura (Ryan *et al.*, 1993; Kochian *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2005).

O Al é acumulado no ápice radicular, local de contínua divisão celular (Foy *et al.*, 1978; Ryan *et al.*, 1993; Blancaflor *et al.*, 1998). Além disso, as raízes tornam-se ineficientes na absorção de água e nutrientes (Degenhardt *et al.*, 1998). A exposição da raiz ao Al afeta inúmeros processos bioquímicos e fisiológicos, tais como: dinâmica e integridade do citoesqueleto, homeostase de Ca^{+2} , produção de espécies de oxigênio, peroxidação de lipídeos, exudação de ácidos orgânicos, polarização da membrana plasmática, sistemas primários de transporte de prótons, síntese de calose e transporte intracelular mediano por plasmodesmos.

– ***Dinâmica e integridade do citoesqueleto***

As alterações morfológicas causadas no ápice radicular pelo Al podem estar relacionadas com a despolimerização dos MTs (Sasaki *et al.*, 1997) ou com a reorganização e estabilização dos MTs ou filamentos de actina (Blancaflor *et al.*, 1998) na zona de alongação da raiz.

Frantzios e colaboradores (2000, 2001) utilizando trigo como modelo evidenciaram que os MTs das células mitóticas e citocinéticas da raiz são um dos alvos da toxicidade do Al. Células mitóticas tratadas com Al apresentavam sérios distúrbios no alinhamento do cinetocoro, assim como problemas na formação da placa equatorial, resultando em cromossomos dispersos pelo citoplasma. A placa equatorial é obtida por um arranjo dos cromossomos, promovido pelos MTs, durante a mitose. Sendo assim, defeitos na formação da placa equatorial foram

interpretados como indicativos de problemas na organização e dinâmica dos MTs (Frantzios *et al.*, 2000). Em células citocinéticas tratadas, o Al estabilizou o sistema microtubular, inclusive os MTs interzonais.

Embora existam evidências de que o Al prejudica a divisão celular e que o citoesqueleto seja um dos alvos da sua toxicidade, o mecanismo pelo qual isso acontece não está claro. Não se sabe, por exemplo, se Al afeta a expressão gênica e/ou a função das proteínas-ligantes ao citoesqueleto.

– **Homeostase de Ca^{2+}**

O Ca^{2+} é um importante sinalizador envolvido em diversos processos intracelulares e também é conhecido por aliviar os estresses ambientais, particularmente, estresse iônico (Na, Al, metais pesados) em plantas (Foy *et al.*, 1978).

Estudos demonstraram que um dos primeiros sintomas bioquímicos da toxicidade do Al é a alteração da homeostase de Ca^{2+} citosólico (Bennet & Breen, 1991; Rengel & Elliot, 1992; Jones & Kochian, 1995). Zhang e Rengel (1999) verificaram que existia uma correlação entre o aumento do Ca^{2+} intracelular induzido pelo Al nas células sub-apicais radiculares de arroz e a inibição do crescimento da raiz. O mesmo foi visto previamente por Nichol e colaboradores (1993). Contrariando esses resultados, em culturas de tabaco o Al induz uma diminuição do Ca^{2+} intracelular (Jones *et al.*, 1998a). Contudo, esse conflito de resultados pode ser dado a diferenças na fisiologia e morfologia dos cultivares analisados, visto que os trabalhos utilizando arroz foram feitos com cultura de células, ao passo que no trabalho utilizando tabaco foram feitos com células presentes no tecido afetado.

– **Produção de espécies reativas de oxigênio**

O íon Al possui uma alta afinidade por biomembranas e pode causar um enrijecimento da mesma (Deleers *et al.*, 1986). Este processo pode facilitar uma produção de radicais livres mediada por íons Fe realçando dessa maneira a peroxidação de lipídeos em raízes (Cakmak & Horst, 1991), de soja (*Glycine max*), células de tabaco (*Nicotiana*

tabacum) (Ono *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1997, 2001). Kawano e colaboradores (2004) em um estudo utilizando células de tabaco verificaram que nessas células o tratamento com baixas concentrações de Al promoveu a geração de superóxidos e o influxo de Ca^{2+} foi secundariamente induzido pelo superóxidos. Contrariamente, altas concentrações de Al inibiram o influxo de Ca^{2+} mediado por superóxidos. O influxo de Ca^{2+} mediado por H_2O_2 :

– ***Peroxidação de lipídeos***

O efeito estimulatório do Al na peroxidação de lipídeos catalizada por Fe foi observada em fosfolipídeos de lipossomos (Gutteridge *et al.*, 1985; Oteiza, 1994; Xie & Yokel, 1996). O Fe é metal de transição e eficientemente inicia ou propaga a peroxidação de lipídeos através de ciclos de redoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1989), enquanto o Al não é um metal de transição e também não pode catalizar reações redox. Oteiza (1994) sugere que o Al estimula a peroxidação de lipídeos mediada por Fe por ligar às membranas e promover mudanças no posicionamento dos lipídeos, que incluem o rearranjo de ácidos graxos para facilitar a propagação da peroxidação dos lipídeos por Fe. O aumento dessa peroxidação mediada por Al foi descrita em células de culturas de tabaco (Ono *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1997). Vários antioxidantes lipolíticos (hidroxianisol butilado, *N, N*-difeníl-*p*-fenilenediamina, propil gallato) protegem as células eficientemente da peroxidação de lipídeos, sugerindo que o aumento da peroxidação de membranas induzido pelo Al é um mecanismo da toxicidade do Al em plantas.

– ***Exudação de ácidos orgânicos***

A exudação de ácidos orgânicos possui um importante papel na neutralização da toxicidade interna e externa do Al (Ma *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 1997, Kochian *et al.*, 2004). Alguns ácidos orgânicos formam um complexo estável com o Al, prevenindo, desta forma, a ligação do Al com componentes intra e intercelulares das raízes (Li *et al.*, 2000). O maior ânion orgânico liberado em resposta ao Al é o malato na maioria

de *Arabidopsis* e na maioria dos cereais (Ryan *et al.*, 1995; Kochian *et al.*, 2004), citrato em leguminosas e milho (Yang *et al.*, 2000), e oxalato em trigo (Ma *et al.*, 1997). Utilizando *Arabidopsis* como modelo, Hoekenga e colaboradores (2006), fizeram um estudo onde identificaram genes transportadores de malato que possivelmente seriam ativados por Al. Nesse trabalho o gene *AtALMT1* foi estudado, homólogo ao gene transportador de malato *ALMT1* de trigo e verificaram que a superexpressão desse gene promovia uma tolerância maior ao Al, verificada através da não inibição do crescimento radicular na presença de 500 μM de AlCl_3 . Liao e colaboradores (2006) verificaram que em raízes de soja Al promovia a exudação de ácidos orgânicos específicos de diferentes regiões da raiz. Neste trabalho, foi visto que citrato e malato foram os dois ácidos orgânicos liberados em maiores quantidades na presença de Al na concentração de 38 μM , porém, a concentração de cada desses ácidos orgânicos variava ao longo da raiz.

– ***Polarização da Membrana Plasmática***

A membrana plasmática (MP) é uma importante barreira para o transporte do Al. Algumas propriedades da membrana como, superfície eletronegativa, são alteradas rapidamente devido a translocação de íons como Na^+ , K^+ , H^+ e Cl^- entre as faces da membrana. E essas mudanças têm sido reportadas como serem a base das diferenças observadas na tolerância/toxicidade entre os diferentes tipos vegetais (Ahn *et al.*, 2001; Kinraide *et al.*, 1998; Façanha & Okorokova-Façanha, 2002). A nível celular, o influxo de próton, por exemplo, ocorre na zona meristemática, ao passo que, a zona sub-apical exibe um efluxo de próton (Piñeros & Kochian, 2001). Uma importante propriedade das plantas é a sua habilidade em alterar o pH da rizosfera durante o seu crescimento. De acordo com a teoria do crescimento ácido, proposta inicialmente por Rayle e Cleland (1992), a manutenção de pH suficientemente ácido na parede celular facilita a expansão dirigida ou pelo afrouxamento da matriz de polissacarídeos ou por otimizar a atividade das proteínas da parede celular e de suas enzimas associadas (Cosgrove, 1997;

Tanimoto *et al.*, 2000; Wu & Cosgrove, 2000). A acidificação da parede celular associada a respostas a graviestimulação das células radiculares (Taylor *et al.*, 1996; Fasano *et al.*, 2001) suportam a idéia da existência entre a acidificação da parede celular e da expansão celular. Foi demonstrado que o perfil espacial da taxa de crescimento ao longo da zona de alongamento da raiz de milho tem coincidido com o perfil espacial com a acidificação da superfície da raiz (Peters & Felle, 1999). Pesquisas mostraram que o Al afeta a homeostase de H⁺ da célula vegetal por estimular a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática (Façanha & Okorova-Façanha, 2002; Matsumoto, 2005), evidenciando que o pH rizosfera na presença de Al diminui, o que poderia favorecer a expansão radicular.

– **Sistemas primários de transporte de H⁺**

Muitas mudanças ultraestruturais causadas pelo estresse do Al em plantas foram observadas em células do meristema fundamental da raiz, incluindo o aparecimento de numerosos e pequenos vacúolos que ocupavam significativamente o citoplasma (Ikeda & Tadano, 1993; Marienfield *et al.*, 1995). Nessas células, o citoplasma era visivelmente reduzido e extensivamente vacuolizado. Foi observado que o aumento no número de vacúolos nessas células estava diretamente relacionado com um aumento da atividade de transporte de H⁺ dependente de ATP nessa organela (Matsumoto *et al.*, 1996; Kasai *et al.*, 1992). O aumento da vacuolização com o aumento da atividade do transporte de H⁺ poderia catalisar o seqüestro do Al citoplasmático para o vacúolo ou manter a homeostase do pH pela restauração de H⁺ pelo vacúolo (Matsumoto, 1991; Hamilton *et al.*, 2001). Além disso, foi visto que a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática é aumentada na presença do Al (Façanha & Okorokova-Façanha, 2002; Mastumoto *et al.*, 2005).

As ATPases são enzimas localizadas nas membranas biológicas, capazes de transportar íons, metais e até mesmo, aminofosfolipídeos através das membranas. Esse transporte é mediado pela hidrólise de ATP. Existem três famílias de ATPases, que incluem a ATPase do tipo F (F₀F₁-ATPase), ATPase tipo V (V₁V₀ H⁺-ATPase) e finalmente ATPases

do tipo P (P-ATPase), (Pedersen and Carafoli 1987). Essa última está presente nas membranas plasmática e intracelular e é caracterizada pela formação de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico, que pode ser inibida por orto-vanadato. Foi identificado que as P-ATPases são capazes de transportar Na^+ , K^+ (Skou, 1957), Ca^{2+} (Hasselbach & Makinose, 1961), e H^+ (Dufour & Goffeau, 1978). As H^+ -ATPases de membrana plasmática existem somente em plantas e fungos. O funcionamento das ATPases gera diferença de potencial e de pH, que são requeridos por transportadores secundários onde a atividade é diretamente dependente da força próton motriz (Morsomme *et al.*, 2000).

As ATPases do tipo V (V_1V_0 H^+ -ATPase), assim como as do tipo F (F_0F_1 -ATPase) são distintas das ATPases do tipo P por 3 razões: primeiramente, por não existirem evidências da formação de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico (Lichko & Okorokov, 1985; Nelson, 1989); segundo, por elas serem formadas por um complexo constituído de múltiplas subunidades (Bowman & Bowman, 1986; Pedersen & Carafoli, 1987) e, por último, por possuírem inibidores específicos como azida (NO_3) atua especificamente na ATPase do tipo F, concanamicina A e bafilomicina A que atuam especificamente nas V-ATPases. As V- H^+ -ATPases são encontradas em membranas vacuolares de plantas e fungos, membranas lisossomais, endossomais, vesículas secretórias e em membrana plasmática de células cancerígenas, funcionando com atividade ótima em pH de 7,0 e 7,5. Essa ATPase utiliza a energia liberada pela hidrólise do ATP para bombear H^+ para dentro das organelas. O bombeamento de H^+ promove diferenças nos potenciais eletroquímicos e mudanças de pH no interior das organelas.

– **Síntese de calose**

O aumento do Ca^{2+} como conseqüência da exposição das células ao Al pode afetar processos metabólicos dependentes de Ca^{2+} que estão direta ou indiretamente envolvidos na regulação da divisão e alongamento celular. (Rengel, 1992a; Delhaize and Ryan, 1995). Por

exemplo, o aumento de Ca^{2+} citosólico é pré-requisito para que haja a síntese de calose (β -1,3-glucano) (Kauss, 1985).

A presença de Al na superfície da MP foi relacionada com alterações na superfície celular, tais como o acúmulo de calose e a inibição do crescimento radicular (Zhang *et al.*, 1994; Frantzios *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2001, 2002). Em estudos feitos sobre a síntese de calose em plantas tratadas com Al, verificou-se que o acúmulo de calose no sub-ápice radicular está diretamente relacionado com a inibição do crescimento da raiz em *T. aestivum* (Zhang *et al.*, 1994), *Triticum turgidum* (Frantzios *et al.*, 2001) e *Zea mays* (Horst *et al.*, 1997). Neste último trabalho utilizando milho como objeto de estudo, os pesquisadores verificaram que a formação de calose ocorria mais intensamente na região de até um cm da ponta radicular e esse acúmulo de calose não se dava apenas nas regiões intactas do sub-ápice radicular, mas também em protoplastos isolados dessa região.

– **Transporte intracelular mediado por plasmodesmos**

Nas células vegetais, o simplasto (espaço intracelular) e o apoplasto (espaço extracelular), embora sejam separados pela membrana plasmática, não são compartimentos individuais e sim formam uma estrutura contínua para troca de sinais a fim de orquestrarem o desenvolvimento (Wyatt & Carpita, 1993). O transporte intracelular de moléculas entre as células vegetais é realizado via junções celulares chamados de plasmodesmos. Essas estruturas são pontuações da membrana tem a propriedade de transportar várias moléculas incluindo pequenos íons, peptídeos, hormônios e ácidos nucléicos (Ding *et al.*, 1992; Lucas & Wolf, 1993; Lucas, 1995; Mezitt & Lucas, 1996; Lee *et al.*, 2000). Foi observado que a presença de Al promove um aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular (Jones *et al.*, 1998a; Zhang & Rengel, 1999). Estudos relacionando os efeitos do Al com a comunicação célula-célula verificaram que a presença desse íon no apoplasto promove o fechamento dos plasmodesmos (Sivaguru *et al.*, 2000). Os autores sugerem que esse fechamento é devido ao

acúmulo de calose que foi previamente estimulado pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólico.

O impacto econômico da toxicidade do Al na agricultura tem focalizado o interesse na pesquisa sobre o efeito do íon Al em sistemas vegetais. Porém, os estudos feitos na área vegetal tornaram-se problemáticos, devido à tentativa de ajustar os resultados obtidos com o uso de uma dada espécie à realidade de outra espécie diferente. Sendo assim, a pesquisa sobre a toxicidade do Al utilizando sistemas vegetais apresenta lacunas nem sempre possíveis de serem preenchidas usando modelos de estudos particularmente complexos, como os vegetais. Apesar de existirem inúmeras linhas de pesquisa na área vegetal, o efeito do Al sobre leveduras e outros eucariotos inferiores, tem sido ainda relativamente incipiente.

1.4. Leveduras: um excelente organismo modelo

Características como: morfologia cilíndrica típica, rápida divisão celular, fácil manipulação genética, além da ausência de patogenicidade, tornaram a levedura de fissão um excelente modelo de estudo para diversos processos celulares. O estudo de proteínas homólogas as ciclinas de células animais envolvidas nos processos de ciclo celular e transcrição (Saiz & Fisher, 2002), o papel das CDKs no estudo da apoptose relacionada à danos no DNA e defeitos na replicação (Burhans *et al.*, 2003), além do uso do genoma desta levedura como modelo para o estudo das funções fisiológicas, substratos específicos e localização intracelular das ATPases do tipo P (Okorokova-Façanha *et al.*, 2003), são alguns exemplos da utilização da levedura de fissão como modelo de estudo. *S. pombe* possui, ainda, outra vantagem: a sua ascendência de uma cepa de laboratório monolítica, em que todas as cepas desta levedura utilizadas em experimentos científicos derivam de um único isolamento (Sunnerhagen, 2002), garantindo maior uniformidade nos resultados. Além disso, essa levedura foi separada dos demais representantes de sua classe há 330-440 milhões de anos (Wood *et al.*, 2002) e teve suas características mais primitivas melhor preservadas ao longo da evolução, o que faz desta levedura um modelo de estudo de sensibilidade, na medida que nos possibilita averiguar

que alvos protéicos são atacados pelas drogas e as vias em que estas interferem (Sunnerhagen, 2002).

Em 1996 foi finalizado o projeto Genoma da Levedura, revelando a seqüência de 5.600 genes presentes nos cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2001). O genoma da levedura de fissão *S. pombe* foi concluído no ano de 2002 (Wood *et al.*, 2002), revelando a seqüência de 5.004 genes. Foi identificado, em ambas as espécies, um número extraordinário de genes que codificam para proteínas cujas funções estão ainda desconhecidas (aproximadamente 35%). Muitas seqüências mostram alto grau de homologia com genes de plantas, ratificando a importância do uso da levedura como modelo nos estudos de mecanismos celulares e moleculares comuns a esses microrganismos eucarióticos e os vegetais.

A levedura de brotamento (*Saccharomyces cerevisiae*) é um excelente organismo-modelo para o estudo de diversos estresses incluindo, Cu (Fogel & Welch, 1982), Co (Conklin *et al.*, 1992), Cd e Zn (Kamizono *et al.*, 1989), Mg e Al (MacDiarmid & Gardner, 1996, 1998; Schott & Gardner, 1997). MacDiarmid e Gardner (1998), isolaram 2 genes desta levedura, ALR1 e ALR2 – relacionados à captação de Mg^{+2} pela célula. Foi visto que a superexpressão desses genes resulta numa tolerância da célula ao Al, ao passo que, em relação a íons divalentes a célula se torna mais sensível. Schott e Gardner (1997) isolaram oito mutantes independentes sensíveis ao Al. Alguns desses mutantes apresentavam vários problemas, como resposta a outros tipos de estresse, mudanças na tolerância a outros cátions metálicos ou ainda morfologia anormal. A H^+ -ATPase vacuolar apresenta uma função importante na tolerância ao Al; a deleção dos genes em cepas mutantes (*vma1⁺* e *vma2⁺*) demonstra uma diminuição do crescimento na presença do Al (MacDiarmid & Gardner, 1998). Esses dados sugerem que a levedura possui mecanismos para aliviar a toxicidade do Al.

Kakimoto e colaboradores (2005) analisaram o efeito do $AlCl_3$ em duzentas cepas com deleção em série e verificaram que três processos celulares como: transporte de vesículas, via de transdução de sinal e glicosilação de proteínas, aparentemente possuem um papel vital na tolerância ao Al. Os genes deletados estão envolvidos nesses processos, e mutantes tratados com Al possuíram uma maior sensibilidade ao Al em relação ao

selvagem (sem tratamento). Dos mutantes obtidos nesse estudo, os que tiveram genes deletados cujos produtos contribuía para o processo de glicosilação, foram os mais sensíveis já na concentração mais baixa utilizada nesse trabalho de 200 μM de AlCl_3 .

Hamilton e colaboradores (2001) verificaram que em *S. cerevisiae*, 15 μM AlCl_3 inibe a atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática. Estes autores sugerem que ocorre uma possível diminuição do pH citoplasmático. Além disso, foi verificado que ocorre um aumento substancial na atividade do transporte de H^+ ATP-dependente no vacúolo. Esse resultado sugere que, o aumento da atividade da V- H^+ ATPase seria a tentativa de aliviar os efeitos promovidos por uma diminuição do pH citosólico, sendo portanto, um efeito indireto da toxicidade causada pelo Al, nessas células.

Assim como em sistemas vegetais, foi visto que na levedura de brotamento *S. cerevisiae*, o Al pode promover o aumento ou ainda a inibição do crescimento, dependendo da concentração e do tempo de exposição (Zheng *et al.*, 2007). Neste trabalho foi visto que 2 mM de AlCl_3 promove o aumento da densidade das culturas até 10 horas de tratamento. Além disso, foi visto utilizando um marcador de viabilidade celular (diacetado de fluoresceína) que o tratamento com Al induz a apoptose dessas células.

Anoop e colaboradores (2003) investigaram o papel do citrato na mediação da tolerância ao Al por *S. cerevisiae*, observaram que o estresse por Al promove uma alta produção de citrato pela célula. O citrato em excesso é transportado para fora da mitocôndria e, a fim de evitar a acidose citosólica provocada pelo ácido cítrico, o mesmo é liberado para o meio extracelular. Fora da célula o citrato forma um complexo estável com o Al. Este estudo sugere um mecanismo pelo qual a levedura de brotamento diminui o efeito citotóxico promovido pelo Al. Esse mesmo processo foi observado em várias espécies de plantas de interesse econômico (De la Fuente *et al.*, 1997; Jones & Kochian, 1997), indicando que o Al afeta a fisiologia da levedura de forma análoga à célula vegetal, justificando o uso da levedura como ferramenta para o estudo da toxicidade desse metal.

A análise genética da toxicidade de metais tem sido acelerada pelo uso de organismos unicelulares como sistema modelo para clonagem e análise de genes que contribuem para a resistência/sensibilidade ao metal. A levedura

S.cerevisiae é um ótimo modelo para o estudo da resistência e toxicidade de metais, pois tem seu genoma inteiramente seqüenciado, permitindo a análise da expressão gênica sob diversos tipos de estresses (Goffeau *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2001). Essa mesma vantagem pode ser atribuída à outra levedura: *Schizosaccharomyces pombe*, da ordem Schizosaccharomycetales, que contém, atualmente, 6 membros: 2 variedades de *S. pombe* (*var. malidevoram* e *var. pombe*), 3 variedades de *S. japonicus* (*var. versitales*, *var. longobardus* e *var. japonicus*) e *S. octosporus* (Sipiczki, 1995). Dentre estes, a *S. pombe var. pombe* é o organismo que normalmente é referido como levedura de fissão, e que é classificada como *archiascomycetes*, fazendo parte do filo Ascomycota, pertencente ao reino Fungi.

Alguns trabalhos reportam a utilização da levedura de fissão no estudo de genes envolvidos na tolerância ao estresse por metais, como, o Co e o Cd (Clemens *et al.*, 2002), e em estudos envolvendo mutantes sensíveis à temperatura (Rajagopalan *et al.*, 2004). A levedura de fissão é também considerada um excelente modelo biológico para o estudo de diversos processos celulares, incluindo, ciclo e morfologia celular e organização espacial da célula (Nurse, 1994a, 1994b; Chang, 2001).

– **Parede Celular da levedura de fissão**

A parede celular (PC) da levedura *Schizosaccharomyces pombe* determina a forma celular, promove a proteção mecânica e auxilia no suporte da pressão osmótica interna. Essa estrutura é composta por polissacarídeos e glicoproteínas, formando um exoesqueleto que não é estático, ao contrário, é muito dinâmico, permitindo as mudanças morfológicas que ocorrem durante o ciclo de vida de *S. pombe*, como um crescimento monopolar ou bipolar durante o ciclo vegetativo (Chang *et al.*, 2002).

O maior componente estrutural da parede celular de *S. pombe* são duas classes de homopolímeros β -1,3-glucano e β -1,6-glucano (48-54%), α -1,3-glucano e α -1,4-glucano (28-32%) do total de polissacarídeos (Kopecka *et al.*, 1995). Esses polissacarídeos apresentam uma alta capacidade de cristalização e formam uma rede na

PC (Bush *et al.*, 1974). A PC também contém glicoproteínas que contribuem na formação de galactomanano, um polímero não estrutural que representa 9-14% dos polissacarídeos da PC.

Em *S. pombe* vários tipos de glucano sintase foram identificadas. Entre elas, Mok1p (Ags1p) é uma α -1,3-glucan sintase; Bgs2p e Bgs3p são β -1,3-glucano sintases envolvidas na alongação celular e formação de esporos (Martin-Cuadrado *et al.*, 2003). Bgs1p (Cps1p) é essencial para formação do septo e atua durante o crescimento polarizado e esporulação (Liu *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2007). Em *S. pombe*, os esporos são o único estágio cuja parede celular contém quitina (ou quitosano), que é sintetizada por Chs1p (Arellano *et al.*, 2000). Enzimas de remodelamento da PC como Eng1p, estão envolvidas na degradação glucanásica (Martin-Cuadrado *et al.*, 2003). Durante a divisão celular, para que a septação celular ocorra é fundamental que haja a coordenação dos anéis de contração no plano mediano da célula. Esse processo requer uma rede de proteínas regulatórias que são coletivamente referidas como (SIN) *septation initiation network*. Essas proteínas também controlam a formação do septo primário durante a contração do anel de actomiosina (Chang, 1999; Pelhan & Chang, 2002). Estudos genéticos indicaram que a ativação de SIN pode ser regulada por Cps1p, uma β -1,3-glucano sintase (Le Goff *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). O septo é formado por três estruturas principais, uma estrutura primária de β -1,3-glucano linear circundada por dois septos secundários, formados por β -1,6 e β -1,3-glucano (Humbel *et al.*, 2001).

A levedura de fissão *S. pombe* é um modelo para estudos da relação entre morfologia e formação da parede celular (Chang *et al.*, 2001). A síntese da parede celular é regulada por Cps1p e sua atividade durante o ciclo celular é finamente regulada. O esclarecimento dos mecanismos celulares, bioquímicos e morfológicos em leveduras envolvidos na resposta a diversos tipos de estresse, como o do AI, poderá facilitar a compreensão dos fenômenos que atingem organismos complexos como os eucariotos superiores.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Analisar os efeitos, ultraestruturais da parede celular e seus componentes bioquímicos, promovidos pelo estresse do Al utilizando como modelo de estudo células da levedura de fissão *S. pombe*.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar o efeito do Al na cultura de *S. pombe*;
- Avaliar as alterações promovidas pelo tratamento por Al no septo e parede celular da levedura de fissão;
- Analisar o efeito do Al na atividade da enzima β -1,3-glucanase;
- Avaliar a capacidade de regeneração da parede celular por células/esferoplastos tratados com Al;
- Analisar a resitência da PC de células de *S. pombe* tratadas com Al através da hidrólise enzimática;
- Analisar o transporte de H^+ pelas ATPases do tipo P e V de membranas isoladas das células da levedura de fissão cultivadas ou não com Al.

MATERIAIS & MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepa utilizada

Neste estudo foi utilizada a cepa selvagem da levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* Fy1180 (*wt*) *h⁺ otr1R(Sphl)::ade6⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6- M210* (Prof. R. Allshire, Edinburgh).

3.2. Meio de Cultura

Para o cultivo da levedura Fy1180 foi utilizado o meio rico, YES, composto de 0,5% de extrato de levedura, 3% de glicose, aminoácidos e nucleotídeos (3,75 mg/mL de adenina e uracila e 7,5 mg/mL de arginina, histidina e leucina). Para se obter o meio sólido foram acrescentados 2% de ágar à concentração final.

Como forma de esterilizar os meios de cultura, estes foram autoclavados à 1 atm, por um tempo de 15 minutos, a uma temperatura de 121°C. Os meios sólidos foram vertidos em placas de Petri (estéreis) no fluxo laminar, que foram posteriormente mantidas na estufa à 30°C por 24 horas, para um controle de esterilidade. O pH do meio em todos os experimentos foi ajustado para 4,5. A manutenção da cepa foi feita em meio sólido, nas placas de Petri, armazenadas à 4°C. A estocagem foi feita em meio de cultura líquido contendo 20% de glicerol à -70°C.

3.3. Cultivo na presença ou não de alumínio

As células de Fy1180 foram inoculadas em meio YES líquido, pH 4,5 e cultivadas à 30°C, 250 rpm por 12 horas. Uma alíquota desta pré-cultura foi adicionada em um novo meio, contendo ou não concentrações de 0,1 e 0,5 mM de AlCl_3 ou $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, de modo que a densidade óptica seja 0,2. Esse cultivo foi acompanhado através de leituras de absorvância em comprimento de onda de 600_{nm} no aparelho de espectrofotômetro e através da contagem celular na câmara de Neubauer, a cada 3 horas, até a cultura atingir a fase estacionária.

3.4. Hidrólise enzimática da parede celular de *S. pombe* na presença de Al

As células foram cultivadas e inoculadas, em meio sem tratamento e com tratamento (0,5 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$), a partir de uma pré-cultura, afim de obtermos culturas com aproximadamente 3,0 unidades/ mL, após 12 horas de crescimento, avaliadas através da densidade ótica. Os 100 mL de meio cultivados foram transferidos para tubos e centrifugadas a 3000xg por 5 minutos à 4°C (centrífuga Excel Baby I 206). As células foram ressuspensas em uma solução alcalina (sorbitol 1,2 M; Tris-HCL 50 mM, pH 8,4; EDTA 10 mM; β -mercaptoetanol 30mM;) e incubadas à 25°C. Após essa etapa, as células foram centrifugadas (3000xg por 5 minutos à 4°C) e ressuspensas com uma solução ácida (sorbitol 1,2 M; NaH_2PO_4 0,05 M; pH 5,8) e centrifugadas novamente (3000xg por 5 minutos à 4°C). Essas células foram então, submetidas à hidrólise enzimática da parede celular (PC) ao serem incubadas com solução ácida, contendo enzima lítica de *Trichoderma* (5 mg/g de células), à 37°C, sob leve agitação. Após o início da incubação, retiramos alíquotas de 10 μl do meio de incubação que são diluídos em 990 μl de água e fazemos a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 600_{nm}. A densidade ótica dessa diluição foi acompanhada a cada 5 minutos, com um tempo total de 45 minutos ou até que houvesse 80% de decaimento da densidade ótica. A densidade ótica indica que está ocorrendo hidrólise enzimática, de maneira indireta, pois à medida que a PC vai sendo hidrolisada, os esferoplastos vão sendo liberados e rompidos devido a diferença de osmolaridade quando em contato com a água, causando uma diminuição da absorbância.

3.5. Análise da regeneração da parede celular da levedura de fissão *S. pombe*

Para que fosse possível analisarmos a regeneração da PC de *S. pombe*, inicialmente foi realizado um ensaio de hidrólise enzimática da PC (materiais e métodos, 3.4), seguido de uma reinoculação dos esferoplastos obtidos em novos meios de culturas na ausência ou presença de 0,5 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ e 1M sorbitol. A partir na reinoculação dos esferoplastos, alíquotas foram retiradas (tempos 0, 15 minutos, 30 minutos, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h e 24h), para o preparo das amostras que serviram para o acompanhamento e verificação da

regeneração da PC dessa levedura em meio controle e contendo Al, utilizando como ferramenta a microscopia eletrônica de varredura.

3.6. Análise da Morfologia de *S. pombe*

Para analisar a morfologia da levedura de fissão, utilizamos como ferramenta a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Os esferoplastos obtidos por meio da hidrólise enzimática (materiais e métodos 3.5), e que foram reinoculados em novos meios de cultura, contendo ou não 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, foram aliqotados nos tempos determinados (materiais e métodos, 3.4). Os esferoplastos/células foram lavados com PBS (0,9% NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) três vezes, com o objetivo de promover a retirada de proteínas existentes no meio de cultura, além de manter o pH estável, a fim de evitar artefatos e também manter a osmolaridade do material. A lavagem foi feita por centrifugação por 30 segundos (minicentrífuga 4515C), seguida de retirada do sobrenadante e posterior ressuspensão das células em PBS. Após a lavagem, os esferoplastos/células foram centrifugados novamente por 30 segundos com a retirada do sobrenadante, para posterior fixação das células. A fixação foi feita com 2% glutaraldeído (GA) e 2% paraformaldeído (PA) em tampão PIPES (ácido 1,4-pipezina dietanosulfônico, pH 7,4). A montagem do material foi feita, primeiramente, sobre uma lamínula coberta com Poli L-lisina. A pós-fixação foi feita com 1% OsO_4 , diluído em tampão PIPES 2%. Os fixadores alteram a permeabilidade da membrana. Após essa etapa, foi iniciado o processo de desidratação, em série com etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), seguido pelo Ponto Crítico (Bal-Tec CPD 030), no qual etanol foi substituído gradativamente por CO_2 líquido. O ponto crítico acontece no momento em que a interface entre CO_2 líquido/gasoso não existe, pois a quantidade de moléculas líquidas que se tornam gás é exatamente igual à quantidade de moléculas de gás que se tornam líquida. A temperatura foi então elevada, e todo o líquido se tornou gás, deixando a amostra totalmente seca. As lamínulas foram fixadas sobre o suporte que estará em contato direto com o porta-amostras do microscópio.

O material foi metalizado no aparelho Bal-Tec FCD 050, sob uma atmosfera de argônio e foi coberto com ouro (Au). As amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 926) à 25 KV.

3.7. Análise ultraestrutural da parede celular de *S. pombe*

Para analisar a ultraestrutura de *S. pombe*, utilizamos como ferramenta a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

As células selvagens Fy1180 foram cultivadas até o início fase logarítmica (1,0 DO₆₀₀/mL), meio de cultura, YES, com e sem adição de 0,5 mM de AlK(SO₄)₂, à 30°C em agitação à 250 rpm, por um tempo de 22 horas. O meio contendo as células foi transferido para microtubos de 0,5 mL e então centrifugadas por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2% de tampão PIPES, pH 7,4. As células foram centrifugadas novamente e ressuspensas numa solução fixadora contendo 1% de PIPES, 2% de glutaraldeído (GA) e 2% de paraformaldeído (PA) por 2 horas em temperatura ambiente. Após essa etapa, as células foram lavadas novamente com tampão PIPES e pós-fixadas com uma solução contendo 1% de OsO₄ e 1% tampão PIPES, seguida de uma nova lavagem com tampão PIPES por 30 minutos. Após esse período, as células foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90, 100%), seguida da inclusão gradual de resina epóxi (EPON[®]), diluída em etanol, nas seguintes proporções: 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:2, 1:3 por 6 horas e, finalmente, epon puro por 24 horas. O epon foi trocado mais uma vez e o material foi posto para polimerizar à 60°C por 48 horas. Os blocos de resina contendo as amostras foram então cortados com faca de diamante numa espessura de aproximadamente 70 nm. Os cortes foram dispensos sobre uma grade de cobre (300 mesh) e contrastados primeiramente com uma solução de acetato de uranila (5%, diluída em H₂O), por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram contrastados com uma solução de citrato de chumbo (composta de 4% de nitrato de chumbo e 3% de citrato de sódio), por 5 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram visualizadas no microscópio Zeiss 900 a 80 kV.

3.8. Determinação da atividade da glucanase de *S. pombe*

O método utilizado foi realizado como o descrito como Somogyi – Nelson (1952), com algumas modificações. O reagente de cobre é composto de duas soluções A e B. Solução A (10% Na₂CO₃; 5% tartarato de potássio; 6% bicarbonato de sódio; 1,6% sulfato de cobre). Solução B (5% sulfato de sódio) fervida por 5 minutos e resfriado à temperatura ambiente. Essas 2 soluções A e

B são reunidas. O reagente arsenomolibdato é composto pela solução C (5% molibdato de amônio, 4% ácido sulfúrico; 0,5% arsenato de sódio) incubada à 37°C por 48 horas. Para analisarmos a atividade da enzima β -1,3-glucanase, incubamos 10 μ l de membranas totais isoladas de células de *S. pombe* com 200 μ l de laminarina (2mg/mL), à 37°C por tempos que variaram de 0 a 12 horas. Após esse tempo, foi adicionado 500 μ l do reagente de cobre e o meio de reação foi fervido por 10 minutos e resfriados à temperatura ambiente. Depois de resfriada, foi adicionado 1 mL do reagente de arsenomolibdato. A densidade óptica desse meio de reação foi avaliada a DO_{500nm}, no aparelho espectrofotômetro.

Os resultados obtidos foram normalizados, levando em consideração a quantidade de proteína contida nas membranas e também a curva padrão de açúcar. A curva padrão foi feita utilizando de 0 a 200 μ g de glicose incubada em tampão acetato de sódio, pH 5,5 à 37°C. O reagente de cobre foi adicionado 500 μ l e fervido por 10 minutos e resfriado à temperatura ambiente. Após esse período, 1 mL do reagente arsenomolibdato foi adicionado e a leitura a 500 nm foi feita no espectrofotômetro.

Os dados foram normalizados utilizando a seguinte fórmula:

$$[(DO \times CG/ACG) * 100] * 3/CP$$

Sendo,

DO = densidade óptica do meio de reação

CG = média concentração de glicose

ACG = média absorvância da concentração de glicose

CP = conteúdo de proteína das membranas totais isoladas

3.9. Isolamento das membranas celulares de *S. pombe*

O volume do pré-inóculo a ser adicionado em 200 mL do meio YES (erlenmeyers de 1000 mL) foi calculado, considerando o tempo de dobra das cepas de *S. pombe* de acordo com a curva de crescimento. Após o crescimento celular, em 250 rpm a 30°C, até a metade da fase logarítima (OD₆₀₀ = 2), procedemos com o isolamento das membranas de *S. pombe*. As células foram inoculadas em meio YES e crescidas no *shaker* (250 rpm a 30°C) até a metade da fase logarítmica do crescimento. O isolamento dos esferoplastos e obtenção

de membranas celulares foi realizado de acordo com a técnica descrita por Okorokov *et al*, 2001. As células foram transferidas para os tubos de centrífuga e coletadas a 5000 rpm por 5 min e posteriormente lavadas em solução de sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,4, EDTA 10mM, β -mercaptoetanol 30 mM na temperatura ambiente por 10 min e centrifugadas novamente a 3000xg por 5 min a 4°C. As células foram lavadas novamente em solução de sorbitol 1,2 M, NaH_2PO_4 0,05 M, ácido cítrico pH 5,8 (solução padrão) e coletadas a 3000 g por 5 min a 4°C. As células foram ressuspensas em solução padrão contendo a enzima de lítica de *Trichodermas* e foram incubadas a 37°C com agitação leve para obtenção de esferoplastos. Os esferoplastos foram transferidos para os tubos de centrífuga contendo solução de sorbitol 1,4 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,2 e coletados a 3000xg por 5 min a 4°C. Os esferoplastos foram ressuspensos em tampão de lise (sacarose 12,5%, Tris-HCl 20 mM pH7,4), homogeneizados no *potter* e submetidos a centrifugação a 3000xg por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 45000xg por 45 minutos à 0°C para a obtenção de membranas totais. As membranas foram ressuspensas em tampão de lise e coletadas manualmente com pipeta automática e estocadas à -70° C para posterior análise.

3.10. Análise da atividade das H⁺-ATPases do tipo P e V da levedura de fissão

Registramos a formação do ΔpH através das membranas, apenas as vesículas de membranas, a partir do transporte de H⁺ realizado pela V₁V₀ H⁺-ATPase ou P-H⁺-ATPase, utilizando a sonda fluorescente ACMA (Okorokov & Licko, 1983).

Para tal, utilizamos tampão de incubação contendo KCl 20 mM, MgSO_4 2,5 mM, solução de MOPS-KOH (12,5% de sacarose, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) em volume necessário para completar 2,0 mL de volume final, 3 μL de ACMA 1 mM (dissolvido em etanol) e suspensão de membranas com volume variando entre 20 e 90 μL , dependendo da atividade apresentada, de modo que a amplitude máxima ($F_{\text{máx}}$) não ultrapassasse o valor de 50%.

Após três minutos de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência) acrescentamos 1 mM de ATP pH 7.2, observando-se a

diminuição da fluorescência do ACMA em fluorímetro, nos comprimentos de ondas de excitação 415 nm e emissão em 485 nm com abertura de 5 nm/10 nm. Após aproximadamente de 600 segundos (ou suficiente para atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons) adicionamos 0,02 M de NH_4Cl a fim de parar a reação, desfazendo o gradiente protônico estabelecido.

Para análise de V e P H^+ -ATPase seguimos o mesmo procedimento, porém, adicionamos inibidores (5,75 μM de concanamicina A e 100 μM de vanadato, respectivamente) ao tampão de incubação.

Montamos a curva de ΔpH utilizando os dados e gráficos obtidos a partir destas análises a fim de determinar a velocidade inicial (V_0) e a fluorescência máxima ($\Delta F_{\text{máx}}$) em cada fração de membrana.

Utilizamos a seguinte fórmula :

$$V_0 = [F_0 / (F_{\text{máx}} * t)] * 100, \text{ onde:}$$

V_0 : velocidade inicial de formação do pH;

F_0 : fluorescência dependente de V_0 , num tempo t, determinada pela extrapolação de uma reta tangente à maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

$F_{\text{máx}}$: fluorescência máxima (total);

t : tempo em minutos;

$$\Delta F_{\text{máx}} = F_{\text{eq}} / F_{\text{máx}} * 100\%;$$

F : fluorescência de equilíbrio, determinado como fluorescência do “platô” que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de H^+ nas vesículas.

Na presença de ATP a fluorescência do ACMA reduz, demonstrando a formação de um gradiente resultante do transporte de prótons para dentro das vesículas membranares. Ao atingir o estágio máximo e de equilíbrio, adicionamos NH_4Cl , que desfaz o gradiente protônico.

3.11. Determinação do conteúdo de proteínas

O conteúdo de proteína em membranas totais foi determinado utilizando 10 a 15 μL de frações membranares com várias diluições pelo método original de Bradford (1976) usando BSA nas concentrações de 0 à 10 μg , como um padrão.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. O efeito do Al sobre o cultivo celular de *S. pombe*

Para determinar o efeito de alumínio no cultivo de *S. pombe*, as células foram cultivadas no meio líquido, YES, contendo ou não AlCl_3 e/ou $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, nas concentrações de 0,5 mM. A densidade óptica das culturas foi avaliada a cada 3 horas, pois esse é o tempo médio de geração da espécie ou seja, tempo necessário para dobrar a população da cepa selvagem Fy1180. O perfil das curvas de crescimento (Figura 1) demonstra que alumínio promove uma inibição do crescimento de células tratadas com 0,5 mM em aproximadamente 40%, até 36 horas de cultivo (Figura 2). Além disso, durante esse mesmo tempo, observamos que o meio de cultura que continha alumínio propiciou o surgimento de células aberrantes, longas e ramificadas, durante a fase estacionária. Das células tratadas com 0,5 mM, 47% apresentaram sinais de aberrações. O efeito do Al na morfologia celular de *S. pombe*, pôde ser observado a partir de 3 horas de cultivo, após esse período as células tratadas com 0,5 mM já apresentavam 5% de células aberrantes. Os diferentes sais de Al utilizados não alteraram os resultados obtidos.

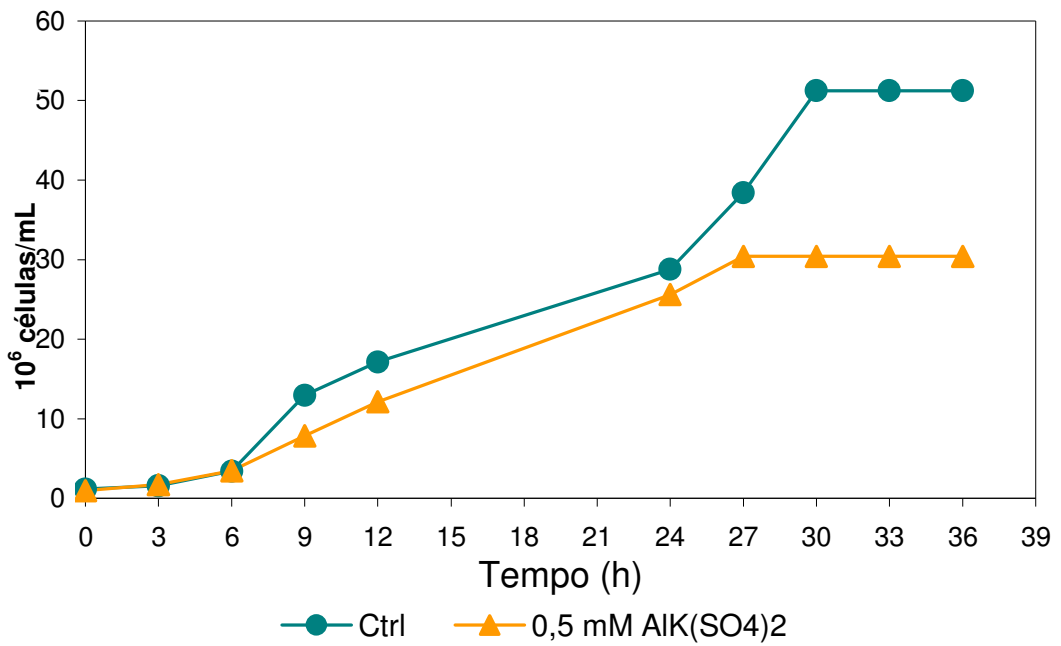


Figura 1. Cultivo de células de *S. pombe* sem (ctrl) e com 0,5 mM de AIK(SO₄)₂.

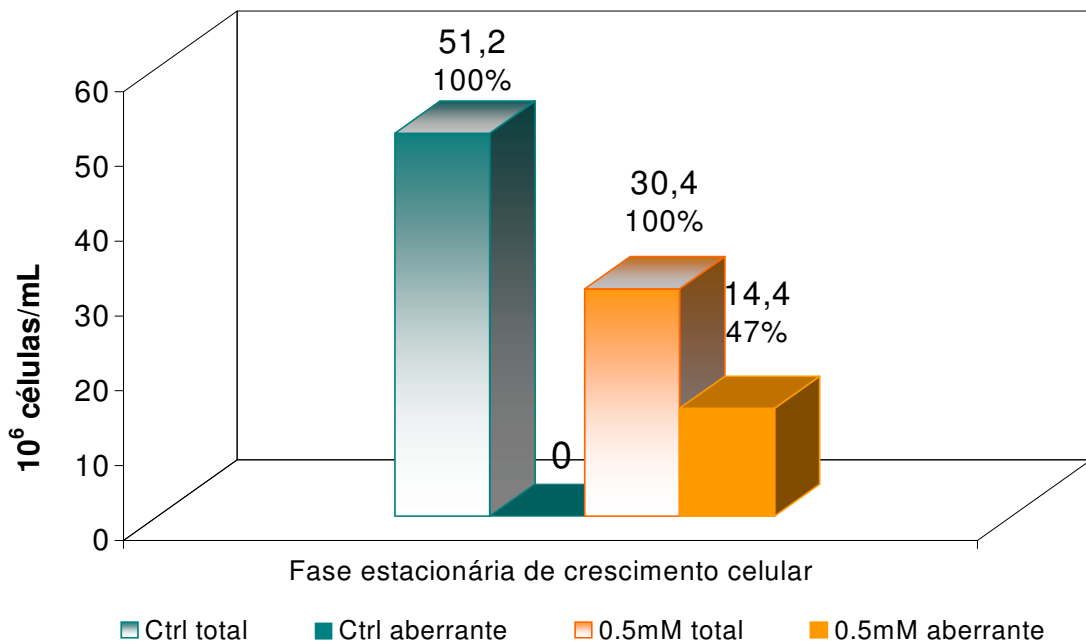


Figura 2. Valores de células morfologicamente aberrantes na cultura, após o tratamento com AIK(SO₄)₂, na fase estacionária de crescimento (36 horas).

2. O efeito do Al na ultraestrutura da parede celular de *S.pombe*

Utilizamos microscopia eletrônica de transmissão (MET) para analisarmos o efeito do Al na estrutura da parede celular (PC) da célula de *S. pombe*. Verificamos que o tratamento com esse metal causou alterações bruscas na célula. Observamos que as células sem tratamento (controle) exibiam uma formação de parede celular (PC) e septo tipicamente normais (Figura 3). Sendo a espessura da PC notadamente uniforme ao longo de toda a superfície celular. O septo citocinético de células sem tratamento apresentou-se totalmente centralizado e alinhado, em relação ao eixo transversal do crescimento polarizado. As células tratadas (0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$), apresentaram PC espessa em determinados locais ao longo superfície celular, o que provocou, conseqüentemente, uma retração citoplasmática nessas células (Figura 4), o que em alguns casos provocou a constrição do material citoplasmático, isolando em algumas regiões internas da célula. Além disso, observamos uma drástica modificação na estrutura e na formação do septo nas células tratadas. O septo, nessas células, apresentou-se mais espesso, descentralizado e também desalinhado em relação às células sem tratamento. E muitas vezes, pudemos observar a presença de mais de um septo na mesma célula (Figura 4).

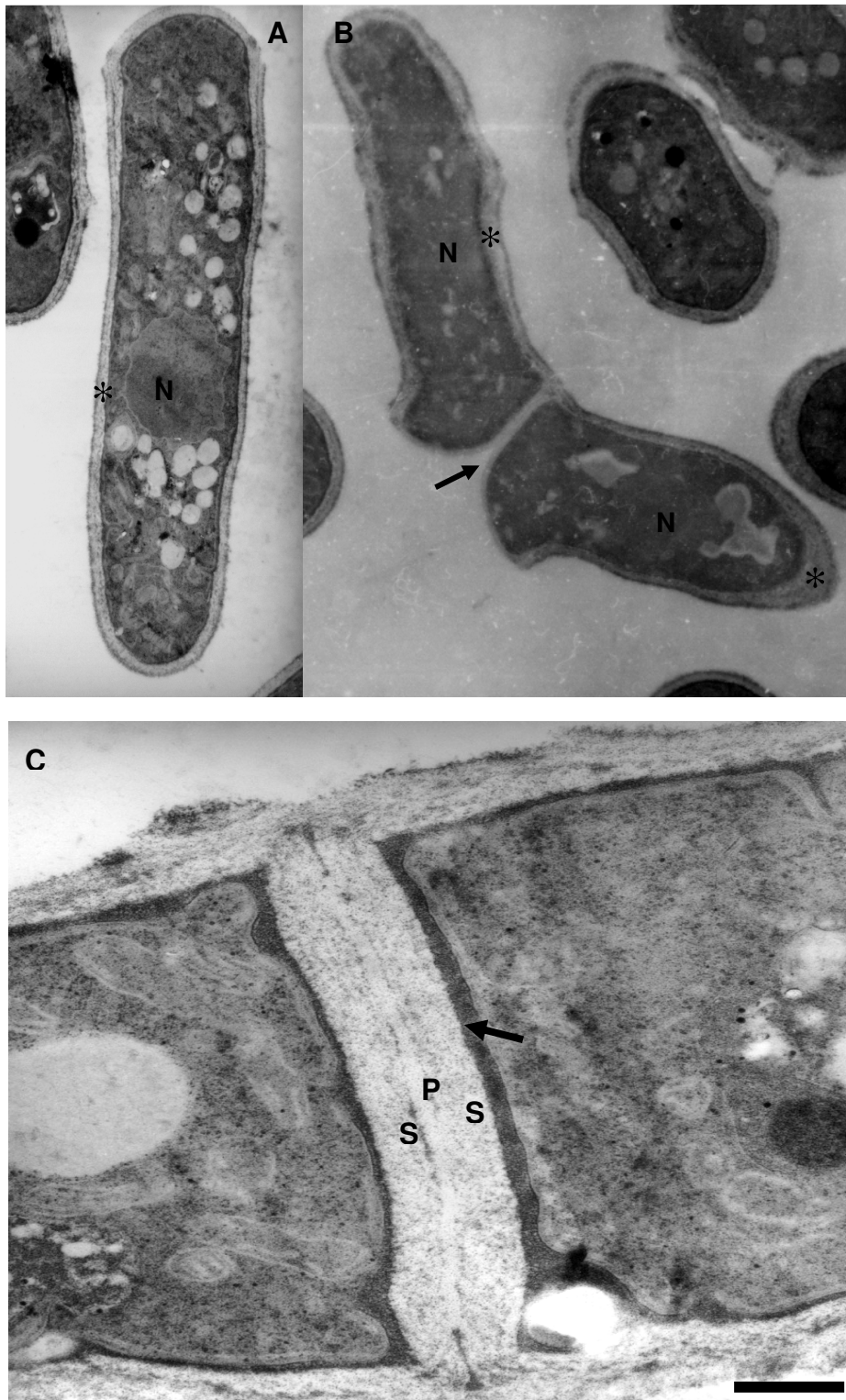


Figura 3. MET de células de *S. pombe* controle; A- morfologia típica da levedura de fissão; B- Momento da citocinese; C- septo típico da levedura de fissão, P – septo primário e S- septo secundário. Setas indicam septo e asterisco indicam parede celular. N- núcleo. Barra = **A** - 1,5 μm ; **B**- 2,5 μm e **C**- 0,35 μm .

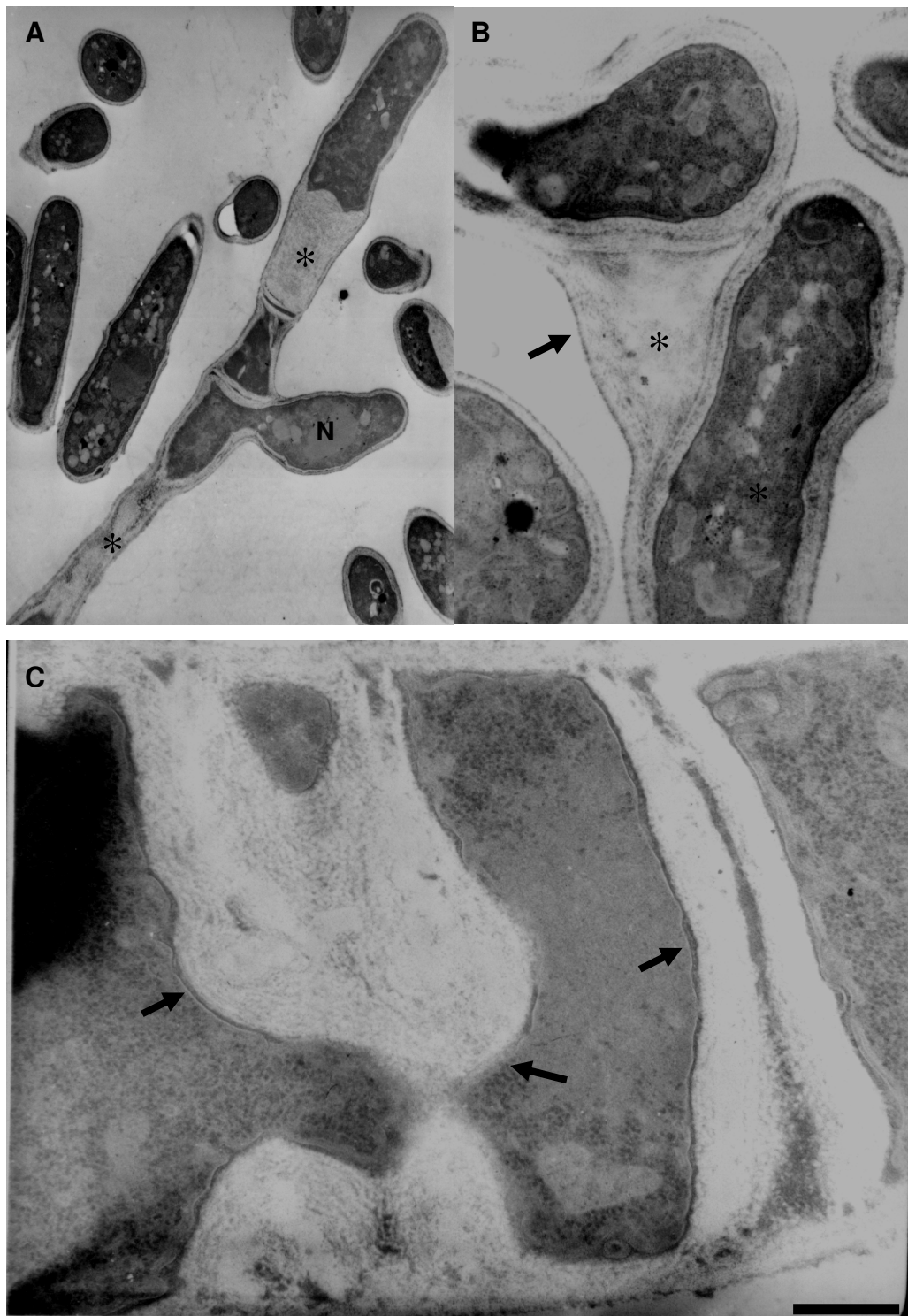


Figura 4. MET de células de *S. pombe* cultivadas com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$; A- célula longa e ramificada, apresentando vários septos e excessiva deposição da parede celular ; B- citocinese de célula aberrante; C- septos amorfos de célula cultivada com Al; Setas indicam septo e asterisco indicam parede celular. N- núcleo. Barra = **A**- 3,5 μm ; **B**- 1,5 μm e **C** – 0,35 μm .

4.3. O efeito do Al sobre a atividade glucanásica

Através da análise da atividade da enzima β -1,3-glucanase, verificamos que nas membranas totais isoladas de células de *S. pombe* que não foram cultivadas com Al, a atividade da enzima β -1,3-glucanase chegou a 2.140 μ g de açúcar hidrolisado por mg de proteína. Ao passo que nas membranas totais que sofreram tratamento prévio com 0,5 M de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ atingiram um valor máximo de atividade glucanásica de 1.343 μ g de açúcar/mg de proteína. O que resultou numa diferença de 37%, em torno de 9 horas de incubação. Demonstrando que em membranas de células isoladas de *S. pombe* submetidas ao tratamento com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, a enzima β -1,3-glucanase possui uma menor atividade, o que resulta numa menor eficiência na hidrólise dos componentes da parede celular (Figura 5).

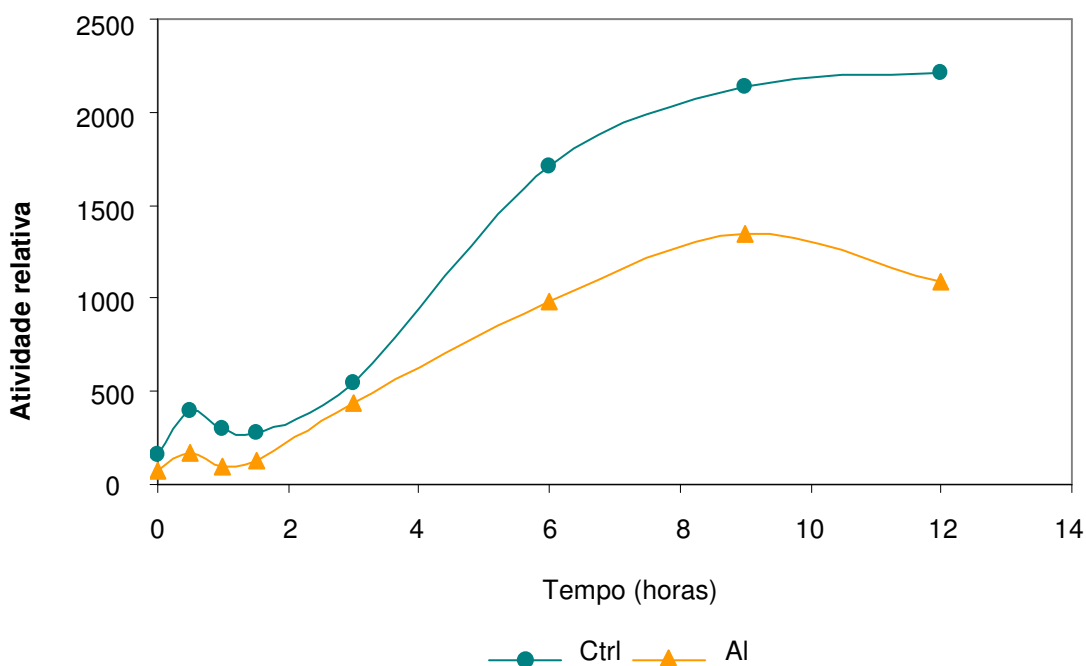


Figura 5. Atividade relativa da enzima β -1,3-glucanase em membranas totais de *S. pombe*, isoladas de células cultivadas com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, durante 12 horas.

4.4. O efeito do Al na resistência da parede celular à hidrólise enzimática

Para confirmar os dados obtidos nos experimentos anteriores que indicam mudanças na parede celular de células cultivadas com Al, determinamos a atividade da hidrólise enzimática da PC usando a enzima lítica de *Trichoderma*. Verificamos que após 45 minutos de ensaio enzimático a cultura sem Al atingiu aproximadamente 83% de decaimento, enquanto as células cultivadas com Al atingiram aproximadamente 63% de decaimento. Isso significa que 17% das células sem tratamento permaneceram intactas, enquanto 37% das células tratadas com $AlK(SO_4)_2$ foram resistentes à hidrólise enzimática (Figura 6).

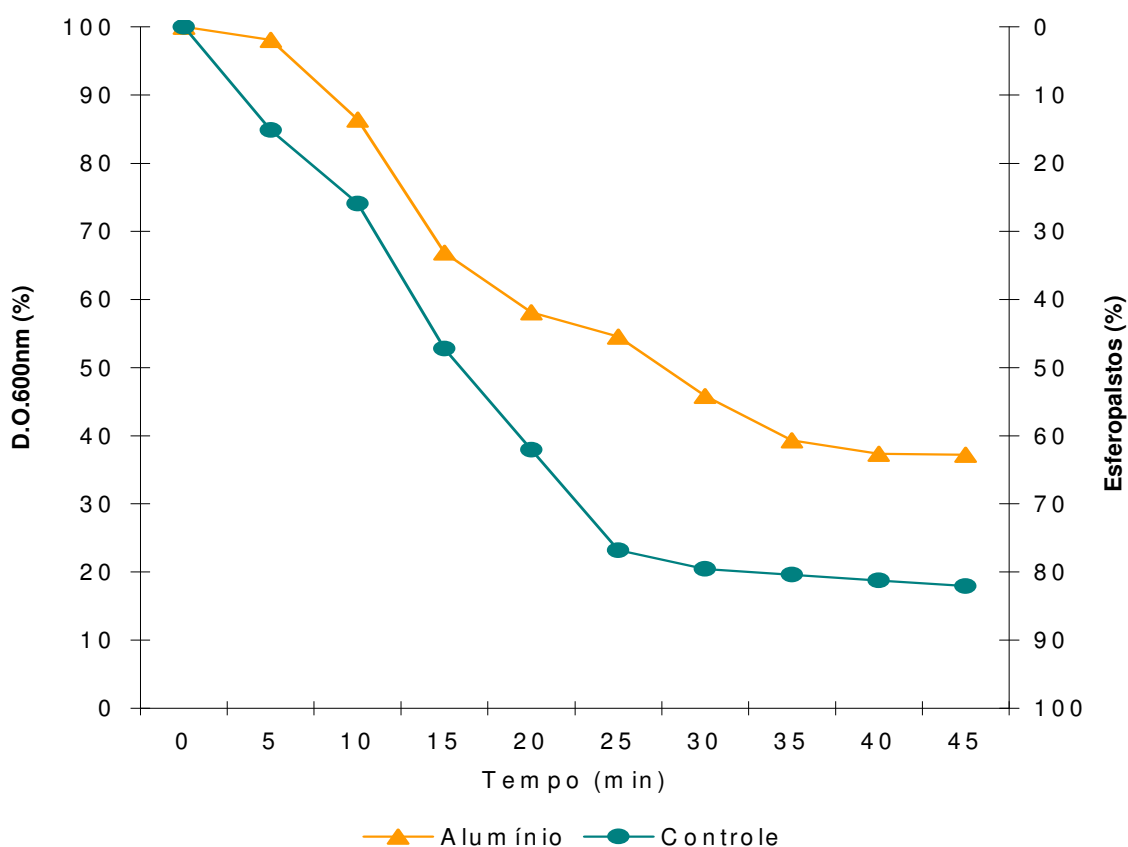


Figura 6. Curva de decaimento da densidade óptica durante a hidrólise enzimática da parede celular (PC) da levedura de fissão. Ctrl- células sem tratamento; Alumínio - células cultivadas em meio contendo 0,5 mM de $AlK(SO_4)_2$, por 18 horas.

4.5. O efeito do Al no crescimento e morfologia celular durante a regeneração da parede celular

Para verificar se o Al interfere na regeneração da PC, as células foram cultivadas ou não na presença de Al, e foram submetidas à hidrólise enzimática da PC para obtenção dos esferoplastos, que foram reinoculados em novos meios contendo ou não Al. Durante a regeneração da PC, monitoramos a densidade óptica das culturas e fizemos microscopia eletrônica de varredura das amostras coletadas nos tempos 0, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h e 24h. Verificamos que a cultura Ctrl/Ctrl apresentou o maior crescimento celular, atingindo DO_{600} 7,6 unidades/mL. A cultura Ctrl/Al, apresentou o segundo maior crescimento celular, atingindo DO_{600} 6,7 unidade/mL. O tratamento prévio com Al prejudicou o crescimento celular, que atingiu DO_{600} 1,6 unidades/mL. Contrastando com esses resultados, a cultura que foi previamente tratada e que permaneceu sob o estresse do Al, apresentou uma densidade óptica de 5,6 unidades/mL (Figura 7).

Em relação a morfologia celular durante a regeneração da parede celular pelos esferoplastos, verificamos que em 2 horas de cultivo, a cultura Ctrl/Ctrl regenerou a PC de, praticamente, todos os esferoplastos (Figura 8 -1B). Ao fim de 24 horas de cultivo, essas células apresentavam a forma cilíndrica típica da levedura de fissão. Além disso, havia muitas células comprovando que, além da regeneração normal dos esferoplastos, essas células foram capazes de promover satisfatoriamente a mitose durante o cultivo (Figura 8 -1C).

Na cultura Ctrl/Al, com apenas 1 hora de cultivo, observamos células morfologicamente aberrantes e com 2 horas de cultivo pudemos verificar que a PC dos esferoplastos havia se reconstituído, porém a superfície dessa PC não era a de uma levedura típica (cilíndrica e um padrão de crescimento uniforme) (Figura 8 - 2B).

Em relação aos esferoplastos que haviam sido tratados previamente com Al (Al/Ctrl), verificamos que ainda no tempo zero de cultivo, havia células que não sofreram hidrólise enzimática e apresentavam morfologia aberrante (Figura 8 - 3A). Ao fim de 24 de cultivo observamos que houve a regeneração da PC desses esferoplastos. Porém, além de ser uma regeneração de PC aberrante, essas células se apresentavam sob a forma de “agregados”

celulares (Figura 8 – 3C). Além disso, verificamos que o volume celular foi menor do que as culturas Ctrl/Ctrl, Ctrl/Al e Al/Al.

Os esferoplastos que haviam sido previamente tratados com Al e permaneceram no tratamento (Al/Al), tiveram uma fase de regeneração da PC mais lenta, em relação aos demais. Porém ao fim de 24 de cultivo, verificamos que houve um aumento da cultura, com a presença de células morfológicamente típicas e aberrantes (Figura 8 - 3D).

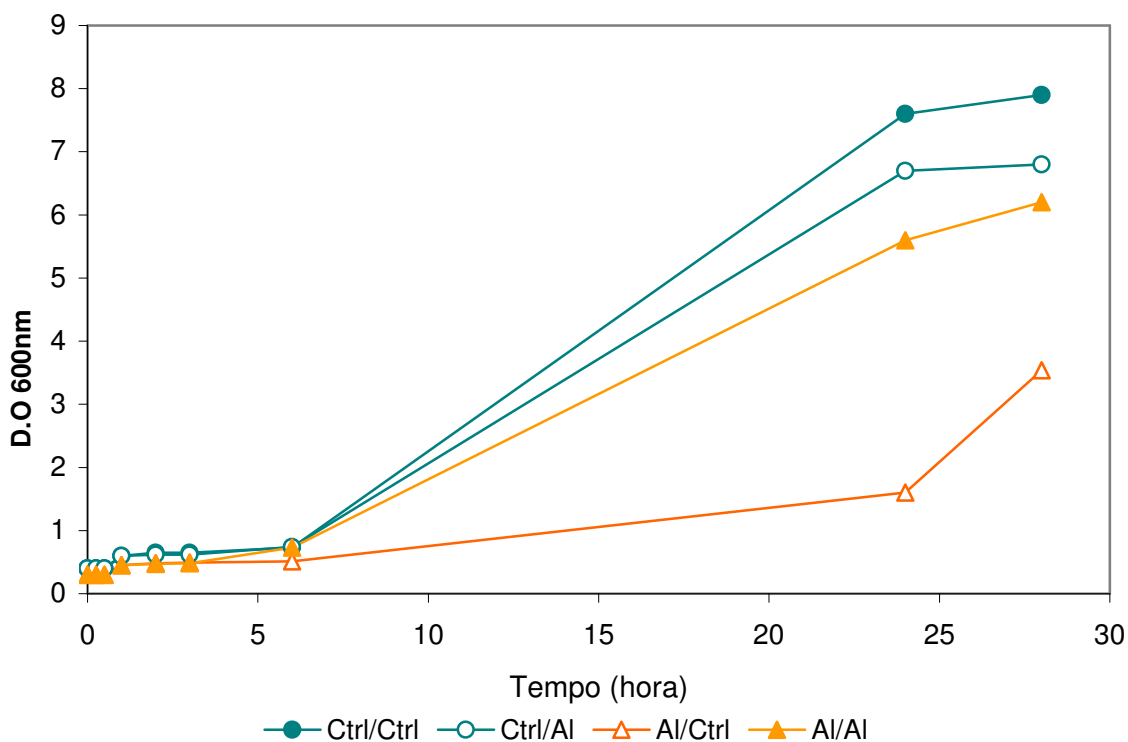
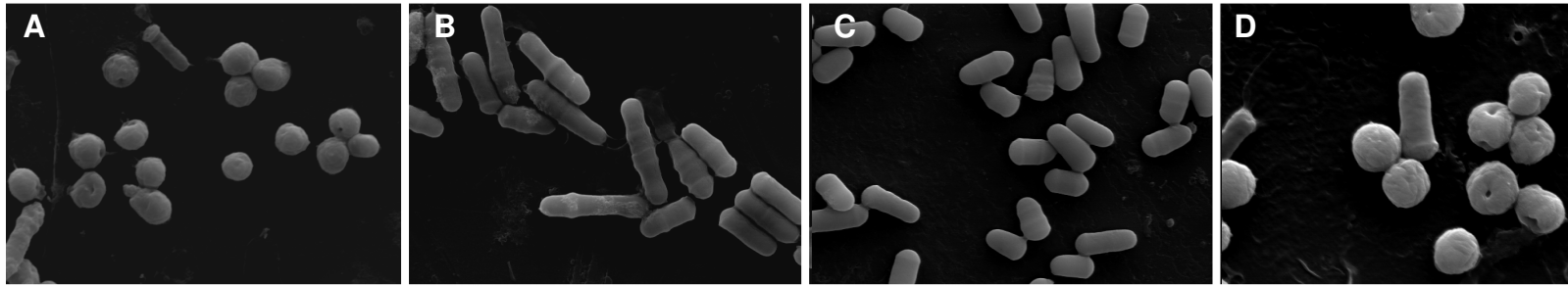


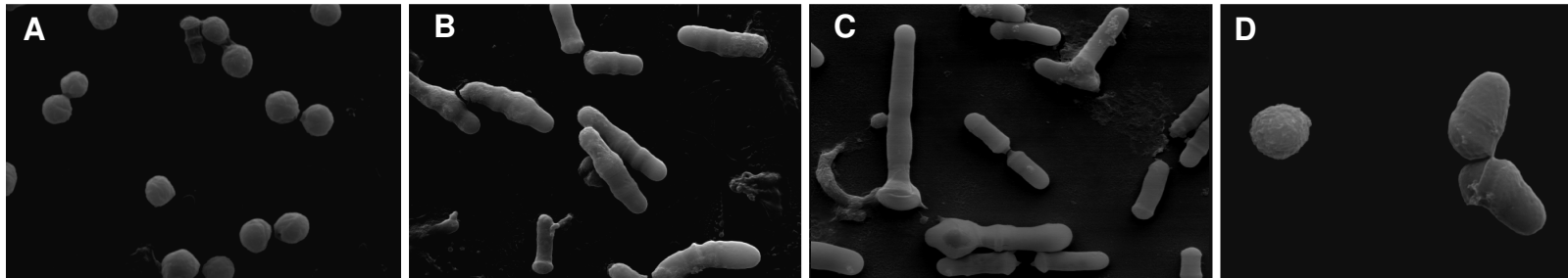
Figura 7. Curva do cultivo de esferoplastos/células durante a regeneração da PC na presença ou não de 0,5 mM $AlK(SO_4)_2$.

Ctrl/Ctrl- cultura cultivada em meio controle e reinoculada em meio controle; Ctrl/Al- cultura cultivada em meio controle e reinoculada em meio com Al; Al/Ctrl- Cultura cultivada em meio com Al e reinoculada em meio controle e Al/Al- cultura cultivada em meio com Al e reinoculada em meio com Al.

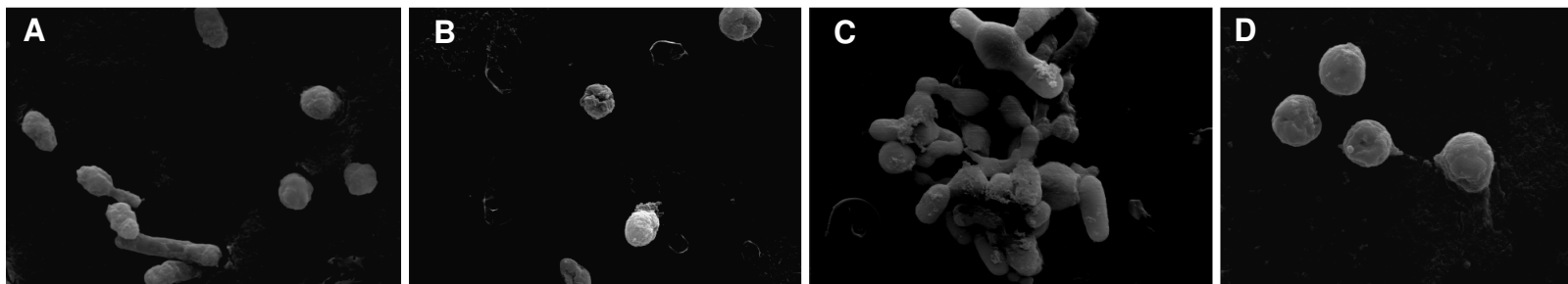
(1) Ctrl/Ctrl



(2) Ctrl/AI



(3) AI/Ctrl



(4) AI/AI

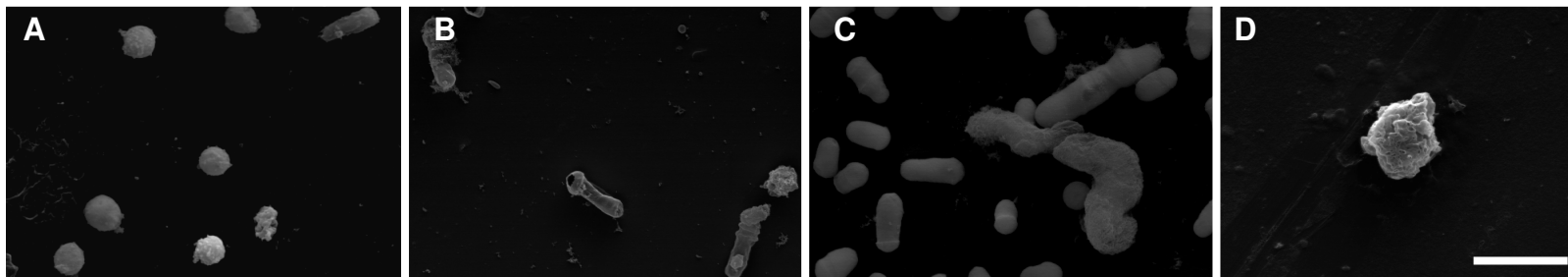


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da regeneração de esferoplastos de *S. pombe*. Ctrl/Ctrl- células e esferoplastos sem Al; Ctrl/Al – células sem Al e esferoplastos com Al; Al/Ctrl – células cultivadas com Al e esferoplastos sem tratamento; Al/Al – células e esferoplastos cultivados com Al. A – tempo 0; B- 2 horas de regeneração; C- 24 horas de regeneração e D – 30 minutos de regeneração. Barra = A,B e C- 2,5 μm ; D – 1,5 μm .

4.6. O efeito do Al sobre o transporte de H⁺

Para avaliar os efeitos do Al sobre a homeostase de H⁺, analisamos o transporte do próton ATP-dependente em membranas celulares isoladas de *S. pombe*. Analisando a fluorescência máxima obtida durante o transporte de H⁺ nas membranas totais de células tratadas e não tratadas com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂, observamos que o tratamento com Al, promoveu um aumento de 3,5 vezes no transporte de H⁺ pela P-ATPase, nessas membranas (Figura 9). Ao passo que, a fluorescência máxima atingida pelo transporte de H⁺ pela V-ATPase foi menor nas membranas totais isoladas de células tratadas com Al em torno de 2,5 vezes (Figura 10). Esses resultados indicam que o tratamento com Al afeta a homeostase de H⁺ das células, seja aumentando a atividade da P-ATPase e ainda, inibindo a atividade da V-ATPase (Tabela1).

Tabela 1. Valores indicativos da Fluorescência máxima (Fmax) encontrada nas ATPases P e V de membranas totais isoladas de células cultivadas (Al) e não cultivadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	Ctrl	Al	Ctrl	Al	Ctrl	Al
P-ATPase	11	37	10	37	11	39
V-ATPase	67	32	40	13	69	19

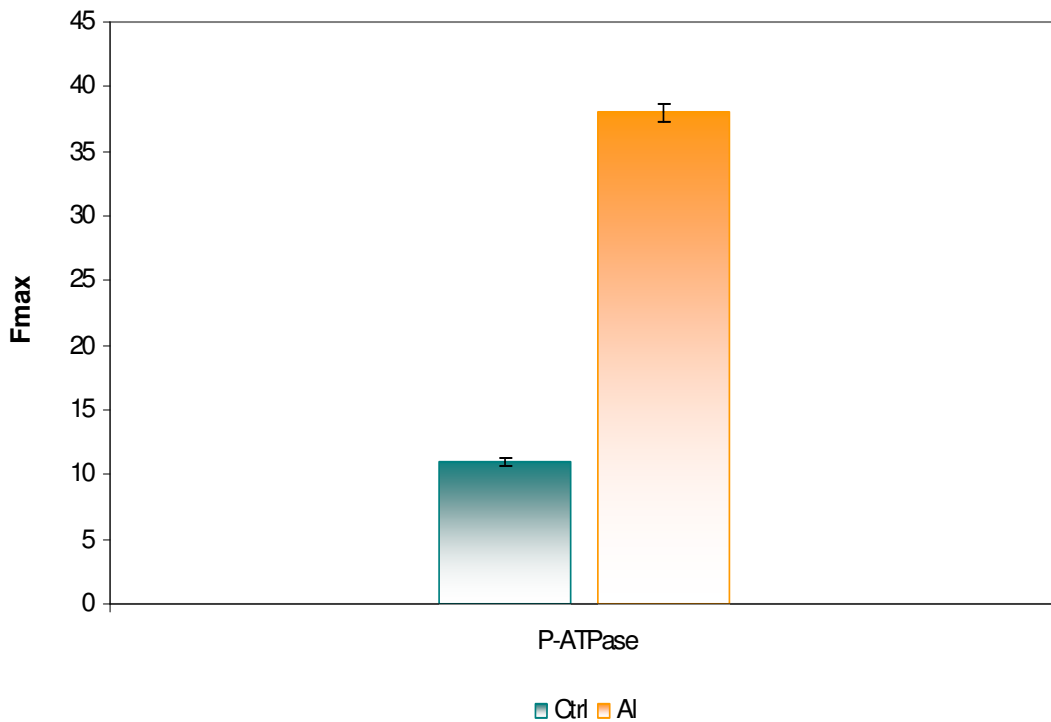


Figura 9. Média da Fluorescência máxima do transporte de H⁺ das P-ATPases de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂.

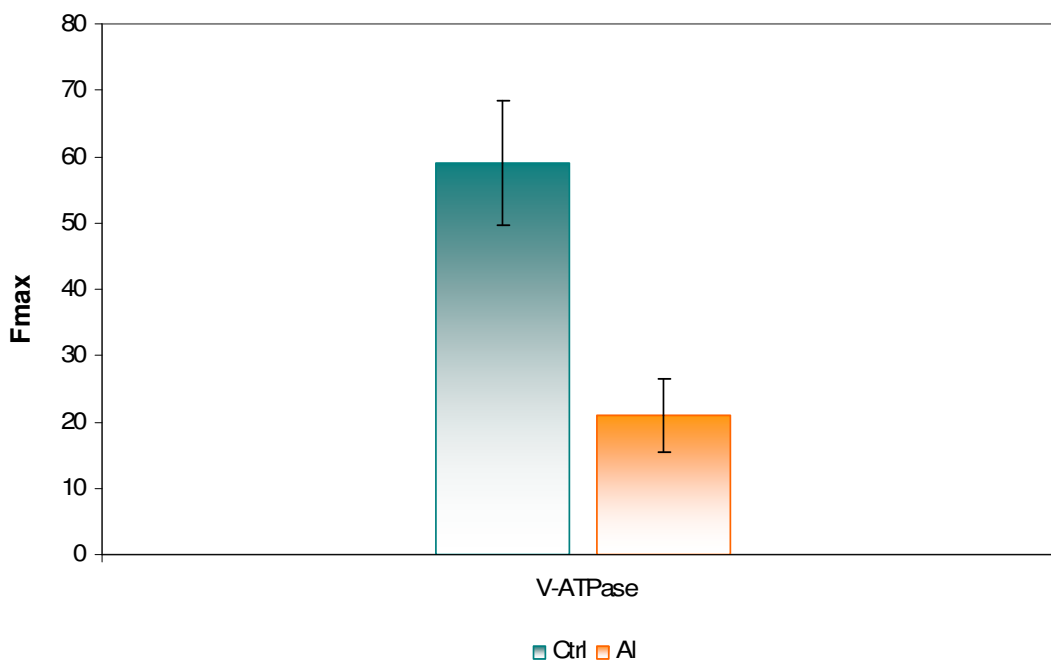


Figura 10. Média da fluorescência máxima do transporte de H⁺ das V-ATPases de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂.

Verificamos que a velocidade inicial do transporte de H⁺ da P-ATPase foi menor em membranas de células que haviam sido tratadas com Al, em torno de 1,2 vezes (Figura 11). Essa proporção se manteve em todos os experimentos realizados (tabela 2). Em relação a velocidade inicial do transporte de H⁺ pela V-ATPase, verificamos que o tratamento do Al nas células de *S. pombe*, propiciou a uma diminuição 1,2 vezes (Figura 12). Demonstrando que o tratamento com Al propiciou mudanças insignificativas na velocidade inicial do transporte de prótons pelas ATPases P e V, nas membranas totais de células de *S. pombe*, que foram tratadas previamente com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂ (Tabela2).

Tabela 2. Valores indicativos da Velocidade inicial (V₀) encontrada nas ATPases P e V de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	Ctrl	Al	Ctrl	Al	Ctrl	Al
P-ATPase	96	83	73	54	16	14
V-ATPase	43	41	26	21	69	62

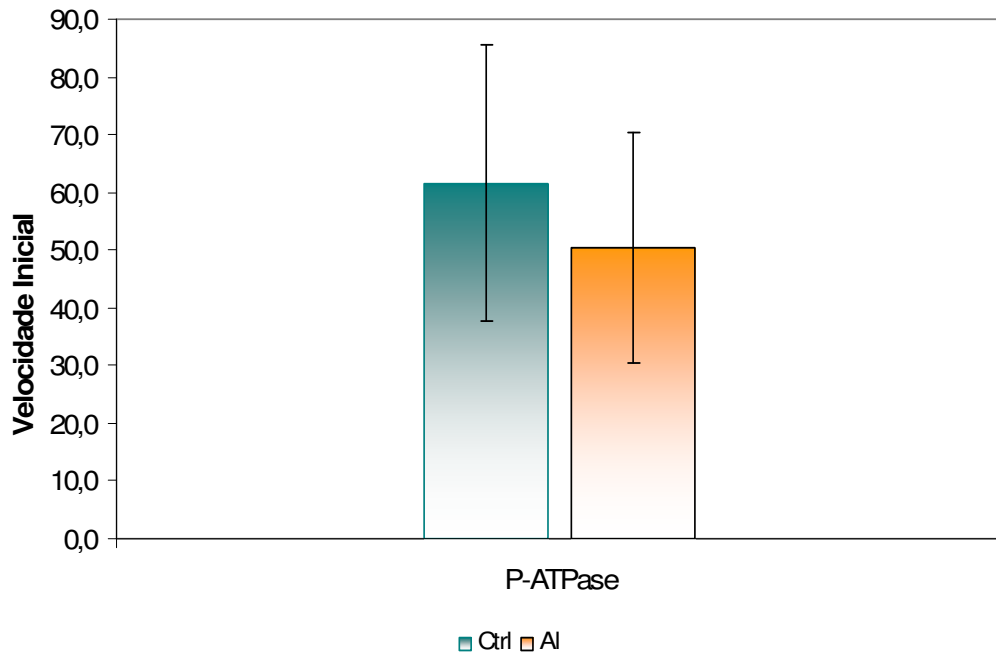


Figura 11. Média da velocidade inicial do transporte de H⁺ das P-ATPases de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂.

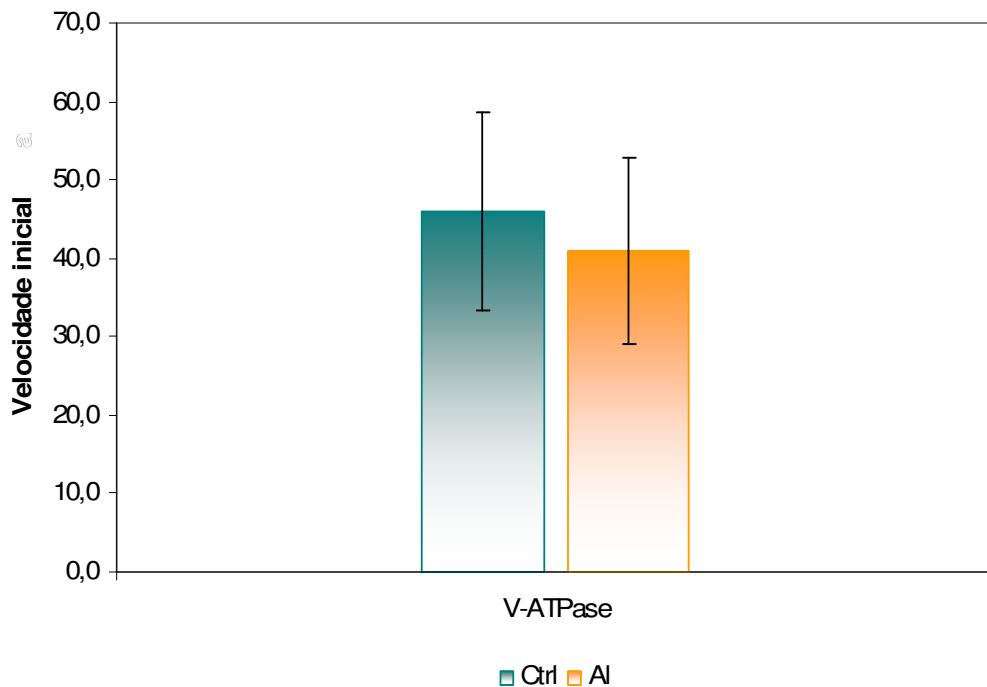


Figura 12. Média da velocidade inicial do transporte de H⁺ das V-ATPases de membranas totais isoladas de células tratadas (Al) e não tratadas (Ctrl) com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos o efeito do Al no transporte de H⁺, ultraestrutura da parede celular e seus componentes, incluindo o septo e também citocinese da célula da levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*. Nossos resultados mostraram que 0,5 mM de AlK(SO₄)₂ inibe o cultivo da levedura de fissão em aproximadamente 40% (Figuras 1 e 2). A inibição do crescimento também pode ser vista em sistemas vegetais onde esse metal inibe o desenvolvimento dos sistemas radiculares, ainda nas primeiras horas de exposição, porém com concentrações variadas de Al (Delhaize and Ryan, 1995; Horst, 1995; Kochian, 1995; Matsumoto, 2000, 2002; Frantzios *et al.*, 2000, 2001). Estudos mostraram que em *Arabidopsis* a concentração de 100 μM de Al, pode inibir o crescimento radicular em até 2,5 vezes (Sivaguru *et al.*, 2003), outros cultivares como o milho (Horst *et al.*, 1995), trigo (Cruz-Ortega *et al.*, 1997; Hamel *et al.*, 1998; Delhaize *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2001; Frantzios *et al.*, 2000, 2001), café (Martínez-Estévez *et al.*, 2003), tabaco (Ezaki *et al.*, 1995, 1996; Rama Devi *et al.*, 2003) e arroz (Milla *et al.*, 2002) também são alvos de estudos sobre os efeitos do Al no sistema radicular. Utilizando a levedura de brotamento, *Saccharomyces cerevisiae*, Ezaki e colaboradores (1999), verificaram que o Al a uma concentração de 0,2 mM inibe o cultivo dessa levedura em aproximadamente, 53%, em relação à cultura não tratada. Esses dados indicam que o Al de fato, é um limitador do crescimento e desenvolvimento de plantas e fungos. Interessantemente, em comparação com plantas e leveduras de brotamento, a levedura de fissão *S. pombe* apresenta uma maior tolerância aos efeitos tóxicos do Al. Em nossos estudos vimos que a concentração 0,5 mM não é uma concentração letal, apenas inibitória, para esse eucarioto inferior (Figura 1), ao passo que em sistemas vegetais essa concentração é de aproximadamente 0,1 mM. Esses dados indicam que apesar de sofrer alterações no cultivo, a levedura de fissão, de alguma forma, possui artifícios capazes de resistir ao estresse provocado pelo Al, quando comparada a outros objetos de estudo como as plantas.

A parede celular tem um importante papel na manutenção da integridade celular. É ela que determina a forma celular, promove proteção mecânica, e suporta a pressão osmótica interna da célula. A PC forma um exoesqueleto que não é estático, ao contrário, é uma estrutura altamente dinâmica, que permite as

mudanças morfológicas que ocorrem durante o ciclo de vida de *S. pombe*, como o crescimento monopolar e bipolar durante o crescimento vegetativo (Pérez & Ribas, 2004). O dinamismo da PC deve-se a diversas proteínas responsáveis pela manutenção de toda a estrutura necessária durante o ciclo celular, como por exemplo, a montagem e desmontagem do septo durante a divisão celular. Em trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório (Rangel, 2005) observamos através da Microscopia Eletrônica de Varredura que o AI altera a morfologia celular, propiciando o surgimento de células ramificadas, extremamente longas, que não possuem um crescimento uniforme, além de apresentarem alterações na superfície celular (Figura 13).

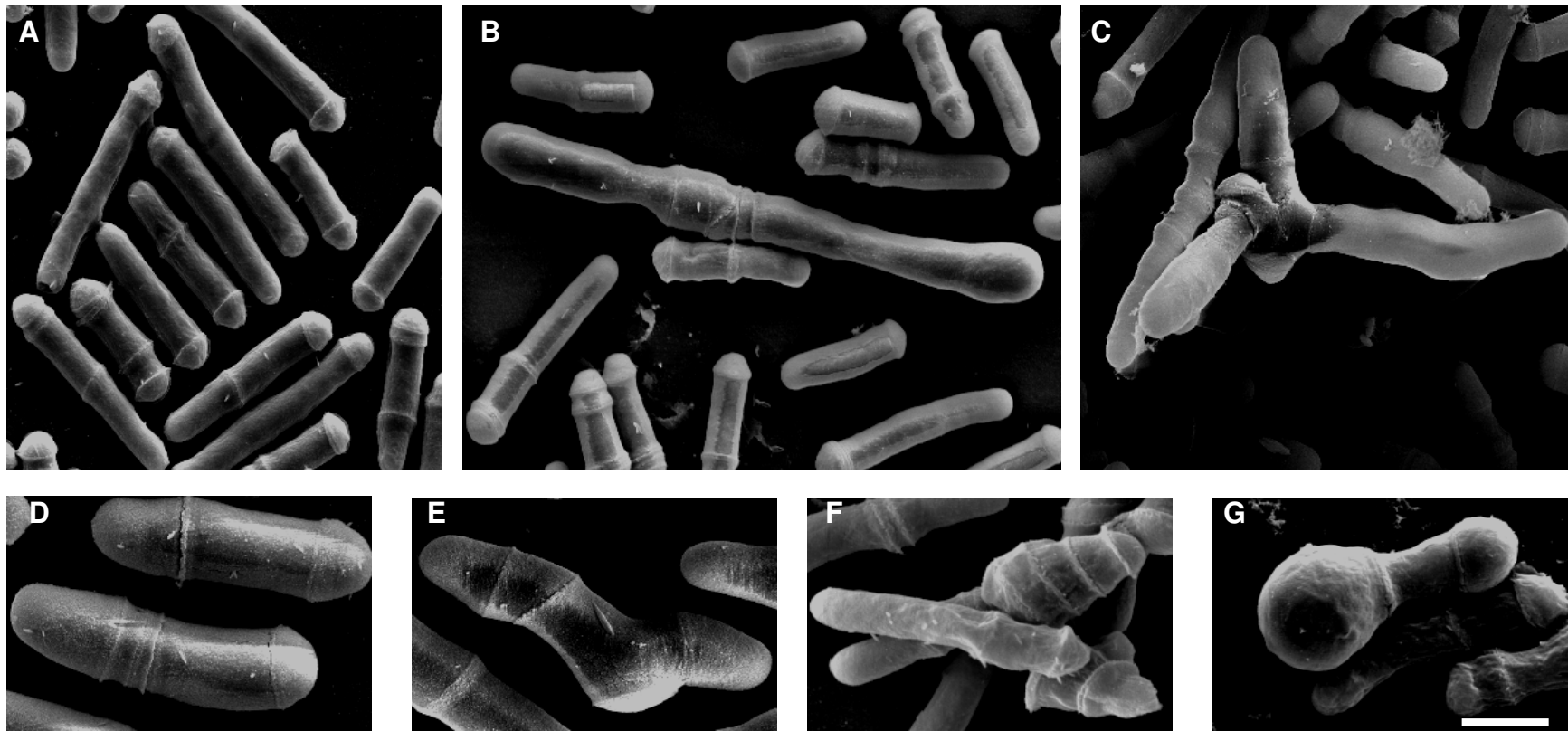


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura de células de *S. pombe* tratadas ou não com Al. A e D – células sem tratamento (Controle); B, C, E e F – células tratadas; A – C, barra= 1,5 μm ; D – G, barra 0,5 μm .

A partir desses dados, investigamos se existiam e quais eram as alterações ultraestruturais promovidas pelo Al na célula de *S. pombe*. Em estudos envolvendo a Microscopia Eletrônica de Transmissão, demonstramos que o tratamento com Al promove diversas alterações estruturais na célula como o surgimento de mais de um septo, deposição anormal do material que compõe a PC e o septo e ainda, ramificação e alongamento celular (Figura 4). No que diz respeito a PC, verificamos que essa estrutura, nas células tratadas com Al, apresenta-se com uma deposição anormal do seu material constituinte (Figura 4), o que a torna mais espessa. Além disso, vimos que o tratamento com Al promoveu a formação de mais de um septo e este, apresentava-se disforme e descentralizado, em relação ao eixo mediano da célula (Fig 4C). Estudos moleculares têm identificado vários genes cujos produtos são importantes em diferentes passos da citocinese, como para o posicionamento e montagem dos anéis de actomiosina, a localização de sítio de divisão, e para a montagem física e divisão do septo (Balasubramanian *et al.*, 1998, 2000; Chang & Nurse, 1996; Gould & Simanis, 1997; Le Goff *et al.*, 1999; McCollum & Gould, 2001; Simanis, 1995). Durante a anáfase, ocorre uma deposição linear do material da PC no plano mediano da célula, formando o septo primário seguido de uma deposição ao redor deste, formando o septo secundário. Alterações na expressão de genes e/ou funções de proteínas envolvidas na formação do septo, podem ocasionar problemas durante a septação (Verde *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2001; Osumi *et al.*, 1998, 1999; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Osumi e colaboradores (1999) fizeram um trabalho onde utilizando células de *S. pombe* mutantes de *cps8⁺* um gene codificante de um tipo de actina, verificaram os efeitos promovidos na ultraestrutura da célula mutante. Nesse trabalho foi visto que *cps8Δ* apresenta morfologia aberrante, como células ramificadas, problemas na divisão celular, espessamento de parede, alterações no posicionamento do septo e espessamento deste. Estudos feitos com *eng1⁺*, um importante gene que codifica uma β -1,3-glucanase, localizada na região do septo da levedura de fissão, mostraram que a ausência dessa proteína promove a formação de células com mais de um septo, isso se deve ao fato dessa proteína ser a responsável pela dissolução do septo primário (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Nossos resultados nos remetem aos mutantes de *cps8⁺* e *eng1⁺*, pois os fenótipos observados em células tratadas com Al são semelhantes aos mutantes de β -1,3-glucanase e actina (Fig. 14), pois aparentemente, o que

ocorre na presença do Al é uma incapacidade, por parte da levedura de fissão, de direcionar e ancorar corretamente todas as proteínas necessárias para a divisão celular e também de degradar o material da PC, tornando, praticamente, impossível a separação da célula em duas entidades independentes, promovendo assim, a formação de células com morfologia e ultraestrutura aberrantes. Sendo assim, nossos resultados sugerem que a atividade/ localização de *cps8p* e *eng1p* podem ser alvos da toxicidade do Al em células cultivadas de *S. pombe*.

Todas as funções de montagem e desmontagem são orquestradas por duas enzimas capazes de remodelar a PC propiciando seu dinamismo ao longo do ciclo celular, são a β -1,3-glucano-sintase e a β -1,3-glucanase, respectivamente. Essas enzimas são capazes de sintetizar e degradar o maior componente da PC de *S. pombe*, o β -1,3-glucano. Nossos resultados mostraram que o tratamento com Al promoveu um acúmulo dos materiais que compõem a PC, tornando-a espessa e disforme (Figura 4). Sendo a β -1,3-glucanase, responsável pela degradação da PC, e estando tipicamente localizada na membrana plasmática, fizemos a análise da atividade dessa enzima em membranas de células que haviam sido tratadas previamente com Al. Verificamos que o estresse pelo Al, diminui a atividade dessa enzima em cerca de 40% (Figura 5), sugerindo que *in vivo*, ocorre uma diminuição na degradação da PC em células tratadas, promovendo o surgimento de células com PC aberrante. Nossos dados indicam que o Al atua inibindo a atividade e/ou a expressão dessa proteína na célula, causando o espessamento da PC. A indução do acúmulo de PC verificado em nossos resultados, não é um evento único e exclusivo encontrado nas células da levedura de fissão quando em contato com o Al. Em plantas, diversos trabalhos reportam o acúmulo de materiais que compõem a PC como calose e lignina em sistemas radiculares promovidos pelo estresse por Al, que pode ser visto após 30 minutos de exposição ao íon (Horst *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1996; Vázquez *et al.*, 1999; Tabuchi & Matsumoto, 2001). Um desses trabalhos merece atenção especial, por se tratar de um belo estudo envolvendo a toxicidade do Al e a morfologia de sistemas radiculares. Nele, Sasaki e colaboradores (1996) descrevem que uma diminuição na viabilidade celular na zona de alongação da raiz de trigo foi observada após 3h de exposição a 5 μ M e 20 μ M de $AlCl_3$, e este evento coincide com o mesmo tempo requerido para a inibição da alongação da raiz, bem como, para a deposição de lignina, promovendo um

aumento no diâmetro dessa região. Esses dados corroboram com nossos estudos, onde verificamos que o tratamento com Al promove uma inibição da cultura (Figuras 1 e 2), trazendo como consequência para sua toxicidade, uma morfologia aberrante da PC e suas estruturas como septo, na levedura de fissão (Figura 4). Ao observarmos nossos dados obtidos através da MET, torna-se claro o acúmulo de PC nas células tratadas com Al, porém sabemos que a Microscopia é uma importante e poderosa ferramenta que pode apresentar muitos artefatos que muitas vezes podem ser facilmente confundidos com falsos resultados. Para sanar qualquer dúvida dessa natureza, fizemos ensaios bioquímicos que nos deram respostas mais precisas. Para verificar a resistência da PC de células tratadas com Al, utilizamos a enzima lítica de *Trichodermas*, capaz de hidrolisar a PC dessa levedura. Este ensaio mede indiretamente a hidrólise da PC, pois a queda da absorvância deve-se ao rompimento dos esferoplastos liberados após a dissolução da PC pela enzima lítica de *Trichodermas*. Verificamos que as células tratadas com Al foram 2 vezes mais resistentes à hidrólise enzimática (Figura 6). Visto que, durante a hidrólise ambas as culturas (cultivadas e não cultivadas com Al) foram incubadas com a mesma proporção de enzima por peso de células, nossos resultados indicam que a quantidade de PC a ser hidrolisada foi maior em células submetidas ao estresse pelo Al. Esses resultados reafirmam os obtidos através da MET, onde foi possível visualizar esse aumento expressivo da quantidade de PC depositada nas células tratadas com Al (Figura 4). Assim como qualquer outro organismo vivo, a levedura de fissão *S. pombe* se vale de mecanismos capazes de diminuir ou ainda aliviar os estresses ambientais, seja químico ou físico. Nesse caso, um metal reconhecidamente fito e neurotóxico como o Al, foi capaz de provocar respostas físicas nessa levedura como o espessamento da parede celular talvez na tentativa de aumentar a barreira física contra a entrada desse íon na célula. Em plantas, alguns trabalhos foram feitos na tentativa de detectar a distribuição do Al na célula utilizando cromóforos (Aniol, 1984; Denton *et al.*, 1984). Taylor e colaboradores (2000), utilizando $50 \mu\text{M } ^{26}\text{Al}$, demonstraram que este íon forma ligações na parede celular de *Chara corallina*. Neste trabalho, foi visto que a PC funciona como uma barreira física contra a entrada do Al, ainda nos primeiros 30 minutos de exposição, pois este forma ligações com os peptídeos, constituintes da PC. Relacionando esses dados com os nossos resultados e ainda, com os trabalhos que tratam sobre o aumento do diâmetro da PC de raízes na presença do

Al, vale sugerir que o espessamento da PC encontrado em nossa levedura, não seja apenas um efeito causado pela toxicidade do Al, mas poderia ser um efeito promovido pela maquinaria de defesa desse microrganismo.

Até o dado momento, vimos que a levedura de fissão na presença do Al reduziu seu crescimento, alterou sua morfologia, ultraestrutura da PC e ainda diminuiu a sua capacidade de degradar o principal constituinte da PC, β -1,3-glucano. A partir desses resultados, passamos a indagar a seguinte questão: Se o estresse por Al promove tantas alterações na PC dessa levedura, aparentemente, provocados pela incapacidade por parte da levedura de fissão de degradar o material que se torna excedente ao longo do ciclo celular, seria então possível que esta levedura fosse capaz de regenerar sua PC uma vez que a célula foi exposta ao Al? Essa questão foi respondida ao verificarmos a capacidade de regeneração da PC nessa levedura utilizando como ferramenta a MEV. Nesse experimento, cultivamos células de *S. pombe* com 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, por 18 h e após esse período, fizemos a hidrólise enzimática da PC, onde obtivemos os esferoplastos. Esses esferoplastos foram reinoculados em novos meios de cultura contendo ou não Al. Sendo assim, tivemos 4 versões: duas culturas controle reinoculadas em meio controle e contendo Al e duas culturas tratadas com Al, reinoculadas em novos meios controle e contendo Al.

Nossos resultados mostraram que o tratamento prévio com Al, interferiu na síntese de nova PC, em relação ao controle (Figura 8 – 3C e 1C), sugerindo que o Al altera também a maquinaria de síntese da PC. Um estudo desenvolvido com diferentes mutantes de *S. cerevisiae* na presença do Al (Kakimoto *et al.*, 2006), corrobora com nossa sugestão. Nesse trabalho foi visto que a presença de concentrações variadas de AlCl_3 (200 μM , 400 μM e 600 μM) em culturas de mutantes de genes envolvidos na glicosilação de proteínas é letal. Indicando que o correto endereçamento de proteínas para a PC é um ponto importante na tolerância ao estresse pelo Al. Observando os esferoplastos tratados com Al e que permaneceram em novo meio também contendo Al durante a regeneração da PC verificamos que estes apresentaram uma maior densidade celular do que os esferoplastos que foram retirados do estresse (Figura 8 – 4C e 3C). Ao observarmos a morfologia dos esferoplastos durante a regeneração celular, verificamos que o tratamento com Al dificultou a regeneração da PC (Figura 8 – 2B, 3B e 4B). Além de proporcionar a montagem deturpada da PC, o tratamento com Al

promoveu a formação de agregados celulares (Figura 8 – 3C). A formação de agregados celulares de leveduras é um indicativo clássico de problemas na PC (Snoek & Steensma, 2007). Esses resultados indicam que o tratamento com Al dificulta a síntese da PC, porém de alguma forma a levedura adapta toda sua fisiologia para viver sob essas condições de tal maneira que ao ser retirada das condições de estresse, toda sua maquinaria para síntese da PC fica comprometida. Osumi e colaboradores (1998) demonstraram a regeneração da PC de mutantes de actina (*cps8p*). Nesse trabalho eles mostraram que os esferoplastos desse mutante possuem uma incapacidade de regenerar sua PC corretamente, demonstrando claramente, o papel do citoesqueleto de actina nesse processo. Nossos resultados sugerem, que o estresse por Al pode afetar de modo quase irreversível a expressão de genes ou ainda a função de algumas proteínas envolvidas na montagem e manutenção da PC e septo.

O pH extracelular é um importante fator que determina a toxicidade do Al, por favorecer a solubilidade desse íon. Blamey e colaboradores (1983), mostraram que um aumento no pH numa solução de nutrientes de 4,5 para 4,6 promove um declínio de 20% na concentração de Al livre no meio. Conseqüentemente, a menor mudança do pH do meio pode afetar a toxicidade do Al. Existem muitos estudos investigando a relação entre o pH na solução e a toxicidade e/ou resistência do Al (Kinraide *et al.*, 1992, 1998; Façanha & Okorokova-Façanha, 2002; Shen *et al.*, 2005). Degenhardt e colaboradores (1998), utilizando um microeletrodo próximo a raiz de *Arabidopsis* Al-tolerante verificou que na presença do Al ocorre um influxo de H⁺ resultando num aumento do pH da rizosfera e na ausência desse metal não há alterações no pH do meio. A efluxo de H⁺ é uma função crítica da membrana que contribui para o controle do pH intracelular e para força próton-motriz essencial para o transporte de solutos (Spanswick, 1984). O pH do meio externo das raízes de trigo foi analisado por Kinraide e colaboradores (1998) que verificaram na presença de 50 μ M de AlCl₃ ocorre a extrusão de prótons e conseqüentemente uma diminuição do pH do meio. A manutenção dos níveis de H⁺, tanto interno quanto externo é mantida pela ação coordenada de H⁺-ATPases do tipo P e V. Para verificar o papel dessas ATPases em células cultivadas com Al, fizemos o isolamento das membranas de células da levedura de fissão e analisamos o transporte de H⁺ ATP-dependente. Demostramos que em membranas de células

cultivadas com Al a Fluorescência máxima (F_{max}) obtida pelo transporte de H^+ foi 3,5 vezes maior do que as P-ATPases de células controle (Figura 9). Indicando que o estresse por Al estimula a saída de H^+ da célula, conseqüentemente, alterando o gradiente eletroquímico e diminuindo o pH do meio externo. Em contrapartida, o transporte de H^+ mediado pela V-ATPase de células tratadas com Al foi menor, aproximadamente 2,5 vezes (Figura 10). Demonstrando que o seqüestro de H^+ para o lúmen do vacúolo torna-se deficitário na presença do metal. Uma possibilidade para justificar esses eventos é a tendência natural da célula de encontrar o equilíbrio. Pois se o H^+ presente no citosol está sendo mais eficientemente transportado para o exterior da célula, existe uma tendência natural da outra bomba de H^+ diminuir sua atividade, numa ação coordenada para que não haja prejuízo na homeostase de H^+ no citoplasma. Corroborando com nossos resultados, Hamilton e colaboradores (2001), sugerem um modelo de comportamento das ATPases da levedura de brotamento *S. cerevisiae*, no qual a atividade do transporte de H^+ da P-ATPase é estimulada pelo Al e a da V-ATPase é inibida. Nossos dados também estão de acordo com Façanha & Okorokova-Façanha (2002), que demonstraram pela primeira vez, que em raízes de milho que o transporte da H^+ -ATPase de membrana plasmática é aumentado na presença do Al em concentrações abaixo de 0,3 mM, além disso, foi visto que o tratamento com 100 μ M de Al foi capaz de promover um estímulo no crescimento da raiz. Apesar o Al ser um elemento reconhecidamente tóxico, alguns trabalhos reportam que em baixas concentrações o Al pode estimular o crescimento radicular (Foy et al., 1978; Kinraide, 1992; Clune & Copeland, 1999; Façanha & Okorokova-Façanha, 2002). Em raízes de milho, foi proposto que o efluxo de H^+ pode induzir a plasticidade da parede celular, de acordo com a “teoria do crescimento ácido” (Hager et al., 1991; Frias et al., 1996). Essa teoria propõe um mecanismo pelo qual ocorre o crescimento celular promovido por uma diminuição do pH na região do apoplasto, resultado de uma extrusão de H^+ (Hager et al., 1991; Rayle & Cleland, 1992; Façanha & Okorokova-Façanha, 2002). A “teoria do crescimento ácido” descreve que a diminuição do pH promovido pela extrusão de H^+ induz o afrouxamento da PC, provavelmente motivado por proteínas capazes de quebrar as pontes de hidrogênio presentes na estrutura da PC (Fry et al., 1992; Shcherban et al., 1995), embora os detalhes desse mecanismo não sejam bem elucidados. Shimoda e Yanagishima (1971) utilizando *S. cerevisiae* como modelo, verificaram que existe

uma correlação entre o aumento da expansão celular com a diminuição da atividade da enzima β -1,3-glucanase. Em nosso estudo sobre o efeito promovido pelo Al na ultraestrutura da PC da levedura de fissão, observamos que o cultivo com Al estimulou o alongamento das células, quando comparada com células controle (Figuras 3 e 4) e além disso, houve um estímulo no efluxo de H^+ por essas células tratadas (Figura 9).

Nossos resultados fornecem um novo conjunto de dados sobre os efeitos promovidos pelo Al à célula. Trata-se do primeiro estudo demonstrando que o Al afeta parede celular e septo da levedura, citocinese e, além disso, induz a extrusão de H^+ . Nosso trabalho está de acordo com os trabalhos envolvendo o Al em sistemas vegetais, onde demonstra possíveis proteínas envolvidas na montagem/manutenção da estrutura celular e também envolvidas na homeostase de íons como o H^+ , como um dos alvos de ação do Al. Entretanto, os estudos sobre a toxicidade do Al em plantas apresentam certas limitações como, desigualdade de respostas observadas conforme a localização/disposição das células num tecido. Isso porque as células da extremidade radicular são expostas diretamente ao Al; as células localizadas ao longo da raiz, ou ainda as células foliculares são atingidas indiretamente. Assim, o uso da levedura, um organismo unicelular, no estudo dos efeitos tóxicos do Al, nos parece ser bastante promissor. Uma das atrações do uso da levedura como modelo é a existência de mutantes deficientes de cada gene, o que possibilita a análise imediata da sensibilidade ao Al nos mutantes de genes identificados como prováveis alvos moleculares desse metal.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- O Al inibe o cultivo de *S. pombe*;
- Células cultivadas com Al apresentam problemas na estrutura/manutenção da parede celular e septo;
- Al inibe a citocinese afetando a divisão celular;
- As células tratadas com Al são mais resistentes à hidrólise enzimática da PC;
- O tratamento com Al prejudica a regeneração da parede celular de esferoplastos de *S.pombe*;
- O tratamento com Al afeta o transporte de H^+ ATP-dependente, estimulando a P-ATPase e inibindo a V-ATPase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn SJ, Sivaguru M, Chung GC, Rengel Z, Matsumoto H (2002) *Aluminum-Induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (Cucurbita pepo)* **J Experimental Botany** 53: 1959-1966
- Ahn SJ, Sivaguru M, Osawa H, Chung GC, Matsumoto H (2001) *Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots.* **Plant Physiol** 126: 1381-1390
- Alfrey AC, LeGendre GR, Kaehny WD (1976) *The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication.* **New Engl J Med** 294: 184- 188
- Aniol A (1984) *Induction of Aluminum Tolerance in Wheat Seedlings by Low Doses of Aluminum in the Nutrient Solution.* **Plant Physiol** 76(3):551-555
- Anoop VM, Basu U, McCammon, McAlister-Henn L, Taylor GJ (2003) *Modulation of Citrate Metabolism Alters Aluminum Tolerance in Yeast and Transgenic Canola Overexpressing a Mitochondrial Citrate Sintase.* **Plant Physiol** 132: 2205-2217
- Arellano M, Cartagena-Lirola H, Nasser Hajibagheri MA, Duran A, Henar Valdivieso M (2000) *Proper ascospore maturation requires the chs1+ chitin synthase gene in Schizosaccharomyces pombe.* **Mol Microbiol** 35(1):79-89
- Aremu DA, Meshitsuka S (2006) *Some aspects of astroglial functions and aluminum implications for neurodegeneration.* **Brain Res Rev** 52 (1): 193-200
- Balasubramanian MK, McCollum D, Chang L, Wong KC, Naqvi NI, He X, Sazer S, Gould KL (1998) *Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants.* **Genetics** 149(3):1265-75
- Balasubramanian MK, McCollum D, Surana U (2000) *Tying the knot: linking cytokinesis to the nuclear cycle.* **J Cell Sci** 113 (Pt 9):1503-13
- Beal MF, Hyman B, Koroshetz W (1993) *Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?* **Trends Neurosci** 16 :125
- Bennet RJ, Breen CM (1991a) *The recovery of the roots of Zea mays L. from various aluminum treatments: towards elucidating the regulatory processes that underlie root growth control.* **Environ Exp Bot** 157: 447–451
- Bielarczyk H, Tomaszewicz M, Szutowicz A (1998) *Effects of aluminum and calcium on acetyl-CoA metabolism in rat brain mitochondria.* **J Neurochem** 71(6):2447-53
- Blamey FPC, Edwards DG, Asher CJ (1983) *Effects of aluminium, OH:Al and P:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture.* **Soil Sci** 136: 197-207

- Blancaflor EB, Jones DL, Gilroy S (1998) *Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize.* **Plant Physiol** 118: 159-172
- Bolan NS, Hedley MJ (2003) *Role of carbon, nitrogen and sulfur cycles in soil acidification.* In: Rengel Z, ed. **Handbook of soil acidity.** NY, USA: Marcel Dekker 29-56
- Bolan NS, Hedley MJ, White RE (1991) *Process of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pasture.* **Plant and Soil** 134: 53-63
- Bonhaus DW, McCormack KM, Mayor GH, Mattson JC, Hook JB (1980) *The effects of aluminum on microtubular integrity using in vitro and in vivo models.* **Toxicol Lett** 6(3):141-7
- Bowman BJ, Bowman EJ (1986) *H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells.* **J Memb Biol** 94: 83-97
- Burhans WC, Weinberger M, Marchetti MA, Ramachandran L, D'Urso G, Huberman JA (2003) *Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects.* **Mutation Research** 532: 227-243
- Bush DA, Horisberger M, Horman I, Wursch P (1974) *The wall structure of Schizosaccharomyces pombe.* **J Gen Microbiol.** 81(1):199-206
- Cakmak I, Horst WJ (1991) *Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (Glycine max).* **Physiol Plant** 83: 463-468
- Chang F (1999) *Movement of a cytokinesis factor cdc12p to the site of cell division.* **Curr Biol** 12;9(15):849-52
- Chang F (2001) *Studies in Fission Yeast on Mechanisms of Cell division Site Placement.* **Cell Structure and Function** 26: 539-544
- Chang F, Nurse P (1996) *How fission yeast in the middle?* **Cell** 84(2):191-194
- Clemens S, Bloss T, Vess C (2002) *A transporter in the endoplasmic reticulum of Schizosaccharomyces pombe cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance.* **J Biol Chem** 277: 18215-18221
- Colomina MT, Roig JL, Sánchez DJ, Domingo JL (2002) *Influence of Age on Aluminum-Induced Neurobehavioral Effects and Morphological Changes in Rat Brain.* **Neurotoxicology** 23: 775-781
- Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C (1992) *COT1, a gene involved in cobalt accumulation in Saccharomyces cerevisiae.* **Mol Cell Biol** 12(9):3678-88

Cortes JC, Konomi M, Martins IM, Munoz J, Moreno MB, Osumi M, Duran A, Ribas JC (2007) *The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation.* **Mol Microbiol** 65(1):201-17

Cosgrove DJ (1997) *Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement.* **Plant Cell** 9(7):1031-41

Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ (1973) *Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration.* **Science** 4;180(85):511-3

Cruz-Ortega R, Cushman JC, Ownby JD (1997) *cDNA clones encoding 1,3-beta-glucanase and a fibrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots.* **Plant Physiol** 114: 1453-1460

De la Fuente JM, Ramirez-Rodriguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (1997) *Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis.* **Science** 276(5318): 1566-1568

Degenhardt J, Larsen PB, Howell Sh, Kochian LV (1998) *Aluminum resistance in the Arabidopsis mutante alr-104 is caused by na aluminum-induced increase in rhizosphere pH.* **Plant Physiol** 117(1): 19-27

Deleers M, Servais JP, Wulfert E (1986) *Neurotoxic cations induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations.* **Biochim Biophys Acta** 27;855(2):271-6

Delhaize E, Hebb DM, Richards KD, Lin JM, Ryan PR, Gardner RC (1999) *Cloning and expression of a wheat (Triticum aestivum L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids.* **J Biol Chem** 274: 7082-7088

Delhaize E, Ryan PR (1995) *Aluminum toxicity and tolerance in plants.* **Plant Physiol** 107: 315-321

Denton J, Freemont AJ, Ball J (1984) *Detection and distribution of aluminium in bone.* **J Clin Pathol** 37(2):136-42

Devi SR, Yamamoto Y, Matsumoto H (2003) *An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells.* **J Inorg Biochem** 15;97(1):59-68

Diaz-Nido J, Avila J. (1990) *Aluminum induces the in vitro aggregation of bovine brain cytoskeletal proteins.* **Neurosci Lett** 110(1-2):221-226

Ding B, Haudenschild JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN, Lucas WJ (1992) *Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants.* **Plant Cell** 4(8):915-28

- Disterthoff JF, Gispen WH, Traber J, Khachaturian ZS (1994) *Calcium Hypothesis of Aging and Dementia*. **Ann NY Acad Sci** 747: 482
- Dufour JP, Goffeau A (1978) *Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast Schizosaccharomyces pombe* **JBC** 253(19): 7026-32
- Exley C (1999) *A molecular mechanisms of aluminum-induced Alzheimer's disease?* **J Inorg Bioch** 76: 133-140
- Ezaki B, Sivaguru M, Ezaki Y, Matsumoto H, Gardner RC (1999) *Acquisition of aluminum tolerance in Saccharomyces cerevisiae by expression of the BCB or NtGDI1 gene derived from plants*. **FEMS Microbiol Letter** 171: 81-87
- Ezaki B, Tsugita S, Matsumoto H (1996) *Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: Possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress*. **Physiol Plant** 96: 21-28
- Ezaki B, Yamamoto Y, Matsumoto H (1995) *Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and Pi starvation in tobacco cultured cells*. **Physiol Plant** 93: 11-18
- Façanha AR, Okorokova – Façanha AL (2002) *Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminum-fluoride complexes*. **Plant Physiol** 129(4):1763-72
- Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao TH, Gilroy S (2001) *Changes in root cap pH are required for the gravity response of the Arabidopsis root*. **Plant Cell** 13(4):907-21
- Fogel S, Welch JW (1982) *Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast*. **Proc Natl Acad Sci USA** 79(17):5342-6
- Foy CD, Chaney RL, White MC (1978) *The physiology of metal toxicity in plants*. **Annu Rev Plant Physiol** 29: 511-56
- Frantzios G, Galatis B, Apostolakos P (2000) *Aluminum effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of Triticum turgidum. I. Mitotic cells*. **New Phytol** 145: 211-224
- Frantzios G, Galatis B, Apostolakos P (2001) *Aluminum effects on Microtubule Organization in Dividing Root-Tip Cells of Triticum turgidum*. **J Plant Res** 114: 157-170
- Frias I, Caldeira MT, Perez Castineira JR, Navarro Avino JP, Cullanez Macia FA, Kuppinger O, Stransky H, Pages M, Hager A, Serrano R (1996) *A major isoform of the maize plasma membrane H₊-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles*. **Plant Cell** 8:1533–1544

- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ (1992) *Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants*. **Biochem. J** 282,821-828
- Gandolfi L, Stella MP, Zambenedetti P, Zatta P (1998) *Aluminum alters intracellular calcium homeostasis in vitro*. **Biochim Biophys Acta** 1406(3):315-20
- Goffeau A *et al* (1996) *Life with 6000 genes*. **Science** 274: 546, 563-567
- Gould KL, Simanis V (1997) *The control of septum formation in fission yeast*. **Genes Dev** 15;11(22):2939-51
- Guo GW, Liang YX (2001) *Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis*. **Brain Res** 12;888(2):221-226
- Guo Q, Fu VW, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP (1999) *Pathophysiology of mitochondrial cell death control* **Nature Med** 5: 101
- Gutteridge JMC, Quinlan GJ, Clark I, Halliwell B (1985) *Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts*. **Biochim Biophys Acta** 835: 441-447
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R (1991) *Auxin-induced exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasmamembrane H⁺-ATPase*. **Planta** 185: 527–537
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R (1991) *Auxin-induced exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasmamembrane H⁺-ATPase*. **Planta** 185: 527–537
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. **2nd Edition, Clarendon Press, Oxford**
- Hamel F, Breton C, Houde M (1998) *Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor*. **Planta** 205: 531-538
- Hamilton CA, Good AG, Taylor GJ (2001) *Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in the aluminum-resistant cultivar of wheat*. **Plant Physiol** 125: 2068-2077
- Harris WR, Berthon G, Day JP, Exley C, Flaten TP, Forbes WF, Kiss T, Orvig C, Zatta PF. (1996) *Speciation of aluminum in biological systems*. 48(6): 543-68
- Hasselbach W, Makinose M (1961) *The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting*. **Biochem Z** 333:518
- Hoekenga OA, Maron LG, Pineros MA, Cancado GM, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian

LV (2006) *AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis.* **Proc Natl Acad Sci USA** 20;103(25):9738-43

Horst WJ (1995) *The role of the apoplast in aluminium toxicity and distance of higher plants: A review.* **Z Pflanzenernähr Bodenk** 158: 419-428

Horst WJ, Puschel AK, Schmohl N (1997) *Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminum sensitivity in maize.* **Plant and Soil** 192: 23-30

Humbel BM, Konomi M, Takagi T, Kamasawa N, Ishijima SA, Osumi M (2001) *In situ localization of beta-glucans in the cell wall of Schizosaccharomyces pombe.* **Yeast** 18(5):433-44

Klatzo I, Wisniewski H, Streicher E (1965) *Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration.* **J Neuropathol Exp Neurol** 24: 187–199

Ikeda H, Tadano T (1993) *Ultrastructural changes of the root tip cells in barley induced by a comparatively low concentration of aluminum.* **Soil Sci Plant Nutr** 39: 109-117

Ishijima SA, Konomi M, Takagi T, Sato M, Ishiguro J, Osumi M (1999) *Ultrastructure of cell wall of the cps8 actin mutant cell in Schizosaccharomyces pombe.* **FEMS Microbiol Lett** 180(1):31-7

Ishtar Snoek IS, Yde Steensma H (2007) *Factors involved in anaerobic growth of Saccharomyces cerevisiae.* **Yeast.** 24(1):1-10

Jones DL, Gilroy S, Larsen PB, Howell SH, Kochian LV (1998) *Effects of aluminum on cytoplasmic Ca²⁺ homeostasis in root hairs of Arabidopsis thaliana (L.)* **Planta** 206: 378-387

Jones DL, Kochian LV (1995) *Aluminum Inhibition of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Signal Transduction Pathway in Wheat Roots: A Role in Aluminum Toxicity?* **Plant Cell** 7(11):1913-1922

Jones DL, Kochian LV (1997) *Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity.* **FEBS Lett** 400: 51-57

Kakimoto M, Kobayashi A, Fukuda R, Ono Y, Ohta A, Yoshimura E (2005) *Genome-wide screening of aluminum tolerance in Saccharomyces cerevisiae.* **Biometals** 18(5):467-74. **Erratum in: Biometals** 19(4):451

Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A (1989) *Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* **Mol Gen Genet** 219(1-2):161-7

Kasai, M., Sasaki, M., Yamamoto, Y. and Matsumoto, H (1992) *Aluminum stress increases K^+ efflux and activities of ATP- and PPI-dependent H^+ pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots.* **Plant Cell Physiol.** 33: 1035-1039

Kauss H (1987) *Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism.* **Annu Rev. Plant Physiol** 38: 47-72

Kawahara M (2005) *Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases.* **J Alzheimers Dis** 8(2):171-82; discussion 209-15

Kawano T, Tanaka S, Kadono T, Muto S. (2004) *Salicylic acid glucoside acts as a slow inducer of oxidative burst in tobacco suspension culture.* **Z Naturforsch** 59(9-10):684-92

Kinraide T, Yerniyahu U, Rytwo G (1998) *Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes. Correspondence to published zeta potentials from diverse plant source.* **Plant Physiol** 118: 505-512

Kinraide TB, Ryan PR, Kochian LV (1992) *Interactive effects of Al^{+3} , H^+ , and others cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential.* **Plant Physiol** 99: 1461-1468

Kiss T (1995) *Interaction of aluminum with biomolecules – any relevance to Alzheimer's disease?* **Arch Geront Geriat** 21 (1): 99-112

Klatzo I, Wisniewski H, Streicher J (1965) *Experimental production of neurofibrillary degeneration — I. Light microscopic observations.* **J Neuropathol Exp Neurol** 24:187–198

Kochian LV (1995) *Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants.* **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol** 46: 237-260

Kochian LV, Hoekenga AO, Pineros MA (2004) *How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency.* **Annu Ver Plant Physiol Plant Mol Biol** 55: 459-493

Kopecka M, Fleet GH, Phaff HJ (1995) *Ultrastructure of the cell wall of Schizosaccharomyces pombe following treatment with various glucanases.* **J Struct Biol** 114(2):140-52. 140–152

Le Goff X, Utzig S, Simanis V (1999) *Controlling septation in fission yeast: finding the middle, and timing it right.* **Curr Genet** 35(6):571-84

Lee JY, Yoo BC, Lucas WJ (2000) *Parallels between nuclear-pore and plasmodesmal trafficking of information molecules.* **Planta** 210(2):177-87

- Li XF, Ma JF, Matsumoto, H (2000) *Pattern of Al-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. Plant Physiol* 123: 1537-1543
- Liao H, Wan H, Shaff J, Wang X, Yan X, Kochian LV (2006) *Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. Plant Physiol* 141(2):674-84
- Lichko LP, Okorokov LA (1985) *GAT family of ATPases does the vacuolar H⁺-ATPase belong to? FEBS Lett* 187: 349-53
- Liu J, Tang X, Wang H, Balasubramanian M (2000) *Bgs2p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in Schizosaccharomyces pombe. FEBS Lett* 28;478(1-2):105-8
- Liu J, Wang H, McCollum D, Balasubramanian MK (1999) *Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in Schizosaccharomyces pombe. Genetics* 153(3):1193-203
- Lucas WJ (1995) *Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. Curr Opin Cell Biol* 7(5):673-80
- Lucas WJ, Wolf S (1993) *Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. Trends Cell Biol* 3(9):308-15
- Ma JF, Hiradate S, Nomoto K, Iwashita T, Matsumoto H (1997) *Internal detoxification mechanism of Al in Hydrangea. Identification of Al form in the leaves. Plant Physiol* 113: 1033-1039
- Ma JF, Taketa S, Yang ZM (2000) *Al tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in Triticale. Plant Physiol* 122: 1-8
- MacDiarmid CW, Gardner RC (1996) *Al toxicity in yeast. A role for Mg? Plant Physiol* 112(3): 1727-1732
- MacDiarmid CW, Gardner RC (1998) *Overexpression of the Saccharomyces cerevisiae Magnesium Transport System Confers Resistance to Aluminum Ion. J Biol Chem* 273: 1727-1732
- Macdonald TL, Humphreys WG, Martin RB (1987) *Promotion of tubulin assembly by aluminum ion in vitro. Science* 236: 183-186
- Mahler RL, Halvorson AR, Koehler FE (1985) *Long-term acidification of farmland in northern Idaho and eastern Washington. Commu Soil Scien Plant Analysis* 16: 83-95
- Marienfeld S, Lehmann H, Stelzer R (1995) *Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (Avena sativa) roots. Plant Soil* 171: 167-173

- Martin-Cuadrado AB, Duenas E, Sipiczki M, Vazquez de Aldana CR, del Rey F (2003) *The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in Schizosaccharomyces pombe*. **J Cell Sci** 1;116 (Pt 9):1689-98
- Martinez-Estevez M, Racagni-Di Palma G, Munoz-Sanchez JA, Brito-Argaez L, Loyola-Vargas VM, Hernandez-Sotomayor SM (2003) *Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in Coffea arabica cells*. **J Plant Physiol** 160(11):1297-303
- Matsumoto H (1991) *Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium and the sequestration of aluminum in plant cells*. In **Plant-Soil Interactions at Low pH (Wright, R.J., Baligar, V.C., Murrmann, R.P., eds) Kluwer Acad Publi** 825-838
- Matsumoto H (2000) *Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants*. **Internat rev cytol – A survey of cell biology** 200: 1-46
- Matsumoto H, Senoo Y, Kasai M, Maeshima M (1996) *Response of the plant root to aluminum stress: Analysis of the inhibition of the root elongation and changes in membrane function*. **J Plant Res** 109: 99-105
- May HM, Nordstrom DK (1991) *Assessing the solubilities and reaction kinetics of aluminous minerals in soils*. In: **Ulrich B, Sumner ME. eds. Soil Acidity. Berlin: Springer Verlag** 125–148
- McCollum D, Gould KL (2001) *Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN*. **Trends Cell Biol** 11(2):89-95
- Mezitt LA, Lucas WJ (1996) *Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids*. **Plant Mol Biol** 32(1-2):251-73
- Milla MA, Butler E, Huete AR, Wilson CF, Anderson O, Gustafson JP (2002) *Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye*. **Plant Physiol** 130(4):1706-16
- Miu AC, Benga O (2006) *Aluminum and Alzheimer's disease: a new look*. **J Alzheimers Dis** 10(2-3):179-201
- Morsomme P, Boutry M (2000) *The plant plasma membrane H(+)-ATPase: structure, function and regulation*. **Biochim Biophys Acta** 1;1465(1-2):1-16
- Mossor-Pietraszewska, T (2001) *Effect of aluminum on plant growth and metabolism*. **Acta Biochim Pol** 48(3): 673-86
- Nelson N (1989) *Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H⁺-ATPases*. **J Bioenerg Biomemb** 21 (5): 553-71
- Nichol BE, Oliveira LA, Glass A, Siddiqi MY (1993) *The Effects of Aluminum on the Influx of Calcium, Potassium, Ammonium, Nitrate, and Phosphate in an Aluminum-Sensitive Cultivar of Barley (Hordeum vulgare L.)*. **Plant Physiol** 101(4):1263-1266

- Nurse P (1994a) *Fission yeast morphogenesis –posing problems*. **Molecular Biol The Cell** 5(6): 613-616
- Nurse P (1994b) *Ordering phase S and M phase in the cell cycle*. **Cell** 79 (4): 547-550
- Okorokova-Facanha AL, Okorokov LA, Ekwall K (2003) *An inventory of the P-type ATPases in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. **Curr Genet.** 43(4):273-80
- Ono K, Yamamoto Y, Hachiya A, Matsumoto H (1995) *Synergistic inhibition of growth by Al and iron of tobacco (Nicotiana tabacum L.) cells in suspension culture*. **Plant Cell Physiol** 36: 115-125
- Osumi M, Sato M, Ishijima AS et al. (1998) *Dynamics of cell wall formation in fission yeast, Schizosaccharomyces pombe*. **Fungal Gen Biol** 24 (1-2) 178-206
- Oteiza PI (1994). *A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation*. **Arch Biochem Biophys** 308: 374-379
- Pedersen PL, Carafoli E (1987) *Íon motive ATPase. I – Ubiquity, properties, and significance to cell function* **TIBS** 12: 146-150
- Pelham RJ, Chang F (2002) *Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast*. **Nature** 5;419(6902):82-6
- Perez P, Ribas JC (2004) *Cell wall analysis*. **Methods** 33(3):245-51
- Peters WS, Felle HH (1999) *The Correlation of Profiles of Surface pH and Elongation Growth in Maize Roots*. **Plant Physiol** 121(3):905-912
- Piñeros MA, Kochian LV (2001) *A patch clamp study on the physiology of aluminum toxicity and tolerance in Zea mays: Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channel*. **Plant Physiol** 125: 292-305
- Rajagopalan S, Liling Z, Liu J, Balasubramanian M (2004) *The N-degron approach to create temperature-sensitive mutants in Schizosaccharomyces pombe*. **Methods** 33(3): 206-212
- Rangel, LC (2005) *O efeito do alumínio na morfologia e citocinese, utilizando a levedura de fissão Schizosaccharomyces pombe como modelo*. **Dissertação de Monografia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ.**
- Rayle DL, Cleland RE (1992) *The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well*. **Plant Physiol** 99(4):1271-4
- Rayle DL, Cleland RE. (1992) *The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well*. **Plant Physiol** 99(4):1271-4

- Rengel Z, Elliott DC (1992) Mechanism of Aluminum Inhibition of Net Ca Uptake by *Amaranthus* Protoplasts. **Plant Physiol** 98(2):632-638
- Ryan PR, Delhaize E, Randall PJ (1995a) *Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat.* **Aust J Plant Physiol** 22: 531-536
- Ryan PR, DiTomaso JM, Kochian LV (1993) *Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap.* **J Experimental Botany** 44:437-446
- Saiz JE, Fisher RP (2002) *A CDK-activating kinase network is required in cell cycle control and transcription in fission yeast.* **Curr Biol** 12(13):1100-1105
- Sasaki, M., Yamamoto, Y. and Matsumoto, H (1996) *Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots.* **Physiol Plant** 96: 193-198
- Savory J, Exley C, Forbes WF, Huang Y, Joshi JG, Kruck T, McLachlan DR, Wakayama I (1996) *Can the controversy of the role of aluminum in Alzheimer's disease be resolved? What are the suggested approaches to this controversy and methodological issues to be considered?* **J Toxic Environ Health** 48 (6): 615-635
- Savory J, Herman MM, Ghribi O (2003) *Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain.* **J Inorg Biochem** 97: 151-154
- Schott EJ, Gardner RC (1997) *Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.* **Mol Gen Genet** 18;254(1):63-72
- Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Gultinan MJ, McQueen-Mason SJ, Shie M, Cosgrove DJ (1995). *Molecular cloning and sequence analysis of expansins, a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants.* **Proc Natl Acad Sci USA** 92, 9245-9249
- Shen H, He LF, Sasaki T, Yamamoto Y, Zheng SJ, Ligaba A, Yan XL, Ahn SJ, Yamaguchi M, Sasakawa H, Matsumoto H (2005) *Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase.* **Plant Physiol** 138(1):287-96
- Shimoda C; Yanagishima, N (1971) *Role of cell wall-degrading Enzymes in auxin-induced cell expansion in yeast.* **Physiol Plantarum** 24 (1): 46-50
- Siegel N, Haug A (1983) *Aluminum interaction with calmodulin. Evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies.* **Physiol Plant** 59: 285-291
- Simanis V (1995) *The control of septum formation and cytokinesis in fission yeast.* **Semin Cell Biol** 6(2):79-87

- Sipiczki M (1995) *Phylogenesis of fission yeast – contradictions surrounding the origin of a century old genus*. **Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol** 68: 119-149
- Sivaguru M, Ezaki B, He ZH, Tong H, Osawa H, Baluska F, Volkmann D, Matsumoto H (2003) *Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis*. **Plant Physiol** 132(4):2256-66
- Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Baluska F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T, Skou JC (1957). *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves* **Biochim Biophys Acta** 23: 394–401
- Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Baluska F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto H (2000) *Aluminum-Induced 1,3- β -D-Glucan Inhibits Cell-to-Cell Trafficking of Molecules through Plasmodesmata. A New Mechanism of Aluminum Toxicity in Plants*. **Plant Physiol** 124: 991-1006
- Spanswick RM, Bennett AB (1984) *Electrogenic ion transport in higher plants*. **Soc Gen Physiol Ser** 38:331-44
- Strong MJ, Garruto RM, Joshi JG, Mundy WR, Shafer T (1996) *Can the mechanisms of aluminum neurotoxicity be integrated into a unified scheme?* **J Toxicol Environ Health** 48:599–613
- Strong MJ, Wolff AV, Wakayama I, Garruto RM (1992) *Aluminum-induced myelopathy in rabbits*. **Neurotoxicology** 12:9–22
- Sunnerhagen P (2002) *Prospects for functional genomics in Schizosacharomyces pombe*. **Curr Gen** 42:73-84
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Kisielewski Y, Jankowska A, Madziar B, Tomaszewicz M (1998) *Effects of aluminum and calcium on acetyl-CoA metabolism in rat brain mitochondria*. **J Neurochem** 71(6):2447-53
- Tabuchi A, Matsumoto H (2001) *Changes of cell wall properties of wheat (Triticum aestivum) roots during aluminium-induced growth inhibition*. **Physiol Plant** 112(3):353-358
- Tang C, Rengel Z (2003) *Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification*. In: **Rengel Z, ed. Handbook of soil acidity**. NY, USA: Marcel Dkker 57-81
- Tanimoto E, Fujii S, Yamamoto R, Inanaga S (2000) *Measurement of viscoelastic properties of root cell walls affected by low pH in lateral roots of Pisum sativum L*. **Plant Soil** 226: 21–28
- Taylor DP, Slattery J, Leopold AC (1996) *Apoplastic pH in corn root gravitropism: a laser scanning confocal microscopy measurement*. **Physiol Plant** 97(1):35-8

- Taylor GJ, McDonald-Stephens JL, Hunter DB, Bertsch PM, Elmore D, Rengel Z, Reid RJ (2000) *Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of Chara corallinae*. **Plant Physiol** 123(3):987-96
- Vazquez MD, Poschenrieder C, Corrales I I, Barcelo J (1999) *Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety* **Plant Physiol** 119(2):435-44
- Verde F, Mata J, Nurse P (1995) *Fission yeast morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle*. **J Cell Biol** 131: 1529-1538
- Volkman D, Matsumoto H (2000) *Aluminum-induced 1,3- β -glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata*. **Plant Physiol** 124: 991-1006
- Wood V, *et al* (2002) *The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe*. **Nature** 415: 871-881
- Wood V, Rutherford KM, Ivens A, Rajandream M-A, Barrell BA (2002) *A re-annotation of the Saccharomyces cerevisiae genome*. **Comp Funct Gen** 2:143-154
- Wu Y, Cosgrove DJ (2000) *Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins*. **J Exp Bot** 51(350):1543-53
- Wyatt SE, Carpita NC (1993) *The plant cytoskeleton-cell-wall continuum*. Trends Cell Biol 3(12):413-7. **Erratum in: Trends Cell Biol** 4(1):71
- Xie CX, Yokel RA (1996) *Aluminum facilitation of iron-mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminum and iron concentrations*. **Arch Biochem Biophys** 327: 222-226
- Yamamoto Y, Hachiya A, Matsumoto H (1997) *Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells*. **Plant Cell Physiol** 38: 1333-1339
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H (2001) *Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but is not the primary cause of elongation inhibition in pea roots*. **Plant Physiol** 125: 199-208
- Yang ZM, Sivaguru M, Horst WJ, Matsumoto H (2000) *Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (Glycine max)*. **Physiol Plant** 110: 72-77
- Yokel RA (2000) *The toxicology of aluminum in the brain: a review*. **Neurotoxicol** 21(5): 813-28
- Yokel RA (2000) *The toxicology of aluminum in the brain: a review*. **Neurotoxicol** 21:813–28

Zhang G, Hodginott J, Taylor GJ (1994) *Characterization of 1,3- β -D-glucan (callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminum toxicity.* **J Plant Physiol** 144: 229-234

Zhang W-H, Rengel Z (1999) *Aluminum induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells.* **Australian J Plant Physiol** 26:401-409

Zheng K, Pan JW, Ye L, Fu Y, Peng HZ, Wan BY, Gu Q, Bian HW, Han N, Wang JH, Kang B, Pan JH, Shao HH, Wang WZ, Zhu MY (2007) *Programmed cell death involved in aluminum toxicity in yeast is alleviated by antiapoptotic members with decreased calcium signals.* **Plant Physiol** 143(1):38-49

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)